

УДК 615+616-05

АНТИОКСИДАНТНЫЕ СВОЙСТВА ГАЛАНИНА И ЕГО N-КОНЦЕВЫХ ФРАГМЕНТОВ ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *in vitro* И *in vivo**

© 2021 О.И. Писаренко**, И.М. Студнева, Л.И. Серебрякова, А.А. Тимошин,
Г.Г. Коновалова, В.З. Ланкин, А.К. Тихазе, О.М. Веселова, И.В. Доброхотов,
Р.О. Любимов, М.В. Сидорова, М.Е. Палькеева, А.С. Молокоедов

ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава РФ, 121552 Москва, Россия; электронная почта: olpi@live.ru

Поступила в редакцию 21.12.2020

После доработки 04.02.2021

Принята к публикации 08.02.2021

Антиоксидантные свойства галанина крысы GWTLNSAGYLLGPHAIIDNHRFSFDKHGLT-NH₂ (Gal), N-концевого фрагмента галанина (2–15 а. о.) WTLNSAGYLLGPHA (G1) и его модифицированного аналога WTLNSAGYLLGPHAN (G2) изучены на моделях региональной ишемии и реперфузии сердца крысы *in vivo* и Cu²⁺-индуцированного свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности в плазме человека *in vitro*. Пептиды получены автоматическим твердофазным синтезом с использованием Fmoc-методологии. Их структура охарактеризована с помощью 1H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF масс-спектрометрии. Полученные данные о влиянии пептидов показали, что внутривенное введение G1, G2 и Gal крысам после индуцированной ишемии уменьшало размеры инфаркта миокарда и активность маркеров некроза, креатинкиназы-MB и лактатдегидрогеназы, в плазме крови к концу реперфузии. G1, G2 и Gal снижали образование спинового аддукта гидроксильных радикалов в интерстиции зоны риска сердца при реперфузии; более того, G2 и Gal также снижали образование вторичных продуктов перекисного окисления липидов в реперфузированном миокарде. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* показано, что способность пептидов галанина снижать продукцию АФК и ингибировать перекисное окисление липидов при реперфузионном повреждении миокарда не связана напрямую с их влиянием на активность ферментов антиоксидантной защиты – Cu,Zn-супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы. Пептиды G1, G2 и Gal в концентрации 0,01 и 0,1 мМ ингибировали Cu²⁺-индуцированное свободнорадикальное окисление липопротеидов низкой плотности человека *in vitro*. Полученные при моделировании окислительного стресса результаты показывают, что природные и синтетические агонисты рецепторов галанина снижают продукцию короткоживущих АФК в сердце, а также липидных радикалов в плазме крови. Таким образом, рецепторы галанина могут быть перспективной терапевтической мишенью при сердечно-сосудистых заболеваниях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: галанин, сердце, ишемия и реперфузия, некроз, перекисное окисление липидов, антиоксидантные ферменты, мембраны кардиомиоцитов.

DOI: 10.31857/S0320972521040102

ВВЕДЕНИЕ

Нейропептид галанин, состоящий у крысы из 29 аминокислотных остатков (а. о.) (из 30 – у человека), участвует в жизненно важных процессах – запоминания, потребления пищи, засыпания, продукции ряда гормонов; на клеточном уровне – в поддержании ионного гомеостаза и осмоса. Этот пептид также играет роль в

развитии алкогольной зависимости и невропатической боли. В периферических органах, включая сердце, действие галанина опосредовано не только нейрональными механизмами, но и активацией трансмембранных рецепторов GalR1, GalR2 и GalR3 [1]. За связывание с рецепторами отвечает N-концевой фрагмент пептида, первые 15 а. о. которого консервативны и сохраняются у большинства видов. Роль рецеп-

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ДМПО – 5,5-диметил-1-пирролин N-оксид; ДМСО – диметилсульфоксид; ЗР – зона риска; И/Р – ишемия/реперфузия; ИМ – инфаркт миокарда; КК-MB – креатинкиназа-MB; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ЛЖ – левый желудочек; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; ПНА – передняя нисходящая коронарная артерия; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ВНТ – бутилированный гидрокситолуол; САТ – каталаза; Cu,Zn-SOD – Cu,Zn-супероксиддисмутазы; GSH-Px – глутатионпероксидаза.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-393, 25.03.2021.

** Адресат для корреспонденции.

торов галанина в регуляции сердечно-сосудистой системы в норме и при патологии малоизучена. Исследования последних лет показали, что запуск сигнального пути через рецептор GalR2 *N*-концевыми фрагментами галанина H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-OH (2–11) и H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-OH (2–15) (G1) ингибирует апоптоз при гипоксии/реоксигенации изолированных кардиомиоцитов крысы и кардиомиоцитов клеточной линии H9c2 благодаря снижению продукции супероксидного анион-радикала и пероксида водорода в митохондриях [2, 3]. Оба пептида способствуют метаболическому и функциональному восстановлению сердца крысы после повреждения, индуцированного ишемией/реперфузией (И/Р) *ex vivo* и *in vivo*. Благодаря указанным выше свойствам пептидов, становится перспективной возможность использования фармакологических агонистов рецепторов галанина для уменьшения повреждения ишемизированного сердца. Для оптимизации физико-химических свойств фрагментов галанина мы синтезировали ряд модифицированных аналогов пептида G1 с сохранением фармакофорных а. о., ответственных за связывание с рецептором GalR2. Общая формула этих пептидов – Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-X-Gly-Pro-Y, где X = Leu, Y = His-Ala-NH₂; или X = Nle, Y = His-Arg-OH; или X = Leu, Y = βAla-His-OH (G2). Изучение этих пептидов на моделях И/Р повреждения сердца продемонстрировало их кардиотропные свойства [4]. Наиболее эффективной оказалась химерная молекула G2, представляющая собой последовательность галанина (2–13), дополненную природным дипептидом карнозином, H-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-βAla-His-OH [5]. В недавнем исследовании, выполненном на крысах с кардиомиопатией, вызванной введением доксорубина, применение пептида G2 уменьшало дисфункцию сердца [6]. Защитный эффект сопровождался снижением перекисного окисления липидов (ПОЛ) вследствие увеличения активности Cu,Zn-супероксиддисмутазы (Cu,Zn-SOD) и глу-

татионпероксидазы (GSH-Px) в поврежденном миокарде, а также улучшением энергетического обеспечения кардиомиоцитов. Настоящая работа является продолжением исследования антиоксидантных свойств лигандов рецепторов галанина. Цели данной работы: (1) изучение действия синтетического пептида G2, природного фрагмента галанина (2–15) G1, и полноразмерного галанина крысы (1–29) (Gal) на активность Cu,Zn-SOD, GSH-Px и каталазы (CAT), образование активных форм кислорода (АФК) и продуктов ПОЛ в ишемизированном сердце крысы *in vivo*; (2) изучение действия указанных пептидов на активность ферментов Cu,Zn-SOD, GSH-Px и CAT в модельных системах *in vitro*; (3) оценка влияния пептидов на уровень свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности (ЛНП) при его индукции *in vitro* с помощью Cu²⁺.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пептиды галанина. В работе использованы Gal и его *N*-концевые фрагменты G1 и G2, полученные путём ступенчатого твердофазного синтеза с использованием Fmoc-методологии в лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «НМИЦ кардиологии» МЗ РФ [5, 7]. Их очистка проведена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на обращённой фазе, структура охарактеризована с помощью 1H-ЯМР-спектроскопии и MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) масс-спектрометрии. Характеристики пептидов представлены в таблице 1.

