

УДК 615; 616-05

Механизмы защиты сердца синтетическим агонистом рецепторов галанина при повреждении хроническим введением доксорубицина

И. М. Студнева¹, О. М. Веселова¹, А. А. Бахтин², Г. Г. Коновалова¹, В. З. Ланкин¹,
О. И. Писаренко^{1*}

¹Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава России, Москва, 121552 Россия

²Научно-клинический центр оториноларингологии ФМБА России, Москва, 123182 Россия

*E-mail: olpi@live.ru

Поступила в редакцию 27.07.2019

Принята к печати 29.11.2019

DOI: 10.32607/actanaturae.10945

РЕФЕРАТ Применение противоопухолевого препарата доксорубицина (Докс) ограничено из-за его кардиотоксического действия. Изучено влияние нового синтетического агониста рецепторов галанина GalR1-3 [βAla14, His15]-галанин (2–15) (G) на метаболизм, активность антиоксидантных ферментов, окислительный стресс и функцию сердца у крыс с кардиомиопатией (КМП), вызванной хроническим введением Докс. Совместное введение пептида G и Докс статистически значимо увеличивало фракцию укорочения (ФУ) и фракцию выброса (ФВ) в среднем на $30 \pm 4\%$ по сравнению с этими показателями в группе Докс. Уменьшение дисфункции сердца под действием G сочеталось со снижением в 2.5 раза активности креатинкиназы-МВ (КК-МВ) в плазме крови. Защитное действие пептида G обусловлено снижением перекисного окисления липидов (ПОЛ) вследствие увеличения активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-SOD) и глутатионпероксидазы (GSH-Px) в поврежденном сердце. Введение пептида G статистически значимо увеличивало пул адениннуклеотидов (ΣАН), АТФ, фосфокреатина (ФКр) и общего креатина (ΣКр) в поврежденном миокарде, а также снижало накопление лактата по сравнению с этим показателем в группе Докс. Улучшение энергетического обеспечения кардиомиоцитов под действием пептида G предотвращало накопление цитотоксичного аммиака и нарушения обмена ключевых аминокислот сердца – глутаминовой (Глу) и аспарагиновой (Асп), а также аланина (Ала). Пептид G снижал морфологические изменения в сердце крыс, получавших Докс. Результаты указывают на перспективность использования пептида G для эффективной коррекции функциональных, морфологических и метаболических повреждений сердца при химиотерапии антрациклинами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антиоксидантные ферменты, галанин, доксорубицин, крыса, метаболизм миокарда.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 2ТБК – 2-тиобарбитуровая кислота; АЭЗ – аденилатный энергетический заряд; АФК – активные формы кислорода; Докс – доксорубицин; И/Р – ишемия/реперфузия; КК-МВ – креатинкиназа-МВ; КМП – кардиомиопатия; Кр – креатин; ЛЖ – левый желудочек; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ТБКАП – тиобарбитуратные кислотно-активные продукты; ФВ – фракция выброса; ФКр – фосфокреатин; ФУ – фракция укорочения; ЭхоКГ – эхокардиография; САТ – каталаза; Cu,Zn-SOD – Cu,Zn-супероксиддисмутазы; GSH-Px – глутатионпероксидаза; PPARs – рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом; ΣАН – пул адениннуклеотидов; ΣКр – общий креатин.

ВВЕДЕНИЕ

Снижение выработки энергии кардиомиоцитами, вызванное нарушением функций митохондрий или токсическим воздействием лекарственных препаратов, может приводить к хроническому повреждению ми-

окарда. Доксорубицин (Докс) – противоопухолевое средство антрациклинного ряда – способен вызывать развитие кардиомиопатии (КМП) и сердечной недостаточности, что ограничивает его использование в онкологической практике [1]. Кардиотоксичность,

иницируемая Докс, является многофакторным процессом, который приводит к гибели кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток [2]. Ключевые причины кардиотоксичности Докс – нарушения окислительного фосфорилирования и генерация активных форм кислорода (АФК), вызывающих перекисное окисление липидов (ПОЛ) [3]. Оптимизация режимов введения Докс и применение его липосомальных форм не устраняют высокую кардиотоксичность этого препарата [4]. В связи с этим актуальной остается разработка лекарственных средств, предотвращающих или ослабляющих повреждения сердца, вызванные Докс. Ранее нами было показано, что экзогенные N-концевые фрагменты галанина (2–11) и (2–15), связываясь с рецептором GalR2, оказывают защитное действие на кардиомиоциты при ишемическом и реперфузионном (И/Р) повреждении. Оно обусловлено снижением образования супероксидных радикалов в митохондриях и запуском сигнальных каскадов, приводящих к уменьшению гибели клеток от апоптоза и некроза [5, 6]. Впоследствии мы синтезировали ряд пептидных аналогов фрагментов галанина (2–11) и (2–15) с сохранением фармакофорных аминокислотных остатков, ответственных за связывание с рецептором GalR2. Тестирование этих пептидов на моделях И/Р повреждения сердца выявило их кардиотропные свойства [7]. Наиболее эффективной оказалась химерная молекула, представляющая последовательность галанина (2–13), дополненную природным дипептидом карнозином, H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH (G) [8]. Пептид G улучшал функцию сердца крыс, интегрированность мембран и энергетическое состояние кардиомиоцитов при хроническом повреждении миокарда Докс [9], что указывало на его влияние на метаболизм миокарда. Однако механизмы действия этого соединения остаются малоизученными. В связи с этим цель настоящей работы заключалась в исследовании действия пептида G на менее изученные мишени Докс – активность антиоксидантных ферментов и показатели азотистого и углеводного обмена в сердце крыс при кардиомиопатии, моделированной введением Докс. Кардиотоксическое действие Докс характеризовали изменениями активности креатинкиназы-МВ (КК-МВ) в крови, уровне окислительного стресса в сердце и плазме крови животных и морфологическим состоянием миокарда.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн эксперимента

Опыты выполнены на крысах-самцах линии Вистар весом 280–300 г, полученных из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для моделирования кардиомиопатии использовали хроническое введение Докс, описанное в работе [9]. Животные были разделены на четыре группы. Контрольная группа (К) – внутрибрюшинное введение физиологического раствора (1 мл/кг веса еженедельно в течение 8 недель); Докс (Д) – внутрибрюшинное введение Докс (1 мг/кг веса еженедельно в течение 8 недель); Докс + пептид G (Д + G) – внутрибрюшинное введение Докс (1 мг/кг веса еженедельно в течение 8 недель) и подкожное введение пептида G (50 нмоль/кг веса ежедневно в течение 8 недель); пептид G (G) – подкожное введение G (50 нмоль/кг веса ежедневно в течение 8 недель). Перед проведением исследования (исходное состояние) и после 8-недельного эксперимента животных взвешивали, в плазме крови определяли активность креатинкиназы-МВ (КК-МВ) и содержание тиобарбитуратных кислотно-активных продуктов (ТБКАП). Показатели функции сердца оценивали методом эхокардиографии (ЭхоКГ). По окончании 8-недельного эксперимента у наркотизированных животных каждой группы (уретан, 120 мг/кг) извлекали сердца для определения содержания метаболитов и ТБКАП, активности антиоксидантных ферментов и морфологического исследования.

