

С-КОНЦЕВЫЕ ФРАГМЕНТЫ АПЕЛИНА: БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОТЕНЦИАЛ

Обзор

© 2023 О.И. Писаренко*, И.М. Студнева

ФГБУ «НМИЦ кардиологии им. академика Е.И. Чазова» Минздрава России,
121552 Москва, Россия; электронная почта: olpi@live.ru

Поступила в редакцию 30.05.2023

После доработки 10.09.2023

Принята к публикации 11.09.2023

В последние годы показано, что адипокин апелин — эндогенный лиганд рецептора APJ — участвует в регуляции сердечно-сосудистой, гипоталамо-гипофизарной, желудочно-кишечной и иммунной системах человека. В обзоре представлены данные литературы о системе апелин/APJ, ее влиянии на сосудистую систему, пищеварение, жировую ткань и водно-электролитный обмен. Обсуждается действие пептидов апелина при ожирении, диабете и сердечно-сосудистых заболеваниях, а также их кардиопротекторные эффекты, связанные с активацией реперфузионных киназ и проявлением антиоксидантных свойств. Обобщены результаты собственных экспериментов по влиянию апелина-13, [Pyr1]апелина-13, апелина-12 и их химически модифицированных аналогов на сердце в норме и при моделировании патофизиологических состояний *in vitro* и *in vivo*. Показано, что спектр действия С-концевых фрагментов апелина на поврежденный миокард охватывает уменьшение гибели кардиомиоцитов от некроза, снижение повреждения клеточных мембран, улучшение метаболического состояния миокарда, снижение образования активных форм кислорода и продуктов перекисного окисления липидов. Сделан вывод о перспективности молекулярного конструирования фармакологических агонистов рецептора APJ, обладающих протеолитической устойчивостью и стабильностью при хранении, которые могут служить основой для разработки нового класса лекарственных средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: апелин, структурные аналоги, сердце, экспериментальная патология, метаболизм, мембраны кардиомиоцитов, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода, антиоксидантные ферменты.

DOI: 10.31857/S0320972523110179, EDN: MMSYTE

ВВЕДЕНИЕ

Хорошо установлено, что жировая ткань является не только хранилищем запасенной энергии, но и активным эндокринным органом, в котором продуцируются пептидные гормоны — адипокины [1]. Они обладают разнообразными биологическими эффектами и оказывают свое влияние во многих органах прямо или через нейроэндокринные механизмы,

взаимодействуя с гормонами гипофиза, инсулином, катехоламинами. Адипокины влияют на обмен липидов, гомеостаз глюкозы, процессы ангиогенеза, иммунитета, воспаления, свертывания крови, образования костной ткани, опухолевого роста и др. Одним из наиболее активно изучающихся адипокинов является апелин — лиганд сопряженного с G-белком семидоменного трансмембранного рецептора APJ [2]. Апелин активно экспрессируется

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода; ИМ — инфаркт миокарда; ЛЖ — левый желудочек сердца; ПЭГ — полиэтиленгликоль; ACE2 — ангиотензин-превращающий фермент 2; Akt — протеинкиназа B; APJ — рецептор апелина (APLNR), связанный с G-белком; CAT — каталаза; CD10 — неприлизин; MEK1/2 — киназа митоген-активируемой протеинкиназы (MAP2K); mitoK⁺ATP-каналы — митохондриальные ATP-зависимые K⁺-каналы; mPTP — митохондриальная пора; MDA — малоновый диальдегид; PI3K — фосфатидилинозитол-3-киназа; PKC — протеинкиназа C; PLCβ — фосфолипаза Cβ; PRCP — пролилкарбокисептидаза; [Pyr1]апелин-13 — пироглутаминированный по N-концевому глутамину апелин-13; RISK-киназа — киназы спасения от реперфузионного повреждения; SOD — супероксиддисмутаза; O₂[•] — супероксидный анион-радикал; ONOO[•] — пероксинитрит.

* Адресат для корреспонденции.

различными тканями, включая эндотелиальные и гладкомышечные клетки коронарных сосудов и кардиомиоциты. Активация системы апелин/APJ оказывает мощное регуляторное действие на сердечно-сосудистую систему. С-концевые фрагменты апелина способны снижать метаболические и функциональные повреждения сердца при различной экспериментальной патологии [3]. Это указывает на целесообразность использования таких пептидов в качестве потенциальных лекарственных средств. В настоящем обзоре рассмотрены структурные и функциональные свойства природных и модифицированных пептидов апелина и молекулярные механизмы их действия.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА АПЕЛИНА

Апелин и его рецептор APJ. Сопряженный с G-белком рецептор APJ, расположенный в 11 хромосоме (локус 11q12), был обнаружен O'Dowd et al. [4] в 1993 г. Он имеет высокую гомологичность с рецептором ангиотензина II 1-го типа AT1 (до 50% по гидрофобным трансмембранным областям), но не связывается с ангиотензином II. Рецептор APJ был идентифицирован у большого числа различных видов животных и человека, он состоит из 377–380 а.о. и содержит 7 трансмембранных доменов. На мембране рецептор существует в форме мономера, димера или олигомера с возможными взаимными превращениями [5], которые могут быть важными для дальнейшей трансдукции сигнала. Рецептор APJ способен к интернализации [6] и ассоциации с другими рецепторами [7, 8]. Его долгое время считали «орфановым» рецептором, пока апе-

лин не был обнаружен в качестве родственного лиганда после выделения из экстрактов желудка крупного рогатого скота в 1998 г. [9]. Рецептор APJ широко распространен в организме, включая скелетную мышцу, сердце, легочную ткань, молочную железу, яичники, головной мозг, почки, поджелудочную железу и надпочечники [10]. Это указывает на роль системы апелин/APJ в регуляции ряда физиологически важных показателей — жидкостного гомеостаза [11], артериального давления [12], метаболического контроля [13] и других. Недавно в эмбриональных стволовых клетках человека был идентифицирован эндогенный лиганд рецептора APJ, названный ELABELA. ELABELA — это пептид, состоящий из 32 а.о., который играет роль в эмбриональном развитии сердца [14].

Ген апелина локализован в X-хромосоме (локус Xq25-q26.1) [15] и кодирует препробелок, состоящий из 77 а.о., с сигнальной последовательностью в N-концевой области. После транслокации в эндоплазматический ретикулум и отделения сигнального пептида образуется пробелок из 55 а.о. Первоначально апелин-55 считался неактивным пробелком, а апелин-36 — предшественником биологически активных изоформ: апелина-17 и апелина-13 [9, 10, 16]. Это было связано с наличием в апелине-36 фрагментов Arg-Arg — типичного сайта расщепления трипсиноподобной эндопептидазой [17]. Апелин-13 может подвергаться посттрансляционному пироглутаминированию, катализируемому глутаминилциклазой (QC), на уровне N-концевого остатка глутамина в [Pyr1]апелин-13. Удаление остатка Gln в апелине-13 приводит к образованию наиболее короткого из биоактивных фрагментов

Таблица 1. Препробелок апелина и его С-концевые фрагменты

Пептид	Аминокислотная последовательность
Препроапелин	MNLRLCVQALLLWLSLTAVCGGSLMPLPDGNGLEDGNVRHLVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRRQRPRLSHKGMPMF
Апелин-55	GSLMPLPDGNGLEDGNVRHLVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRRQRPRLSHKGMPMF
Апелин-36	LVQPRGSRNGPGPWQGGRRKFRRQRPRLSHKGMPMF
Апелин-17	KFRRQRPRLSHKGMPMF
Апелин-13	QRPRLSHKGMPMF
[Pyr1]апелин-13	(pGlu)RPRLSHKGMPMF
Апелин-12	RPRLSHKGMPMF

Примечание. Жирным шрифтом показаны остатки Cys6 и Cys21, обеспечивающие стабильность димера препроапелина.

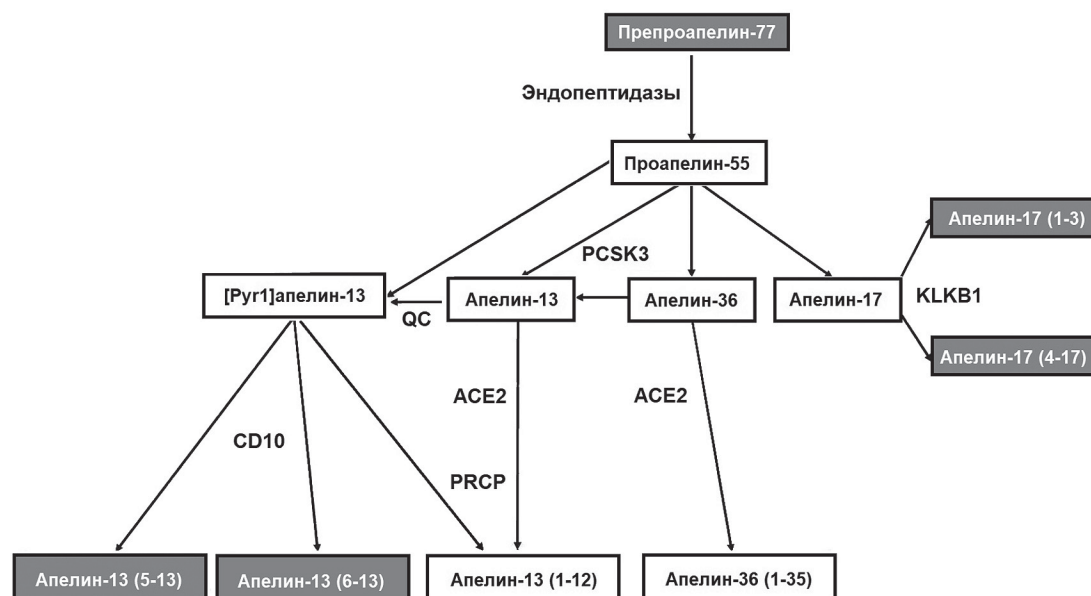


Рис. 1. Ферментативное расщепление пептидов апелина. ACE2 — ангиотензин-превращающий фермент 2; CD10 — неприлизин; KLKB1 — калликреин; PRCP — пролилкарбоксипептидаза; PCSK3 — пропротеинконвертаза субтилизин/кексин 3; QC — глутаминилциклаза. Темным цветом показаны пептиды, не способные связываться с рецептором APJ (апелин-13 (5–13) и апелин-13 (6–13)) или активировать внутриклеточную сигнализацию (апелин-17 (1–3) и апелин-17 (4–17))

апелина-12 (табл. 1). Короткие С-концевые фрагменты апелина ответственны за связывание с рецептором и биологическую активность пептида [16, 18]. Было обнаружено, что препроапелин в нативной ткани существует как димер, стабилизированный дисульфидными мостиками остатков Cys6 и Cys21, а апелин-36 и апелин-13 являются мономерами [15].