Модельные животные. Для изучения влияния пептидов на сердце при ишемии и реперфузии использовали самцов крыс Wistar (массой 300–350 г). Животных содержали в виварии в условиях естественного освещения и свободного доступа к воде и корму. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода за лабораторными животными и их использования в экспериментах были соблюдены.

Таблица 1. Характеристики пептидов галанина

| Пептид | Последовательность | Мол. вес, г/моль | MALDI-TOF, m/z |
|--------|---|------------------|----------------|
| Gal | GWTLNSAGYLLGPH AIDNHRFSDKHGLT-NH ₂ | 3164,4 | 3163,47 |
| G1 | WTLNSAGYLLGPHA | 1499,7 | 1499,72 |
| G2 | WTLNSAGYLLGPHAN | 1499,7 | 1499,76 |

Примечание. Замены аминокислот показаны жирным шрифтом.

Модель региональной ишемии и реперфузии у крыс *in vivo*. Крыс Wistar наркотизировали 20%-ным уретаном (1200 мг/кг веса внутрибрюшинно) и в условиях торакотомии осуществляли искусственную вентиляцию лёгких комнатным воздухом с помощью аппарата KTR-5 («Hugo Sacks Electronik», Германия). Яремную вену катетеризировали для окрашивания сердца 1%-ным раствором Эванса в конце процедуры, сонную артерию — для регистрации артериального давления. Регистрацию систолического артериального давления (САД) и частоты сердечных сокращений (ЧСС) проводили на полиграфе Biograph-4 (Санкт-Петербургский госуниверситет аэрокосмического приборостроения, Россия) при присоединении артериального катетера к тензометрическому датчику. Запись на компьютер выполнена с помощью аналогоцифрового преобразователя USB-6210 и программы LabView 7 («National Instruments», США) [5]. По окончании подготовки животного следовал 30-минутный период стабилизации гемодинамических показателей (далее — «исходное состояние»), затем проводилась окклюзия передней нисходящей коронарной артерии (ПНА) в течение 40 мин, после чего следовал период реперфузии в течение 60 мин. В экспериментальной серии после периода региональной ишемии внутривенно болюсом вводили пептиды Gal, G1 и G2 в дозах 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 или 3,0 мг/кг веса одновременно с началом реперфузии; в контрольной серии опытов — такой же объём физиологического раствора (0,5 мл). В отдельной серии экспериментов было исследовано влияние растворителя пептидов 0,2%-ного раствора диметилсульфоксида (ДМСО) на размеры инфаркта миокарда (ИМ). В конце процедуры для идентификации зоны риска (ЗР) и интактной области миокарда реокклюдировали ПНА и в яремную вену вводили болюсно 2%-ный раствор Эванса (2 мл). Затем сердце вырезали и выделяли левый желудочек (ЛЖ) для последующего определения размеров ИМ.

Оценка некротической гибели кардиомиоцитов в зоне риска. Степень некроза кардиомиоцитов в ЗР определяли по площади ИМ методом компьютерной планиметрии с помощью программы ImageJ (NIH, США). Замороженный ЛЖ разрезали перпендикулярно длинной оси сердца на 4–5 срезов толщиной $\approx 1,5$ –2,0 мм, которые затем инкубировали 10 мин в 1%-ном растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида в 0,1 М калий-фосфатном буфере (рН 7,4 при 37 °С) и фиксировали в 10%-ном формалине. Полученные образцы сканировали для определения площади ИМ и ЗР на сохраненных изображениях. Срезы взвешивали для определения массы ЛЖ.

В каждой группе рассчитывали отношение «зона риска/вес левого желудочка» (ЗР/ЛЖ) и «инфаркт миокарда/зона риска» (ИМ/ЗР), выраженное в процентах [8].

Оценка повреждения клеточных мембран. Повреждение мембран кардиомиоцитов оценивали по увеличению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинкиназы-МВ (КК-МВ) в плазме крови. Около 0,5 мл крови собирали в гепаринизированные пробирки из венозного катетера крысы в исходном состоянии (перед окклюзией ПНА) и после часа реперфузии. Активность ферментов в плазме определяли на спектрофотометре UV-1800 («Shimadzu», Япония) при $\lambda = 340$ нм с использованием наборов «BioSystems SA» (Испания).

Определение активности антиоксидантных ферментов и содержания продуктов свободнорадикального окисления липидов в ЗР. Ткань зоны риска сердца крысы, замороженную в жидком азоте, гомогенизировали в 50 мМ натрий-фосфатном буфере (рН 7,4; вес/объем 1 : 10) при помощи гомогенизатора Ultra-Turrax T18 («IKA Werke», Германия) и центрифугировали на Sigma 3-16KL (Германия) при 1000 g и 4 °С в течение 10 мин. В супернатанте определяли содержание вторичных продуктов ПОЛ (реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой — TBARS) и активность антиоксидантных ферментов (Cu,Zn-SOD, GSH-Px и CAT). Активность Cu,Zn-SOD определяли по ингибированию восстановления *n*-нитротетразолия синего супероксидным радикалом, генерируемым в системе ксантин–ксантинооксидаза. Кинетику образования формазана регистрировали на спектрофотометре UV-2600 («Shimadzu», Япония) при 560 нм. За единицу активности Cu,Zn-SOD принимали количество фермента, необходимое для 50%-ного подавления восстановления *n*-нитротетразолия синего; результаты выражали в ед. акт./мг белка [9]. Активность CAT определяли по скорости расходования H₂O₂ при 20 °С в течение 1 мин. Измерения проводили при 240 нм на спектрофотометре UV-2600. При расчете активности использовали коэффициент молярной экстинкции пероксида водорода $\varepsilon = 43,6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для утилизации 1 мкмоль H₂O₂ в минуту; результаты также выражали в ед. акт./мг белка [10]. Активность GSH-Px определяли в сопряженной системе глутатион–глутатионредуктаза по окислению NADPH, используя гидропероксид третбутила в качестве субстрата. Скорость окисления NADPH ($\lambda = 340$ нм) определяли в термостатируемой 9-канальной кювете при 30 °С на химическом анализаторе FP-900 («Labsystems

Оу», Финляндия). За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для окисления 1 мкмоль восстановленного глутатиона в условиях определения; результаты выражали в ед. акт./мг белка [11]. В супернатанте гомогената сердечной мышцы белки осаждали 10%-ной трихлоруксусной кислотой (1 : 1) и определяли содержание вторичных продуктов ПОЛ по реакции с 2-тиобарбитуровой кислотой, анализируя количество образовавшегося триметинового комплекса при $\lambda = 532$ нм на спектрофотометре UV-2600 [12].