Модифицированный N-концевой фрагмент галанина G

Пептид G (H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH, молекулярная масса 1499.7) получен путем ступенчатого твердофазного синтеза с использованием Fmoc-методологии [7]. Пептид G очищали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращенной фазе, его структура охарактеризована с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-масс-спектрометрии [8].

Трансторакальная ЭхоКГ

Применена высокочастотная ультразвуковая система Vevo 1100 Visual Sonic (FUJILM, Нидерланды) с линейным датчиком 13–24 МГц и максимальной глубиной лоцирования 30 мм. Исследование проводили у крыс под наркозом (Золетил 100, Virbac Sante Animale, Франция, 5 мг/кг) с использованием парастернального доступа по короткой и длинной осям. В В-режиме измеряли диастолические и систолические размеры левого желудочка (ЛЖ), на их основе рассчитывали параметры ЛЖ в диастоле и систоле, а также фракции выброса (ФВ) и укорочения (ФУ).

Определение содержания метаболитов в ткани сердца

Часть ткани сердец, замороженных в жидком азоте, гомогенизировали в холодной 6% HClO₄

(10 мл/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Германия). Белки осаждали центрифугированием (центрифуга Sorvall RT1, Thermo Fisher Scientific, США) при 2800g в течение 10 мин при 4°C. Супернатанты нейтрализовали 5 М K_2CO_3 до pH 7.4. Осадок $KClO_4$ отделяли центрифугированием в тех же условиях. Безбелковые экстракты хранили при -20°C до определения метаболитов. Сухой вес гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение суток при 110°C. Содержание адениннуклеотидов (АТР, АДР и АМР), фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр), глюкозы, лактата, глутаминовой и аспарагиновой кислот, аланина и аммиака в экстрактах определяли энзиматическими методами [10] с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800 (Япония).

Определение активности антиоксидантных ферментов и ТБКАП в сердце

Оставшуюся часть замороженной ткани сердец крыс гомогенизировали в 50 мМ Na-фосфатном буфере pH 7.4 (10 мл/г ткани) при помощи гомогенизатора Ultra-Turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Германия) и центрифугировали на центрифуге Sigma 3-16 KL (США) при 1000g и 4°C в течение 10 мин. Содержания ТБКАП определяли в гомогенатах, активность Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-SOD), каталазы (САТ) и глутатионпероксидазы (GSH-Px) – в супернатантах. Белок в супернатанте определяли по методу Лоури. Все измерения проводили на спектрофотометре Shimadzu 2600 (Япония). Содержание ТБКАП определяли в реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой (2ТБК) при $\lambda = 532$ нм [11]. Активность Cu,Zn-SOD определяли по подавлению скорости восстановления нитросинего тетразолия при генерации супероксидного анион-радикала в процессе окисления ксантина ксантинооксидазой при $\lambda = 560$ нм [12]. Активность САТ измеряли по скорости расходования пероксида водорода (H_2O_2) при 20°C в течение 1 мин, принимая коэффициент молярной экстинкции H_2O_2 равным 43.6 $M^{-1}cm^{-1}$ [13]. Активность GSH-Px определяли по скорости окисления NADPH в сопряженной глутатионредуктазной системе при $\lambda = 340$ нм. В качестве субстрата использовали H_2O_2 . Реакцию проводили в присутствии 3 мМ азида натрия для ингибирования САТ [14].

Оценка повреждения клеточных мембран и концентрации ТБКАП в плазме

Активность КК-МВ определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) при $\lambda = 340$ нм, используя наборы фирмы BioSystems. Концентрацию ТБКАП в плазме определяли по образованию окра-

шенного комплекса в реакции с 2ТБК, который экстрагировали из реакционной смеси бутанолом [15].

Морфологическое исследование

Сердца крыс каждой группы фиксировали в 10% растворе забуференного формалина (pH 7.4) в течение 24 ч. Из верхней части ЛЖ вырезали слайс толщиной 2 мм, перпендикулярный длиннику органа, содержащий свободную стенку ЛЖ. Затем образцы обрабатывали в спиртах возрастающей концентрации (70–100%), ксилоле и заливали в парафин. Далее формировали парафиновые блоки с последующим изготовлением срезов толщиной 5–7 мкм. После высушивания срезов в горизонтальном положении проводили обзорную окраску гематоксилином и эозином (ГЭ), а также окрашивание гематоксилин-основной фуксин-пикриновой кислотой (ГОФП) для выявления фуксинофильных кардиомиоцитов [16]. Использовали оптический микроскоп Leica DM2500 (Германия).

Статистическая обработка результатов

Использовали пакет программ SigmaPlot 11.2 (SysStat, США). Результаты представляли как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Различия между группами подтверждены статистически с применением дисперсионного анализа (ANOVA). При сравнении нескольких групп с контролем использовали *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми отличия считали при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние пептида G на кардиотоксичность и окислительный стресс

ЭхоКГ-исследование животных контрольной группы не выявило изменений в частоте сокращений сердца и показателях сократимости ЛЖ по сравнению с исходным состоянием спустя 8 недель наблюдения. При введении Докс у животных развивалась КМП – конечно-систолический размер (КСР) ЛЖ был увеличен, а фракция укорочения (ФУ) и фракция выброса (ФВ) были снижены до 67 и 69% соответственно (рис. 1А–В). Совместное введение Докс и пептида G статистически значимо уменьшало КСР ЛЖ и увеличивало ФУ и ФВ по сравнению с этими показателями в группе Д. Развитие КМП под действием Докс сопровождалось активацией ПОЛ и повреждением мембран кардиомиоцитов. После 8 недель исследования содержание ТБКАП в сердце и плазме крови крыс, получавших Докс, было выше, чем у животных контрольной группы (рис. 1Г, Д). Совместное введение пептида G и Докс значимо снижало этот показатель.