Недавние исследования показали, что процессинг апелина сложен. Выяснено, что апелин-55 не является биологически неактивным пробелком и может активировать рецептор APJ, хотя и с меньшей эффективностью, чем более короткие С-концевые фрагменты апелина [19]. В дополнение Shin et al. [20] обнаружили способность пропротеинконвертазы субтилизин/кексин 3 (PCSK3) расщеплять апелин-55 с образованием апелина-13 без образования других изоформ, что представляет новый путь деградации апелина. Кроме того, не ясными остаются процессы, связанные с образованием апелина-13 и -12 из апелина-36 [21]. Чувствительность пептидов апелина к протеолитической деградации значительно ограничивает продолжительность и эффективность их действия в биологических средах. Период полувыведения апелина у человека составляет около 5 минут [17]. Нестабильность апелинов объясняется ферментативной активностью неприлизина (CD10), ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), пролилкарбоксипептидазы (PRCP) и калликреина (KLKB1)

[22–25]. Металлопротеаза CD10 расщепляет [Pyr1]апелин-13 между остатками Arg4 и Leu5 и Leu5 и Ser6, создавая фрагменты 5–13 и 6–13 соответственно. Образующиеся при этом пептиды лишены способности активировать рецептор APJ [22]. ACE2, цинксодержащая карбоксимонопептидаза, отвечает за отщепление С-концевого Phe в апелине-13 и -36 [23]. В результате расщепления ACE2 апелина-13 и -36 образуются два фрагмента — апелин-13 (1–12) и апелин-36 (1–35). Оба фрагмента способны связываться с APJ и активировать внутриклеточную сигнализацию. PRCP способна сходным образом с ACE2 гидролизовать апелин-13 и [Pyr1]апелин-13, но с более низкой скоростью [24]. Сериновая протеаза калликреин расщепляет апелин-17 между Arg3 и Arg4 на две изоформы — апелин-17 (1–3) и апелин-17 (4–17). Эти фрагменты связываются с рецептором APJ с высоким сродством, но не могут активировать передачу сигнала и мобилизацию ионов Ca^{2+} [25]. Пути деградации пептидов апелина могут быть представлены следующей схемой (рис. 1).

Связывание с рецептором. С-концевые фрагменты апелина различаются аффинностью по отношению к APJ. Инкубация ^{125}I -меченных пептидов апелина на мембранах клеток яичника китайского хомячка CHO-A10 показала, что короткие апелины связываются с рецептором прочнее более длинных [16]. Апелин-13, [Pyr1]апелин-13 и апелин-12, являющиеся наи-

более биологически активными изоформами [9, 15], характеризуются более высокими значениями аффинности ($1/K_d$) и максимального связывания (B_{max}), чем апелин-17, -19 и -36 [10]. В то же время апелин-36 может связываться с рецептором APJ дольше, чем более короткие изоформы [16]. Это увеличение занятости рецепторов можно объяснить наличием отрицательно заряженной области рецептора APJ, которая взаимодействует с положительно заряженными аминокислотами в более длинном пептиде апелин-36 [26].

Работы по изучению структуры и активности апелина обнаружили, что последовательности аминокислотных остатков Arg-Pro-Arg-Leu и Lys-Gly-Pro-Met являются наиболее существенными для связывания апелина-13 с рецептором APJ, а замены Gln¹, His⁷, Pro¹² и Phe¹³ незначительно ухудшают сродство с рецептором [27]. В работе Medhurst et al. [27] было также показано, что два С-концевых фрагмента апелина, N-ацетил-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-COOH и N-ацетил-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-COOH, проявляют низкое сродство к рецептору APJ. Кроме того, замена в структуре апелина-13 Leu⁵ или Arg² на Ala приводит к значительному (более чем 50-кратному) снижению способности связываться с рецептором. Таким образом, последовательность Arg-Pro-Arg-Leu в структуре апелина играет ключевую роль для взаимодействия с рецептором APJ. Эта гипотеза подтверждается результатами ¹H-ЯМР-исследований апелина-17 (NH₂-Lys-Phe-Arg-Arg-Gln-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-COOH), которые показали, что последовательность Arg-Pro-Arg-Leu образует четко определенный тип β-поворота в растворе [28], играющего, как полагают, решающую роль в узнавании и связывании эндогенных пептидов с рецепторами, сопряженными с G-белком [29].

В работе Murza et al. [30] была продемонстрирована исключительная важность пространственной ориентации некоторых аминокислотных остатков апелина-13, в особенности Arg², Pro³, Arg⁴ и в меньшей степени Pro¹². Также было изучено влияние на связывание с рецептором модификации С-концевой части молекулы, состоящей в замене Phe¹³ на различные типы ароматических групп. Оно подтвердило связь С-концевого Phe с электрон-насыщенными аминокислотными остатками кармана связывания APJ-рецептора. Была предпринята попытка модификации центральной части молекулы заменой аминокислот на различные линкеры (полиэтиленгликоль (ПЭГ), аланин),

демонстрируя важность жесткости конструкции и расстояния между двумя эпитопами [30]. Таким образом, показано значение последовательности аминокислот Arg-Pro-Arg-Leu в структуре апелина и С-концевого Phe для связывания с рецептором APJ.

Распределение в организме. мРНК апелина и рецептора APJ экспрессируются практически во всех тканях и органах организма и в центральной нервной системе. Особенно высоки их концентрации в мозжечке, сосудистом эндотелии, сердце, легких, почках, печени, надпочечниках и жировой ткани [9, 16, 31]. Рецепторы APJ в сердце обнаруживаются в эндотелии, гладкомышечных клетках и кардиомиоцитах, так же как и рецептор AT1 [32]. Обширная «география» синтеза апелина в организме свидетельствует о широком спектре его регуляторного влияния на физиологические и биохимические процессы. Таким образом, апелин является не только гормоноподобным веществом, циркулирующим в крови, но и аутопаракринным, и паракринным фактором в целом ряде тканей-мишеней. Считается, что апелин оказывает значимую часть своего влияния паракринным путем, хотя и эндокринный путь является очень важным [33].

ФИЗИОЛОГИЧЕСКАЯ РОЛЬ СИСТЕМЫ АПЕЛИН/APJ

В последние годы подтверждена существенная роль апелина в физиологии человека как регуляторного пептида в сердечно-сосудистой, гипоталамо-гипофизарной, желудочно-кишечной и иммунной системах [34]. Многочисленные работы демонстрируют, что активация рецептора APJ апелинами вовлечена в регуляцию тонуса сосудов, сердечной сократимости, водного баланса, метаболизма, клеточной пролиферации, апоптоза и воспаления [35].

Влияние на сосудистую систему. Апелин-13 и [Pyr1]апелин-13 влияют на сосудистый тонус *in vivo*, вызывая снижение артериального давления у крыс [15, 36] и вазодилатацию резистивных сосудов предплечья у человека [37]. *In vitro* апелин-13 вызывает вазодилатацию висцеральной артерии человека [38] преимущественно благодаря NO-зависимому механизму. Под действием образующегося в эндотелиальных клетках оксида азота (NO) происходит активация растворимой гуанилатциклазы в гладкомышечных клетках, которая приводит к образованию циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) и расслаблению этих кле-

ток, вызывая вазодилатацию. Однако апелин может вызвать и вазоконстрикторный эффект при контакте с дисфункциональным эндотелием. Показано, что [Pyr1]апелин-13 вызывает вазоконстрикцию подкожной вены [39] и грудной артерии [40] человека *in vitro*. В этом случае пептид действует напрямую на гладкомышечные клетки сосуда, которые также экспрессируют APJ-рецептор, увеличивая концентрацию внутриклеточного Ca^{2+} и вызывая их сокращение. Работы, проведенные на нокаутных по гену апелинового рецептора мышах, показали присутствие баланса между сигнальным путем ангиотензина II, который повышает кровяное давление, и сигнальным путем апелина, который снижает давление [35].

Активация рецептора APJ участвует в формировании новых кровеносных сосудов [35]. Ангиогенная активность — это следствие действия апелина на пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток. Показано, что апелин-13 является мощным ангиогенным фактором [41, 42] и митогеном эндотелиальных [40, 43] и гладкомышечных [44] клеток сосудов. Он активирует внутри клетки сигнальные каскады (фосфорилирование ERK, Akt (протеинкиназы B) и p70S6-киназ), которые приводят к пролиферации эндотелиальных клеток и формированию новых кровеносных сосудов. Исследования на клетках микрососудов мозга мышей показали, что апелин действует как митогенный, хемотаксический и антиапоптотический агент для эндотелиальных клеток. Было продемонстрировано, что нокаут по гену апелина у мышей связан со снижением развития ретинальных сосудов, а нокаут по гену апелинового рецептора приводит к дефектам развития сердечно-сосудистой системы [45]. Подобно многим другим ангиогенным факторам, экспрессия APJ возрастает в условиях гипоксии [42].

Инотропное действие. Рецептор APJ экспрессируется на начальных стадиях формирования сердца в эмбриональном периоде, где он регулирует миграцию прогениторных клеток, дифференцирующихся в сократительные клетки — кардиомиоциты [46]. Экспрессия APJ также обнаружена в кардиомиоцитах взрослых животных, где апелин является мощным стимулятором сердечной сократимости [47, 48]. Показано, что [Pyr1]апелин-13 и апелин-16 оказывают положительный инотропный эффект на сердце лабораторных животных и человека *in vivo* благодаря прямому действию [49, 50]. При этом полумаксимальная эффективная концентрация EC_{50} составляет

около 40 пМ в ткани сердца человека [48] и 33 пМ — в ткани сердца крысы [49]. Пожилые нокаутные по генам апелина и рецептора APJ мыши показывают прогрессивное ухудшение сердечной сократимости независимо от внутриклеточного транспорта ионов Ca^{2+} , потерю способности к укорочению саркомеров и уменьшение скорости сокращения и расслабления миофибрилл [51].

Регуляция жидкостного гомеостаза. Экспрессия апелина и его рецептора, подобно антидиуретическому гормону (вазопрессину), происходит также в магноцеллюлярных нейронах супраоптического и паравентрикулярного ядер гипоталамуса, т.е. в областях мозга, включенных в регуляцию потребления пищи и воды [15]. Введение апелина-13 увеличивает потребление воды, а также уменьшает в гипоталамусе секрецию вазопрессина. Показано, что интрацеребровентрикулярная инъекция апелина-13 мышам ингибирует активность вазопрессиновых нейронов и высвобождение вазопрессина, уменьшая его концентрацию в плазме и усиливая диурез [52]. Обезвоживание усиливает экспрессию апелина и уменьшает экспрессию вазопрессина у крыс [53]. Этот диуретический эффект апелина вместе с его гипотензивным эффектом принимает глобальное участие в гомеостатической регуляции жидкостей тела.

