

УДК 615, 616-05

Галанин уменьшает ишемическое/реперфузионное повреждение сердца у крыс со стрептозотоциновым диабетом

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

Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии им. акад. Е.И. Чазова
МЗ РФ, Москва, 121552 Россия

*E-mail: olpi@live.ru

Поступила в редакцию 27.08.2024

Принята к печати 21.10.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27506

РЕФЕРАТ Большинство клинических исследований подтверждает негативное влияние сахарного диабета (СД) на течение и исход сердечно-сосудистых осложнений, вызванных ишемическим/реперфузионным повреждением (ИРП) сердца, поэтому актуален поиск новых подходов к лечению ИРП диабетического миокарда. В представленной работе изучали влияние нейропептида галанина (G) на размеры инфаркта миокарда (ИМ), показатели функции митохондрий и энергетического состояния зоны риска (ЗР) у крыс с сахарным диабетом первого типа (СД1), подвергнутых региональной ишемии и реперфузии сердца. Галанин крысы был получен методом твердофазного синтеза с использованием Fmoc-стратегии и очищен с помощью ВЭЖХ. СД1 индуцировали введением стрептозотоцина. ИРП сердца моделировали окклюзией передней нисходящей коронарной артерии и последующей реперфузией. G в дозе 1 мг/кг вводили в/в перед реперфузией. G уменьшал размеры ИМ и активность креатинкиназы-МВ в плазме крови диабетических крыс на 40 и 28% соответственно. Под действием G улучшалось дыхание митохондрий в скинированных сапонином волокнах ЗР – максимальное ADP-стимулированное состояние 3, дыхательный контроль и функциональная связь митохондриальной креатинкиназы с окислительным фосфорилированием. G поддерживал достоверно более высокие уровни АТР, общего фонда адениннуклеотидов, аденилатного энергетического заряда кардиомиоцитов и снижал потери общего креатина в ЗР сердца диабетических крыс. Полученные результаты предполагают перспективность применения G при ИРП миокарда, осложненном СД1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА галанин, крыса, стрептозотоциновый диабет, ишемия и реперфузия сердца, дисфункция митохондрий, энергетическое состояние миокарда, повреждение клеточных мембран.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; АЭЗ – аденилатный энергетический заряд; ДК – дыхательный контроль; ЗР – зона риска; ИМ – инфаркт миокарда; ИРП – ишемическое/реперфузионное повреждение; КК-МВ – креатинкиназа-МВ; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ЛЖ – левый желудочек; мт-КК – митохондриальная креатинкиназа; ОФ – окислительное фосфорилирование; ЛНА – левая нисходящая коронарная артерия; ПОЛ – перекисное окисление липидов; СД – сахарный диабет; СТЗ – стрептозотоцин; Сг – креатин; G – галанин; PCr – фосфокреатин; Σ AN – общий пул адениннуклеотидов; Σ Cr – общий креатин.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема коморбидности сахарного диабета и ишемической болезни сердца как двух распространенных патологий является одной из важнейших в современной экспериментальной и клинической кардиологии, учитывая их взаимное негативное влияние на прогноз и качество жизни больных. У пациентов с сахарным диабетом чаще возника-

ют окклюзии коронарных артерий, а сердце более чувствительно к ишемическому и реперфузионному повреждению (ИРП), чем у пациентов без диабета [1]. Как правило, защита сердца от ИРП миокарда при диабете оказывается неэффективной [2]. Это вызвано дефектами в сигнальных каскадах PI3K/Akt и JAK2/STAT3, ключевых для защиты миокарда [3]. Диабетическая гипергликемия может вызывать

дисфункцию митохондрий за счет увеличения экспрессии динамин-связанного белка 1 [4], блокирования митохондриальных АТФ-зависимых K^+ -каналов [5] и инактивации фактора-1 α , индуцируемого гипоксией (HIF-1 α) [6]. Перечисленные метаболические изменения способствуют десенсибилизации диабетического миокарда к терапевтическим вмешательствам против ИПП. В связи с этим актуален поиск новых фармакологических мишеней для профилактики и лечения ИПП миокарда при диабете.

В последнее время важную роль в регуляции функции сердца при патологических состояниях отводят галанинергической системе [7]. Нейропептид галанин (GWTLSAGYLLGPHADNHRFSFDKHLG-LT-NH₂) широко представлен в центральной и периферической нервной системе, а также в других тканях [8]. В периферических органах, включая сердце, G действует не только через нейрональные механизмы, но и активирует семейство трансмембранных рецепторов GalR1-3 [9]. Недавно мы показали, что внутривенное введение G крысам после региональной ишемии миокарда значительно снижало некротическое повреждение кардиомиоцитов [10]. Этот эффект был опосредован активацией рецептора GalR2 и значительно снижался под влиянием M871, антагониста GalR2 [11]. Уменьшение размеров инфаркта миокарда (ИМ) под действием G сопровождалось снижением образования аддукта гидроксильных радикалов 5,5-диметил-пирролин-N-оксид-ОН и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в зоне риска (ЗР) при возобновлении кровотока. G способен также ингибировать свободнорадикальное окисление липопротеинов низкой плотности в плазме крови человека [12]. Существенно, что G предотвращал развитие гипергликемии при стрептозотоциновом (СТЗ) диабете у крыс, улучшал метаболическое состояние сердца диабетических животных благодаря повышению дыхательной функции митохондрий и снижал образование продуктов ПОЛ в плазме крови [13]. Мы предположили, что этот пептид, улучшающий образование энергии в митохондриях сердца и снижающий окислительный стресс, может быть перспективным для снижения ИПП сердца при СД1. Ранее влияние G на ишемизированный миокард, подвергнутый воздействию диабета, не изучалось. Для проверки этой гипотезы G был использован в период реперфузии после региональной ишемии миокарда у крыс с гипергликемией, вызванной введением СТЗ. В этой

работе критериями повреждения сердца служили размеры ИМ и активность маркеров некроза – креатинкиназы-МВ (КК-МВ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) – в плазме. Для понимания механизмов действия G акцент сделали на энергетическом состоянии ЗР и функции митохондрий, которая была охарактеризована параметрами дыхания волокон миокарда, скинированных сапонином.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты

Производные Fmoc-защищенных аминокислот были приобретены у Novabiochem и Bachem (Швейцария), реагенты для синтеза пептидов – у компании Fluka Chemie GmbH (Швейцария). Ферменты и химические препараты для определения метаболитов и параметров дыхания волокон миокарда приобретены у ООО «Мерк Лайф Сайенс» (Россия). Растворы готовили с использованием деионизированной воды (Millipore Corp., США).

