



СИНТЕЗ И ОЦЕНКА БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АНТАГОНИСТА РЕЦЕПТОРА ГАЛАНИНА GalR2 ПРИ ИШЕМИИ И РЕПЕРФУЗИИ СЕРДЦА КРЫС *in vivo*

© 2022 г. М. В. Сидорова*, #, М. Е. Палькеева*, Д. В. Авдеев*, И. М. Студнева*, Л. И. Серебрякова*, О. М. Веселова*, И. В. Доброхотов*, А. С. Молокоедов*, О. И. Писаренко*

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России, Россия, 121552 Москва, 3-я Черепковская ул., 15а

Поступила в редакцию 11.03.2022 г.

После доработки 19.03.2022 г.

Принята к публикации 22.03.2022 г.

На модели региональной ишемии и реперфузии сердца крысы *in vivo* изучено дозозависимое действие антагониста рецептора галанина GalR2, синтетического пептида M871 (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Glu-His-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH₂) и фармакологического агониста G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH) на размеры инфаркта миокарда (ИМ) и активность креатинкиназы-МВ (КК-МВ) в плазме крови. Пептиды синтезировали твердофазным методом с применением Fmoc-методологии и очищали с помощью ВЭЖХ. Они имели корректную молекулярную массу и чистоту 97–98%. Блокада рецепторов GalR2 внутривенным введением M871 в дозе 3, 6 и 8 мг/кг перед началом реперфузии не влияла на размеры ИМ и активность КК-МВ по сравнению с контролем. Внутривенное введение агониста G в дозе 1 мг/кг в начале реперфузии достоверно снижало ИМ и активность КК-МВ в плазме на 38 и 40% соответственно по сравнению с контролем. Препараты M871 и G не оказывали существенного влияния на гемодинамические показатели сердца. Предварительное внутривенное введение возрастающих доз препарата M871 перед введением агониста G приводило к постепенному увеличению размеров ИМ и активности КК-МВ. Использование соединения M871 в дозе 6 или 8 мг/кг полностью отменяло кардиопротекторные эффекты агониста G. Полученные результаты свидетельствуют об участии рецептора GalR2 в механизмах защитного действия химерного агониста G на сердце, подвергнутое ишемии и реперфузии, и указывают на перспективность разработки лекарственных препаратов для терапии сердечно-сосудистых заболеваний на основе молекулярного конструирования пептидных агонистов рецептора GalR2.

Ключевые слова: рецептор GalR2, N-концевые фрагменты галанина, пептиды, твердофазный синтез, ишемия и реперфузия сердца, инфаркт миокарда, повреждение кардиомиоцитов

DOI: 10.31857/S0132342322050220

ВВЕДЕНИЕ

Создание лекарственных средств на основе биоактивных пептидов значительно ускорилось в

сокращения: Boc – трет-бутилоксикарбонил; Bu^t – трет-бутил; DCM – дихлорметан; DMF – N,N-диметилформамид; DMSO – диметилсульфоксид; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; GalR – рецептор галанина; MALDI-TOF – времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-ассоциированной лазерной десорбцией/ионизацией; 4-MePip – 4-метилпиперидин; NMM – N-метилморфолин; TIS – триизопропилсилан; TBTU – N,N,N,N'-тетраметил-O-(бензотриазол-1-ил)урония тетрафторборат; TFA – трифторуксусная кислота; Trt – тритил; АФК – активные формы кислорода; ЗР – зона риска; ИМ – инфаркт миокарда; И/Р – ишемия/реперфузия; КК-МВ – креатинкиназа МВ; ЛЖ – левый желудочек; САД – систолическое артериальное давление; ЧСС – частота сердечных сокращений.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 414-67-16; эл. почта: peptide-cardio@yandex.ru).

последние годы благодаря исследованиям генома, расширившим выбор клеточных мишеней, и успехам комбинаторной химии и твердофазного синтеза пептидов с помощью Fmoc-методологии. В частности, большое внимание уделяется использованию галанина и лигандов его рецепторов для разработки препаратов, корректирующих нарушения метаболизма при ожирении, диабете и нейродегенеративных заболеваниях мозга [1]. Нейропептид галанин, состоящий из 29 а.о. у большинства видов животных и 30 а.о. у человека, широко распространен в центральной и периферической нервной системе, а также в других тканях и органах. В периферических органах, включая сердце, галанин действует не только через нейрональные механизмы, но и активируя трансмембранные рецепторы GalR1–3. За связывание с рецепторами отвечает N-концевой фрагмент

пептида, первые 15 а.о. которого консервативно сохраняются у большинства видов млекопитающих. С-концевой фрагмент (17–29) варьирует у животных и человека и имеет слабую аффинность по отношению к рецепторам [2].