Пищеварение. Рецептор APJ экспрессируется в желудочных энтерохромаффиноподобных клетках, некоторых клетках поджелудочной железы, эпителиальных клетках кишечника [54]. В желудке активация рецепторов APJ на энтерохромаффиноподобных клетках апелином, секретлируемым париетальными клетками, может ингибировать высвобождение энтерохромаффиноподобными клетками гистамина, который, в свою очередь, уменьшает секрецию кислоты париетальными клетками. В поджелудочной железе апелин ингибирует секрецию инсулина, индуцированную глюкозой. Предполагается существование функциональной взаимозависимости между сигнальными путями апелина и инсулина на уровне адипоцитов, где инсулин стимулирует продукцию апелина [35].

Влияние на жировую ткань. Адипоциты, секретлирующие апелин, являются возможными источниками плазматического апелина [35]. На экспрессию апелина в жировой ткани влияют многие факторы, в том числе голодание, гипоксия [36, 55] и инсулин [56]. В то время как инсулин стимулирует экспрессию апелина жировой тканью [35, 56], апелин ингибирует секрецию инсулина [57], демонстрируя взаи-

мозависимость этих двух систем. Активация системы апелин/APJ также принимает участие в усвоении глюкозы благодаря активации AMP-активируемой протеинкиназы (AMPK) и Akt [58]. Апелин может быть также вовлечен в васкуляризацию жировой ткани [55].

ДЕЙСТВИЕ ПЕПТИДОВ АПЕЛИНА ПРИ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Ожирение и диабет. Данные, имеющиеся в современной литературе, указывают, что плазматический апелин положительно коррелирует с индексом массы тела человека, а увеличенная экспрессия апелина в плазме и жировой ткани у пациентов с ожирением может быть снижена благодаря низкокалорийной диете, приводящей к потере веса [59]. Однако на моделях ожирения у мышей было показано, что не ожирение, а уровень инсулина является основным фактором, определяющим повышение экспрессии апелина [35]. Это означает, что экспрессия апелина увеличивается не просто при ожирении, а в ответ на гиперинсулинемию, связанную с ожирением, хотя исследование влияния плазматического апелина на сахарный диабет 2-го типа дает разрозненные результаты [60, 61]. Регуляция экспрессии апелина при ожирении может быть полезной при метаболическом синдроме, потому что периферийное введение апелина снижает толерантность к глюкозе и улучшает ее утилизацию при ожирении у инсулин-резистентных мышей [58]; и наоборот, нокаутные по гену апелина мыши обладают сниженной чувствительностью к инсулину [62]. Апелин также уменьшает количество жировой ткани у мышей с ожирением, не изменяя потребление пищи, путем увеличения экспрессии разобщающего белка UCP1 и расхода энергии [63]. Очевидно, что регуляция метаболизма апелином при ожирении может также оказать благоприятное действие на сердечно-сосудистую систему, снижая артериальное давление и повышая сократимость сердца.

Сердечно-сосудистые заболевания. В исследованиях Chen et al. [64], Chong et al. [65] и Miettinen et al. [66] были отмечены изменения уровня апелина в плазме крови человека в условиях сердечной дисфункции с довольно противоречивыми результатами и очень широким диапазоном концентраций (20–4000 пг/мл) в зависимости от уровня патологии и метода определения пептида. В основном предполагается, что уровень плаз-

матического апелина возрастает на ранних стадиях сердечной недостаточности [64], но возвращается к исходному уровню или снижается на более поздних стадиях [65, 66]. Было установлено, что экспрессия мРНК APJ снижается в левом желудочке (ЛЖ) у пациентов с идиопатической дилатационной кардиомиопатией [67]. Эти данные позволяют предположить, что увеличение уровня экспрессии апелина на ранних стадиях заболевания может быть компенсаторным действием, повышающим силу сокращения сердца. Уровень экспрессии апелина и его рецептора затем может подавляться на более поздних стадиях сердечной недостаточности, когда положительное инотропное действие апелина начнет ухудшать состояние сердца в связи с увеличением потребности в кислороде. Уровень [Pyr1]апелина-13 в сердце возрастает в ответ на гипоксию через гипоксия-индуцибельный фактор-1 [68]. Кроме того, уровень экспрессии апелина и его рецептора повышается при ишемической сердечной недостаточности у крыс [66, 69].

В ряде исследований были предприняты попытки изучить роль системы апелин/APJ в патогенезе атеросклероза. Так, в 2007 г. с помощью трансгенных моделей у мышей Hashimoto et al. [70] показали, что апелин-13 стимулирует экспрессию субъединицы NADPH-оксидазы и индуцирует связанную с окислительным стрессом пролиферацию в гладкомышечных клетках сосудов, а рецептор APJ может участвовать в развитии атеросклероза, связанного с гиперхолестеринемией. У человека уровень экспрессии апелина увеличивается в атеросклеротической коронарной артерии [71]. Кроме того, уровни экспрессии апелина и APJ увеличиваются при стенозе аортального клапана – процессе, который отражает некоторые признаки атеросклероза [72], демонстрируя вовлеченность апелиновой системы в атеросклероз у человека. Апелин также предотвращает образование аневризмы аорты у мышей [73].

Предполагается участие системы апелин/APJ при патофизиологическом ангиогенезе, который способствует портосистемной коллатерализации и висцеральной неоваскуляризации у портальных гипертензивных крыс [74], неоангиогенезу при циррозе печени [75] и неоангиогенезу опухоли [76, 77]. Тем не менее ангиогенное действие апелина [78, 79] может вносить серьезный вклад в восстановление сердца после ишемии. Таким образом, апелин очень важен для сохранения функции поврежденного сердца.

Защитное действие апелина при ишемическом и реперфузионном повреждении сердца. Имеющиеся в современной литературе данные показывают, что под действием апелина происходит уменьшение ишемического и реперфузионного (И/Р) повреждения миокарда *in vitro* и *in vivo*. В работе Zeng et al. [80] на модели изолированного сердца крысы было показано, что глобальная ишемия приводит к значительному увеличению экспрессии APJ-рецептора на уровне мРНК и продукции белка, а также к ухудшению функции сердца, которая существенно улучшается после перфузии раствором, содержащим апелин-13. Кроме того, эти же авторы на модели аноксии/реоксигенации неонатальных кардиомиоцитов крысы продемонстрировали, что апелин-13 уменьшает апоптоз и генерацию активных форм кислорода (АФК), увеличивает активность супероксиддисмутазы (SOD) и снижает образование малонового диальдегида (MDA) [80]. На модели изолированного сердца крысы Rastaldo et al. [81] показали отсутствие достоверного влияния апелина-13 на снижение размера инфаркта миокарда (ИМ) и повреждение клеточных мембран при введении пептида до ишемии. Однако перфузия апелином-13 по окончании периода глобальной ишемии приводила к уменьшению ИМ вдвое, по сравнению с контролем, и ограничению реперфузионной контрактуры, а также к снижению активности лактатдегидрогеназы (LDH) в миокардиальном эффуенте. Существенно, что эти эффекты отменялись в присутствии ингибитора NO-синтазы N^G-нитро-L-аргинина (L-NNA), демонстрируя NO-зависимый механизм кардиозащитного действия апелина. Кроме того, было показано, что ишемический период увеличивает экспрессию APJ-рецептора на уровне белка [81]. Simpkin et al. [82] провели сравнительное исследование эффективности действия двух C-концевых фрагментов: апелина-13 и апелина-36. На модели изолированного сердца крысы и острого ИМ у мышей *in vivo* под действием апелина-13 уменьшение размеров ИМ происходило в большей степени, чем под действием апелина-36. В хронических экспериментах *in vivo* пятидневное введение крысам [Pyr1]апелина-13 после окклюзии коронарной артерии уменьшало размеры ИМ к окончанию двухнедельного периода реперфузии [83]. В ряде работ показано, что кардиозащитное действие пептидов апелина при И/Р-повреждении связано с активацией PI3K → Akt → NO и MEK1/2 → ERK1/2 сигнальных путей в кардиомиоцитах [81, 84–86].

МЕХАНИЗМЫ ЗАЩИТНОГО ДЕЙСТВИЯ АПЕЛИНА

Запуск каскада реперфузионных киназ (RISK-сигнализация). Кардиопротекторное действие апелина включает стимуляцию механизмов запрограммированного клеточного выживания, которые запускаются реперфузионными киназами (RISK) [87, 88]. Связывание пептидов апелина с рецептором APJ активирует сигналинг через Gi/o-белок с дальнейшим фосфорилированием PI3K и Akt-киназы [34, 89] (рис. 2). В пользу активации Gi/o-белков свидетельствует то, что апелин снижает стимулированную форсколином и гормонами активность аденилатциклазы в клетках, где экспрессируется рецептор APJ [90]. Существенно, что данный путь включает образование NO в результате активации eNOS протеинкиназой B (Akt). Последующая активация гуанилатциклазы под действием NO приводит к образованию cGMP, который, в свою очередь, активирует протеинкиназу G (PKG) и ε-изоформу протеинкиназы C (PKC). Следствием этого является открытие митохондриальных АТР-зависимых K⁺-каналов (mitoK⁺АТР-каналов), инициирующих закрытие митохондриальной поры (mPTP) [88, 91]. Участие mitoK⁺АТР-каналов в механизмах защитного действия апелинов было подтверждено тем, что 5-гидроксидеканоат (5-HD) — ингибитор mitoK⁺АТР-каналов — отменял/снижал влияние C-концевых фрагментов апелина-12 на размеры ИМ [92]. Еще одной мишенью Akt является киназа гликогенсинтазы-3β (GSK-3β). В результате ингибирования GSK-3β происходит блокирование открытия митохондриальной поры и, как следствие, — защита клетки от гибели [88, 93].