Оценка влияния пептидов на активность антиоксидантных ферментов. Коммерческие препараты Cu,Zn-SOD и GSH-Px из бычьих эритроцитов и CAT из бычьей печени («Sigma», США) растворяли в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4 в концентрации 250 мкг/мл. Активность ферментов составила $145,3 \pm 3,19$; $462,8 \pm 43,07$; $12,73 \pm 0,45$ ед./мл соответственно. Затем в раствор, содержащий ферменты, вводили растворы пептидов G1, G2 и Gal в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4 до конечных концентраций 0,01 и 0,1 мМ и инкубировали полученные смеси при 4 °C в течение 24 ч. После окончания инкубации активность Cu,Zn-SOD, CAT и GSH-Px определяли согласно описанным методикам [9–11].

Исследование влияния пептидов на свободнорадикальное окисление ЛНП человека. Для препаративного выделения липопротеидов низкой плотности (ЛНП) плазму крови доноров, содержащую 1 мг/мл ЭДТА, подвергали двукратному центрифугированию в градиенте плотности $1,019\text{--}1,063$ г/см³ NaBr в течение 2 ч при скорости 42 000 об./мин в угловом роторе 50Ti при 4 °C в рефрижераторной ультрацентрифуге Optima XPN-80 («Beckman Coulter», США) согласно описанной методике [13]. Полученные ЛНП диализовали в изотоничном (0,154 М NaCl) 50 мМ K,Na-фосфатном буфере pH 7,4 при 4 °C в течение 16 ч. Короткое время центрифугирования позволяет избежать окисления нативных ЛНП в процессе выделения. При электрофорезе в образцах ЛНП, полученных описанным методом, не было выявлено существенных загрязнений другими фракциями липопротеидов или белка плазмы.

После диализа содержание белка в образцах ЛНП определяли по методу Лоури. Затем пробы белка разбавляли до 50 мкг/мл раствором, содержащим 0,154 М NaCl в 50 мМ K,Na-фосфатном буфере pH 7,4, добавляли пептиды галанина в концентрациях 0,01 и 0,1 мМ. Окисление ЛНП индуцировали при 37 °C введением 30 мкМ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, после чего через фиксированные интервалы времени измеряли накопленные липогидропероксидов при $\lambda = 233$ нм на

спектрофотометре UV-2600. Степень ингибирования свободнорадикального окисления ЛНП характеризовали продолжительностью периода индукции (лаг-фазы) окисления (τ), за который принимали время достижения оптической плотности при $\lambda = 233$ нм на кинетических кривых окисления ЛНП, равное 0,15 ($\Delta D_{233} = 0,15$) [13]. В референсную пробу вносили 0,01 мМ синтетического фенольного антиоксиданта, бутилированного гидрокситолуола (ВНТ) в растворе этанола (конечное содержание этанола 0,25%). Предварительно было показано, что внесение 0,25%-ного этанола в пробу не влияет на продолжительность лаг-фазы при окислении ЛНП без других добавок.

Мониторирование продукции АФК в ЗР сердца крысы с помощью спиновой ловушки. Для регистрации уровня короткоживущих кислородных радикалов в зоне риска ЛЖ использовали метод микродиализа и спиновую ловушку 5,5-диметил-1-пирролин *N*-оксид (ДМПО). Это соединение способно эффективно взаимодействовать как с супероксидными, так и с гидроксильными радикалами с образованием относительно стабильных спиновых аддуктов, регистрируемых методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [14]. В область региональной ишемии имплантировали микродиализное волокно (внешний диаметр 0,25 мм, проницаемое для веществ с молекулярной массой < 5 кДа), которое с помощью микронасоса перфузировали со скоростью 3 мкл/мин раствором Рингера (pH 7,4 при 37 °C) с содержанием 100 мМ ДМПО. Вытекающий диализат собирали последовательными фракциями по 20 мин в пластиковые пробирки, охлажденные до 0 °C. Образцы диализатов замораживали и хранили в жидком азоте. Спектры ЭПР образцов диализата, содержащего спиновую ловушку ДМПО, регистрировали на спектрометре X-диапазона E-109E («Varian», США) при комнатной температуре. Амплитуда высокочастотной модуляции магнитного поля составляла 0,1 мТл при частоте 100 кГц. Частота СВЧ поля спектрометра составляла 9,14 ГГц, а его мощность устанавливалась на уровне 10 мВт. Сканирование магнитного поля при записи сигналов осуществлялось центром при $g = 2,00$.

Статистическая обработка данных. Для обработки полученных данных использовали пакет программ SigmaPlot 11.2 («SysStat», США). Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения ($M \pm SEM$). При сравнении нескольких групп с контролем использовали *t*-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Влияние пептидов на И/Р повреждение сердца у крыс *in vivo*. Гистохимический анализ срезов ЛЖ после реперфузии не выявил достоверных различий в размерах ЗР между контролем, пептидами галанина и 0,2%-ным ДМСО. Для исследованных групп величина ЗР/ЛЖ в среднем составляла $40,5 \pm 1,3\%$, что свидетельствует о единообразии моделирования И/Р повреждения у всех животных. В контроле величина ИМ, выраженная отношением ИМ/ЗР в процентах, составляла $43,0 \pm 2,0\%$ (рис. 1, а). Введение 0,2%-ного ДМСО не влияло на размеры ИМ – в этом случае отношение ИМ/ЗР составляло $41,6 \pm 3,1\%$. В то же время внутривенное введение каждой из исследованных доз пептидов приводило к уменьшению размеров ИМ. Оптимальная доза для Gal составила 0,5 мг/кг, для G1 и G2 – 1,0 мг/кг. Использование этих доз Gal и G2 снижало размеры ИМ в среднем на 40%, G1 – на 27% по сравнению с контролем ($p < 0,001$). Развитие ИМ в контроле к концу реперфузии сопровождалось значительным увеличением активности КК-МВ и ЛДГ в плазме по сравнению с исходным состоянием (рис. 1, б, в). Введение 0,2%-ного ДМСО не влияло на активность обоих ферментов по сравнению с контролем. Введение оптимальных доз пептидов Gal, G1 и G2 уменьшало активность ЛДГ и КК-МВ к окончанию реперфузии в среднем на 30% по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Эти данные отражают снижение уровня некроза кардиомиоцитов в ЗР под действием галанина и его N-концевых фрагментов. В дальнейшем на этой модели были использованы указанные выше оптимальные концентрации пептидов.

Влияние пептидов на продукцию АФК в ЗР сердца крысы. Регистрируемые спектры ЭПР образцов диализата состояли из четырёх узких эквидистантных линий, соотношение амплитуд которых составило 1 : 2 : 2 : 1, характерных для парамагнитного аддукта ДМПО-ОН, образующегося в результате взаимодействия ДМПО и гидроксида [14]. На рисунке 2 представлены изменения в содержании аддукта ДМПО-ОН в образцах диализата в ходе эксперимента. Видно, что в контроле после 40-минутной окклюзии коронарной артерии содержание ДМПО-ОН в диализате увеличивалось, отражая увеличение уровня АФК в интерстиции ЗР. Это может быть связано с существенным возрастанием скорости генерации АФК в дыхательной цепи митохондрий при восстановлении кровотока в ЗР. Введение пептидов G1, G2 или Gal перед реперфузией достоверно снижало содержание ДМПО-ОН по сравнению с контролем ($p < 0,01$). Эти дан-