Синтез и хроматография пептида G

Пептид G получен конвергентным синтезом на твердой фазе путем конденсации пептидных блоков, полученных на полимере и в растворе, и очищен с помощью препаративной ВЭЖХ до 98% чистоты на хроматографе Knauer (Германия) с колонкой (30 × 250 мм) Kromasil 100-10 ODS (Швеция) [14]. Аналитическую ВЭЖХ проводили на колонке Kromasil 100-5 C18 (4.6 × 250 мм), размер частиц сорбента 5 мкм; в качестве элюентов использовали: буфер А – 0.1% TFA, буфер Б – 80% ацетонитрил в буфере А, элюция проводилась линейным градиентом от 20 до 80% Б за 30 мин со скоростью 1 мл/мин, детекция при $\lambda = 220$ нм (Приложения, рис. S1). Структуру пептида подтверждали методом масс-спектрометрии MALDI-TOF/TOF на приборе UltrafleXtreme Bruker Daltonics GmbH (Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd) (Приложения, рис. S2). Характеристики пептида G приведены в табл. 1.

Дизайн эксперимента

В работе использовали крыс-самцов Вистар массой 280–290 г, полученных из питомника животных «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий (Москва, Россия). Животных содержали в индивидуальных клетках при температуре 20–

Таблица 1. Характеристики нейропептида G

Аминокислотная последовательность	Мол. масса, г/моль	MALDI-TOF, m/z	Растворимость в воде, мг/мл	Чистота, ВЭЖХ, %
GWTLSAGYLLGPHADNHRFSFDKHLG-LT-NH ₂	3164.45	3163.474 [M + H] ⁺	>40	98.10

25°C с естественным циклом света и темноты, они имели свободный доступ к стандартному гранулированному рациону и воде. Перед исследованием всех животных взвешивали. После 24-часового голодания у 10 крыс забирали кровь из хвостовой вены для определения концентрации глюкозы и активности КК-МВ и ЛДГ в плазме. Затем крыс наркотизировали 2,2,2-трибромэтанолом (1 мг/кг в/б авертин, «Мерк», Россия) и выделяли сердца для определения показателей энергетического обмена ($n = 5$) и параметров дыхания митохондрий в волокнах левого желудочка (ЛЖ) сердца ($n = 5$) (исходное состояние – группа КС). Оставшихся крыс распределяли случайным образом на пять групп по 15 крыс в каждой: контроль (К), ИРП сердца (ИР); диабет (Д), диабет с последующим ИРП сердца (Д+ИР), диабет с ИРП сердца и с введением G на реперфузии (Д+ИРG). В группе ИР повреждение сердца моделировали окклюзией левой нисходящей коронарной артерии (ЛНА) и последующей реперфузией [11]. Острый СД1 вызывали однократной инъекцией СТЗ (60 мг/кг, в/в) [15]. О развитии диабета судили по повышению уровня глюкозы в крови до 12 мМ и выше через 2 дня после инъекции СТЗ. Уровень глюкозы не снижался в течение 16 дней эксперимента у всех животных, получавших СТЗ. Группа Д+ИР получала однократную инъекцию СТЗ (60 мг/кг, в/в). Животных этой группы после 16-дневного эксперимента подвергали окклюзии ПНА и реперфузии, такой же длительности, как в группе ИР. Животным группы Д+ИРG вводили однократно СТЗ (60 мг/кг, в/в) и через 16 дней моделировали ИРП. Пептид G в физиологическом растворе вводили в/в в дозе 1 мг/кг болюсом в начале реперфузии. Доза G была выбрана на основе наших предыдущих результатов [11]. Крысы контрольной группы получали однократную в/в инъекцию 0.1 М цитратного буфера pH 4.5 (растворитель СТЗ). Массу тела и уровень глюкозы в крови животных экспериментальных групп определяли еженедельно. После 16-дневного исследования образцы крови собирали из хвостовой вены у крыс всех групп для определения активности КК-МВ и ЛДГ в плазме. В сердце пяти животных из групп ИР, Д+ИР и Д+ИРG гистохимическим методом оценивали размеры ЗР и ИМ. У пяти крыс из экспериментальных групп после анестезии авертином (1 мг/кг, в/б) выделяли сердце и замораживали его в жидком азоте с использованием щипцов Волленбергера для последующего анализа метаболитов. Оставшихся пять животных из этих групп использовали для определения параметров дыхания митохондрий в волокнах левого желудочка (ЛЖ) сердца. Схема экспериментального протокола показана на рис. 1.

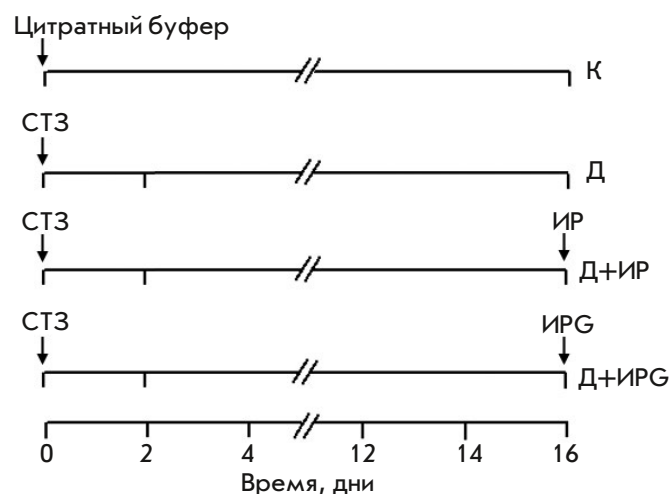


Рис. 1. Схема протокола опытов. Д – крысы получали в/в инъекцию СТЗ (60 мг/кг в 0.1 М цитратном буфере pH 4.5); Д+ИР – диабетические крысы (СТЗ 60 мг/кг, в/в), подвергнутые региональной ишемии и реперфузии сердца; Д+ИРG – диабетические крысы (СТЗ 60 мг/кг, в/в), подвергнутые региональной ишемии и реперфузии сердца, получавшие G (в/в в дозе 1 мг/кг болюсом в начале реперфузии). Цитр. буф. – 0.1 М цитратный буфер pH 4.5; СТЗ – стрептозотозин