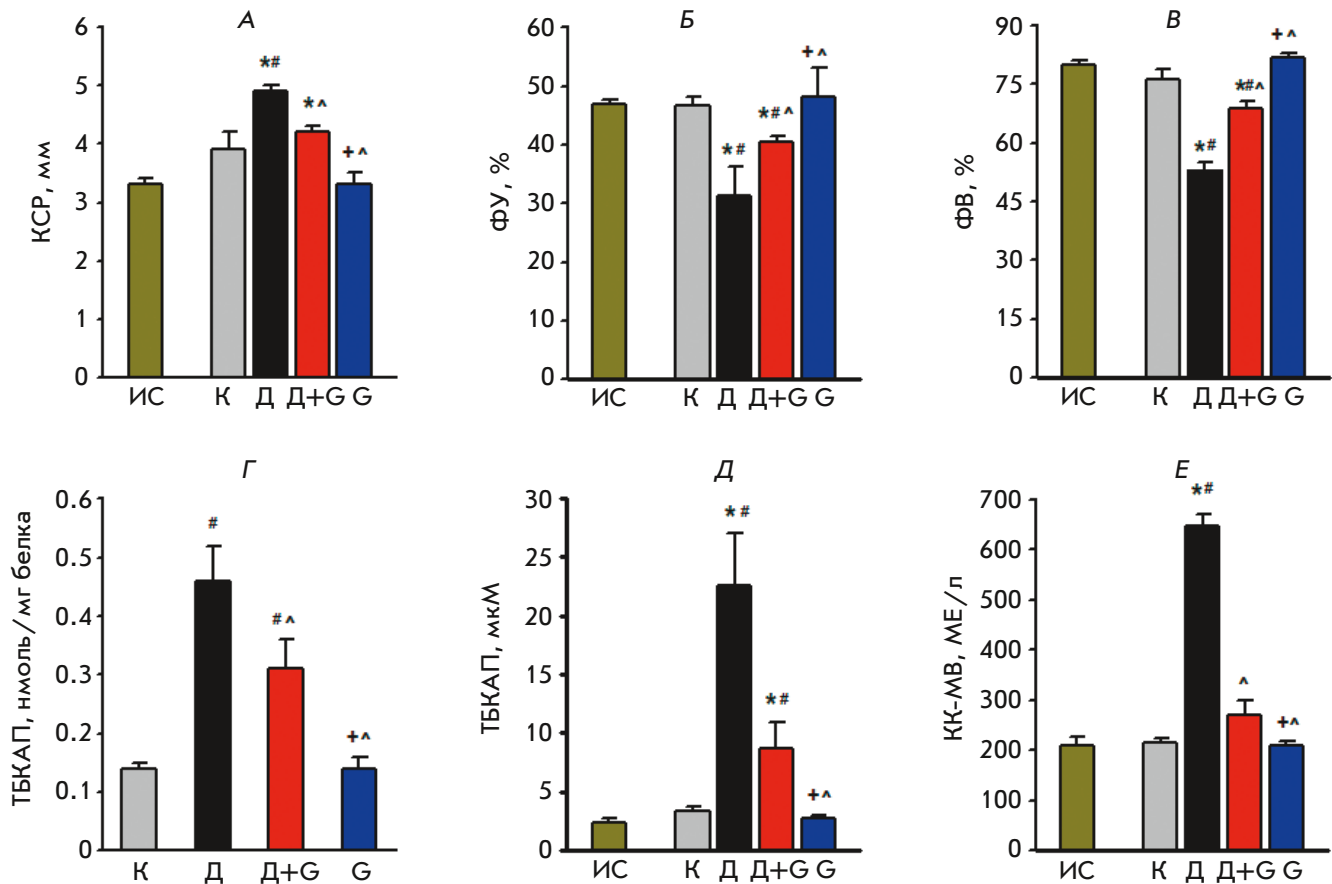


Рис. 1. Показатели ЭхоКГ, окислительного стресса и повреждения мембран кардиомиоцитов в исследуемых группах. А – конечно-систолический размер (КСР) ЛЖ. Б – фракция укорочения (ФУ = (КДР – КСР)/КДР×100%), где КСР и КДР – конечно-систолический и конечно-диастолический размеры ЛЖ. В – фракция выброса (ФВ = (КДО – КСО/КДО×100%)), где КДО и КСО – конечно-диастолический и конечно-систолический объемы ЛЖ. Г – содержание тиобарбитуратных кислотно-активных продуктов (ТБКАП) в сердце. Д – концентрация ТБКАП в плазме крови. Е – активность креатинкиназы-МВ (КК-МВ) в плазме крови. ИС – исходное состояние, К – контроль, Д – доксорубицин, Д + G – доксорубицин + пептид G, G – пептид G. Данные представлены как $M \pm m$ ($n = 12$). $P < 0.05$ от: * ИС, # К, ^ Д, + Д + G

В конце исследования активность КК-МВ в группе Д была почти в 3 раза выше, чем в контроле (рис. 1Е). Введение пептида G одновременно с Докс снижало этот показатель практически до значения в контроле. Под действием одного пептида G изменений в ЭхоКГ-показателях, содержании ТБКАП в сердце и плазме и активности КК-МВ в плазме крови не происходило. Таким образом, пептид G снижал повреждающее действие Докс, уменьшая окислительный стресс и повреждения мембран кардиомиоцитов.

Влияние пептида G на морфологические изменения в миокарде

В контроле при окрашивании ГЭ отмечали небольшое полнокровие и умеренный стаз эритроцитов в сосудах капиллярного типа (рис. 2А). При окра-

ске по ГОФП очаги фуксинофилии не обнаружены, что косвенно свидетельствует об отсутствии контрактуры и ишемии миокарда [17]. В группе Д в большинстве случаев наблюдался выраженный стаз эритроцитов в капиллярах, а также полнокровие. При окрашивании по ГОФП в половине случаев наблюдали множественные очаги фуксинофилии кардиомиоцитов, носящие как диффузный, так и очаговый характер (рис. 2Б). В группе Д + G лишь в одном случае на фоне выраженного стаза эритроцитов и полнокровия выявлены единичные кардиомиоциты с фуксинофилией (рис. 2В). В большинстве сердец животных группы G очаги фуксинофилии не обнаружены. При введении одного пептида G наблюдали незначительный стаз эритроцитов, как и в контрольной группе. При окрашивании ГОФП единичные фукси-