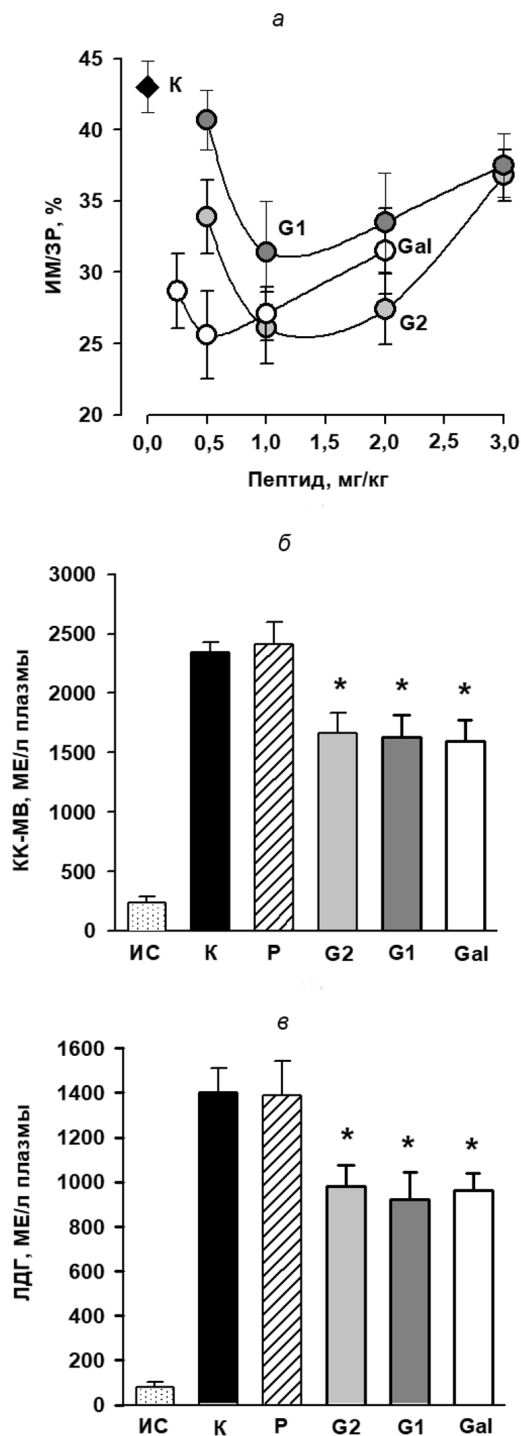


Рис. 1. Влияние внутривенного введения пептидов галанина на показатели И/Р повреждения сердца у крыс *in vivo*. а – Дозозависимое действие пептидов Gal, G1 и G2 на размеры инфаркта миокарда (ИМ/ЗР, %): К – контроль, ИМ – инфаркт миокарда, ЗР – зона риска. Влияние оптимальных доз пептидов на активность КК-МВ (б) и ЛДГ (в) в плазме крови крыс в конце реперфузии: ИС – исходное состояние, К – контроль (введение физиологического раствора), Р – растворитель 0,2% ДМСО, пептиды G1 (1 мг/кг), G2 (1 мг/кг), Gal (0,5 мг/кг). Данные представлены как $M \pm SEM$ для каждой группы из 8 животных. * – Достоверное отличие от К и Р ($p < 0,01$)

ные указывают на снижение продукции АФК в реперфузированной области сердца под действием пептидов галанина.

Влияние пептидов на активность антиоксидантных ферментов и содержание продуктов ПОЛ в ЗР сердца крысы. В контроле (после региональной ишемии и реперфузии сердца без введения пептидов) активности Cu,Zn-SOD, CAT и GSH-Px в ЗР не отличались от значений в исходном состоянии (табл. 2). Активность Cu,Zn-SOD под действием G2 и Gal в ЗР к окончанию реперфузии не изменялась, введение G1 приводило к ее снижению. Активность CAT достоверно не изменялась под действием пептидов галанина. Активность GSH-Px в ЗР по сравнению с контролем достоверно увеличивалась при введении пептидов G2 и Gal, тогда как введение G1 воздействия не оказывало. Под влиянием региональной ишемии и реперфузии сердца в контроле содержание TBARS в ЗР возрастало вдвое по сравнению с исходным значением. Введение G2 и Gal заметно снижало накопление TBARS в ЗР к концу реперфузии, G1 не оказывал влияния на этот показатель. Таким образом, под действием пептидов G2 и Gal происходило снижение образования продуктов ПОЛ в реперфузированном миокарде, несмотря на отсутствие влияния на активность Cu,Zn-SOD и CAT, и незначительное увеличение активности GSH-Px. Почти двукратное снижение активности Cu,Zn-SOD, вызванное введением G1, не влияло на интенсивность ПОЛ в ЗР по сравнению с контролем. Эти данные показывают, что наблюдаемые изменения ПОЛ в реперфузированной области сердца под действием пептидов не связаны непосредственно с активностью ключевых антиоксидантных ферментов.

Влияние пептидов галанина на активность Cu,Zn-SOD, GSH-Px и CAT *in vitro*. Реперфузионное повреждение миокарда, сопровождающееся нарушениями структуры мембран кардио-

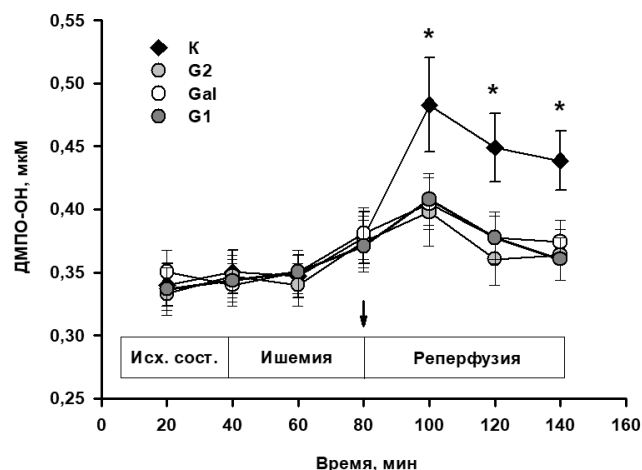


Рис. 2. Влияние пептидов галанина на концентрацию аддукта ДМПО-ОН в интерстиции ЗР сердца крысы: К – контроль (введение физиологического раствора), пептиды G1 (1 мг/кг), G2 (1 мг/кг), Gal (0,5 мг/кг). Данные представлены как $M \pm SEM$ для каждой группы из 5 животных. * – Достоверное отличие от G1, G2 и Gal ($p < 0,01$); стрелкой указан момент введения пептидов

миоцитов [15], может способствовать переносу экзогенных пептидов галанина из кровотока во внутриклеточное пространство. Это не исключает непосредственного взаимодействия пептидов с антиоксидантными ферментами миокарда. Такая ситуация была смоделирована нами инкубацией пептидов G1, G2 и Gal с коммерческими ферментами Cu,Zn-SOD, GSH-Px и CAT в модельных системах *in vitro*. При выборе концентраций пептидов в инкубационной среде мы руководствовались следующими соображениями. Оптимальная доза G1 и G2 для внутривенного введения крысе составляет 1 мг/кг, Gal – 0,5 мг/кг. Учитывая молекулярный вес пептидов (табл. 1) и объем циркулирующей крови (20 мл) в крысе средней массы (350 г), получаем, что концентрация пептидов в кровотоке должна составить 0,012 мМ для G1 и G2 и 0,003 мМ для Gal. В соответствии с этим для