Модель региональной ишемии и реперфузии сердца крысы

Крысы групп ИР, Д+ИР и Д+ИРG наркотизировали 20% уретаном (1200 мг/кг веса, в/б) и в условиях торакотомии осуществляли искусственную вентиляцию легких комнатным воздухом с помощью аппарата KTR-5 (Hugo Sacks Elektronik, Германия). Контролировали среднее артериальное давление и частоту сокращений сердца. Показатели записывали в ходе опыта с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (National Instruments, США) и программы в системе LabView 7 (National Instruments). После окончания препарирования следовал период стабилизации гемодинамических показателей (30 мин). Затем животных подвергали 40-минутной окклюзии ЛНА с последующей 60-минутной реперфузией. Животным группы Д+ИРG одновременно с началом реперфузии в/в болюсом вводили пептид G в дозе 1.0 мг/кг веса. В группах ИР и Д+ИР после периода региональной ишемии в/в болюсом вводили такой же объем физиологического раствора. В конце опыта для идентификации ЗР и интактной области миокарда реокклюдировали ЛНА и в яремную вену вводили 2 мл 2% раствора Эванса. Затем вырезали сердце и выделяли левый желудочек (ЛЖ) для определения размеров ИМ.

Определение размеров инфаркта миокарда

Замороженный ЛЖ разрезали перпендикулярно длинной оси сердца на 4–5 срезов толщиной око-

ло 1.5–2.0 мм, которые затем инкубировали в течение 10 мин в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида в 0.1 М калий-фосфатном буфере (pH 7.4 при 37°C). Полученные образцы сканировали, площади ИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу ImageJ (NIH, США). После этого срезы взвешивали для определения массы ЛЖ. В каждой группе рассчитывали отношения ЗР/ЛЖ и ИМ/ЗР в % [11].

Оценка повреждения мембран кардиомиоцитов

Повреждение мембран кардиомиоцитов оценивали по увеличению активности ЛДГ и КК-МВ в плазме крови. Около 0.5 мл крови собирали в гепаринизированные пробирки из венозного катетера в исходном состоянии (перед окклюзией ПНА) и после 1 ч реперфузии. Активность ферментов в плазме определяли с использованием наборов фирмы BioSystems на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) при $\lambda = 340$ нм.

Дыхание пермеабилizированных волокон миокарда

Пермеабилizированные сапонином волокна из ЛЖ сердца крысы получали по модифицированному методу [16]. Параметры дыхания волокон ЛЖ оценивали с использованием субстратов комплекса I – 10 мМ глутамата и 5 мМ малата – с помощью системы Oxygraph plus (HansaTech Instruments, Великобритания) и выражали в нмоль O_2 /мин/мг сухого веса. Скорость дыхания в состоянии 3 (V_3) достигалась добавлением 2 мМ ADP. Сухую массу волокон определяли после сушки в течение ночи при 95°C. Параметры дыхания каждого образца волокон ЛЖ измеряли дважды. Дыхание в состоянии 2 (V_2) оценивали по скорости потребления кислорода после добавления 10 мМ глутамата и 5 мМ малата без ADP. Функцию митохондрий оценивали по величине дыхательного контроля (ДК), который рассчитывали как отношение V_3/V_2 . Целостность внешней мембраны митохондрий оценивали, добавляя 10 мкМ цитохрома c после максимальной стимуляции дыхания 2 мМ ADP, и выражали отношением $V_{\text{cyt c}}/V_{\text{ADP}}$ в %. Степень функционального сопряжения митохондриальной креатинкиназы (мт-КК) с окислительным фосфорилированием (ОФ) оценивали, добавляя 30 мМ Cr к волокнам в присутствии субмаксимальной концентрации ADP (0.1 мМ), и рассчитывали как отношение $(V_{\text{Cr}} - V_{\text{ADP}})/V_{\text{ADP}}$ (%) [17].

Определение содержания метаболитов в зоне риска сердца

По окончании реперфузии ЗР быстро выделяли из ЛЖ и замораживали щипцами Волленбергера,

охлажденными в жидком азоте. Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6% $HClO_4$ (10 мл/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Германия). Белки осаждали центрифугированием (центрифуга Sorvall RT1, Thermo Fisher Scientific, США) при 2800 g 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 -70°C до определения метаболитов. Сухой вес гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение суток при 110°C. Содержание ATP, ADP, AMP, PCr и Cr в тканевых экстрактах определяли модифицированными энзиматическими методами [18], используя спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Япония).

Статистическая обработка данных

Использован пакет программ SigmaPlot 11.2 (SysStat, США). Значения представлены 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 использован *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Отличия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Масса тела и уровень глюкозы в крови

В исходном состоянии (1-й день эксперимента) масса крыс достоверно не различалась между группами (табл. 2). В контрольной группе за период наблюдения происходило прогрессивное увеличение массы тела животных. У крыс диабетической группы не выявлено прибавления массы тела на 9-й день исследования (через неделю после повышения содержания глюкозы в крови выше 12 мМ под действием СТЗ). В конце исследования у животных этой группы масса тела была в среднем на 11.8 и 22.1% ниже, чем в исходном состоянии и в контроле ($p < 0.02$ и $p < 0.001$ соответственно). Сходное изменение массы тела отмечено у животных групп Д+ИР и Д+ИРГ. Не обнаружено различий в массе тела животных диабетических групп в последний день исследования перед моделированием ИР повреждение сердца и введением пептида G.