Влияние рецепторов галанина на регуляцию метаболизма и функции сердца при экспериментальной патологии изучено недостаточно полно. Однако исследования последних лет показали, что экзогенные *N*-концевые фрагменты галанина (2–11) и (2–15), обладающие высоким сродством к рецептору GalR2, оказывают защитное действие на кардиомиоциты при ишемическом и реперфузионном (И/Р) повреждении. Это защитное действие приводит к снижению образования супероксидных радикалов в митохондриях и запуску сигнальных каскадов, уменьшающих гибель клеток от апоптоза и некроза и улучшающих энергетическое состояние миокарда (возможные механизмы обсуждены в работах Timotin et al. [3] и Pisarenko et al. [4]). Впоследствии был синтезирован ряд оригинальных модифицированных аналогов фрагментов галанина (2–11) и (2–15) с сохранением фармакофорных остатков, ответственных за связывание с рецептором GalR2. Изучение этих пептидов на моделях И/Р повреждения сердца и доксорубин-индуцируемой кардиомиопатии продемонстрировало их способность снижать гибель клеток, улучшать метаболическое и антиоксидантное состояние миокарда и уменьшать повреждение мембран кардиомиоцитов [5–7].

Наиболее эффективным оказалось соединение, представляющее собой химерный агонист G – последовательность галанина (2–13), дополненная природным дипептидом карнозином (β Ala-His), H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro- β Ala-His-OH [6]. Существенно, что действие полноразмерного галанина, связывающегося со всеми тремя подтипами рецепторов GalR1–3, эффективно воспроизводилось модифицированным *N*-концевым фрагментом галанина G или его природным аналогом (2–15), обладающими высокой аффинностью к рецептору GalR2 [7]. Эти данные предполагают участие рецептора GalR2 в кардиопротекторном действии этих лигандов. В то же время рецептор-зависимые механизмы действия *N*-концевых фрагментов галанина при экспериментальной патологии сердца остаются невыясненными.

Цель данной работы состояла в выяснении роли активации рецепторов GalR2 в уменьшении повреждения сердца, происходящего под действием пептида G, при ишемии и реперфузии *in vivo*. Для этого мы использовали новый химерный пептидный антагонист рецепторов галанина GalR2 M871.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез пептидов G и M871. Пептиды G и M871 получали автоматическим твердофазным синтезом с применением Fmoc-методологии. Синтез пептида G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro- β Ala-His-OH) был описан нами ранее [5, 6]. При получении пептида M871 (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Glu-His-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH₂) [8] в сочетании с N ^{α} -Fmoc-защитной группой для блокирования функциональных групп боковых цепей аминокислот были использованы кислотолabile защитные группы: Boc – для индольного кольца Trp, Bu^t – для гидроксильных функций Thr, Ser, Tyr и γ -карбоксильной функции Glu, Trt – для карбоксамидной функции Asn и имидазольного кольца His. Для создания амидных связей применяли метод с использованием урониевых солей (TBTU/NMM). По окончании синтеза пептид удаляли с полимерного носителя с одновременным деблокированием функциональных групп аминокислот действием TFA со скэвенджерами. После очистки методом ВЭЖХ пептид M871 имел корректную молекулярную массу (рис. 1). Характеристики пептидов G и M871 представлены в табл. 1.

Влияние пептидов G и M871 на размеры инфаркта миокарда и повреждение мембран кардиомиоцитов. Влияние блокады рецепторов GalR2 с помощью высокоаффинного антагониста M871 на кардиопротекторное действие химерного агониста рецепторов галанина G было изучено на модели региональной ишемии и реперфузии сердца крысы *in vivo*. Данная модель была использована нами ранее для оценки действия полноразмерного галанина и его *N*-концевых фрагментов [3, 4, 6].

Антагонист M871 связывается с рецепторами галанина GalR2 с более чем 30-кратной селективностью по сравнению с GalR1, оказывая мощное антагонистическое действие на рецептор GalR2. В дополнение пептид такой последовательности блокирует агонистические свойства галанина в экспериментах *in vitro* на клеточной линии, полученной из яичников китайского хомячка (CHO). Аффинность M871 в отношении подтипа рецепторов GalR3 не изучена. Однако известно, что GalR3 в основном экспрессируется в периферической нервной системе, а GalR2 – в центральных и периферических органах и тканях [9, 10]. Такие различия в распределении рецепторов обосновывают возможность использования пептида M871 в исследованиях на сердце.