Таблица 2. Активность антиоксидантных ферментов и содержание TBARS (продуктов ПОЛ) в сердце крысы

| Состояние | Cu,Zn-SOD, ед./мг белка | CAT, ед./мг белка | GSH-Px, ед./мг белка | TBARS, нмоль/мг белка |
|--------------------|-------------------------|-------------------|----------------------|-----------------------|
| Исходное состояние | 105,48 ± 6,85 | 27,26 ± 3,22 | 0,37 ± 0,03 | 0,19 ± 0,06 |
| Контроль | 123,99 ± 6,25 | 33,66 ± 1,00 | 0,27 ± 0,02 | 0,40 ± 0,03* |
| G1 | 67,00 ± 2,86*# | 35,10 ± 2,39 | 0,30 ± 0,02 | 0,36 ± 0,04* |
| G2 | 131,70 ± 14,40 | 32,11 ± 2,85 | 0,36 ± 0,01# | 0,13 ± 0,01# |
| Gal | 123,84 ± 5,76 | 27,80 ± 2,65 | 0,36 ± 0,02# | 0,12 ± 0,03# |

Примечание. Приведены данные для серий из 8 экспериментов. * – Достоверное отличие от исходного состояния; # – достоверное отличие от контроля; ($p < 0,05$).

Таблица 3. Влияние пептидов галанина на активность антиоксидантных ферментов *in vitro*

| Условия | Cu,Zn-SOD, ед./мл | GSH Pх, ед./мл | CAT, ед./мл |
|--------------|-------------------|----------------|----------------|
| Контроль | 145,30 ± 3,19 | 12,73 ± 0,45 | 462,84 ± 3,07 |
| G1, 0,01 мМ | 135,09 ± 3,41 | 13,08 ± 0,36 | 463,12 ± 1,73 |
| G1, 0,1 мМ | 148,88 ± 2,83 | 13,29 ± 0,52 | 454,33 ± 3,44 |
| G2, 0,01 мМ | 193,73 ± 3,72* | 13,82 ± 0,34 | 443,12 ± 1,77* |
| G2, 0,1 мМ | 180,23 ± 3,36* | 13,12 ± 0,10 | 438,36 ± 2,68* |
| Gal, 0,01 мМ | 136,73 ± 1,39 | 13,58 ± 0,34 | 470,44 ± 4,90 |
| Gal, 0,1 мМ | 140,04 ± 3,15 | 13,17 ± 0,22 | 465,03 ± 2,85 |

Примечание. Приведены данные для серий из 3 экспериментов. * – Достоверное отличие от контроля ($p < 0,05$).

оценки влияния пептидов на активность антиоксидантных ферментов в инкубационной среде мы использовали две концентрации пептидов: близкую к физиологической (0,01 мМ) и на порядок более высокую (0,1 мМ) (табл. 3). Из таблицы 3 видно, что пептиды G1 и Gal не оказывали влияния на активность антиоксидантных ферментов при длительной инкубации (различия между опытными и контрольной группами были статистически не достоверны). В то же время действие G2 в указанных выше концентрациях вызывало заметную активацию Cu,Zn-SOD (на 24 и 34% соответственно), незначительно снижало активность CAT (в среднем на 4,5% независимо от концентрации) и не влияло на активность GSH-Px. Однако с учетом того, что использованные в этих модельных опытах концентрации пептидов и длительность их взаимодействия с ферментами маловероятны

в условиях *in vivo*, из приведенных результатов следует, что G1, G2 и Gal практически не влияют на активность антиоксидантных ферментов.

Влияние пептидов на свободнорадикальное окисление ЛНП плазмы крови человека. Для изучения влияния G1, G2 и Gal на параметры свободнорадикального окисления липидов был использован разработанный нами ранее кинетический метод исследования ингибиторной активности соединений на модели Cu^{2+} -иницированного окисления природных изолированных ЛНП плазмы крови здоровых доноров [13]. Известно, что продолжительность периода индукции τ (лаг-фаза окисления) определяется следующим уравнением: $\tau = [\text{InH}]/w$, где $[\text{InH}]$ – концентрация ингибиторов свободнорадикальных процессов в системе, w – скорость инициирования окисления [16, 17]. Мы проводили эксперименты с использованием одних и тех же образцов свежесыведенных ЛНП в стандартных условиях. Очевидно, что концентрация природных эндогенных ингибиторов свободнорадикальных процессов $[\text{InH}]$ в исходных образцах ЛНП была идентичной. Стандартной должна быть и скорость инициирования окисления изолированных из плазмы крови ЛНП (w), поскольку она зависит от содержания образованных *in vivo* липогидропероксидов $[\text{LOOH}]$. В присутствии ионов меди липогидропероксиды подвергаются деструкции с образованием активных липидных радикалов, инициирующих дальнейшее окисление ненасыщенного субстрата – полиеновых липидов [18, 19]:

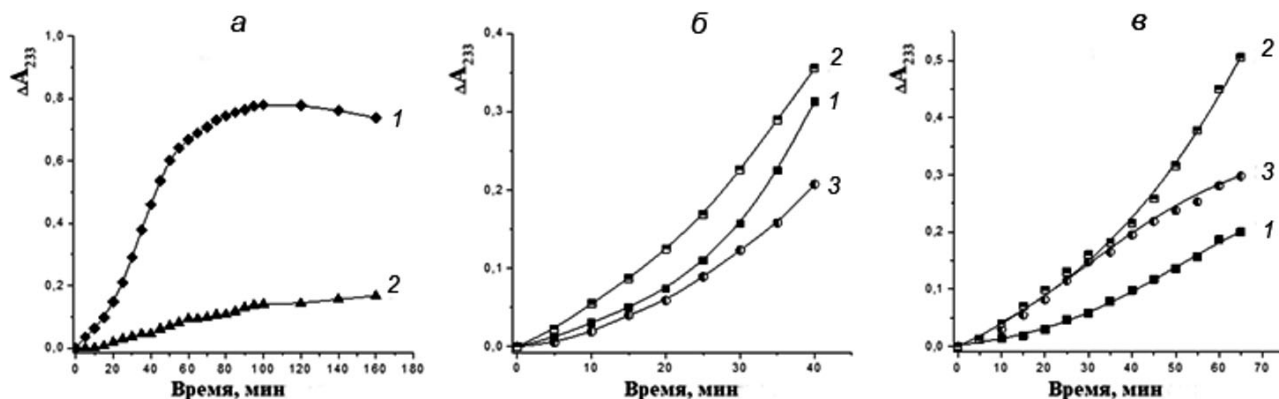
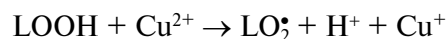


Рис 3. Характерные кинетические кривые Cu^{2+} -иницированного свободнорадикального окисления ЛНП в присутствии синтетического фенольного антиоксиданта ВНТ и пептидов G1, G2 и Gal. а – Влияние ВНТ: кривая 1 – контроль (без добавок); 2 – в присутствии 0,01 мМ ВНТ. Влияние пептидов: б – в присутствии G1 (кривая 1), G2 (2) и Gal (3) в концентрации 0,01 мМ; в – в присутствии G1 (1), G2 (2) и Gal (3) в концентрации 0,1 мМ

Таким образом, продолжительность периода индукции окисления ЛНП в наших опытах (τ) зависела исключительно от антиоксидантной способности внесённых в среду окисления экзогенных пептидов. Результаты проведённых кинетических экспериментов представлены на рисунке 3. Они демонстрируют выраженное ингибирующее действие синтетического фенольного антиоксиданта, бутилированного гидрокситолуола (ВНТ) в концентрации 0,01 мМ (рис. 3, а). Пептиды G1, G2 и Gal в концентрациях 0,01 мМ и 0,1 мМ также подавляли свободнорадикальное окисление ЛНП (рис. 3, б и в).