В исходном состоянии не было достоверной разницы между концентрацией глюкозы в крови животных всех групп. Введение СТЗ повышало уровень глюкозы по сравнению с контролем в течение всего эксперимента. Через 16 дней концентрация глюкозы в крови животных группы Д в 4.5 раза

Таблица 2. Изменения массы тела и концентрации глюкозы в крови животных изученных групп в течение эксперимента

Группа	Масса тела, г		
	1-й день	9-й день	16-й день
К	326.2 ± 11.7	344.2 ± 3.5	379.2 ± 4.5*
Д	335.2 ± 2.5	348.7 ± 3.3*	295.5 ± 14.5* [§] @
ИР	340.6 ± 3.6	-	-
Д+ИР	338.2 ± 1.7	376.5 ± 2.6* [@]	291.3 ± 4.6* [§] @
Д+ИРГ	336.2 ± 2.3	380.0 ± 4.3* [@] #	321.2 ± 13.0 [§] @+
Глюкоза крови, мМ			
К	6.1 ± 0.2	-	6.3 ± 0.2
Д	5.3 ± 0.5	22.4 ± 0.8*	23.8 ± 1.7* [@]
ИР	5.1 ± 0.4	-	-
Д+ИР	4.9 ± 0.6	26.8 ± 3.3*	21.3 ± 5.1* [@]
Д+ИРГ	5.0 ± 0.2	25.0 ± 2.0*	21.5 ± 3.3* [@]

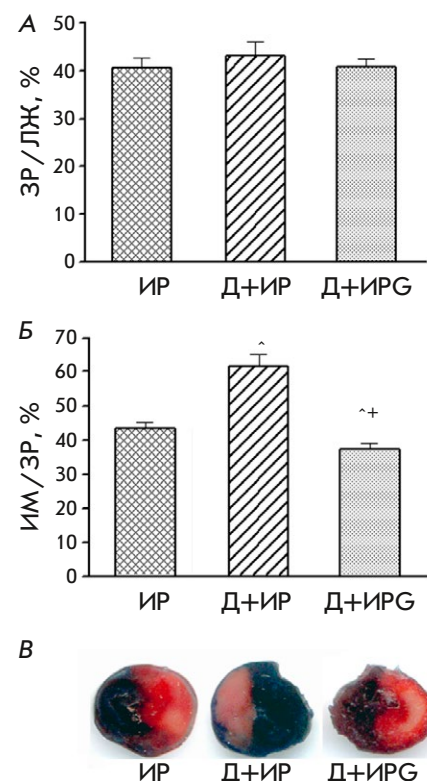
Данные представлены как $M \pm m$ ($n = 15$). $p < 0.05$ от: * показателя в 1-й день, [§] показателя на 9-й день, [@] контроля, # Д, + Д+ИР.

превышала исходный уровень ($p < 0.001$) и в 3.8 раза значения в контрольной группе ($p < 0.001$). Аналогичные изменения этого показателя наблюдали в группах Д+ИР и Д+ИРГ. Статистически значимых различий в уровне глюкозы в обеих диабетических группах перед моделированием ИР повреждения сердца не было.

Влияние диабета и пептида G на размеры инфаркта миокарда

Гистохимический анализ срезов ЛЖ сердца в конце реперфузии не выявил различий в размерах ЗР между группами ИР, Д+ИР и Д+ИРГ (рис. 2). Величина ЗР/ЛЖ в этих группах была близкой и составляла в среднем $41.3 \pm 1.3\%$. Это означает, что моделирование ИР повреждения сердца было стандартным у всех животных. В группе ИР величина инфаркта, выраженная отношением ИМ/ЗР составила $43.4 \pm 1.6\%$. Под действием СТЗ размеры ИМ увеличивались и к окончанию эксперимента были в 1.4 раза больше этого показателя, чем в группе ИР ($p = 0.002$). Реперфузия с G значительно снижала ИМ/ЗР у диабетических крыс: в группе Д+ИРГ этот показатель был на 40% ниже, чем в группе Д+ИР. На рис. 2В показана локализация некротической зоны в срезах ЛЖ после их окрашивания ТФТ. Увеличение образования пигмента красного цвета формазана в результате восстановления ТФТ NAD^+ и $NADP^+$ -зависимыми дегидрогеназами в группе Д+ИРГ указывает на снижение инфаркта под действием G.

Рис. 2. Размеры зоны риска (А), инфаркта миокарда (Б) срезы ЛЖ (В), окрашенные 2,3,5-трифенилтетразолий хлоридом в конце реперфузии, в группах с региональной ишемией и реперфузией. Показаны $M \pm m$ для групп из пяти животных. $p < 0.05$ по сравнению с: ^ ИР, + Д+ИР



Активность КК-МВ и ЛДГ в плазме крови

Активности КК-МВ и ЛДГ у крыс контрольной группы не отличались от значений в исходном состоянии (рис. 3А,Б). Развитие диабета в результате введения СТЗ приводило к значимому увеличению активности КК-МВ и ЛДГ к окончанию эксперимента по сравнению с контролем ($p = 0.027$ и $p = 0.046$ соответственно). Моделирование ИР повреждения сердца значительно увеличивало активности КК-МВ и ЛДГ к окончанию реперфузии по сравнению с этими показателями в контроле ($p < 0.001$). Эти значения были соответственно в 2.0 и 4.4 раза выше, чем в диабетической группе ($p < 0.001$). Региональная ишемия и реперфузия сердца у диабетических животных группы Д+ИР не вызывала значимого увеличения активности маркеров некроза по сравнению с группой ИР. Болюсное в/в введение G в начале реперфузии снижало активность КК-МВ по сравнению с этим показателем в группе Д+ИР в 1.4 раза ($p = 0.006$). Активность ЛДГ в группе Д+ИРГ под действием G по сравнению с этим показателем в группе Д+ИР снижалась недостоверно ($p = 0.085$).

Параметры дыхания волокон миокарда, скинированных сапонином

После 16 дней эксперимента отсутствовали различия в скорости дыхания в состоянии 2, состоянии 3, величине ДК и степени функциональной связи мт-КК с ОФ между этими показателями в контрольной