Другие сигнальные пути связаны с активацией Ras-белков [89, 94], приводящей к запуску митоген-активируемого протеинкиназного (MAP-киназного) каскада. Так, сопряжение APJ с Gi/o может стимулировать передачу сигнала через PKC — активатор малого G-белка Ras. Ras затем активирует MAP-киназный каскад Raf-1 → MEK1/2 → ERK1/2. Данные MAP-киназы подавляют проапоптотические белки BAX и BAD либо напрямую, либо посредством дистальных сигнальных компонентов, таких как рибосомальные p70S6- и p90RS-киназы, что, в свою очередь, приводит к ингибированию высвобождения цитохрома c (Cyt c), препятствуя открытию mPTP (рис. 2). Сопряжение APJ с Gq/11 может стимулировать передачу сигнала через фосфо-

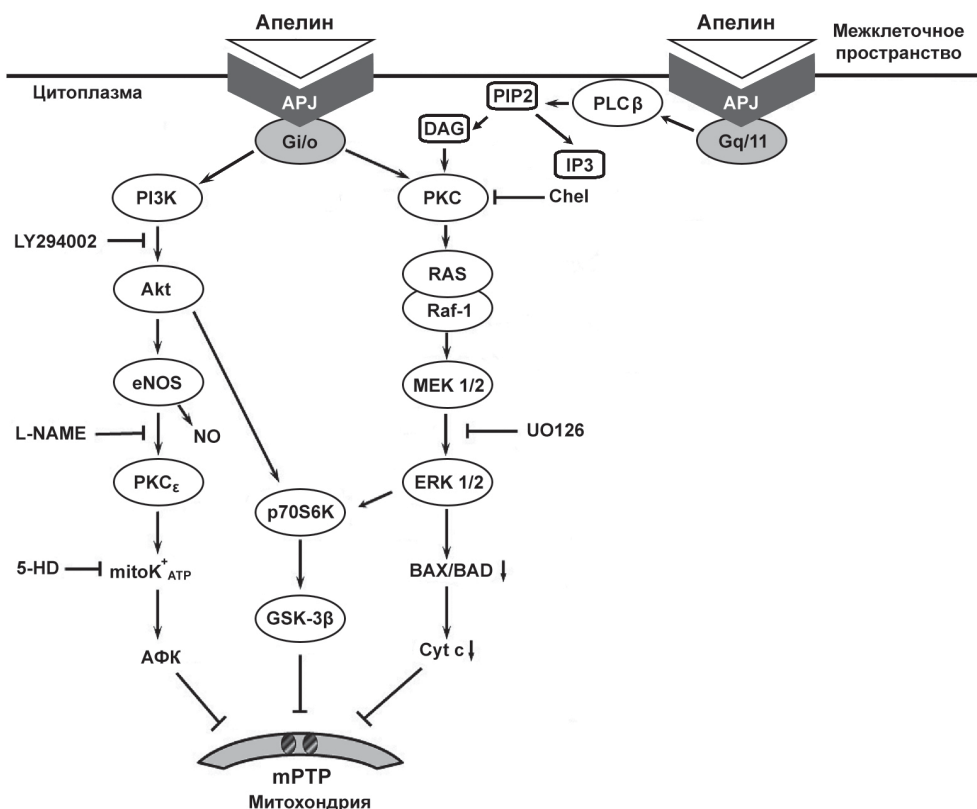


Рис. 2. Активация RISK-сигналикации системой апелин/рецептор APJ в ишемизированном кардиомиоците предупреждает открытие митохондриальной поры (mPTP). Ras – семейство малых G-белков; MEK1/2 – киназа митоген-активируемой протеинкиназы (MAP2K); ERK1/2 – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами; BAX/BAD – проапоптотические белки; Cyt c – цитохром c; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; Akt – протеинкиназа B; eNOS – эндотелиальная NO-синтаза; PKCε – ε-изоформа протеинкиназы C; mitoK⁺ATP-каналы – митохондриальные ATP-зависимые K⁺-каналы; GSK-3β – киназа гликогенсинтазы 3β; p70S6K – рибосомная протеиновая киназа S6 β1; Chel – хелеритрин; PLCβ – фосфолипаза Cβ; PIP2 – фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат; IP3 – инозитол-1,4,5-трисфосфат; DAG – диацилглицерол; АФК – активные формы кислорода; LY294002 – селективный ингибитор PI3K; Raf-1 – серин/треониновая протеинкиназа

липазу Cβ (PLCβ), включающую гидролиз фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфата (PIP2) до инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP3) и диацилглицерола (DAG). DAG далее активирует протеинкиназу C (PKC). В результате активации RAS под действием PKC происходит запуск MAP-киназного каскада Raf-1 → MEK1/2 → ERK1/2. Наконец, Gq/11 может сигнализировать независимо от PLCβ и PKC через Ras и этот каскад MAPK [93]. (Этот путь не представлен на рис. 2.)

Активация MAP-киназных каскадов связана с реперфузионным повреждением и нарушениями сердечного ритма. Было показано, что изменения в сигнальных путях MAP-киназ у больных после кардиохирургических вмешательств, кардиоплегии и искусственного кровообращения, участвуют в коронарной микроциркуляторной дисфункции с негативными последствиями для перфузии миокарда [95]. Блокирование RISK-сигналикации (рис. 2) селективными ингибиторами PI3K (LY294002 или вортманнином) [80, 82], инги-

биторами ERK1/2 (UO126 или PD098059) [44] или ингибитором p70S6-киназы рапамицином [90] отменяет действие апелина-13 на митохондриальную пору и приводит к гибели кардиомиоцитов, усиливая некроз и апоптоз.

Механизмы антиоксидантной защиты. Помимо ингибирования открытия mPTP, уменьшение реперфузионного повреждения миокарда под действием апелина может быть связано с антиоксидантными свойствами NO. В культуре кардиомиоцитов при моделировании гипоксии и реоксигенации экзогенный апелин-13 уменьшал образование вторичного продукта свободнорадикального окисления липидов MDA и супероксидного анион-радикала (O₂^{•-}), а также увеличивал экспрессию антиоксидантного фермента SOD, утилизирующей O₂^{•-} [80]. Было показано, что при введении апелина-13 отмечаются меньшие нарушения структуры мембран кардиомиоцитов и снижение продукции MDA в поврежденном изопротеренолом миокарде крыс *in vivo* [96]. Подавление окислительного стресса, инду-

цированного пероксидом водорода (H_2O_2) в изолированных неонатальных кардиомиоцитах крысы, с помощью [Pyr1]апелина-13 сопровождалось повышением уровня мРНК и активности каталазы (CAT) [97]. Также у мышей *in vivo* под действием диеты, обогащенной [Pyr1]апелином-13, снижение гипертрофии ЛЖ сопровождалось уменьшением концентрации липогидропероксидов в плазме и увеличением активности CAT в миокарде [97]. Таким образом, действие апелина может быть связано со снижением генерирования АФК, вызванным возрастанием экспрессии генов, кодирующих SOD и CAT и увеличением продукции NO.

В присутствии NO $O_2^{\cdot-}$ образует пероксинитрит ($ONOO^{\cdot}$), который расщепляется на высокоактивный цитотоксичный гидроксильный радикал ($^{\cdot}OH$) и радикал диоксида азота ($NO_2^{\cdot}$) (рис. 3) [98]. Наличие АФК и азота ($O_2^{\cdot-}$, $ONOO^{\cdot}$, $^{\cdot}OH$, $NO_2^{\cdot}$) приводит к дисфункции и гибели клеток. Можно предположить, что удаление избытка супероксида за счет повышения активности SOD под влиянием апелина должно уменьшать окислительный стресс. В то же время увеличение активности SOD способствует образованию H_2O_2 , менее токсичного соединения, но также способного инициировать повреждения миокарда. Как известно, H_2O_2 разлагается на воду и кислород под действием CAT [97], активность которой может возрастать под действием апелина. Также пероксид водорода может быть трансформирован в воду под действием глутатионпероксидазы (GSHPx) в результате окисления восстановленного глутатиона до дисульфида глутатиона. Поскольку апелин активирует эндотелиальную NO-синтазу, то образующийся вследствие этого NO способен конкурировать с SOD за супероксид-анион $O_2^{\cdot-}$. Вероятно, увеличения активности SOD под действием апелина достаточно для того, чтобы предупредить образование цитотоксичного $ONOO^{\cdot}$ и тем самым снижать нежелательные последствия окислительного стресса.

Этот гипотетический механизм частично объясняет, каким образом С-концевые фрагменты апелина могут участвовать в регуляции свободнорадикального окисления и улучшать антиоксидантный потенциал ишемизированного сердца при реперфузии.

СТРУКТУРНЫЕ АНАЛОГИ АПЕЛИНА

Циклические аналоги апелина-12 и -13. Необходимость повышения устойчивости пеп-

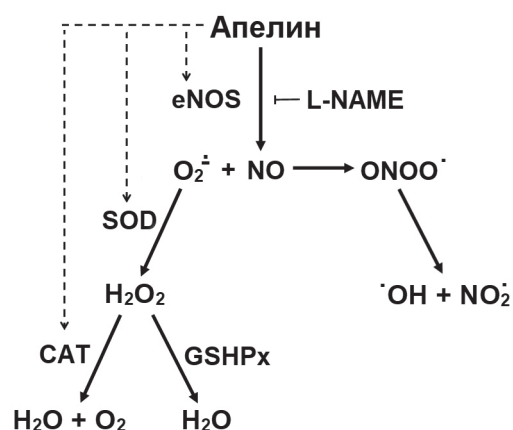


Рис. 3. Антиоксидантное действие апелина. eNOS — эндотелиальная NO-синтаза; SOD — супероксиддисмутаза; CAT — каталаза; GSHPx — глутатионпероксидаза; L-NAME — ингибитор eNOS метиловый эфир N-нитро-L-аргинина

тидов апелина по отношению к действию аминокислот и карбоксипептидаз в биологических системах [18] обусловила новое направление работ, связанных с синтезом фармакологических агонистов APJ-рецептора. Было показано, что циклические аналоги апелина (рис. 4) связываются с апелиновым рецептором и обладают функциональной активностью, обусловленной запуском внутриклеточной сигнализации [99, 100]. В работе Macaluso et al. [99] по оценке возможностей конкурентного связывания с APJ циклических фрагментов апелина-13 различной длины (рис. 4) было выяснено, что соединения, содержащие последовательность Arg-Pro-Arg-Leu, демонстрируют четко определенный β -поворот, необходимый для связывания с рецептором. Циклические аналоги апелина-12 показали дозозависимый ингибиторный эффект по отношению к форсколин-индуцированному накоплению cAMP. Кроме того, они, аналогично природному пептиду, могут влиять на пути внутриклеточной сигнализации [100].