Вычисленные при анализе кинетических кривых окисления значения периодов индукции (τ) представлены в таблице 4. Из приведенных значений τ следует, что все исследованные пептиды галанина обладают ингибирующей активностью по отношению к свободнорадикальному окислению липидов. При концентрации 0,01 мМ продолжительность периодов индукции окисления для G1, G2 и Gal была достоверно выше контроля на 45, 15 и 75% соответственно. Увеличение концентрации пептидов в среде инкубации до 0,1 мМ приводило к возрастанию антиоксидантной активности G1 в 2,75, а G2 и Gal в 1,5 раза по сравнению с контролем, а также снижению периода индукции для Gal на 25% по сравнению с этим показателем при концентрации 0,01 мМ. Результаты экспериментов с использованием различных концентраций пептидов показывают, что способность ингибировать свободнорадикальное окисление липидов у этих соединений снижалась в ряду G1 > Gal > G2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе антиоксидантная активность полноразмерного галанина Gal и его природного и химически модифицированного N-концевого фрагмента (G1 и G2 соответственно) продемонстрирована на двух моделях окислительного стресса – ишемическом/реперфузионном повреждении сердца крысы *in vivo* и свободнорадикальном окислении ЛНП плазмы крови человека *in vitro*. Внутривенное введение пептидов галанина крысам после региональной ишемии уменьшало необратимые повреждения зоны риска. Это проявлялось в ограничении размера инфаркта миокарда и защите мембран кардиомиоцитов – уменьшении активности КК-МВ и ЛДГ в плазме крови к концу реперфузии. Пептиды G1, G2 и Gal снижали образование спинового аддукта гидроксильных радикалов ДМПО-ОН в интерстиции ЗР при реперфузии, при этом G2 и Gal также снижали образо-

Таблица 4. Продолжительность периодов индукции свободнорадикального окисления ЛНП (τ , мин)

| Группы | Концентрация исследуемых веществ | |
|----------|----------------------------------|-------------|
| | 0,01 мМ | 0,1 мМ |
| Контроль | 20 ± 0,2 | 20 ± 0,2 |
| G1 | 29 ± 0,4* | 55 ± 0,3*# |
| G2 | 23 ± 0,2* | 30 ± 0,05*# |
| Gal | 35 ± 0,1* | 30 ± 0,1*# |
| ВНТ | 140 ± 0,1* | |

Примечание. *, $p < 0,05$ по сравнению с контролем; #, $p < 0,05$ по сравнению с пептидом в концентрации 0,01 мМ; $n = 3$.

вание вторичных продуктов ПОЛ в реперфузированном миокарде. Кроме того, все пептиды галанина ингибировали Cu^{2+} -индуцированное свободнорадикальное окисление ЛНП человека *in vitro*.

Как было отмечено выше, введение пептидов G1, G2 и Gal крысам после периода региональной ишемии миокарда существенно снижало образование ДМПО-ОН в интерстиции ЗР ЛЖ при возобновлении кровотока. Образование этого спинового аддукта в диализном волокне, вероятно, являлось следствием проникновения в него гидроксильных радикалов, образующихся при реакции Фентона. Возможно также, что образование ДМПО-ОН проходило вне диализного волокна: в этом случае молекулы ДМПО могли проникать в ткань миокарда по градиенту концентрации через поры в диализаторе, и после взаимодействия с АФК в ткани сердечной мышцы образовавшийся спиновый аддукт мог возвращаться обратно в диализатор. Нельзя также исключать факт взаимодействия молекул ловушки ДМПО с супероксидными анион-радикалами с образованием аддукта ДМПО-ООН с последующим его спонтанным переходом в аддукт гидроксида ДМПО-ОН [20]. Тем не менее полученные методом микродиализа результаты свидетельствуют об уменьшении генерации АФК в ткани реперфузированного миокарда под действием пептидов. Они согласуются со способностью пептида G1 снижать продукцию супероксид-аниона и пероксида водорода в митохондриях изолированных кардиомиоцитов при их инкубации в условиях реоксигенации после периода гипоксии [3]. Как известно, гиперпродукция АФК является одним из основных механизмов повреждения миокарда во время реперфузии, вызывающим нарушение проницаемости мембран кардиомиоцитов, изменение

ионного гомеостаза и гибель клеток путем некроза и апоптоза [21]. В соответствии с этим снижение образования ДМПО-ОН в экспериментальных группах с введением пептидов G1, G2 и Gal сопровождалось заметным уменьшением размеров инфаркта миокарда и снижением активности маркеров некроза в плазме крови в конце реперфузии (рис. 1). Дополнительно в ЗР ЛЖ животных, защищенных введением G2 или Gal, обнаружено снижение содержания продуктов ПОЛ до предишемических значений (табл. 2). Эти данные однозначно указывают на способность пептидов галанина снижать окислительный стресс при реперфузии.

Ранее мы показали, что у крыс с кардиомиопатией, вызванной доксорубицином, подкожное введение пептида G2 в течение 8 недель снижало ПОЛ и увеличивало активность Cu,Zn-SOD и GSH-Px в поврежденном сердце [6]. В настоящей работе существенного влияния пептидов G1, G2 и Gal на активность ключевых ферментов антиоксидантной защиты Cu,Zn-SOD, CAT и GSH-Px в зоне риска ЛЖ миокарда крыс выявлено не было. В данной работе отмечено лишь незначительное увеличение активности GSH-Px под действием G2 и Gal и снижение активности Cu,Zn-SOD под действием G1 (табл. 2). Вполне вероятно, что короткого времени реперфузии (1 ч) недостаточно для экспрессии генов этих ферментов в миокарде. В пользу этого предположения свидетельствуют не только результаты нашей работы [6], но и исследование Timotin et al. [22], в котором показано, что снижение размеров инфаркта миокарда у мышей в результате длительного введения Gal сопровождается ростом количества мРНК Cu,Zn-SOD в кардиомиоцитах. Для понимания причин изменения активности Cu,Zn-SOD и GSH-Px в зоне риска сердца крыс под действием пептидов при реперфузии мы оценили влияние G1, G2 и Gal на активность коммерческих антиоксидантных ферментов *in vitro*. Несмотря на длительную инкубацию (24 ч) и использование высоких концентраций пептидов (0,1 мМ), заметное влияние было отмечено только при действии G2, проявлявшееся в активации Cu,Zn-SOD и ингибировании CAT (табл. 3). Различное влияние пептидов галанина на активность Cu,Zn-SOD, CAT и GSH-Px в экспериментах *in vitro* и *in vivo* свидетельствует в пользу того, что их способность к снижению генерации АФК и продуктов ПОЛ в сердце крыс при реперфузии не связана с воздействием на ферментативную систему антиоксидантной защиты.