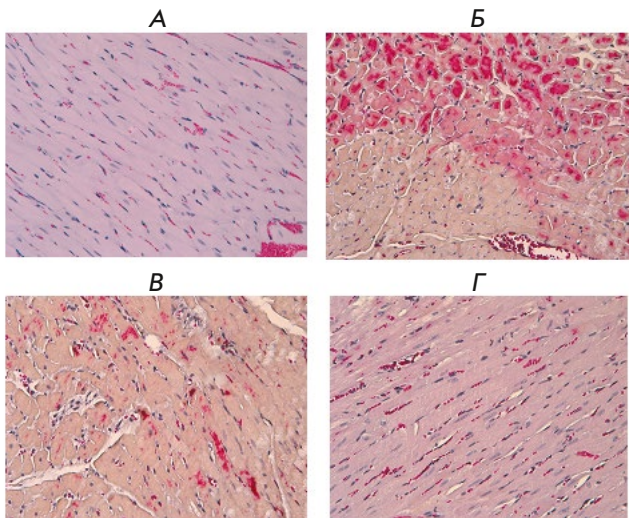


Рис. 2. Влияние пептида G на морфологические изменения сердца крыс, получавших Докс. А – контроль, ГЭ, ×200. Незначительное полнокровие и стаз эритроцитов. Б – группа Докс, ГОФП, ×200. Обширные очаги фуксинофилии кардиомиоцитов. В – группа Д + G, ГОФП, ×200. Группы единичных кардиомиоцитов, проявляющих цитоплазматическую фуксинофилию. Г – группа G, ГОФП, ×200. Незначительный стаз эритроцитов, отсутствие фуксинофильных кардиомиоцитов

нофильные кардиомиоциты обнаружены лишь в одном случае. У основной части животных группы G очаги фуксинофилии кардиомиоцитов не выявлены (рис. 2Г). Таким образом, введение пептида G снижало морфологические изменения в сердце крыс, вызванные воздействием Докс.

Таблица 2. Влияние Докс и пептида G на энергетическое состояние миокарда крыс после 8-недельного исследования

Метаболит	Контроль	Докс	Докс + G	G
АТФ	18.84 ± 1.17	11.83 ± 1.33*	16.31 ± 1.32 [#]	18.91 ± 1.97 [#]
АДР	5.47 ± 0.11	5.60 ± 0.35	7.28 ± 0.47 ^{**}	6.30 ± 0.33*
АМР	0.92 ± 0.06	1.14 ± 0.16	1.58 ± 0.15*	1.50 ± 0.10*
ΣАН	25.24 ± 1.22	18.56 ± 1.66*	25.18 ± 1.50 [#]	25.71 ± 1.13 [#]
АЭЗ	0.86 ± 0.01	0.78 ± 0.02*	0.79 ± 0.01*	0.85 ± 0.02
ФКр	22.57 ± 1.52	12.08 ± 1.25*	17.74 ± 1.14 ^{**}	20.66 ± 2.04 [#]
Кр	34.94 ± 2.64	38.34 ± 3.80	38.24 ± 3.89	37.43 ± 2.67
ΣКр	57.51 ± 1.67	50.42 ± 2.26*	55.98 ± 2.12	58.09 ± 2.81 [#]

Примечание. Данные представлены как $M \pm m$ ($n = 6$) и выражены для метаболитов в мкмоль/г сух. веса. Σ АН = АТФ+АДР+АМР; АЭЗ (аденилатный энергетический заряд) = (АТФ+0.5 АДР)/ΣАН; ΣКр = ФКр+Кр. $P < 0.05$ от: * контроля; [#] Докс.

Таблица 1. Влияние Докс и пептида G на активность антиоксидантных ферментов в сердце крыс после 8-недельного исследования

Группа крыс	Cu,Zn-SOD	CAT	GSH-Px
Контроль	220.75 ± 17.92	16.73 ± 0.43	0.21 ± 0.01
Докс	165.50 ± 22.77	21.50 ± 0.50*	0.16 ± 0.01*
Докс + G	259.64 ± 13.78 [#]	23.67 ± 1.49*	0.20 ± 0.01 [#]
G	227.55 ± 19.31	19.13 ± 1.08	0.19 ± 0.01

Примечание. Данные представлены как $M \pm m$ ($n = 6$) и выражены в ед. активности/мг белка. $P < 0.05$ от: * контроля; [#] Докс + G.

Влияние пептида G на активность антиоксидантных ферментов сердца

Отмечено, что действие Докс приводит к снижению активности GSH-Px, появлению тенденции к уменьшению активности Cu,Zn-SOD и увеличению активности CAT по сравнению с контролем (табл. 1). Совместное введение Докс и G статистически значимо увеличивало активность Cu,Zn-SOD и GSH-Px и незначимо CAT ($P = 0.082$) по сравнению с этими показателями в группе Д. Введение одного пептида G не влияло на активность ферментов.

Влияние пептида G на показатели энергетического обмена сердца

После 8 недель исследования общий пул адениннуклеотидов (ΣАН) в сердце и аденилатный энергетический заряд (АЭЗ) кардиомиоцитов у крыс группы Д были статистически значимо ниже, чем в контроле, за счет уменьшения содержания АТФ (табл. 2).