Модификации апелина-13 и апелина-36. В работе Wang et al. [101] было изучено влияние двух структурных аналогов [Pyr1]апелина-13, включающих бромирование С-концевого фенилаланина, на И/Р-повреждение сердца у мышей *in vivo*. При этом наиболее оптимальная модификация пептида не приводила к ухудшению кардиопротекторных свойств по сравнению с природным [Pyr1]апелином-13. Введение этой структуры уменьшало размер ИМ у мышей, по сравнению с контролем, более чем в 2 раза. Одновременно наблюдалась меньшая дегградация модифицированной структуры под действием ACE2. Влияние модификации

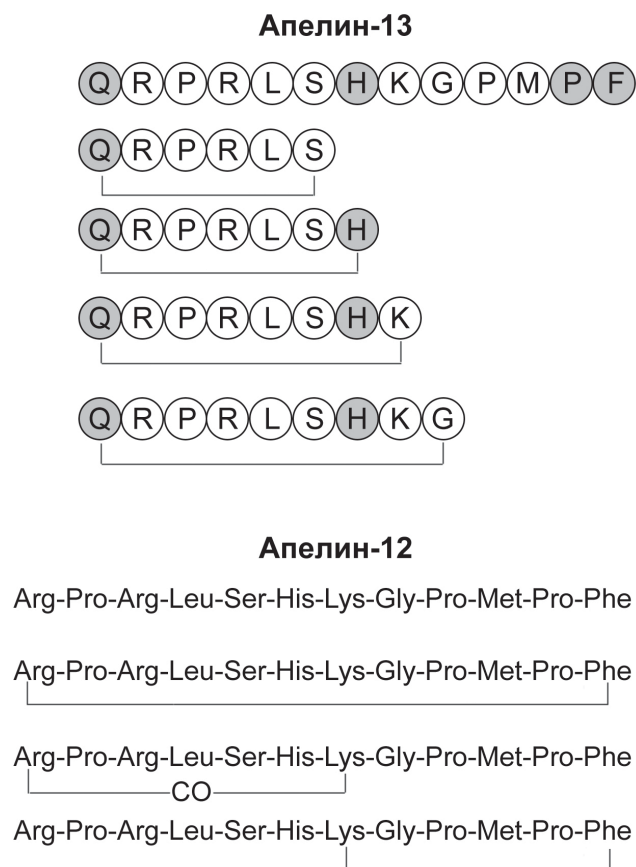


Рис. 4. Циклические аналоги апелина-13 и апелина-12. Апелин-13 — линии обозначают амидные связи между *N*- и *C*-концами (циклизация «от головы к хвосту»). Затемненные кружки обозначают аминокислотные остатки с наибольшим влиянием на связывание с рецептором APJ. Апелин-12 — линии обозначают связи между аминокислотными остатками; CO — карбонильная группа

апелина-36 по *N*-концу полиэтиленгликолем (ПЭГ, 40 кДа) было изучено на крысах в работе Jia et al. [102]. Инфузия конъюгата ПЭГ—апелин-36 в течение 20 минут поддерживала более высокий уровень апелина-36 в плазме крови в течение 2 часов и обеспечивала увеличение фракции выброса сердца по сравнению с инфузией немодифицированного апелина-36 после моделирования ИМ у крыс.

Также впервые был синтезирован не-пептидный агонист апелинового рецептора E339-3D6, который проявил себя как частичный агонист в отношении образования cAMP и как полный агонист в отношении интернализации рецептора APJ [103]. Это соединение более эффективно препятствовало вазоконстрикции колец аорты крысы, вызванной норадреналином, по сравнению с природным апелином-17.

Результаты исследований по влиянию модификации *C*-концевой части молекулы апелина на связывание с APJ-рецептором [18, 104,

105] показали, что замена или удаление *C*-концевого Phe снижает гипотензивные свойства апелина-13 и ингибирует интернализацию апелинового рецептора. Кроме того, Iturrioz et al. [105] продемонстрировали наличие гидрофобной полости в нижней части кармана связывания рецептора APJ, в которую вкладывается *C*-концевой Phe пептидов апелина-13 или апелина-17 благодаря Trp¹⁵², Trp²⁵⁹ и Phe²⁵⁵, которые, как было установлено с помощью молекулярного моделирования, являются ключевыми аминокислотными остатками для интернализации рецептора. Однако имеются данные, свидетельствующие о том, что удаление или замена *C*-концевого Phe влияет только на интернализацию рецептора APJ, но не оказывает влияния на связывание апелина с рецептором или сопряжение с G-белком. Так, Pitkin et al. [106] показали, что структура, аналогичная [Pyr1]апелин-13, без *C*-концевого Phe обнаруживала сродство к апелиновому рецептору и проявляла активность агониста в опытах *in vitro* на подкожной вене человека. Macaluso et al. [107] удалось создать антагонист рецептора APJ со свойствами конкурентного ингибитора, состоящий из двух циклизированных последовательностей Arg-Pro-Leu-Arg, соединенных между собой линкерным участком Lys-His. Работы Murza et al. [30] по изучению возможности связывания соединений пептидной природы с APJ-рецептором привели к созданию ряда синтетических агонистов с более высоким сродством и протеолитической устойчивостью в плазме по сравнению с природным [Pyr1]апелином-13.

Структурные аналоги апелина-12. С целью повышения протеолитической устойчивости природного апелина-12 и стабильности при хранении были синтезированы его структурные аналоги (табл. 2) [108, 109].

Одна из модификаций апелина-12 заключалась в метилировании *N*-концевого Arg (пептиды AII и AIII). Показано, что введение в пептидную цепь *N*^α-метиламинокислот существенно повышает устойчивость этих соединений к ферментативной биodeградации, в том числе к действию аминопептидаз [110, 111]. Кроме того, *C*-концевая часть молекул пептидов AIII и AIV была защищена от действия карбоксипептидаз амидной группой. Модификация AIV заключалась также во введении нитрогруппы в гуанидиновую группу остатка Arg для увеличения продукции NO. Стабильность этих структурных аналогов апелина-12 при хранении была повышена за счет замены легко окисляющегося Met на Nle — природную аминокислоту небелкового

Таблица 2. Апелин-12 и его структурные аналоги

Структура	М, г/моль	Обозначения пептидов
H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-Phe-OH	1422,7	Апелин-12
H-(N ^ε Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH	1418,7	АII
H-(N ^ε Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-NH ₂	1417,7	АIII
H-(N ^ε NO ₂)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-NH ₂	1448,7	АIV
H-Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Met-Pro-dAla-OH	1346,6	AV

Примечание. Модификации в структуре природного апелина-12 выделены жирным шрифтом.

происхождения, устойчивую к окислению кислородом. Для оценки роли C-концевого Phe в кардиопротекторном действии апелина-12 при ишемии и реперфузии сердца эта аминокислота была заменена на d-Ala в модификации AV. Полученные аналоги апелина-12 были исследованы на моделях различного физиологического уровня при ишемии и реперфузии сердца.

Было показано, что синтезированные на основе апелина-12 агонисты рецептора APJ способны подавлять процессы свободнорадикального окисления в культуре кардиомиоцитов в изолированном перфузируемом сердце и в целом организме [112]. Их действие включает перехват супероксид-аниона, снижение продукции пероксида водорода в митохондриях кардиомиоцитов, а также уменьшение образования АФК в ишемизированном миокарде при реперфузионном стрессе. Снижение генерации короткоживущих АФК под действием этих пептидов сочетается с уменьшением образования продуктов свободнорадикального окисления липидов в моделях *ex vivo* и *in vivo* и уменьшением Cu²⁺-индуцированного окисления липопротеидов низкой плотности в плазме крови человека *in vitro* [113, 114]. Антиоксидантные эффекты аналогов апелина-12 в реперфузированном миокарде проявляются увеличением активности Cu,Zn-SOD, CAT и GSHPx [113], которое, вероятно, связано с экспрессией генов этих ферментов под влиянием пептидов [97]. Существенно, что защита миокарда от реперфузионного повреждения на различных экспериментальных моделях фармакологическими агонистами APJ, состоящими из 12 а.о., включает уменьшение повреждения мембран кардиомиоцитов и улучшение энергетического состояния кардиомиоцитов [109, 114–116].

В нашей лаборатории было показано, что одним из наиболее эффективных структурных аналогов апелина-12 является пептид H-(N^εMe)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-

Pro-Nle-Pro-Phe-OH (AII). Роль сигнальных механизмов, участвующих в посткондиционировании сердца с AII, была изучена на анестезированных крысах *in vivo*, подвергнутых окклюзии коронарной артерии и восстановлению коронарного кровотока [85]. Ингибиторы MEK1/2 и PI3K (UO126 и LY294002 соответственно) снижали защитную эффективность AII. Об этом свидетельствовала отмена ограничения размеров ИМ, ослабление метаболического восстановления зоны риска ЛЖ сердца и нарушения целостности сарколеммы при совместном введении AII с этими ингибиторами. Это показывает, что MEK1/2 и PI3K являются принципиально важными внутриклеточными молекулами, участвующими в эффектах AII, так же, как и в случае природного апелина-13 и апелина-36 [80, 82]. Дополнительно было выяснено, что ингибирование NO-синтазы (NOS) с помощью метилового эфира N-нитро-L-аргинина (L-NAME) снижает полезные эффекты AII при посткондиционировании сердца крыс *in vivo* [85]. Как известно, образование NO приводит к открытию mitoK⁺АТР-каналов, препятствуя открытию mPTP [117, 118]. Введение блокатора mitoK⁺АТР-каналов (5-HD) совместно с AII отменяло влияние пептида на снижение размера ИМ, уменьшение активности маркеров некроза и ухудшало метаболическое восстановление зоны риска к окончанию реперфузии [92], указывая на участие агониста AII в этом механизме защиты. Недавно была завершена разработка новой технологии синтеза структурного аналога AII с использованием Fmoc-методологии в сочетании с временной защитой гуанидиновых остатков Arg протонированием (солеобразованием) на стадии образования амидной связи [119]. Она позволила исключить образование побочных продуктов и повысить целевой выход пептида. Существенно, что изучение биоактивности полученного по новой схеме агониста AII на кроликах с хронической сердечной недоста-

точностью (ХСН), вызванной длительным введением доксорубина, подтвердило его способность уменьшать дисфункцию ЛЖ при инфузии. Очевидно, что эта технология может быть использована для синтеза фармакологических лигандов рецептора APJ с метилированным *N*-концевым аргинином, которые могут иметь терапевтический потенциал.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты исследований, выполненных в различных лабораториях в течение последнего десятилетия, показали, что система апелин/рецептор APJ является важным регулятором сердечно-сосудистой системы в нормальных и патологических условиях. Создание фармакологических лигандов рецептора APJ, которые обладают повышенной устойчивостью к воздействию протеолитических ферментов и стабильностью при хранении, указывает на возможность разработки новых лекарственных средств для применения при реперфузионном повреждении сердца, сердечной недостаточности и окислительном стрессе. Наши работы показывают, что одним из перспективных подходов к созданию таких лигандов является модификация *C*- и *N*-концевых остатков аминокислот в молекуле апелина-12, обладающего высокой биологической активностью, и замена остатка легко окисляющегося Met на Nle [108]. Это позволило синтезировать устойчивый к действию протеаз аналог природного апелина-12 H-(N^εMe)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-

Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH (АП), оказывающий мощное влияние на сердце в условиях дефицита кислорода и энергетических субстратов. Он обеспечивает меньшее повреждение функции сердца при окислительном стрессе, снижает необратимые повреждения кардиомиоцитов и улучшает метаболическое состояние миокарда после ишемии и реперфузии, а также обладает выраженными антиоксидантными свойствами. Структурный аналог АП не уступает по эффективности кардиозащиты природным пептидам апелину-12, апелину-13 и [Pyr1]апелину-13. Мы полагаем, что это соединение, доклиническое исследование которого завершается в настоящее время, может найти применение при терапии целого ряда заболеваний, связанных с сердечной патологией.