Известно, что многие пептиды обладают способностью перехватывать АФК и ингибировать перекисное окисление липидов [23, 24].

Однако, насколько нам известно, данные о прямом антиоксидантном действии галанина или его биоактивных *N*-концевых фрагментах в литературе отсутствуют. Поэтому изучение механизмов снижения окислительного стресса в сердце с помощью пептидов галанина представляется важной задачей будущих исследований. В этой связи интерес представляют результаты, полученные при изучении влияния G1, G2 и Gal на Cu²⁺-индуцированное свободнорадикальное окисление ЛНП плазмы крови человека *in vitro*. Полученные нами данные продемонстрировали ингибирующий эффект этих соединений, вызванный уменьшением образования липидных радикалов, хотя и более слабый, чем у синтетического антиоксиданта ВНТ (табл. 4, рис. 3). Тем не менее нельзя исключить, что при использовании указанной модели подавление свободнорадикального окисления липидов могло быть вызвано хелатированием ионов меди изучаемыми пептидами.

Помимо регуляции свободнорадикальных процессов, активация пептидами галанина различных путей трансдукции при связывании с рецепторами GalR1–3 также может способствовать уменьшению повреждения клеток. Все три подтипа рецепторов галанина через белки Gi/Go ингибируют активность аденилатциклазы, что приводит к ингибированию транскрипционного фактора CREB – белка, связывающего цикло-АМР-зависимый элемент. Это повышает экспрессию транспортера глюкозы GLUT4 и способствует его перемещению в сарколемму, стимулируя захват и окисление глюкозы кардиомиоцитами. Запуск этого механизма имеет решающее значение в условиях снижения продукции АТФ [25]. Сопряжение рецептора GalR2 с белком Gq/11 активирует фосфолипазу С и через гидролиз фосфатидилинозитол дифосфата регулирует гомеостаз кальция, что улучшает инотропные свойства сердца. Нижние звенья этого сигнального пути вызывают фосфорилирование протеинкиназы В (Akt), ингибирование проапоптотических белков BAD/BAX, каспазы-3 и каспазы-9 [1, 26]. Как правило, на моделях *in vivo* снижение апоптоза кардиомиоцитов сопровождается ограничением области инфаркта миокарда и улучшением сократительной функции сердца [27]. Активация GalR1 и GalR2 стимулирует сигнальные пути, инициируемые митоген-активируемыми протеинкиназами (MEK1/2 и ERK1/2), приводящие к ингибированию открытия митохондриальной поры временной проницаемости (mPTP) и, таким образом, способствует выживанию и подвижности клеток [28]. Кроме того, активация фосфорилирования киназ ERK способствует увели-

чению экспрессии рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом (PPARs), контролирующей энергетический метаболизм, включая и экспрессию PPAR γ , стимулирующего поглощение и окисление глюкозы кардиомиоцитами [29]. Из этого следует, что пептидные агонисты рецепторов галанина способны усиливать адаптационные механизмы метаболической защиты при повреждении сердца.

Одним из важных аспектов реализации эффектов биоактивных пептидов является их влияние на интенсивность свободнорадикального окисления в органах и тканях, которое сопровождается коррекцией нарушений, вызванных различными патологическими факторами. В связи с этим природные и синтетические пептидные биорегуляторы можно рассматривать как перспективные фармакологические средства, способствующие уменьшению стресс-индуцированных изменений в организме. Полученные результаты свидетельствуют об участии галанинергической системы в адаптации сердца к ише-

мическому/реперфузионному повреждению и окислительному стрессу. Эти данные указывают на перспективность молекулярного конструирования фармакологических агонистов рецептора галанина GalR2 с улучшенными физико-химическими характеристиками (растворимость, протеолитическая стабильность) и детального изучения механизмов их действия. Подобные соединения могут служить основой для разработки нового класса кардиопротекторов для терапии различных сердечно-сосудистых заболеваний.

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода за лабораторными животными и их использования в экспериментах были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Branchek, T. A., Smith, K. E., Gerald, C., and Walker, M. W. (2000) Galanin receptor subtypes. *Trends Pharmacol. Sci.*, **21**, 109-117, doi: 10.1016/S0165-6147(00)01446-2.
2. Timotin, A., Pisarenko, O., Sidorova, M., Studneva, I., Shulzhenko, V., et al. (2017) Myocardial protection from ischemia/reperfusion injury by exogenous galanin fragment, *Oncotarget*, **8**, 21241-21252, doi: 10.18632/oncotarget.15071.
3. Pisarenko, O., Timotin, A., Sidorova, M., Studneva, I., Shulzhenko, V., et al. (2017) Cardioprotective properties of N-terminal galanin fragment (2-15) in experimental ischemia/reperfusion injury, *Oncotarget*, **8**, 60, 101659-101671, doi: 10.18632/oncotarget.21503.
4. 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. (2018) Тетрадекапептиды, улучшающие восстановительную функцию сердечно-сосудистой системы при ишемии. Патент № 2648846. РФ. А61К 38/10 (2006.01).
5. Palkeeva, M., Studneva, I., Molokoedov, A., Serebryakova, L., Veselova, O., et al. (2019) Galanin/GalR1-3 system: a promising therapeutic target for myocardial ischemia/reperfusion injury, *Biomed. Pharmacother.*, **109**, 1556-1562, doi: 10.1016/j.biopha.2018.09.182.
6. Студнева И. М., Веселова О. М., Бахтин А. А., Коновалова Г. Г., Ланкин В. З., Писаренко О. И. (2020) Механизмы защиты сердца синтетическим агонистом рецепторов галанина при повреждении хроническим введением доксорубина, *Acta Naturae*, **12**, 28-37, doi: 10.32607/actanaturae.10945.
7. Sidorova, M. V., Palkeeva, M. E., Avdeev, D. V., Molokoedov, A. S., Ovchinnikov, M. V., et al. (2020) Convergent synthesis of the rat galanin and study of its biological activity, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **46**, 32-42, doi: 10.1134/S1068162020010100.
8. Kitakaze, M., Takashima, S., Funaya, H., Minamino, T., Node, K., et al. (1997) Temporary acidosis during reperfusion limits myocardial infarct size in dogs, *Am. J. Physiol.*, **272**, H2071-H2078, doi: 10.1152/ajpheart.1997.272.5.H2071.
9. Beauchamp, C., and Fridovich, I. (1971) Superoxide dismutase: improved assays and assay applicable to acrylamide gels, *Anal. Biochem.*, **44**, 276-287, doi: 10.1016/0003-2697(71)90370-8.
10. Aebi, H. (1984) Catalase *in vitro*, *Methods Enzymol.*, **105**, 121-126, doi: 10.1016/s0076-6879(84)05016-3.
11. Ланкин В. З., Гуревич С. М. (1976) Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментативными системами (супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза) при экспериментальном злокачественном росте, *ДАН СССР*, **226**, 705-708.
12. Draper, H. H., and Hadley, M. (1990) Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation, *Methods Enzymol.*, **186**, 421-431, doi: 10.1016/0076-6879(90)86135-i.
13. Ланкин В. З., Кандалинцева Н. В., Коновалова Г. Г., Тихазе А. К., Хольшин С. В., Ягунов С. Е., Одинокова О. А. (2017) Способ экспресс-скрининга потенциальных антиоксидантов с использованием кинетической модели медь-инициированного свободнорадикального окисления липопротеидов низкой плотности плазмы крови человека. Патент на изобретение RU 2629398.
14. Britigan, B. E., Cohen, M. S., and Rosen, G. M. (1987) Detection of the production of oxygen-centered free radicals by human neutrophils using spin trapping techniques: a critical perspective, *J. Leukoc. Biol.*, **41**, 349-362, doi: 10.1002/jlb.41.4.349.
15. Vanden Hoek, T. L., Shao, Z., Li, C., Zak, R., Schumacker, P. T., and Becker, L. B. (1996) Reperfusion injury on cardiac myocytes after simulated ischemia, *Am. J. Physiol.*, **270**, H1334-H1341, doi: 10.1152/ajpheart.1996.270.4.H1334.