В исходном состоянии среднее систолическое артериальное давление (САД) было практически одинаковым во всех экспериментальных группах (см. “Эксп. часть”) и составляло 85 ± 2 мм рт. ст., частота сердечных сокращений (ЧСС) – 330 ± 5 мин⁻¹. Внутривенное введение физиологического рас-

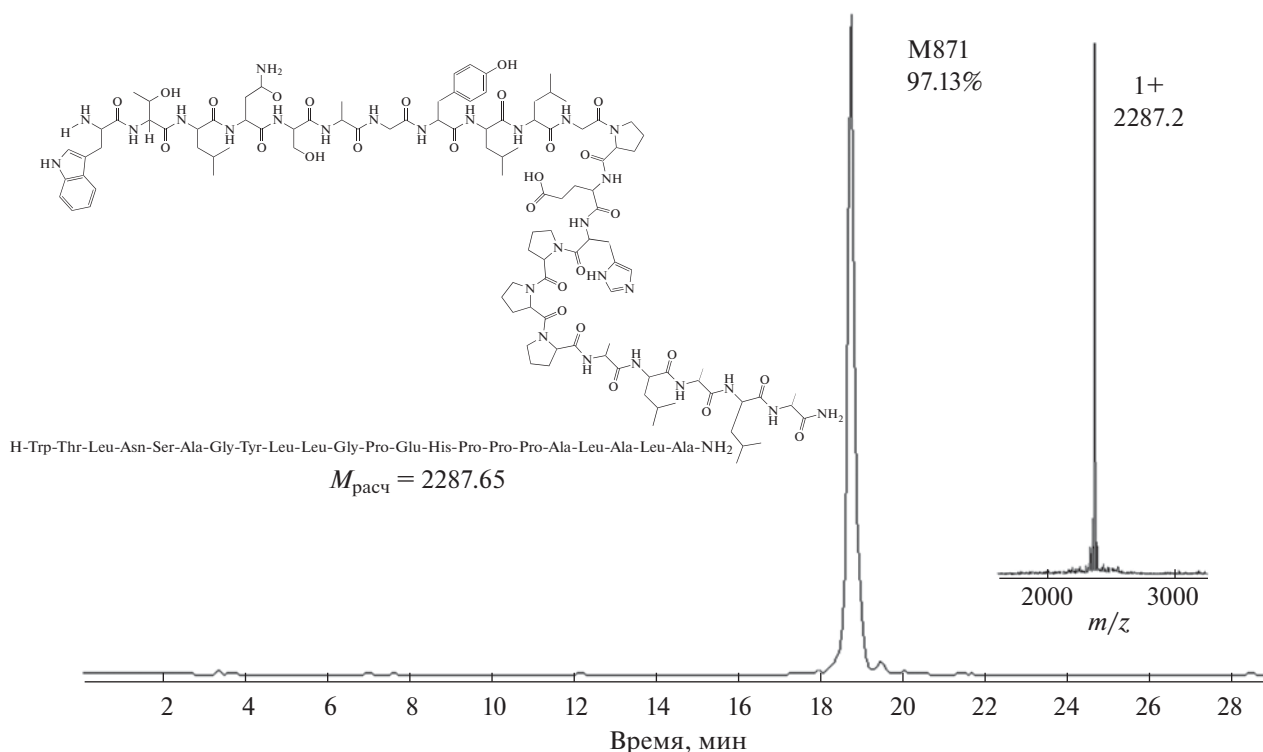


Рис. 1. Химическая структура, аналитическая ВЭЖХ и масс-спектр MALDI-TOF пептида M871.

творя в контроле или растворителя (0.5%-ного DMSO в физиологическом растворе, который применяли для растворения антагониста M871) в период региональной ишемии не приводило к изменению САД и ЧСС при реперфузии. Введение пептида G в дозе 1.0 мг/кг веса вызывало незначительное снижение САД и ЧСС на первых минутах реперфузии, которое сменялось практически полным восстановлением этих параметров к окончанию реперфузии. Введение антагониста M871 в дозе 3, 6 или 8 мг/кг за 5 мин до окончания реперфузии не оказывало достоверного влияния на САД и ЧСС в ходе эксперимента.

Гистохимический анализ срезов левого желудочка (ЛЖ) после реперфузии не выявил достоверных различий в размерах зоны риска (ЗР/ЛЖ) между контрольной группой, группой растворителя (0.5%-ный DMSO) и группами пептида M871, использовавшегося в дозе 3, 6 и 8 мг/кг (табл. 2). Это означает, что И/Р повреждение было смоделировано одинаково у животных всех групп. В контроле величина инфаркта миокарда (ИМ), выраженная отношением ИМ/ЗР, составила $(45.8 \pm 2.0)\%$. Внутривенное введение 0.5%-ного DMSO после периода региональной ишемии не оказывало достоверного влияния на этот

Таблица 1. Характеристики пептидов G и M871

Пептид	Последовательность	Молекулярная масса, г/моль	Выход*, %	Растворимость в воде, мг/мл	ВЭЖХ		MALDI-TOF, m/z
					R _t , мин	чистота, %	
G	H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH	1499.67	46.3	>20	14.66	98.20	1499.76 [M + H] ⁺ , 1521.73 [M + Na] ⁺ , 1537.72 [M + K] ⁺
M871	H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Glu-His-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH ₂	2287.61	33.2	~10	18.63	97.13	2287.20 [M + H] ⁺

* Выход в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимерному носителю.