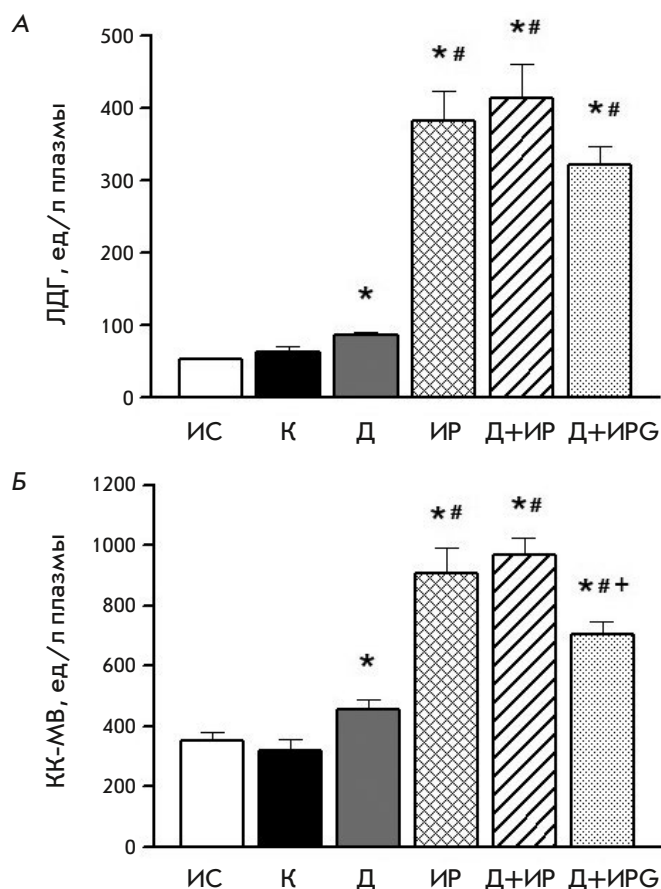


Рис. 3. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, А) и креатинкиназы-МВ (КК-МВ, Б) в плазме крови крыс. Представлены значения $M \pm m$ для групп из пяти животных. $p < 0.05$ по сравнению с: * К, # Д, + Д+ИР

группе и в исходном состоянии (рис. 4). У крыс, получавших СТЗ, наблюдалось снижение V_2 и особенно V_3 (на 28 и 60% по сравнению с контролем соответственно, $p < 0.05$ и $p < 0.001$). Результатом этого было двукратное снижение ДК ($p < 0.001$). Степень функциональной активности мт-КК, оцененная в Сг-тесте, у животных с диабетом снижалась в 1.6 раза по сравнению с контролем ($p < 0.001$). Сходные изменения дыхательной функции митохондрий ЗР вызывало ИРП сердца. Средние значения параметров дыхания в этом случае не отличались значимо от значений в группе Д. Совместное воздействие СТЗ и ИРП ухудшало дыхание в состоянии 2 и 3 по сравнению с этими показателями у крыс диабетической группы ($p = 0.038$ и $p < 0.01$ соответственно) и у животных с ИРП ($p = 0.022$ и $p = 0.004$ соответственно). Это приводило к уменьшению ДК по сравнению с группой Д и ИР ($p = 0.037$ и $p = 0.05$ соответственно). Функциональная активность мт-КК в группе Д+ИР была заметно ниже, чем в группах Д и ИР, однако различия между этими группами были статистически недостоверными. Введение пептида G диабетическим

животным после региональной ишемии миокарда увеличивало максимальное ADP-стимулированное состояние 3 и ДК в 2.3 и 1.6 раза по сравнению с этими показателями в группе Д+ИР ($p = 0.011$ и $p = 0.022$ соответственно). Функциональная связь мт-КК с ОФ в группе Д+ИРPG возрастала в 2.4 раза по сравнению с группой Д+ИР. Репрезентативные протоколы дыхания, демонстрирующие изменения в состоянии 3 в изученных группах, показаны в Приложениях (рис. S3). Добавление 10 мкМ цитохрома с не влияло на ADP-стимулированное дыхание в группах Д, Д+ИР и Д+ИРPG в конце эксперимента по сравнению с контролем. Процентное отношение $V_{\text{сyt c}}/V_{\text{ADP}}$ в этих группах составило в среднем $103.5 \pm 1.9\%$, что свидетельствует об отсутствии повреждения наружной мембраны МХ под влиянием СТЗ и ИР.

Энергетическое состояние миокарда

В контроле содержание АТФ, АДФ, АМР, PCr и Cr в ЛЖ сердца после 16-дневного эксперимента не отличалось статистически значимо от исходных величин (табл. 3). У животных диабетической группы отмечено достоверное снижение содержания АТФ, Σ AN, PCr и Σ Cr по сравнению с этими показателями в контроле ($p < 0.05$ – 0.001). Более сильное воздействие на АТФ и Σ AN в ЗР оказывало ИРП сердца. В этом случае снижение этих параметров было в среднем в 1.3 раза больше, чем в контроле ($p < 0.003$ и $p < 0.002$ соответственно). Введение СТЗ и последующая региональная ишемия и реперфузия сердца увеличивали потери АТФ и Σ AN в ЗР по сравнению с этими показателями в сердце животных диабетической группы ($p = 0.001$ и $p = 0.008$ соответственно). Эти изменения в содержании адениннуклеотидов приводили к снижению аденилатного энергетического заряда (АЭЗ) кардиомиоцитов по сравнению со снижением в группах Д и ИР ($p < 0.01$ и $p < 0.001$ соответственно). Отсутствовали достоверные изменения в системе PCr–Cr в ЗР животных группы Д+ИР по сравнению с группами Д и ИР. Введение пептида G животным диабетической группы в начале реперфузии улучшало энергетическое состояние ЗР к окончанию реперфузии. Это проявлялось в поддержании более высокого уровня АТФ и Σ AN по сравнению с этими показателями в группе Д+ИР (в 1.4 и 1.25 раза, $p = 0.023$ и $p = 0.04$ соответственно) и достоверно более высокому АЭЗ кардиомиоцитов ($p = 0.022$). Под действием пептида G содержание Σ Cr в ЗР было выше, чем группе Д+ИР ($p = 0.007$) и достоверно не отличалось от значения в контроле.