16. Эмануэль Н. М., Лясковская Ю. Н. (1961) Торможение процессов окисления жиров, *Пищепромиздат*, Москва, стр. 10-19.
17. Lankin, V., Konovalova, G., Tikhaze, A., Shumaev, K., Kumsikova, E., and Viigimaa, M. (2014) The initiation of free radical peroxidation of low-density lipoproteins by glucose and its metabolite methylglyoxal: a common molecular mechanism of vascular wall injury in atherosclerosis and diabetes, *Mol. Cell. Biochem.*, **395**, 241-252, doi: 10.1007/s11010-014-2131-2.
18. Lankin V. Z. (2003) The enzymatic systems in the regulation of free radical lipid peroxidation, in *Free Radicals, Nitric Oxide, and Inflammation: Molecular, Biochemical, and Clinical Aspects*, NATO Science Series (Tomasi, A., et al., eds) vol. 344, IOS Press, Amsterdam, pp. 8-23.
19. Lankin, V. Z., Antonovsky, V. L., and Tikhaze, A. K. (2004) Regulation of Free radical lipoperoxidation and organic peroxides metabolism during normal station and pathologies, in *Peroxides at the Beginning of the Third Millennium* (Antonovsky, V.L., et al., eds) Nova Science Publishers Inc., New York, pp. 85-111.
20. Тимошин А. А., Дроботова Д. Ю., Цкитишвили О. В., Серебрякова Л. И., Писаренко О. И., Рууге Э. К., Ваннин А. Ф. (2010) Защитное действие динитрозильных комплексов железа с глутатионом в условиях региональной ишемии миокарда крыс: исследование методом микродиализа, *Доклады Академии Наук (Раздел «Биофизика»)*, **432**, 416-419.
21. Murphy, E., and Steenbergen, C. (2008) Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury, *Physiol. Rev.*, **88**, 581-609, doi: 10.1152/physrev.00024.2007.
22. Timotin, A., Cinato, M., Kramar, S., Loy, H., Merabishvili, G., and (2019) Galanin is a checkpoint regulator of mitochondrial biogenesis coordinating a pro-survival phenotype in post-infarct myocardial remodeling, *Lancet*, preprint, doi: 10.2139/ssrn.3424189.
23. Power, O., Jakeman, P., and FitzGerald, R. J. (2013) Antioxidative peptides: enzymatic production, *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides, *Amino Acids*, **44**, 797-820, doi: 10.1007/s00726-012-1393-9.
24. Jakubczyk, A., Karas, M., Rybczynska-Tkaczyk, K., Zielinska, E., and Zielinski, D. (2020) Current trends of bioactive peptides – new sources and therapeutic effect, *Foods*, **9**, 846, doi: 10.3390/foods9070846.
25. Tian, R., and Abel, E. D. (2001) Responses of GLUT4-deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis, *Circulation*, **103**, 2961-2966, doi: 10.1161/01.CIR.103.24.2961.
26. Lang, R., Gundlach, A. L., Holmes, F. E., Hobson, S. A., Wynick, D., et al. (2015) Physiology, signaling, and pharmacology of galanin peptides and receptors: three decades of emerging diversity, *Pharmacol. Rev.*, **67**, 118-175.
27. Krijnen, P. A., Nijmeijer, R., Meijer, C. J., Visser, C. A., Hack, C. E., and Niessen, H. W. (2002) Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction, *J. Clin. Pathol.*, **55**, 801-811, doi: 10.1136/jcp.55.11.801.
28. Hausenloy, D. J., and Yellon, D. M. (2013) Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target, *J. Clin. Invest.*, **123**, 92-100, doi: 10.1172/JCI62874.
29. Jay, M. A., and Ren, J. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in metabolic syndrome and type 2 diabetes mellitus, *Curr. Diab. Rev.*, **3**, 33-39, doi: 10.2174/157339907779802067.

ANTIOXIDANT PROPERTIES OF GALANIN AND ITS N-TERMINAL FRAGMENTS IN MODELING OXIDATIVE STRESS *in vitro* AND *in vivo**

O. I. Pisarenko**, I. M. Studneva, L. I. Serebryakova, A. A. Timoshin, G. G. Konovalova, V. Z. Lankin, A. K. Tihaze, O. M. Veselova, I. V. Dobrokhotov, R. O. Lyubimov, M. V. Sidorova, M. E. Palkeeva, and A. S. Molokoedov

National Medical Research Center for Cardiology, 121552 Moscow, Russia; E-mail: olpi@live.ru

Antioxidant properties of rat galanin GWTLNSAGYLLGPHALDNRHSFSDKHGLT-NH₂ (Gal), N-terminal fragment of galanin (2-15 aa) WTLNSAGYLLGPHA (G1), and its modified analogue WTLNSAGYLLGPHAH (G2) were studied *in vivo* in the rat model of regional myocardial ischemia and reperfusion and *in vitro* in the process of Cu²⁺-induced free radical oxidation of human blood plasma low-density lipoproteins. Intravenous administration of G1, G2, and Gal to rats after ischemia induction reduced the infarction size and activities of the necrosis markers, creatine kinase-MB and lactate dehydrogenase, in blood plasma at the end of reperfusion. G1, G2, and Gal reduced formation of the spin adducts of hydroxyl radicals in the interstitium of the area at risk during reperfusion, moreover, G2 and Gal also reduced formation of the secondary products of lipid peroxidation in the reperfused myocardium. It was shown in the *in vivo* experiments and in the *in vitro* model system that the ability of galanin peptides to reduce formation of ROS and attenuate lipid peroxidation during myocardial reperfusion injury was not associated directly with their effects on activities of the antioxidant enzymes of the heart: Cu,Zn-superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. The peptides G1, G2, and Gal at concentrations of 0.01 and 0.1 mM inhibited Cu²⁺-induced free radical oxidation of human low-density lipoproteins *in vitro*. The results of oxidative stress modeling demonstrated that the natural and synthetic agonists of galanin receptors reduced formation of the short-lived ROS in the reperfused myocardium, as well as of lipid radicals in blood plasma. Thus, galanin receptors could be a promising therapeutic target for cardiovascular diseases.

Keywords: galanin, heart, ischemia and reperfusion, necrosis, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, cardiomyocyte membrane damage