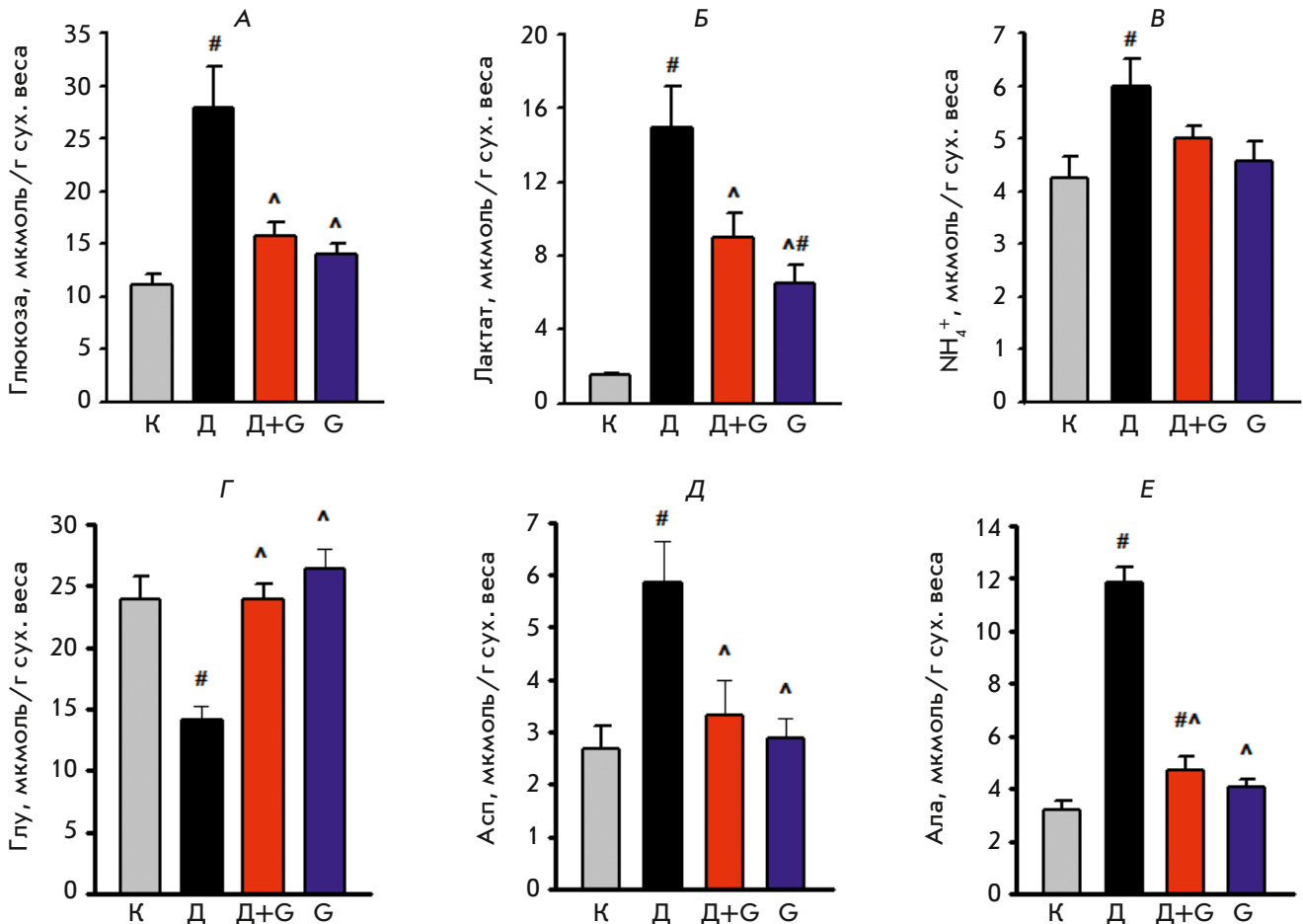


Рис. 3. Содержание глюкозы (А), лактата (Б), аммиака (NH₄⁺) (В), глутаминовой кислоты (Глу) (Г), аспарагиновой кислоты (Асп) (Д) и аланина (Ала) (Е) в миокарде крыс после 8 недель исследования. К – контроль, Д – доксорубицин, Д + G – доксорубицин + пептид G, G – пептид G. Данные представлены как M ± m (n = 6). P < 0.05 от: #К, ^Д

Содержание ФКр в сердцах животных группы Д было в 2 раза ниже. Это стало причиной уменьшения содержания общего креатина (ΣКр), поскольку содержание Кр под влиянием Докс не изменялось. Введение животным пептида G совместно с Докс повышало содержание АТФ и АДФ, результатом чего было 1.5-кратное увеличение ΣАН до значения в контроле. У животных группы Д + G содержание ФКр и ΣКр в миокарде было более высоким, чем в группе Д, и не отличалось значимо от значений в контроле. Поскольку потери внутриклеточного ΣКр связывают с повреждениями сарколеммы [18], более высокое содержание ΣКр в группе Д + G указывало на менее существенное повреждение клеточных мембран под действием G.

Влияние пептида G на содержание метаболитов углеводного и азотистого обмена в сердце

Снижение β-окисления жирных кислот, увеличение захвата глюкозы миокардом и компенсаторное уси-

ление анаэробного гликолиза после 8-недельного введения Докс [19] значительно повышали содержание глюкозы и лактата в сердце крыс группы Д по сравнению с контролем (рис. 3А, Б). Введение пептида G совместно с Докс снижало содержание глюкозы до значения, близкого к контролю, и одновременно уменьшало содержание лактата по сравнению с этим показателем в группе Д. При введении только пептида G уровень глюкозы в сердце не отличался статистически значимо от уровня в контрольной группе, а содержание лактата было выше, чем в контроле.

Мы изучили действие Докс и пептида G на содержание в сердце ключевых аминокислот – глутаминовой (Глу), аспарагиновой (Асп), аланина (Ала) и аммиака. Нарушение аэробного энергетического обеспечения сердца под действием Докс увеличивало скорость катаболизма Глу и образования Ала. После 8 недель содержание Глу в группе Д было статистически значимо снижено, а Ала – увеличено вслед-

ствие трансаминирования гликолитического пирувата по сравнению с этими показателями в контроле. В результате сопряженного трансаминирования Глу и оксалоацетата содержание Асп в группе Д увеличивалось вдвое по сравнению с контролем (рис. 3Г, Д, Е). Под действием пептида G в группе Д + G содержание Глу восстанавливалось, а Ала снижалось. Одновременно уровень Асп в группе Д + G снижался до значений в контроле.

Введение Докс крысам статистически значимо увеличивало содержание аммиака в миокарде по сравнению с контролем (рис. 3В). Под действием пептида G этот показатель снижался до значения в контрольной группе. Таким образом, улучшение энергетического состояния сердца, поврежденного Докс, обусловленное действием пептида G, предотвращало изменения в обмене Глу, Асп и Ала и снижало накопление аммиака в миокарде. Содержание этих азотистых соединений у животных, которым вводили только пептид G, было таким же, как в контрольной группе.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе на модели КМП у крыс, вызванной хроническим введением Докс, показано защитное действие пептида G. Снижение нарушений функции сердца, уменьшение ремоделирования ЛЖ и морфологических изменений при совместном введении Докс и пептида G сопровождалось значительным улучшением энергетического обеспечения кардиомиоцитов. На это указывает более высокое содержание АТФ, ΣАН и ФКр в сердце, которое сочеталось со снижением накопления глюкозы и лактата. Существенно, что при доксорубициновой КМП увеличивалась скорость катаболизма миокардиальной Глу, что сопровождалось образованием Ала и Асп и накоплением цитотоксичного аммиака. Как правило, такие изменения в обмене этих аминокислот обнаруживаются в тех случаях, когда окислительное фосфорилирование не может обеспечить необходимого образования АТФ, происходит активация гликолиза и использование резервных макроэргических фосфатов. Реакции сопряженного трансаминирования Глу и Асп и образования Ала сопряжены с усилением субстратного фосфорилирования в митохондриях на уровне сукцината, компенсирующего ингибирование окислительного фосфорилирования. При этом потеря внутриклеточного пула Глу, участвующей в поддержании уровня АТФ, и продукция Ала тесно связаны с энергетическим состоянием сердца [20, 21]. Увеличение аэробного обмена под действием пептида G в сердце, поврежденном Докс, восстанавливало нормальное содержание Глу, Асп и Ала и снижало образование аммиака. Такие сдвиги во внутриклеточном обмене миокарда отра-