Таблица 2. Влияние введения пептидов G и M871 на размеры зоны риска, инфаркта миокарда и активность КК-МВ в плазме крови крыс

Группа	ЗР/ЛЖ, %	ИМ/ЗР, %	КК-МВ, ед./л
Исходное состояние	—	—	172.4 ± 16.2
Контроль	41.0 ± 3.1	45.8 ± 2.0	1732.8 ± 216.0 [#]
DMSO	39.7 ± 3.1	39.5 ± 4.0	1703.9 ± 239.2 [#]
G	40.1 ± 3.0	28.4 ± 2.1 [*]	1023.5 ± 106.3 ^{#, *}
M871-3	39.4 ± 4.5	45.1 ± 2.7	1822.4 ± 116.5 ^{#, +}
M871-6	41.0 ± 4.8	45.6 ± 2.2	1789.8 ± 197.1 ^{#, +}
M871-8	42.3 ± 2.7	46.8 ± 2.3	1910.3 ± 188.4 ^{#, +}

Примечание: данные представлены как $M \pm m$ для серий из пяти опытов. Отмечены достоверные отличия ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (*), исходным состоянием ([#]) и пептидом G (⁺).

показатель. В соответствии с ранее полученными результатами [6], размер ИМ достоверно снижался на 38% (по сравнению с контрольной группой, $p < 0.001$) под действием агониста рецептора GalR2 – пептида G. Введение изученных доз антагониста M871 (3, 6 и 8 мг/кг) за 5 мин до начала реперфузии не влияло на ИМ по сравнению с контрольной группой.

Развитие ИМ в контрольной группе сопровождалось увеличением активности маркера некроза креатинкиназы МВ (КК-МВ) в плазме крови в конце реперфузии на порядок по сравнению с исходным состоянием (табл. 2). Введение 0.5%-ного DMSO не влияло на активность КК-МВ по сравнению с контролем. Под действием пептида G активность КК-МВ к окончанию реперфузии снижалась на 40% по сравнению с контролем ($p = 0.019$). При введении антагониста M871 в дозе 3, 6 или 8 мг/кг этот показатель не отличался от значения в контроле и был достоверно выше, чем после введения пептида G. Полученные данные показывают, что блокада рецепторов GalR2 возрастающими дозами антагониста M871 перед началом реперфузии не увеличивала некротическое повреждение реперфузированного сердца. Это подтверждается величинами ИМ и активности маркера некроза КК-МВ, достоверно не отличающимися от этих показателей у животных контрольной группы.

На следующем этапе было изучено влияние совместного действия антагониста M871 и агониста G на показатели повреждения реперфузированного сердца. В этих опытах блокаду рецепторов GalR2 различными дозами антагониста M871 осуществляли за 5 мин до окончания окклюзии левой коронарной нисходящей артерии перед введением оптимальной дозы агониста G (1 мг/кг) в начале реперфузии. Результаты этих экспериментов суммированы на рис. 2. Предварительное введение возрастающих доз антагониста M871 перед введением агониста G приводило к постепенному увеличению размеров ИМ

(рис. 2а). Начиная с дозы антагониста M871 6 мг/кг, различия в ИМ/ЗР между группами совместного введения пептидов (M871-6 + G и M871-8 + G) и группой введения агониста G становились достоверными ($p < 0.001$), а величина ИМ у животных этих групп не отличалась от контрольной группы. Увеличение ИМ при совместном введении пептидов M871 и G сопровождалось возрастанием активности КК-МВ в плазме крови крыс (рис. 2б). В группах животных, которые получали оба пептида M871-6 + G и M871-8 + G, активность КК-МВ в плазме достоверно не отличалась от значения этого показателя в контрольной группе, а в группе, подвергнутой воздействию пептидов M871-8 + G, была достоверно выше ($p = 0.007$), чем в группе агониста G.

Приведенные результаты показывают, что использованные дозы пептида M871 не оказывали дополнительного повреждающего действия на сердце при реперфузии. Однако введение пептида M871 перед использованием фармакологического агониста G заметно снижало или полностью отменяло, как в случае высоких доз 6 и 8 мг/кг, кардиопротекторное действие последнего. Это свидетельствует об участии рецепторов GalR2 в механизмах защитного действия химерного лиганда G на ишемизированный миокард.

Роль активации рецепторов GalR2 в кардиопротекторном действии пептида G. Для изучения механизмов действия фармакологического агониста рецепторов галанина пептида G на сердце крыс *in vivo* был впервые использован химерный пептидный антагонист рецепторов GalR2 M871. Дозозависимое влияние антагониста M871 при использовании оптимальной дозы агониста G оценивали по изменениям размеров ИМ и активности маркера некроза МВ-КК в плазме крови крыс при региональной ишемии миокарда и реперфузии. Ранее на этой модели была показана возможность эффективного снижения некротического повреждения миокардиальной ткани и улучшения метаболизма реперфузированного

сердца под действием природных и модифицированных *N*-концевых фрагментов галанина, обладающих высокой аффинностью к рецепторам GalR2, при их внутривенном введении в начальной стадии реперфузии [6]. Однако действие этих агонистов не было изучено в условиях предварительной блокады рецепторов GalR2. Результаты данной работы показывают, что фармакологическое посткондиционирование пептидом G обладает выраженным GalR2-зависимым терапевтическим потенциалом, способным уменьшать размеры пораженного участка миокарда при остром ИМ.