ОБСУЖДЕНИЕ

Моделирование СД1 у крыс введением СТЗ помимо гипергликемии и отсутствия прироста массы

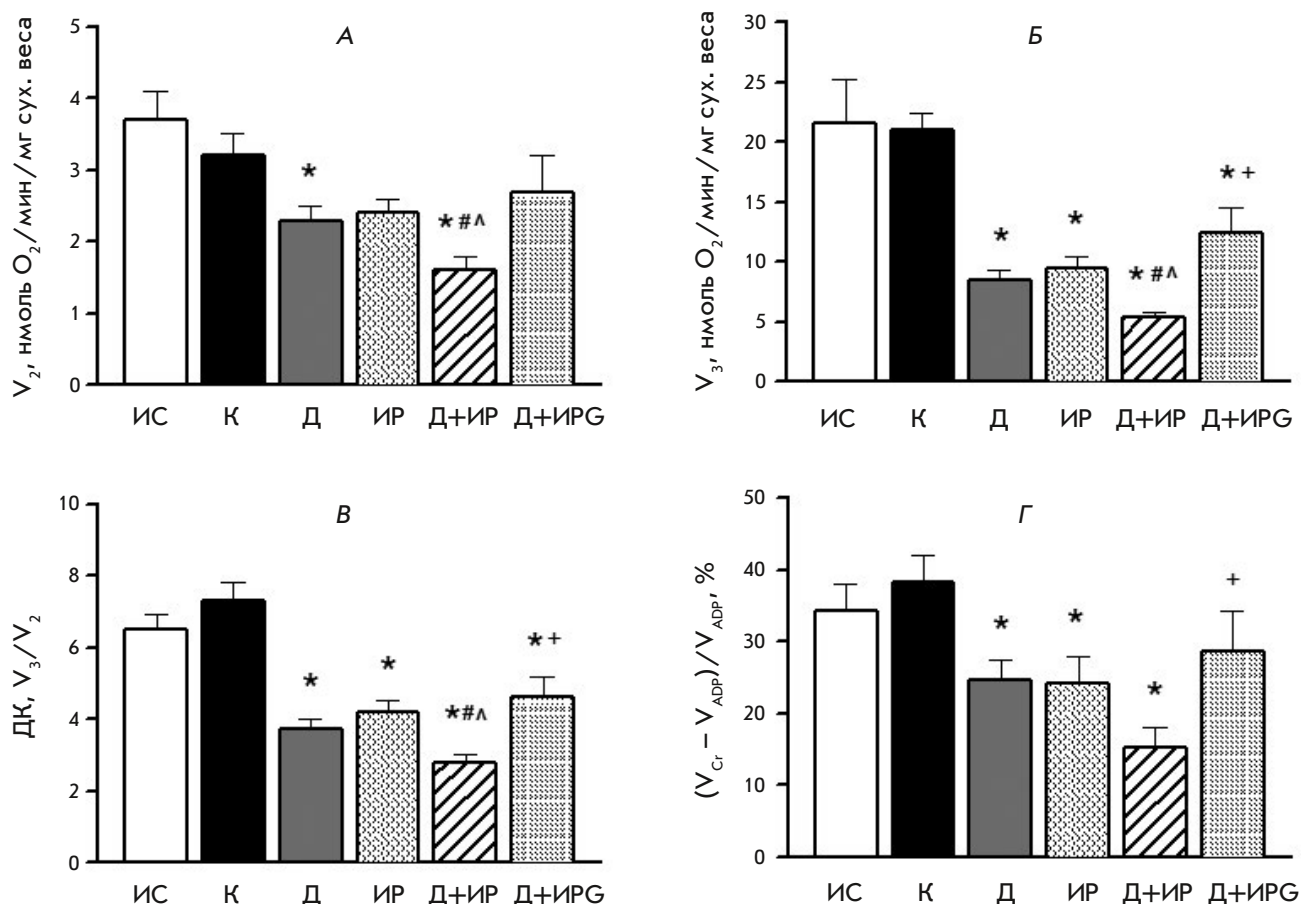


Рис. 4. Параметры митохондриального дыхания в скинированных сапонином волокнах ЛЖ в присутствии 10 мМ глутамата и 5 мМ малата. А – скорость потребления кислорода в состоянии 2 (V_2); Б – скорость потребления кислорода в состоянии 3 (V_3); В – дыхательный контроль ДК = V_3/V_2 ; Г – степень связывания мт-КК с ОФ ($(V_{Cr} - V_{ADP})/V_{ADP}$, %). Значения представлены как $M \pm m$ для групп из пяти животных. $p < 0.05$ по сравнению с: *К; # Д; ^ ИР; + Д+ИР

Таблица 3. Энергетическое состояние миокарда крыс в изученных группах

Показатель	ИС	К	Д	ИР	Д+ИР	Д+ИРГ
АТФ	20.16±1.27	19.16±1.56	14.53±1.21*	10.34±1.45*	8.11±0.44*#	11.27±1.04*+
АДП	5.47±0.43	5.36±0.53	4.93±0.68	4.54±0.51	4.98±0.27	5.69±0.34
АМФ	1.03±0.14	1.13±0.24	1.02±0.27	0.97±0.14	1.75±0.28^	2.20±0.15*#^
ΣAN	26.66±1.87	25.68±1.90	20.43±1.24*	15.86±1.12*#	14.83±1.02*#	18.68±1.35*+
АЭЗ	0.85±0.01	0.85±0.02	0.82±0.01	0.79±0.02	0.71±0.01*#^	0.75±0.01*#+
PCr	25.34±1.98	25.29±1.39	15.62±0.95*	13.86±2.02*	17.06±1.54*	18.89±1.25*
Cr	37.21±2.77	34.98±1.36	32.54±2.77	31.54±2.67	30.57±1.47	34.42±2.41
ΣCr	62.55±2.15	60.27±1.37	48.16±2.03*	45.40±2.33*	47.63±0.74*	52.86±1.26*+^

Данные представлены как $M \pm m$ ($n=5$) и выражены для метаболитов в мкмоль/г сух. веса. ИС – исходное состояние. $\Sigma AN = ATP + ADP + AMP$; $АЭЗ = (ATP + 0.5 ADP) / \Sigma AN$; $\Sigma Cr = PCr + Cr$. $p < 0.05$ от: * К и ИС, # Д, ^ ИР, + Д+ИР.