жают снижение отношения $NADH/NAD^+$ в цитозоле, нормализацию функции малат-аспартатного челнока и цикла трикарбоновых кислот [22, 23]. Они хорошо согласуются с более высоким дыхательным контролем в митохондриях сердца на NAD^+ -зависимых субстратах (Глу и малате), обнаруженном нами ранее после совместного введения Докс и пептида G крысам [9].

Контроль содержания аммиака в сердечной мышце, характеризующейся интенсивным аэробным обменом, имеет особое значение. Это связано с его способностью 1) ингибировать реакции декарбоксилирования α -кетокислот в цикле Кребса и синтез белка; 2) сдвигать направление глутаматдегидрогеназной реакции в сторону образования Глу и тем самым блокировать катаболизм аминокислот; 3) нарушать активный перенос одновалентных катионов и изменять внутриклеточный pH [24, 25]. Снижение внутриклеточного уровня аммиака, обладающего токсическим действием на окислительный обмен, обусловлено улучшением метаболизма миокарда под действием пептида G. Этот эффект, скорее всего, вызван активацией связывания аммиака в АТФ-зависимых реакциях образования глутамина, аспарагина, а также снижением деградации адениннуклеотидов [26, 27]. Таким образом, пептид G корректировал ключевые звенья метаболизма миокарда при КМП – энергетический, углеводный и азотистый обмены.

В настоящее время клонированы и охарактеризованы три подтипа рецепторов галанина – GalR1, GalR2 и GalR3, которые существуют и в сердце. За связывание с рецепторами отвечает N-концевой фрагмент пептида, первые 15 аминокислотных остатков которого консервативно сохраняются у большинства видов животных и человека [28]. Влияние пептида G на метаболическое состояние поврежденного сердца обусловлено, вероятно, его связыванием преимущественно с GalR2, сопряженного с различными типами G-белков, которое активирует механизмы клеточной защиты (рис. 4). Активация всех подтипов рецепторов галанина через белки Gi/o ингибирует активность аденилатциклазы, что приводит к ингибированию транскрипционного фактора CREB – белка, связывающего цикло-АМФ-зависимый элемент. Это повышает экспрессию транспортера глюкозы GLUT4 и его перемещение в сарколемму, стимулируя захват и окисление глюкозы кардиомиоцитами. Запуск этого механизма имеет решающее значение в условиях снижения продукции АТФ [29]. Сопряжение рецептора GalR2 с белком Gq/11 активирует фосфолипазу C и через гидролиз фосфатидилинозитолдифосфата регулирует гомеостаз Ca^{2+} , что улучшает инотропные свойства сердца [30].

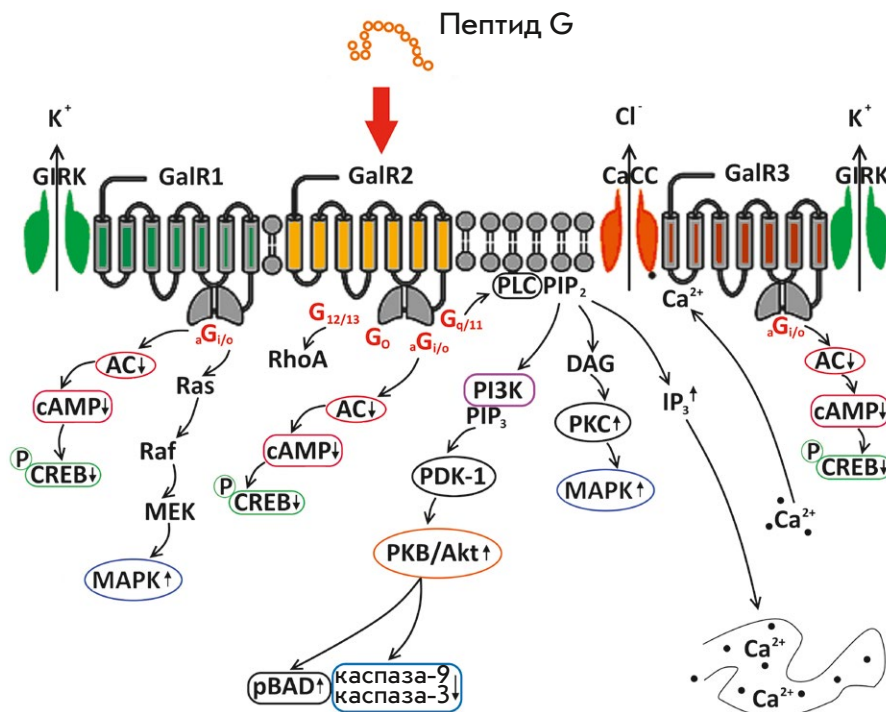


Рис. 4. Пути внутриклеточной сигнализации, активируемые пептидом G – фармакологическим агонистом рецепторов галанина (Runeson [31]). AC – аденилатциклаза; (p)BAD – (фосфорилированный) Bcl2-регулятор апоптоза; CaCC – Ca²⁺-зависимый хлоридный канал; (p)CREB – фосфорилированный cAMP-зависимый элемент; DAG – диацилглицерин; GIRK – G-белок-связанный входящий калиевый канал; IP₃ – инозитолтрифосфат; MAPK – митогенактивируемая протеинкиназа; MEK – APK/ERK-киназа; PDK-1 – фосфоинозитол-зависимая протеинкиназа-1; PIP₂ – фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат; PIP₃ – фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; PKB – протеинкиназа B (Akt); PLC – фосфолипаза C; RhoA – Ras-подобный белок

Нижние звенья этого сигнального пути вызывают фосфорилирование протеинкиназы B (Akt), ингибирование проапоптотических белков BAD/BAX и активностей каспазы-3 и каспазы-9 [31]. Как правило, в моделях *in vivo* уменьшение апоптоза кардиомиоцитов, в том числе и индуцированного Докс, сочетается с уменьшением размера необратимого повреждения миокарда и улучшением его сократительной функции [32]. Активация GalR1 и GalR2 стимулирует сигнальные пути, активируемые митогенактивируемыми протеинкиназами (MEK1/2 и ERK1/2), приводящие к ингибированию открытия митохондриальной поры временной проницаемости (mPTP). Этот механизм отвечает за выживание и подвижность клеток [33]. Кроме того, активация фосфорилирования ERK способствует повышенной экспрессии рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPARs), контролирующими энергетический метаболизм, включая и экспрессию PPAR γ , стимулирующего поглощение и окисление глюкозы кардиомиоцитами [34]. Из этого следует, что пептид G способен запускать различные механизмы, которые способствуют защитным кардиометаболическим эффектам при повреждении сердца Докс.