Вклад авторов. О.И. Писаренко – концепция и руководство работой, И.М. Студнева – анализ данных литературы. Оба автора подготовили рукопись к печати.

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

Благодарности. Авторы признательны М.В. Сидоровой и Ю.А. Пелогейкиной за ценные советы при обсуждении этого обзора.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coelho, M., Oliveira, T., and Fernandes, R. (2013) Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ, *Arch. Med. Sci.*, **9**, 191-200, doi: 10.5114/aoms.2013.33181.
2. Castan-Laurell, I., Masri, B., and Valet, P. (2019) The apelin/APJ system as a therapeutic target in metabolic diseases, *Expert. Opin. Ther. Targets*, **23**, 215-225, doi: 10.1080/14728222.2019.1561871.
3. Kinjo, T., Higash, H., Un, K., and Kuramoto, N. (2021) Apelin/apelin receptor system molecular characteristics, physiological roles, and prospects as a target for disease prevention and pharmacotherapy, *Curr. Mol. Pharmacol.*, **14**, 210-221, doi: 10.2174/1874467213666200602133032.
4. O'Dowd, B. F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H. H., Tsui, L. C., Kennedy, J. L., Shi, X., Petronis, A., George, S. R., and Nguyen, T. (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11, *Gene*, **136**, 355-360, doi: 10.1016/0378-1119(93)90495-o.
5. Cai, X., Bai, B., Zhang, R., Wang, Ch., and Chen, J. (2017) Apelin receptor homodimer-oligomers revealed by single-molecule imaging and novel G protein-dependent signaling, *Sci. Rep.*, **7**, 40335, doi: 10.1038/srep40335.
6. Charo, D. N., Ho, M., Fajardo, G., Kawana, M., Kundu, R. K., Sheikh, A. Y., Finsterbach, Th. P., Leeper, N. J., Ernst, K. V., Chen, M. M., Ho, Y. D., Chun, H. J., Bernstein, D., Ashley, E. A., and Quertermous, Th. (2009) Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **297**, 1904-1913, doi: 10.1152/ajpheart.00686.2009.
7. Li, Y., Chen, J., Bai, B., Du, H., Liu, Y., and Liu, H. (2012) Heterodimerization of human apelin and kappa

- opioid receptors: roles in signal transduction, *Cell Signal.*, **24**, 991-1001, doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.012.
8. Abbasloo, E., Najafipour, H., and Esmacili-Mahani, S. (2016) Induction of antinociceptive tolerance to the chronic intrathecal administration of apelin-13 in rat, *Neuropeptides*, **60**, 7-12, doi: 10.1016/j.npep.2016.08.001.
 9. Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M. X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., and Fujino, M. (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **251**, 471-476, doi: 10.1006/bbrc.1998.9489.
 10. Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2001) Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding, *Biochim. Biophys. Acta*, **1538**, 162-171, doi: 10.1016/S0167-4889(00)00143-9.
 11. Roberts, E. M., Newson, M. J. F., Pope, G. R., Landgraf, R., Lolait, S. J., and O'Carroll, A. M. (2009) Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice, *J. Endocrinol.*, **202**, 453-462, doi: 10.1677/JOE-09-0134.
 12. Mughal, A., and O'Rourke, S. T. (2018) Vascular effects of apelin: mechanisms and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.*, **190**, 139-147, doi: 10.1016/j.pharmthera.2018.05.013.
 13. Bertrand, C., Valet, P., and Castan-Laurell, I. (2015) Apelin and energy metabolism, *Front. Physiol.*, **6**, 115, doi: 10.3389/fphys.2015.00115.
 14. Chung, S. C., Ho, L., Tian, J., and Reversade, B. (2013) ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the Apelin receptor, *Dev. Cell.*, **27**, 672-680, doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.002.
 15. Lee, D. K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A. P., Liu, Y., Osmond, D. H., George, S. R., and O'Dowd, B. F. (2000) Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor, *J. Neurochem.*, **74**, 34-41, doi: 10.1074/jbc.M908417199.
 16. Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., and Fujino, M. (2000) Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin, *J. Biol. Chem.*, **275**, 21061-21067, doi: 10.1074/jbc.M908417199.
 17. Klein, M. J., and Davenport, A. P. (2005) Emerging roles of apelin in biology and medicine, *Pharmacol. Ther.*, **107**, 198-211, doi: 10.1016/j.pharmthera.2005.04.001.
 18. Japp, A. G., and Newby, D. E. (2016) Unlocking the therapeutic potential of apelin, *Hypertension*, **68**, 307-309, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07057.
 19. Shin, K., Chapman, N. A., Sarker, M., Kenward, C., Huang, S. K., Weatherbee-Martin, N., Pandey, A., Dupré, D. J., and Rainey, J. K. (2017) Bioactivity of the putative apelin proprotein expands the repertoire of apelin receptor ligands, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Sub.*, **1861**, 1901-1912, doi: 10.1016/j.bbagen.2017.05.017.
 20. Shin, K., Pandey, A., Liu, X. Q., Anini, Y., and Rainey, J. K. (2013) Preferential apelin-13 production by the proprotein convertase PCSK3 is implicated in obesity, *FEBS Open Bio.*, **3**, 328-333, doi: 10.1016/j.fob.2013.08.001.
 21. Adam, F., Khatib, A. M., Lopez, J. J., Vatiér, C., Turpin, S., Muscat, A., Soulet, F., Aries, A., Jardin, I., Bobe, R., Stepanian, A., de Prost, D., Dray, C., Rosado, J. A., Valet, P., Feve, B., and Siegfried, G. (2016) Apelin: an antithrombotic factor that inhibits platelet function, *Blood*, **127**, 908-920, doi: 10.1182/blood-2014-05-578781.
 22. McKinnie, S. M., Fischer, C., Tran, K. M., Wang, W., Mosquera, F., Oudit, G. Y., and Vederas, J. C. (2016) The metalloprotease neprilysin degrades and inactivates apelin peptides, *Chem. Bio. Chem.*, **17**, 1495-1498, doi: 10.1002/cbic.201600244.
 23. Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., and Tummino, P. (2002) Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 14838-14843, doi: 10.1074/jbc.M200581200.
 24. Kehoe, K., Elzen, R., Verkerk, R., Sima, Y., van der Veken, P., Lambeir, A. M., and De Meester, I. (2016) Prolyl carboxypeptidase purified from human placenta: its characterization and identification as an apelin-cleaving enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **1864**, 1481-1488, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.07.004.
 25. Fischer, C., Lamer, T., Wang, W., McKinnie, S. M. K., Iturrioz, X., Llorens-Cortes, C., Oudit, G. Y., and Vederas, J. C. (2019) Plasma kallikrein cleaves and inactivates apelin-17: palmitoyl- and PEG-extended apelin-17 analogs as metabolically stable blood pressure-lowering agents, *Eur. J. Med. Chem.*, **166**, 119-124, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.040.
 26. Ma, Y., Yue, Y., Ma, Y., Zhang, Q., Zhou, Q., Song, Y., Shen, Y., Li, X., Ma, X., Li, C., Hanson, M. A., Han, G. W., Sickmier, E. A., Swaminath, G., Zhao, S., Stevens, R. C., Hu, L. A., Zhong, W., Zhang, M., and Xu, F. (2017) Structural basis for apelin control of the human apelin receptor, *Structure*, **25**, 858-866.e4, doi: 10.1016/j.str.2017.04.008.
 27. Medhurst, A. D., Jennings, C. A., Robbins, M. J., Davis, R. P., Ellis, C., Winborn, K. Y., Lawrie, K. W., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J. E., Herrity, N. C., Murdock, P., and Darker, J. G. (2003) Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin, *J. Neurochem.*, **84**, 1162-1172, doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01587.x.