Активация пептидами галанина различных путей передачи сигнала при связывании с рецептором GalR2 обсуждена нами в работе Писаренко с соавт. [11]. Сопряжение GalR2 с G-белками различных типов (Gi/o, Gq/11 и G12/13) [12] стимулирует захват и окисление глюкозы кардиомиоцитами [13, 14], ингибирует проапоптотические белки BAX/BAX и снижает активности каспазы-3 и каспазы-9 [1, 15], блокирует открытие митохондриальных пор временной проницаемости (mPTP) и, таким образом, способствует выживанию и подвижности клеток [16]. Наряду с этим пептидные агонисты галанина способны усиливать механизмы антиоксидантной защиты при И/Р повреждении сердца. На это указывают снижение продукции АФК, уменьшение образования продуктов перекисного окисления липидов и увеличение активности супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы в реперфузированном миокарде [7]. Эти эффекты могут быть вызваны как усилением экспрессии генов, кодирующих антиоксидантные ферменты [17], так и прямым перехватом АФК и ингибированием перекисного окисления липидов [18]. Результат посткондиционирования сердца пептидом G – повышение эффективности метаболических путей образования АТФ, поддержка ионного гомеостаза и улучшение антиоксидантного состояния кардиомиоцитов при реперфузии. Важно, что действие полноразмерного галанина, связывающегося со всеми подтипами рецепторов GalR1–3, воспроизводится его *N*-концевыми фрагментами, обладающими аффинностью к рецептору GalR2. Это относится как к природным фрагментам (2–11) и (2–15), так и к их модифицированным аналогам, среди которых высокую эффективность на всех использованных моделях обнаружил синтетический химерный агонист G. Эти данные указывают на принципиальную роль активации рецепторов GalR2 в кардиопротекторном действии пептидных агонистов рецепторов галанина, которая была подтверждена при совместном использовании антагониста M871 и фармакологического лиганда G.

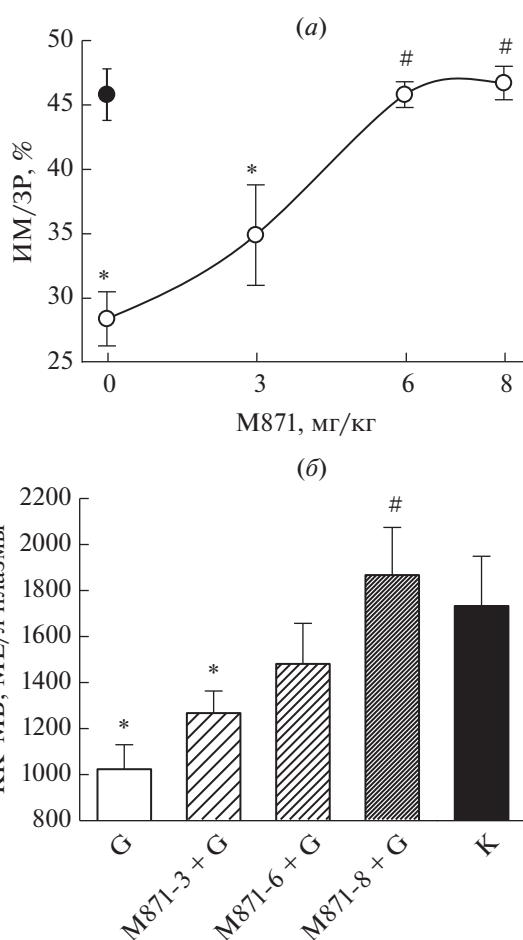


Рис. 2. Влияние блокады рецепторов GalR2 антагонистом M871 на снижение повреждения сердца при ишемии и реперфузии, вызванное введением фармакологического агониста рецепторов галанина G. (a) – Дозозависимое влияние антагониста M871 на изменение размеров инфаркта миокарда (ИМ/ЗР, %), вызванное введением агониста G в начале реперфузии. 0 – введение пептида G в дозе 1 мг/кг без предварительного введения пептида M871; 3, 6 и 8 – введение антагониста M871 в дозе 3, 6 или 8 мг/кг с последующим введением пептида G (1 мг/кг). Данные представлены как $M \pm m$ для серий из пяти опытов. Отмечены достоверные отличия ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (*) и пептидом G (#). Черным цветом показан размер инфаркта миокарда в контроле; (b) – дозозависимое влияние антагониста M871 на изменение активности КК-МВ в плазме крови крыс в конце реперфузии, вызванное введением агониста G. G – введение агониста G в дозе 1 мг/кг без предварительного введения M871; M871-3 (M871-6, M871-8) + G – введение антагониста M871 в дозе 3, 6 или 8 мг/кг с последующим введением пептида G (1 мг/кг); K – контроль. Данные представлены как $M \pm m$ для серий из пяти опытов. Отмечены достоверные отличия ($p < 0.05$) по сравнению с контролем (*) и пептидом G (#).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез пептидов G и M871. В работе использованы производные L-аминокислот (Novabiochem, Германия); TBTU, TIS, NMM (Fluka,