Окислительный стресс – один из ведущих факторов кардиотоксичности, инициируемой Докс [2, 4]. В нашей работе это подтверждено высокими уровнями продуктов ПОЛ ТБКАП как на системном, так и на органном уровне, а также повышенной активностью специфичного маркера некроза

сердца – КК-МВ – в плазме крови животных, получавших Докс. Для понимания особенностей окислительного стресса в сердце под действием Докс мы изучили его воздействие на ключевые ферменты антиоксидантной защиты – Cu,Zn-SOD, CAT и GSH-Px. Под влиянием Докс в сердце статистически значимо снизилась активность только GSH-Px, активность Cu,Zn-SOD снижалась незначительно, а CAT увеличилась по сравнению с контролем. Столь разнонаправленный ответ антиоксидантных ферментов связан с использованием низкой кумулятивной дозы Докс (8 мг/кг) в наших опытах. Докс, генерируя небольшое количество АФК, может не влиять на активность антиоксидантных ферментов или активировать ряд сигнальных путей, приводящих к индукции ферментов антиоксидантной защиты. Такие данные получены на моделях индуцируемого Докс окислительного стресса у животных различных видов [35, 36]. Важно, что введение пептида G на фоне повреждения сердца Докс существенно снижало содержание продуктов ПОЛ в сердце и плазме крови животных и одновременно улучшало интегрированность мембран кардиомиоцитов. Эти эффекты уменьшения окислительного стресса сопровождались увеличением активности Cu,Zn-SOD и GSH-Px, что указывает на усиление антиоксидантной защиты. Следует отметить, что внутриклеточная Cu,Zn-SOD контролирует не только образование АФК, но и высокорективного пероксинитрита, и ограничивает таким образом нитрозильный стресс [37]. Наблюдаемое

увеличение активности Cu,Zn-SOD и GSH-Px могло быть связано с увеличением экспрессии генов этих ферментов под влиянием пептида G. Известно также, что некоторые пептиды обладают способностью перехватывать АФК и ингибировать ПОЛ [38]. Однако данные о прямом антиоксидантном действии галанина или пептидов, содержащих карнозиновую последовательность на С-конце молекулы, отсутствуют. Несомненно, механизмы снижения окислительного стресса с помощью пептида G заслуживают дальнейшего изучения. Мы полагаем, что основными факторами, обуславливающими фармакологическую эффективность пептида G и снижение кардиотоксичности, вызванной длительным введением Докс, можно считать улучшение энергетического обеспечения кардиомиоцитов и усиление ферментативной антиоксидантной защиты. Схема, иллюстрирующая кардиопротектное действие этого синтетического агониста рецепторов галанина, представлена на рис. 5.

Ранее токсичность пептида G была изучена нами на мышах линии BALB/c. Введение пептида G не вызывало каких-либо признаков интоксикации и гибели животных в течение 14 дней наблюдения [39]. Существенно, что наиболее высокая из испытанных доз пептида G (520 мг/кг) многократно превышала его кумулятивную дозу, использованную в настоящей работе с Докс (4.2 мг/кг). Эти данные свидетельствуют о хорошей переносимости пептида G и перспективности проведения доклинических исследований этого препарата, обладающего широким спектром защитного действия при Докс-индуцированной КМП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на использование антрациклинов нового поколения со сниженной кардиотоксичностью (эпирубицина и идарубицина), Докс остается препаратом, обладающим высоким противоопухолевым эффектом, что, в свою очередь, требует снижения повреждений сердечно-сосудистой системы при его химиотерапевтическом использовании. Приведенные экспериментальные факты свидетельствуют о возможности коррекции КМП у крыс, вызванной хроническим применением Докс, с помощью пептида G – фармакологического агониста рецепторов галанина. Снижение кардиотоксического действия Докс при введении пептида G подтверждено уменьшением систолической дисфункции левого желудочка и уменьшением активности в крови КК-МВ – маркера повреждения сердечной мышцы. Эти эффекты прямо связаны со снижением окислительного стресса и улучшением метаболического и антиоксидантного состояния сердца. Для понимания механизмов дей-

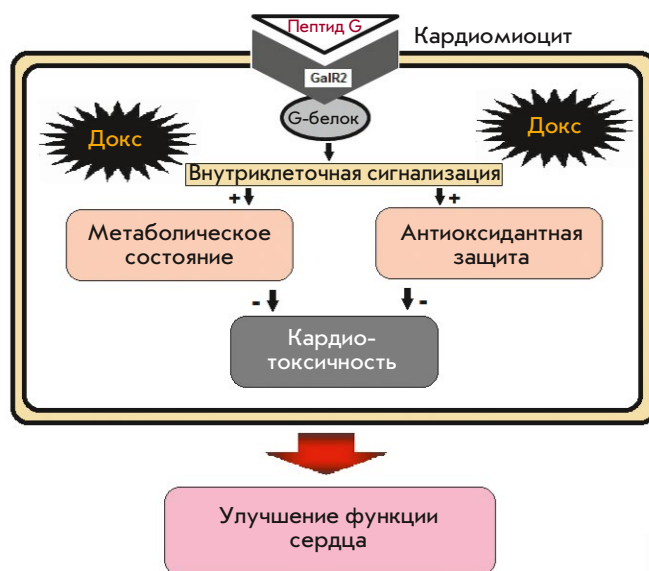


Рис. 5. Активация рецептора галанина GalR2 пептидом G снижает систолическую дисфункцию миокарда при КМП, индуцированной Докс, благодаря улучшению метаболического и антиоксидантного состояния сердца

ствия пептида необходимо изучить роль активации рецепторов галанина этим лигандом и пути передачи сигнала в кардиомиоцитах. Полученные данные создают предпосылки для изучения возможности использования фармакологических лигандов рецепторов галанина в онкологии с целью снижения токсичности антрациклиновых антибиотиков. При этом они свидетельствуют о целесообразности доклинического исследования пептида G, который может быть использован в качестве потенциального противоопухолевого, мембраностабилизирующего и антиоксидантного лекарственного средства. ●

Авторы выражают искреннюю благодарность руководителю лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ М.В. Сидоровой за предоставление пептида G и ценные советы при обсуждении результатов работы. Авторы признательны А.В. Просвирнину за проведение ЭхоКГ-исследования и обработку результатов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 18-015-00008 и 18-015-00009).