28. Langelan, D. N., Bebbington, E. M., Reddy, T., and Rainey, J. K. (2009) Structural insight into G-protein coupled receptor binding by apelin, *Biochemistry*, **48**, 537-548, doi: 10.1021/bi801864b.
29. Tyndall, J. D., Pfeiffer, B., Abbenante, G., and Fairlie, D. P. (2005) Over one hundred peptide-activated G protein-coupled receptors recognize ligands with turn structure, *Chem. Rev.*, **105**, 793-826, doi: 10.1021/cr040689g.
30. Murza, A., Parent, A., Besserer-Offroy, E., Tremblay, H., Karadereye, F., Beaudet, N., Leduc, R., Sarret, P., and Marsault, É. (2012) Elucidation of the structure-activity relationships of apelin: influence of unnatural amino acids on binding, signaling, and plasma stability, *Chem. Med. Chem.*, **7**, 318-325, doi: 10.1002/cmdc.201100492.
31. Kleinz, M. J., and Davenport, A. P. (2004) Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endothelial cells, *Regul. Pept.*, **118**, 119-125, doi: 10.1016/j.regpep.2003.11.002.
32. Kleinz, M. J., Skepper, J. N., and Davenport, A. P. (2005) Immunocytochemical localization of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells, *Regul. Pept.*, **126**, 233-240, doi: 10.1016/j.regpep.2004.10.019.
33. Barnes, G., Japp, A. G., and Newby, D. E. (2010) Translational promise of the apelin-APJ system, *Heart*, **96**, 1011-1016, doi: 10.1136/hrt.2009.191122.
34. Chapman, N. A., Dupré, D. J., and Rainey, J. K. (2024) The apelin receptor: physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR, *Biochem. Cell Biol.*, **92**, 431-440, doi: 10.1139/bcb-2014-0072.
35. Pitkin, S. L., Maguire, J. J., Bonner, T. I., and Davenport, A. P. (2010) International union of basic and clinical pharmacology. LXXIV. Apelin receptor nomenclature, distribution, pharmacology, and function, *Pharmacol. Rev.*, **62**, 331-342, doi: 10.1124/pr.110.002949.
36. Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M. X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., and Fujimiya, M. (2001) The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism, *Regul. Pept.*, **99**, 87-92, doi: 10.1016/s0167-0115(01)00236-1.
37. Japp, A. G., Cruden, N. L., Amer, D. A., Li, V. K., Goudie, E. B., Johnston, N. R., Sharma, S., Neilson, I., Webb, D. J., Megson, I. L., Flapan, A. D., and Newby, D. E. (2008) Vascular effects of apelin *in vivo* in man, *Am. Coll. Cardiol.*, **52**, 908-913, doi: 10.1016/j.jacc.2008.06.013.
38. Salcedo, A., Garijo, J., Monge, L., Fernandez, N., Luis García-Villalon, A., Sánchez Turrión, V., Cuervas-Mons, V., and Diéguez, G. (2007) Apelin effects in human splanchnic arteries. Role of nitric oxide and prostanoids, *Regul. Pept.*, **144**, 50-55, doi: 10.1016/j.regpep.2007.06.005.
39. Katugampola, S. D., Maguire, J. J., Matthewson, S. R., and Davenport, A. P. (2001) [125I]-(Pyr1) Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man, *Br. J. Pharmacol.*, **132**, 1255-1260, doi: 10.1038/sj.bjp.0703939.
40. Maguire, J. J., Kleinz, M. J., Pitkin, S. L., and Davenport, A. P. (2009) [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease, *Hypertension*, **54**, 598-604, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134619.
41. Kasai, A., Shintani, N., Oda, M., Kakuda, M., Hashimoto, H., Matsuda, T., Hinuma, S., and Baba, A. (2004) Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **325**, 395-400, doi: 10.1016/j.bbrc.2004.10.042.
42. Cox, C. M., D'Agostino, S. L., Miller, M. K., Heimark, R. L., and Krieg, P. A. (2006) Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo, *Dev. Biol.*, **296**, 177-189, doi: 10.1016/j.ydbio.2006.04.452.
43. Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2004) Apelin (65-77) activates p70S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells, *FASEB J.*, **18**, 1909-1911, doi: 10.1096/fj.04-1930fje.
44. Li, F., Li, L., Qin, X., Pan, W., Feng, F., Chen, F., Zhu, B., Liao, D., Tanowitz, H., Albanese, C., and Chen, L. (2008) Apelin-induced vascular smooth muscle cell proliferation: the regulation of cyclin D1, *Front. Biosci.*, **13**, 3786-3792, doi: 10.2741/2967.
45. Kasai, A., Shintani, N., Kato, H., Matsuda, S., Gomi, F., Haba, R., Hashimoto, H., Kakuda, M., Tano, Y., and Baba, A. (2008) Retardation of retinal vascular development in apelin deficient mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **28**, 1717-1722, doi: 10.1161/ATVBAHA.108.163402.
46. Zhang, Q., Shen, Y., Niloy, S. I., O'Rourke, S. T., and Sun, C. (2023) Chronic effects of apelin on cardiovascular regulation and angiotensin II-induced hypertension, *Pharmaceuticals (Basel)*, **16**, 600, doi: 10.3390/ph16040600.
47. Berry, M. F., Pirololi, T. J., Jayasankar, V., Burdick, J., Morine, K. J., Gardner, T. J., and Woo, Y. J. (2004) Apelin has *in vivo* inotropic effects on normal and failing hearts, *Circulation*, **110**, II187-II193, doi: 10.1161/01.CIR.0000138382.57325.5c.
48. Aydin, S., Eren, M. N., Sahin, I., and Aydin, S. (2014) The role of apelins in the physiology of the heart, *Protein Pept. Lett.*, **21**, 2-9, doi: 10.2174/09298665113209990083.
49. Szokodi, I., Tavi, P., Földes, G., Voutilainen-Myllylä, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piuhola, J., Rysä, J., Tóth, M., and Ruskoaho, H. (2002) Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility, *Circ. Res.*, **91**,

- 434-440, doi: 10.1161/01.res.0000033522.37861.69.
50. Ashley, E. A., Powers, J., Chen, M., Kundu, R., Finsterbach, T., Caffarelli, A., Deng, A., Eichhorn, J., Mahajan, R., Agrawal, R., Greve, J., Robbins, R., Patterson, A. J., Bernstein, D., and Quertermous, T. (2005) The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading *in vivo*, *Cardiovasc. Res.*, **65**, 73-82, doi: 10.1016/j.cardiores.2004.08.018.
 51. Scimia, M. C., Hurtado, C., Ray, S., Metzler, S., Wei, K., Wang, J., Woods, C. E., Purcell, N. H., Catalucci, D., Akasaka, T., Bueno, O. F., Vlasuk, G. P., Kaliman, P., Bodmer, R., Smith, L. H., Ashley, E., Mercola, M., Brown, J. H., and Ruiz-Lozano, P. (2012) APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy, *Nature*, **488**, 394-398, doi: 10.1038/nature11263.
 52. De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., Kordon, C., Vaudry, H., Moos, F., and Llorens-Cortes, C. (2004) Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10464-10469, doi: 10.1073/pnas.0403518101.
 53. Reaux-Le Goazigo, A., Morinville, A., Burlet, A., Llorens-Cortes, C., and Beaudet, A. (2004) Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons, *Endocrinology*, **145**, 4392-4400, doi: 10.1210/en.2004-0384.
 54. Huang, Zh., Luo, X., Liu, M., and Chen, L. (2019) Function and regulation of apelin/APJ system in digestive physiology and pathology, *J. Cell. Physiol.*, **234**, 7796-7810, doi: 10.1002/jcp.27720.
 55. Kunduzova, O., Alet, N., Delesque-Touchard, N., Millet, L., Castan-Laurell, I., Muller, C., Dray, C., Schaeffer, P., Herault, J. P., Savi, P., Bono, F., and Valet, P. (2008) Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes, *FASEB J.*, **22**, 4146-4153, doi: 10.1096/fj.07-104018.
 56. Wei, L., Hou, X., and Tatemoto, K. (2005) Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes, *Regul. Pept.*, **132**, 27-32, doi: 10.1016/j.regpep.2005.08.003.
 57. Sorhede Winzell, M., Magnusson, C., and Ahren, B. (2005) The APJ receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice, *Regul. Pept.*, **131**, 12-17, doi: 10.1016/j.regpep.2005.05.004.
 58. Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buléon, M., Cani, P. D., Attané, C., Guigné, C., Carpéné, C., Burcelin, R., Castan-Laurell, I., and Valet, P. (2008) Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice, *Cell. Metab.*, **8**, 437-445, doi: 10.1016/j.cmet.2008.10.003.
 59. Castan-Laurell, I., Vítková, M., Daviaud, D., Dray, C., Kováčiková, M., Kovacova, Z., Hejnova, J., Stich, V., and Valet, P. (2008) Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ, *Eur. J. Endocrinol.*, **158**, 905-910, doi: 10.1530/EJE-08-0039.
 60. Li, L., Yang, G., Li, Q., Tang, Y., Yang, M., Yang, H., and Li, K. (2006) Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects, *Exp. Clin. Endocrinol. Diab.*, **114**, 544-548, doi: 10.1055/s-2006-948309.
 61. Castan-Laurell, I., Dray, C., Knauf, C., Kunduzova, O., and Valet, P. (2012) Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends. Endocrinol. Metab.*, **23**, 234-241, doi: 10.1016/j.tem.2012.02.005.
 62. Yue, P., Jin, H., Aillaud, M., Deng, A. C., Azuma, J., Asagami, T., Kundu, R. K., Reaven, G. M., Quertermous, T., and Tsao, P. S. (2010) Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **298**, E59-E67, doi: 10.1152/ajpendo.00385.2009.
 63. Higuchi, K., Masaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., and Yoshimatsu, H. (2007) Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice, *Endocrinology*, **148**, 2690-2697, doi: 10.1210/en.2006-1270.
 64. Chen, M. M., Ashley, E. A., Deng, D. X., Tsalenko, A., Deng, A., Tabibiazar, R., Ben-Dor, A., Fenster, B., Yang, E., King, J. Y., Fowler, M., Robbins, R., Johnson, F. L., Bruhn, L., McDonagh, T., Dargie, H., Yakhini, Z., Tsao, P. S., and Quertermous, T. (2003) Novel role for the potent endogenous inotrope apelin in human cardiac dysfunction, *Circulation*, **108**, 12, 1432-1439, doi: 10.1161/01.CIR.0000091235.94914.75.
 65. Chong, K. S., Gardner, R. S., Morton, J. J., Ashley, E. A., and McDonagh, T. A. (2006) Plasma concentrations of the novel peptide apelin are decreased in patients with chronic heart failure, *Eur. J. Heart. Fail.*, **8**, 355-360, doi: 10.1016/j.ejheart.2005.10.007.
 66. Miettinen, K. H., Magga, J., Vuolteenaho, O., Vanninen, E. J., Punnonen, K. R., Ylitalo, K., Tuomainen, P., and Peuhkurinen, K. J. (2007) Utility of plasma apelin and other indices of cardiac dysfunction in the clinical assessment of patients with dilated cardiomyopathy, *Regul. Pept.*, **140**, 178-184, doi: 10.1016/j.regpep.2006.12.004.
 67. Foldes, G., Horkay, F., Szokodi, I., Vuolteenaho, O., Ilves, M., Lindstedt, K. A., Mäyränpää, M., Sárman, B., Seres, L., Skoumal, R., Lakó-Futó, Z., deChâtel, R., Ruskoaho, H., and Tóth, M. (2003) Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **308**, 3, 480-485, doi: 10.1016/s0006-291x(03)01424-4.
 68. Ronkainen, V. P., Ronkainen, J. J., Hanninen, S. L.,