тела сопровождалось истощением запасов макроэргических фосфатов и сопутствующим снижением ΣAN и ΣCr в сердце. Обнаруженные нарушения энергетического обеспечения кардиомиоцитов сочетались с глубоким снижением максимально-

го ADP-стимулированного потребления кислорода в состоянии 3 и уменьшением функциональной активности мт-КК, оцененной в тесте с Cr. Обычно такие изменения дыхания митохондрий связывают с ограничением продукции АТФ [19] и уве-

личением образования АФК [20]. Действие СТЗ-индуцированного диабета сопровождалось увеличением уровня циркулирующих КК-МВ и ЛДГ, что свидетельствовало о повреждении миокарда. Повышенная активность КК-МВ и ЛДГ в плазме была обнаружена ранее на моделях диабетической кардиомиопатии, вызванной введением СТЗ лабораторным животным [21], и у пациентов с диабетом [22]. Последующая региональная ишемия и реперфузия сердца у крыс, получавших СТЗ, вызвала увеличение некротического повреждения ЛЖ (до 25.6%) и значительное возрастание активности обоих маркеров некроза в плазме по сравнению с диабетическими животными. Некротическая гибель кардиомиоцитов в ЗР сопровождалась ухудшением дыхательной функции митохондрий, большими потерями АТР и Σ АН, чем у крыс с диабетом, и снижением АЭЗ кардиомиоцитов к окончанию реперфузии. Следует отметить, что совместное воздействие СТЗ и ИР существенно увеличивало размеры инфаркта, выраженные отношением ИМ/ЗР (%), по сравнению только с одной региональной ишемией и реперфузией.

Настоящая работа впервые продемонстрировала защитное действие введения G в начале реперфузии после периода региональной ишемии у крыс с СД1. G существенно уменьшал размеры ИМ и активность КК-МВ в плазме этих крыс по сравнению с животными диабетической группы Д+ИР. Эти эффекты могли быть обусловлены в том числе снижением дисфункции митохондрий, на что указывает увеличение АДР-стимулированного дыхания в состоянии 3, ДК и улучшение функционального сопряжения мт-КК с ОФ. В результате происходило повышение уровня АТР, Σ АН и АЭЗ кардиомиоцитов и лучшее сохранение Σ Cr в ЗР. Ранее мы обнаружили способность G уменьшать реперфузионное повреждение сердца крысы *in situ*, которая выражалась в ограничении размеров ИМ и снижении повреждения мембран кардиомиоцитов [23]. Она была связана со снижением образования активных форм кислорода (АФК) и продуктов ПОЛ в реперфузированном миокарде. В настоящей работе избыточная продукция АФК и ПОЛ, индуцированная диабетической гипергликемией и последующей региональной ишемией и реперфузией сердца, могла быть ведущей причиной дисфункции митохондрий и некротической гибели клеток [24]. Не исключено, что защитное действие G может быть обусловлено его антиоксидантными свойствами – усилением экспрессии генов *SOD*, *CAT* и *GSH-Px*, кодирующих ферменты системы антиоксидантной защиты сердца, и/или способностью перехватывать АФК и ингибировать ПОЛ [12, 23].

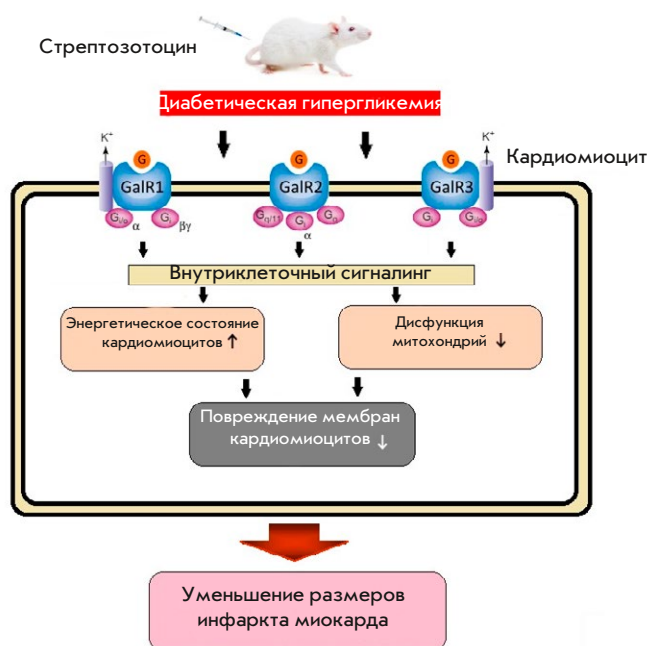


Рис. 5. Активация внутриклеточной сигнализации G при стрептозотоциновой гипергликемии у крыс снижает митохондриальную дисфункцию, улучшает энергетическое состояние миокарда и уменьшает повреждение клеточных мембран в зоне риска реперфузированного сердца, что приводит к уменьшению размеров инфаркта

Помимо регуляции свободнорадикальных процессов, активация G различных путей сигнализации при связывании с рецепторами GalR1-3 может способствовать уменьшению повреждения клеток [10]. Это принципиально важно, поскольку диабет нарушает внутриклеточные сигнальные каскады, активируемые RISK-киназами, ответственные за повышение резистентности клеток к повреждениям и прежде всего сигнальный путь PI3K/Akt [2, 3]. Основные звенья внутриклеточного сигналинга, активируемого G, показаны в Приложениях (рис. S4). Наиболее физиологически значимые из них приводят к стимуляции захвата глюкозы кардиомиоцитами, ингибированию проапоптотических белков BAD/BAX, каспазы-3 и каспазы-9, блокированию открытия митохондриальной поры временной проницаемости (mPTP) и увеличению экспрессии рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPAR). Запуск этих адаптационных механизмов имеет решающее значение в условиях сниженной продукции АТР при диабете и реперфузии сердца [25]. Как известно, снижение апоптоза кардиомиоцитов в моделях *in vivo* сопровождается ограничением размеров ИМ и улучшением сократительной функции сердца [26], ингибирование открытия mPTP способствует выживанию и подвижности клеток [27], а экспрессия PPAR γ стимулирует поглощение

и окисление глюкозы кардиомиоцитами [28]. На рецепторную природу действия G указывает и тот факт, что блокада рецептора GalR2 селективным антагонистом M871 при ИПП сердца значительно ослабляла защитный потенциал G, увеличивая размеры ИМ и активность маркеров некроза в плазме [11]. В этом контексте важно, что действие полноразмерного галанина, связывающегося со всеми подтипами его рецепторов GalR1-3, воспроизводится N-концевыми природными и модифицированными фрагментами G, обладающими высокой аффинностью к GalR2 [10]. Это указывает на потенциальную роль активации GalR2 для лечения/профилактики ИПП миокарда у пациентов с СД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа подтверждает влияние стрептозотоцинового диабета на восприимчивость миокарда крыс к ИПП. Показано, что в этих условиях введение G при возобновлении реперфузии значительно снижало ИМ. Этот эффект связан с запуском внутриклеточной сигнализации через сопряженные с G-белками трансмембранные рецепторы GalR1, GalR2 и GalR3 (рис. 5). Защитное действие G

проявлялось в уменьшении дисфункции митохондрий, результатом которой было улучшение энергетического состояния реперфузированной области миокарда. Эти положительные сдвиги в энергетике миокарда сопровождались снижением повреждения клеточных мембран. В целом, полученные результаты указывают на потенциальную возможность применения G в качестве дополнительной терапии при СД1 с ИПП миокарда. В связи с этим дальнейшее изучение молекулярных механизмов снижения реперфузионного стресса в диабетическом сердце с помощью природных и модифицированных пептидов галанина представляется важной задачей. ●

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00008) и Минздрава РФ (НИОКТР 121031700143-1).