Конфликт интересов. Все авторы заявляют об отсутствии потенциального конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. // *Pharmacol. Rev.* 2004. V. 56. № 2. P. 185–229.
2. Zhang S., Liu X., Bawa-Khalfe T., Lu L.S., Lyu Y.L., Liu L.F., Yeh E.T. // *Nat. Medicine.* 2012. V. 18. № 11. P. 1639–1642.
3. Tokarska-Schlattner M., Wallimann T., Schlattner U. // *C. R. Biol.* 2006. V. 329. № 9. P. 657–668.
4. Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L., Janssens S., Crijns H.J., Moens A.L. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012. V. 52. № 6. P. 1213–1225.
5. Timotin A., Pisarenko O., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoedov A., Veselova O., Cinato M., et al. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 13. P. 21241–21252.
6. 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. № 60. P. 101659–101671.
7. 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 № 2648846. РФ. А61К 38/10 (2006.01). 2018.
8. Palkeeva M., Studneva I., Molokoedov A., Serebryakova L., Veselova O., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. // *Biomed. Pharmacother.* 2019. V. 109. P. 1556–1562.
9. Studneva I., Palkeeva M., Veselova O., Molokoedov A., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. // *Cardiovascular. Toxicol.* 2019. V. 19. № 2. P. 136–146.
10. Bergmeyer H.U. *Methods of enzymatic analysis.* New York: Acad. Press, 1974. P. 1464–1467, 1772–1776, 1777–1781, 2127–2131.
11. Draper H.H., Hadley M. // *Meth. Enzymol.* 1990. V. 186. P. 421–434.
12. Beauchamp C., Fridovich I. // *Anal. Biochem.* 1971. V. 44. № 1. P. 276–287.
13. Beers R.F., Sizer I.W. // *J. Biol. Chem.* 1952. V. 195. № 1. P. 133–140.
14. Paglia D.E., Valentine W.N. // *J. Lab. Clin. Med.* 1967. V. 70. № 1. P. 158–169.
15. Uchlyama M., Mihara M. // *Anal. Biochem.* 1978. V. 86. № 1. P. 271–278.
16. Морфологическая диагностика. Подготовка материала для гистологического исследования и электронной микроскопии. Руководство под ред. Д.Э. Коржевского. СПб.: Спец-Лит, 2013. 127 с.
17. Кактурский Л.В., Бахтин А.А. // Тезисы Всероссийской научно-практической конференции «Современные подходы в клинико-морфологической диагностике и лечении заболеваний человека», Санкт-Петербург, 9–10 октября 2015. С. 103–106.
18. Zervou S., Whittington H.J., Russell A.J., Lygate C.A. // *Mini-Rev. Med. Chem.* 2016. V. 16. P. 19–28.
19. Hrelia S., Fiorentini D., Maraldi T., Angeloni C., Bordoni A., Biagi P.L., Hakim G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. V. 1567. № 1–2. P. 150–156.
20. Sanborn T., Gavin W., Berkowitz S., Perille T., Leach M. // *Am. J. Physiol.* 1979. V. 273. № 5. P. H535–H541.
21. Weisner R.J., Deussen A., Borst M., Schrader J., Grieshaber M.K. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1989. V. 21. № 1. P. 49–59.
22. Safer B., Williamson J.R. // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. № 7. P. 2570–2579.
23. LaNoue K.F., Walajtys E.I., Williamson J.R. // *J. Biol. Chem.* 1973. V. 248. № 20. P. 7171–7183.
24. McKhann G.M., Tower D.B. // *Am. J. Physiol.* 1961. V. 200. P. 420–424.
25. Katunuma N., Okada M., Nishi Y. // *Adv. Enz. Regul.* 1966. V. 4. P. 317–336.
26. Watanabe T., Hamazaki N., Aoyama S. // *Israel Med. Sci.* 1969. V. 5. P. 496–500.
27. Katunuma N., Jkada M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1965. V. 19. P. 109–113.
28. Webling K.E.B., Runesson J., Bartfai T., Langel Ü. // *Front. Endocrinol.* 2012. V. 3. Article 146.
29. Tian R., Abel E.D. // *Circulation.* 2001. V. 103. № 24. P. 2961–2966.
30. Lang R., Gundlach A.L., Holmes F.E., Hobson S.A., Wynick D., Höckfelt T., Kofler B. // *Pharmacol. Rev.* 2015. V. 67. № 1. P. 118–175.
31. Runesson J. *Galanin receptor ligands.* Stockholm University, 2009. 36 p.
32. Krijnen P.A., Nijmeijer R., Meijer C.J., Visser C.A., Hack C.E., Niessen H.W. // *J. Clin. Pathol.* 2002. V. 55. № 11. P. 801–811.
33. Hausenloy D.J., Duchon M.R., Yellon D.M. // *Cardiovasc. Res.* 2003. V. 60. P. 617–625.
34. Jay M.A., Ren J. // *Curr. Diab. Rev.* 2007. V. 3. № 1. P. 33–39.
35. Aniss H.A., Said A.A., Sayed I.H., AdLy C. // *Egypt. J. Hosp. Med.* 2012. V. 48. P. 383–393.
36. Li T., Singal P.K. // *Circulation.* 2000. V. 102. № 17. P. 2105–2110.
37. Ferdinandy P., Schulz R. // *Br. J. Pharmacol.* 2003. V. 138. № 4. P. 532–543.
38. Power O., Jakeman P., FitzGerald R.J. // *Amino Acids.* 2013. V. 44. № 3. P. 797–820.
39. Серебрякова Л.И., Палькеева М.Е., Студнева И.М., Овчинников М.В., Веселова О.М., Молокоедов А.С., Азьмуко А.А., Арзамасцев Е.В., Афанасьева Е.Ю., Терехова О.А. и др. // *Биомед. химия.* 2019. Т. 65. № 3. С. 231–238.