Швейцария). Для синтеза применяли DMF, дихлорметан и TFA (Panreac, Испания). Препаративную ВЭЖХ проводили на хроматографе Well-Chrom (Knauer, Германия), аналитическую ВЭЖХ – на приборе Smartline (Knauer, Германия). Для ВЭЖХ использовали ацетонитрил (Panreac, Испания). Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Kromasil 100-5 C18 (4.6 × 250 мм), размер частиц сорбента 5 мкм; элюенты: буфер А – 0.05 М KH_2PO_4 (рН 3.0), буфер Б – 70%-ный ацетонитрил в буфере А, элюция со скоростью 1 мл/мин градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин, детекция при 220 нм. Препаративную ВЭЖХ проводили на колонке Eurosphere 100-10 C18 (20 × 250 мм), размер частиц сорбента 10 мкм. На первом этапе очистки пептида М871 в качестве элюентов использовали буфер А (0.05 М KH_2PO_4 , рН 3.0) и буфер Б (70%-ный ацетонитрил). Элюцию проводили от 90% буфера А градиентом буфера Б (0.5%/мин) со скоростью 10 мл/мин. После этого фракции, содержащие целевой продукт, собирали, ацетонитрил упаривали, остаток обессоливали на той же колонке с использованием в качестве буфера А 0.01%-ной TFA в тех же условиях. Детекцию пептидов осуществляли при 220 нм.

Синтез пептида G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH) описан ранее [5, 6].

Автоматический твердофазный синтез пептида М871 (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Glu-His-Pro-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH₂) проводили на синтезаторе Tribute-UV (Protein Technologies, Inc., США) в масштабе 0.125 ммоль в соответствии с программой однократной конденсации Fmoc-аминокислот, включавшей функцию спектрофотометрического контроля полноты отщепления Fmoc-защитных групп. Пептидную цепь наращивали с C-конца по одной аминокислоте на полимере Ринка, представляющем собой сополимер стирола с 1% дивинилбензола с 4-(2',4'-диметоксифенил-Fmoc-аминометил)-феноксиметильной якорной группой (Novabiochem, Германия) с содержанием аминокислот 0.33 ммоль/г. Цикл твердофазного синтеза включал следующие стадии: 1) деблокирование α-аминогрупп 25%-ным 4-MePip/DMF (2 × 2 мин); 2) 4 промывки DMF; 3) конденсация 0.4 М раствора 4-кратного избытка ацилирующего агента (0.5 ммоль Fmoc-аминокислоты + 0.5 ммоль TBTU + 1.0 ммоль NMM) в DMF в течение 1 ч; 4) 4 промывки DMF. Пептид отщепляли от полимерного носителя действием смеси TFA–вода–триизопропилсилан–дитиотреитол (85 : 5 : 5 : 5) в течение 1.5 ч. Полимер отфильтровывали, промывали на фильтре деблокирующей смесью, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим диэтиловым эфиром. Осадок отфильтровывали,

промывали эфиром, DCM, эфиром и высушивали. Получено 95 мг (33.2%) пептида М871, характеристики приведены в табл. 1.

Влияние пептидов М871 и G на размеры инфаркта миокарда и повреждение мембран кардиомиоцитов. Опыты проведены на самцах крыс Wistar (300–350 г, возраст 10 недель). Животные получены из филиала “Столбовая” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий” ФМБА России. В каждой экспериментальной группе было по пять животных.