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

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27506>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dia M., Paccalet A., Pillot B., Leon Ch., Ovize M., Claire C., Bochaton Th., Paillard M. // Front. Cardiovasc. Med. 2021. V. 8. P. 660698.
- Lejay A., Fang F., John R., Thaveau F., Chakfe N., Geny B., Scholey J. // J. Mol. Cell. Cardiol. 2016. V. 91. P. 11–22.
- Gao S., Wang R., Dong S., Wu J., Perek B., Xia Z., Yao Sh., Wang T. // Oxid. Med. Cell. Longev. 2021. P. 6657529.
- Ding M., Lei J., Han H., Li W., Qu Y., Fu E., Fu F., Wang X. // Cardiovasc. Diabetol. 2015. V. 14. P. 143.
- Li D., Huang B., Liu J., Li L., Li X. // PLoS One. 2013. V. 8. P. e73334.
- Riquelme J.A., Westermeier F., Hall A.R., Vicencio J.M., Pedrozo Z., Ibacache M., Fuenzalida B., Sobrevia L., Davidson S.M., Yellon D.M., et al. // Pharmacol. Res. 2016. V. 103. P. 318–327.
- Díaz-Cabiale Z., Parrado C., Narváez M., Millón C., Puigerver A., Fuxe K., Narváez J.A. // EXS. 2010. V. 102. P. 113–131.
- Lang R., Gundlach A.L., Holmes F.E., Hobson S.A., Wynick D., Hökfelt T., Kofler B. // Pharmacol. Rev. 2015. V. 67. P. 118–175.
- Webbing K.E., Runesson J., Bartfai T., Langel U. // Front. Endocrinol. 2012. V. 3. P. 146.
- Pisarenko O.I., Studneva I.M., Veselova O.M. // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. № 10. P. 1342–1351.
- Serebryakova L., Veselova O., Studneva I., Dobrokhoto I., Palkeeva M., Avdeev D., Molokoedov A., Ovchinnikov M., Sidorova M., Pisarenko O. // Fundam. Clin. Pharmacol. 2022. V. 37. № 6. P. 1109–1118.
- Pisarenko O.I., Studneva I.M., Serebryakova L.I., Timoshin A.A., Kononova G.G., Lankin V.Z., Tihaze A.K., Veselova O.M., Dobrokhoto I.V., Sidorova M.V., et al. // Biochemistry (Moscow). 2021. V. 86. № 4. P. 496–505.
- Veselova O., Studneva I., Dobrokhoto I., Palkeeva M., Molokoedov A., Sidorova M., Pisarenko O. // Int. J. Peptide Res. Therap. 2022. V. 28. P. 103.
- Sidorova M.V., Palkeev M.E., Avdeev D.V., Molokoedov A.S., Ovchinnikov M.V., Azmuko A.A., Serebryakova L.I., Veselova O.M., Studneva I.M., Pisarenko O.I. // Rus. J. Bioorg. Chem. 2020. V. 46. P. 32–42.
- Chen H., Brahmbhatt S., Gupta A., Sharma A. // Cardiovasc. Diabetol. 2005. V. 4. P. 3.
- Saks V.A., Veksler V.I., Kuznetsov A.V., Kay L., Sikk P., Tiivel T., Tranqui L., Olivares J., Winkler K., Wiedemann F., et al. // Mol. Cell. Biochem. 1998. V. 184. № 1–2. P. 81–100.
- Kuznetsov A.V., Veksler V., Gellerich F.N., Saks V., Margreiter R., Kunz W.S. // Nat. Prot. 2008. V. 3. № 6. P. 965–976.
- Bergmeyer H.U. Methods of enzymatic analysis. 4th edn. N.Y.: Acad. Press, 1974. pp. 1196–1200, 1475–1478, 1772–1776, 1777–1781, 2101–2110.
- Avram V.F., Merce A.P., Hâncu I.M., Bătrân A.D., Kennedy G., Rosca M.G., Muntean D.M. // Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 8852.
- Dominiak K., Jarmuszkiewicz W. // Antioxidants. 2021. V. 10. № 3. P. 533.
- Huang E.J., Kuo W.W., Chen Y.J., Chen T.H., Chang M.H., Lu M.C., Tzang B.S., Hsu H.H., Huang C.Y., Lee S.D. // Clin. Chim. Acta. 2006. V. 366. P. 293–298.
- Fuleshwar M., Pratik A., Deepak K. // Sciences. 2013. V. 3. P. 51–54.
- Serebryakova L., Studneva I., Timoshin A., Veselova O., Palkeeva M., Ovchinnikov M., Azmuko A., Molokoedov A., Sidorova M., Pisarenko O. // Inter. J. Pept. Res. Ther. 2021. V. 27. P. 2039–2048.
- Münzel T., Camici G.G., Maack C., Bonetti N., Fuster V., Kovacic J. // J. Am. Coll. Cardiol. 2017. V. 70. P. 212–229.
- Tian R., Abel E.D. // Circulation. 2001. V. 103. P. 2961–2966.
- Krijnen P.A., Nijmeijer R., Meijer C.J., Visser C.A., Hack C.E., Niessen H.W.M. // J. Clin. Pathol. 2002. V. 55. P. 801–811.
- Hausenloy D.J., Yellon D.M. // J. Clin. Invest. 2013. V. 203. P. 123.
- Jay M.A., Ren J. // Curr. Diab. Rev. 2007. V. 3. P. 33–39.