Препарирование наркотизированных 20%-ным уретаном (1.2 г/кг веса, внутривенно) животных в условиях торакотомии осуществляли при искусственной вентиляции легких комнатным воздухом, как указано в работе Palkeeva et al. [6]. Регистрацию среднего артериального давления (САД) и частоты сокращений сердца (ЧСС) осуществляли на полиграфе Biograph-4 (Санкт-Петербургский государственный университет аэрокосмического приборостроения, Россия). Запись данных на компьютер в режиме online проводили с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (National Instruments, США) и программы в системе LabVIEW 7 (National Instruments, США). После 30-мин стабилизации гемодинамических показателей (исходное состояние) выполняли 40-мин окклюзию левой коронарной нисходящей артерии, продолжительность последующей реперфузии составляла 60 мин. Для определения активности маркера некроза креатинкиназы-MB (КК-MB) проводили отбор крови в гепаринизированные пробирки из венозного катетера в исходном состоянии и после 60-мин реперфузии. Проведены следующие серии опытов: Контроль – указанный выше протокол с внутривенным введением 0.5 мл физиологического раствора одновременно с началом реперфузии; G – тот же протокол с внутривенным введением оптимальной дозы химерного агониста пептида G (1.0 мг/кг болюсом [6]) в начале реперфузии; М871 – внутривенное введение антагониста GalR2 М871 болюсом в дозах 3, 6 или 8 мг/кг за 5 мин до начала реперфузии; М871 + G2 – внутривенное введение пептида М871 в дозах 3, 6 или 8 мг/кг за 5 мин до начала реперфузии с последующим внутривенным введением пептида G (1.0 мг/кг) одновременно с началом реперфузии; DMSO – внутривенное введение растворителя М871 (0.5%-ного раствора DMSO в физиологическом растворе) за 5 мин до начала реперфузии. Пептиды растворяли в DMSO, а затем до необходимой концентрации в физиологическом растворе непосредственно перед введением.

В конце опыта для гистохимической оценки размеров зоны риска (ЗР) и интактной области сердца использовали 2%-ный раствор Эванса и инкубацию срезов левого желудочка (ЛЖ) сердца

в 1%-ном растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида в 0.1 М калий фосфатном буфере (рН 7.4 при 37°C), как указано в работе Palkeeva et al. [6]. Площади инфаркта миокарда (ИМ) и ЗР в окрашенных срезах ЛЖ определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу ImageJ (NIH, США). В каждой группе рассчитывали отношения зона риска/вес левого желудочка (ЗР/ЛЖ) и инфаркт миокарда/зона риска (ИМ/ЗР), в процентах. Активность КК-МВ в плазме крови определяли на спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) при $\lambda = 340$ нм, используя наборы фирмы BioSystems (Испания).

Статистический анализ данных. Использован пакет программ SigmaPlot 11.2 (SysStat, США). Значения представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения ($M \pm m$). При сравнении нескольких групп с контролем использовали *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми отличия считали при $p < 0.05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия усилия многих лабораторий сосредоточены на исследовании молекулярных механизмов регуляции функций жизненно важных органов человека с помощью природных и синтетических пептидов. Результаты настоящей работы расширяют представление о галанинергической системе как перспективной мишени для фармакологического воздействия при функциональных и метаболических нарушениях сердца. Нами впервые использован высоко-селективный антагонист рецептора галанина GalR2 M871 для изучения действия фармакологического пептидного агониста G – модифицированного N-концевого фрагмента галанина (2–15) – при региональной ишемии и реперфузии сердца крыс *in vivo*. С его помощью показано, что блокада рецепторов GalR2 перед возобновлением коронарного кровотока отменяет полезные эффекты агониста G, увеличивая величину ИМ и повреждение мембран кардиомиоцитов в реперфузированном сердце. Эти данные указывают на физиологическое значение активации рецептора GalR2 в защите сердца от И/Р стресса и демонстрируют перспективность молекулярного конструирования агонистов рецептора GalR2 для разработки лекарственных пептидных препаратов для терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-015-0008-а, 18-015-0009-а) и Министер-

ства здравоохранения Российской Федерации (рег. № НИОКТР 121031700143-1).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования на животных проводили в соответствии с Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных, принятыми Международным советом медицинских научных обществ в Женеве в 1985 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lang R., Gundlach A.L., Kofler B. // Pharmacol. Ther. 2007. V. 115. P. 177–207. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.05.009>
2. Branchek T.A., Smith K.E., Gerald C., Walker M. // Trends Pharmacol. Sci. 2000. V. 21. P. 109–117. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01446-2](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01446-2)
3. Timotin A., Pisarenko O., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoedov A., Veselova O., Cinato M., Tronchere H., Boal F., Kunduzova O. // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 21241–21252. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15071>
4. Pisarenko O., Timotin A., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoedov A., Veselova O., Cinato M., Boal F., Tronchere H., Kunduzova O. // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 101659–101671. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21503>
5. Азьмуко А.А., Веселова О.М., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Палькеева М.Е., Писаренко О.И., Серебрякова Л.И., Сидорова М.В., Студнева И.М. // Патент RU2648846C1. Оpubл. 28.03.2018.
6. Palkeeva M., Studneva I., Molokoedov A., Serebryakova L., Veselova O., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. // Biomed. Pharmacother. 2019. V. 109. P. 1556–1562. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.09.182>
7. Писаренко О.И., Студнева И.М., Серебрякова Л.И., Тимошин А.А., Коновалова Г.Г., Ланкин В.З., Тихазе А.К., Веселова О.М., Доброхотов И.В., Любимов Р.О., Сидорова М.В., Палькеева М.Е., Молокоедов, А.С. // Биохимия. 2021. Т. 86. С. 584–594. [Pisarenko O.I., Studneva I.M., Serebryakova L.I., Timoshin A.A., Konvalova G.G., Lankin V.Z., Tikhaze A.K., Veselova O.M., Dobrokhotov I.V., Lubimov R.O., Sidorova M.V., Palkeeva M.E., Molokoedov A.S. // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. P. 496–505.] <https://doi.org/10.1134/S0006297921040106>
8. Sollenberg U.E., Lundstrom L., Bartfai T., Langel U. // Int. J. Peptide Res. Ther. 2006. V. 12. P. 115–119. <https://doi.org/10.1007/s10989-005-9008-x>
9. Wang S., He C., Hashemi T., Bayne M. // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. P. 31949–31952.

10. O'Donnell D., Ahmad S., Wahlestedt C., Walker P. // J. Comp. Neurol. 1999. V. 409. P. 469–481.
11. Писаренко О.И., Студнева И.М., Веселова О.М. // Биохимия. 2021. Т. 86. С. 1502–1512. [Pisarenko O.I., Studneva I.M., Veselova O.M. // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. P. 1342–1351.]
https://doi.org/10.1134/S000629792110014X
12. Webling K.E.B., Runesson J., Bartfai T., Langel Ü. // Front. Endocrinol. 2012. V. 3. P. 146.
https://doi.org/10.3389/fendo.2012.00146
13. Fang P., Shib M., Guo L., He B., Wang Q., Yu M., Bo P., Zhang Zh. // Peptides. 2014. V. 62. P. 159–163.
https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.10.001
14. Jay M.A., Ren J. // Curr. Diab. Rev. 2007. V. 3. P. 33–39.
https://doi.org/10.2174/157339907779802067
15. Krijnen P.A., Nijmeijer R., Meijer C.J., Visser C.A., Hack C.E., Niessen H.W. // J. Clin. Pathol. 2002. V. 55. P. 801–811.
https://doi.org/10.1136/jcp.55.11.801
16. Hausenloy D.J., Yellon D.M. // J. Clin. Invest. 2013. V. 123. P. 92–100.
https://doi.org/10.1172/JCI62874
17. Timotin A., Cinato M., Kramar S., Loy H., Merabishvili G., Boal F., Tronchere H., Kunduzova O. // 2019. Preprint at https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3424189
https://doi.org/10.2139/ssrn.3424189
18. Power O., Jakeman P., FitzGerald R.J. // Amino Acids. 2013. V. 44. P. 797–820.
https://doi.org/10.1007/s00726-012-1393-9

Synthesis of Galanine Receptor GalR2 Antagonist and Its Biological Activity in Ischemia and Reperfusion of Rat Heart *in vivo*

M. V. Sidorova*, #, M. E. Palkeeva*, D. V. Avdeev*, I. M. Studneva*, L. I. Serebryakova*, O. M. Veselova*, I. V. Dobrokhотов*, A. S. Molokoedov*, and O. I. Pisarenko*

Phone: +7 (495) 414-67-16; e-mail: peptide-cardio@yandex.ru

*National Medical Research Center of Cardiology, Ministry of Health Care, ul. 3-ya Cherepkovskaya 15A, Moscow, 121552 Russia

The dose-dependent effect of galanin receptor antagonist GalR2 M871 (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-Glu-His-Pro-Pro-Ala-Leu-Ala-Leu-Ala-NH₂) and pharmacological agonist G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla) on the size of myocardial infarction (MI) and creatine kinase-MB activity (CK-MB) in blood plasma was studied on a model of regional ischemia and reperfusion of rat heart *in vivo*. Peptides were synthesized by automatic solid-phase method using Fmoc methodology and purified using HPLC. They had the correct molecular weight and purity of 97–98%. Blockade of GalR2 receptors by intravenous (IV) administration of M871 at a dose of 3, 6, and 8 mg/kg before the start of reperfusion did not affect the size of MI and the activity of CK-MB compared with the control. Intravenous administration of G at a dose of 1 mg/kg at the beginning of reperfusion significantly reduced MI and CK-MB activity in plasma by 38 and 40%, respectively, compared with the control. M871 and G did not significantly affect the hemodynamic parameters of the heart. Preliminary intravenous administration of increasing doses of M871 before the introduction of G led to a gradual increase in the size of MI and the activity of CK-MB. Using of M871 at a dose of 6 or 8 mg/kg completely canceled the cardioprotective effects of G. Results indicate the participation of GalR2 receptors in the mechanisms of the protective action of the chimeric agonist G on the heart subjected to ischemia and reperfusion. They point to the prospects of developing drugs for the treatment of cardiovascular diseases based on the molecular design of peptide agonists of the GalR2 receptor.

Keywords: GalR2 receptor, N-terminal fragments of galanin, peptides, solid-phase synthesis, cardiac ischemia and reperfusion, myocardial infarction, cardiomyocyte damage