- Leskinen, H., Ruas, J. L., Pereira, T., Poellinger, L., Vuolteenaho, O., and Tavi, P. (2007) Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin, *FASEB J.*, **21**, 1821-1830, doi: 10.1096/fj.06-7294com.
69. Sheikh, A. Y., Chun, H. J., Glassford, A. J., Kundu, R. K., Kutschka, I., Ardigo, D., Hendry, S. L., Wagner, R. A., Chen, M. M., Ali, Z. A., Yue, P., Huynh, D. T., Connolly, A. J., Pelletier, M. P., Tsao, P. S., Robbins, R. C., and Quertermous, T. (2008) *In vivo* genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **294**, H88-H98, doi: 10.1152/ajpheart.00935.2007.
 70. Hashimoto, T., Kihara, M., Imai, N., Yoshida, S., Shimoyamada, H., Yasuzaki, H., Ishida, J., Toya, Y., Kiuchi, Y., Hirawa, N., Tamura, K., Yazawa, T., Kitamura, H., Fukamizu, A., and Umemura, S. (2007) Requirement of apelin-apelin receptor system for oxidative stress-linked atherosclerosis, *Am. J. Pathol.*, **171**, 1705-1712, doi: 10.2353/ajpath.2007.070471.
 71. Pitkin, S. L., Maguire, J. J., Kuc, R. E., and Davenport, A. P. (2010) Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man, *Br. J. Pharmacol.*, **160**, 1785-1795, doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00821.x.
 72. Peltonen, T., Napankangas, J., Vuolteenaho, O., Ohtonen, P., Soini, Y., Juvonen, T., Satta, J., Ruskoaho, H., and Taskinen, P. (2009) Apelin and its receptor APJ in human aortic valve stenosis, *J. Heart Valve Dis.*, **18**, 644-652.
 73. Leeper, N. J., Tedesco, M. M., Kojima, Y., Schultz, G. M., Kundu, R. K., Ashley, E. A., Tsao, P. S., Dalman, R. L., and Quertermous, T. (2009) Apelin prevents aortic aneurysm formation by inhibiting macrophage inflammation, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **296**, H1329-H1335, doi: 10.1152/ajpheart.01341.2008.
 74. Tiani, C., Garcia-Pras, E., Mejias, M., de Gottardi, A., Berzigotti, A., Bosch, J., and Fernandez, M. (2009) Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension, *J. Hepatol.*, **50**, 296-305, doi: 10.1016/j.jhep.2008.09.019.
 75. Principe, A., Melgar-Lesmes, P., Fernandez-Varo, G., del Arbol, L. R., Ros, J., Morales-Ruiz, M., Bernardi, M., Arroyo, V., and Jiménez, W. (2008) The hepatic apelin system: a new therapeutic target for liver disease, *Hepatology*, **48**, 1193-1201, doi: 10.1002/hep.22467.
 76. Kalin, R. E., Kretz, M. P., Meyer, A. M., Kispert, A., Heppner, F. L., and Brändli, A. W. (2007) Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis, *Dev. Biol.*, **305**, 599-614, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.03.004.
 77. Sorli, S. C., Le Gonidec, S., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2007) Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis, *Oncogene*, **26**, 7692-7699, doi: 10.1038/sj.onc.1210573.
 78. Eyries, M., Siegfried, G., Ciumas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F., and Soubrier, F. (2008) Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis, *Circ. Res.*, **103**, 432-440, doi: 10.1161/circresaha.108.179333.
 79. Kidoya, H., Naito, H., and Takakura, N. (2010) Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia, *Blood*, **115**, 3166-3174, doi: 10.1182/blood-2009-07-232306.
 80. Zeng, X. J., Zhang, L. K., Wang, H. X., Lu, L. Q., Ma, L. Q., and Tang, C. S. (2009) Apelin protects heart against ischemia/reperfusion injury in rat, *Peptides*, **30**, 1144-1152, doi: 10.1016/j.peptides.2009.02.010.
 81. Rastaldo, R., Cappello, S., Folino, A., Berta, G. N., Sprio, A. E., Losano, G., Samaja, M., and Pagliaro, P. (2011) Apelin-13 limits infarct size and improves cardiac postischemic mechanical recovery only if given after ischemia, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **300**, H2308-H2315, doi: 10.1152/ajpheart.01177.2010.
 82. Simpkin, J. C., Yellon, D. M., Davidson, S. M., Lim, S. Y., Wynne, A. M., and Smith, C. C. (2007) Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury, *Basic Res. Cardiol.*, **102**, 518-528, doi: 10.1007/s00395-007-0671-2.
 83. Azizi, Y., Faghihi, M., Imania, A., Roghanib, M., and Nazari, A. (2013) Post-infarct treatment with [Pyr1]-apelin-13 reduces myocardial damage through reduction of oxidative injury and nitric oxide enhancement in the rat model of myocardial infarction, *Peptides*, **46**, 76-82, doi: 10.1016/j.peptides.2013.05.006.
 84. Yang, S., Li, H., Tang, L., Ge, G., Ma, J., Qiao, Z., Liu, H., and Fang, W. (2015) Apelin-13 Protects the Heart against Ischemia-Reperfusion Injury through the RISK-GSK-3-MPTP Pathway, *Arch. Med. Sci.*, **11**, 1065-1073, doi: 10.5114/aoms.2015.54863.
 85. Pisarenko, O. I., Shulzhenko, V. S., Studneva, I. M., Serebryakova, L. I., Pelogeykina, Y. A., and Veselova, O. M. (2015) Signaling pathways of a structural analogue of apelin-12 involved in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury, *Peptides*, **73**, 67-76, doi: 10.1016/j.peptides.2015.09.001.
 86. An, S., Wang, X., Shi, H., Zhang, X., Meng, H., Li, W., Chen, D., and Ge, J. (2020) Apelin protects against ischemia-reperfusion injury in diabetic myocardium via Inhibiting apoptosis and oxidative stress through PI3K and P38-MAPK signaling pathways, *Aging*, **12**, 25120-25137, doi: 10.18632/aging.104106.
 87. Kleinz, M. J., and Baxter, G. F. (2008) Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase, *Regul. Pept.*, **146**, 271-277, doi: 10.1016/j.regpep.2007.10.002.
 88. Smith, C. C., Mocanu, M. M., Bowen, J., Wynne, A. M., Simpkin, J. C., Dixon, R. A., Cooper, M. B., and Yellon, D. M. (2007) Temporal changes in myocardial salvage kinases during reperfusion following

- ischemia: studies involving the cardioprotective adipocytokine apelin, *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **21**, 409-414, doi: 10.1007/s10557-007-6054-y.
89. O'Carroll, A.-M., Lolait, S. J., Harris, L. E., and Pope, G. R. (2013) The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis, *J. Endocrinol.*, **219**, R13-R35, doi: 10.1530/joe-13-0227.
 90. Masri, B., Morin, N., Pedebernade, L., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2006) The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments, *J. Biol. Chem.*, **281**, 18317-18326, doi: 10.1074/jbc.M600606200.
 91. Kennedy, S. G., Kandel, E. S., Cross, T. K., and Hay, N. (1999) Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome *c* from mitochondria, *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 5800-5810, doi: 10.1128/MCB.19.8.5800.
 92. Pisarenko, O., Shulzhenko, V., Studneva, I., Serebryakova, L., and Veselova, O. (2017) 5-Hydroxydecanoate abolishes cardioprotective effects of a structural analogue of apelin-12 in ischemia/reperfusion injury, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **23**, 333-341, doi: 10.1007/s10989-016-9565-1.
 93. Miura, T., Tanno, M., and Sato, T. (2010) Mitochondrial kinase signaling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis, *Cardiovasc. Res.*, **88**, 7-15, doi: 10.1093/cvr/cvq206.
 94. Chapman, N. A., Dupré, D. J., and Rainey, J. K. (2014) The apelin receptor: physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR, *Biochem. Cell Biol.*, **92**, 431-440, doi: 10.1139/bcb-2014-0072.
 95. Khan, T. A., Bianchi, C., Ruel, M., Voisine, P., and Sellke, F. W. (2004) Mitogen-activated protein kinase pathways and cardiac surgery, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **127**, 806-811, doi: 10.1016/j.jtcvs.2003.04.001.
 96. Jia, Y. X., Pan, C. S., Zhang, J., Geng, B., Zhao, J., Gerns, H., Yang, J., Chang, J. K., Tang, C. S., and Qi, Y. F. (2006) Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats, *Regul. Pept.*, **133**, 147-154, doi: 10.1016/j.regpep.2005.09.033.
 97. Foussal, C., Lairez, O., Calise, D., Pathak, A., Guilbeau-Frugieret, C., Valet, P., Parini, A., and Kunduzova, O. (2010) Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy, *FEBS Lett.*, **584**, 2363-2370, doi: 10.1016/j.febslet.2010.04.025.
 98. Rastaldo, R., Cappello, S., Folino, A., and Losano, G. (2011) Effect of apelin-apelin receptor system in post-ischaemic myocardial protection: a pharmacological postconditioning tool? *Antioxid. Redox Signal.*, **14**, 909-922, doi: 10.1089/ars.2010.3355.
 99. Macaluso, N. J., and Glen, R. C. (2010) Exploring the 'RPRL' motif of apelin-13 THROUGH molecular simulation and biological evaluation of cyclic peptide analogues, *Chem. Med. Chem.*, **5**, 1247-1253, doi: 10.1002/cmdc.201000061.
 100. Hamada, J., Kimura, J., Ishida, J., Kohda, T., Morishita, S., Ichihara, S., and Fukamizu, A. (2008) Evaluation of novel cyclic analogues of apelin, *Int. J. Mol. Med.*, **22**, 547-552, doi: 10.3892/ijmm.00000054.
 101. Wang, W., McKinnie, S. M., Patel, V. B., Haddad, G., Wang, Z., Zhabyeyev, P., Das, S. K., Basu, R., McLean, B., Kandalam, V., Penninger, J. M., Kassiri, Z., Vederas, J. C., Murray, A. G., and Oudit, G. Y. (2013) Loss of apelin exacerbates myocardial infarction adverse remodeling and ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential of synthetic apelin analogues, *J. Am. Heart Assoc.*, **2**, e000249, doi: 10.1161/JAHA.113.000249.
 102. Jia, Z. Q., Hou, L., Leger, A., Wu, I., Kudej, A. B., Stefano, J., Jiang, C., Pan, C. Q., and Akita, G. Y. (2012) Cardiovascular effects of a PEGylated apelin, *Peptides*, **38**, 181-188, doi: 10.1016/j.peptides.2012.09.003.
 103. Iturrioz, X., Alvear-Perez, R., De Mota, N., Franchet, C., Guillier, F., Leroux, V., Dabire, H., Le Jouan, M., Chabane, H., Gerbier, R., Bonnet, D., Berdeaux, A., Maignet, B., Galzi, J. L., Hibert, M., and Llorens-Cortes, C. (2010) Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist, *FASEB J.*, **24**, 1506-1517, doi: 10.1096/fj.09-140715.
 104. Murali, S., and Aradhyam, G. K. (2023) Structure-function relationship and physiological role of apelin and its G protein coupled receptor, *Biophys. Rev.*, **15**, 127-143, doi: 10.1007/s12551-023-01044-x.
 105. Iturrioz, X., Gerbier, R., Leroux, V., Alvear-Perez, R., Maignet, B., and Llorens-Cortes, C. (2010) By interacting with the C-terminal Phe of apelin, Phe255 and Trp259 in helix VI of the apelin receptor are critical for internalization, *J. Biol. Chem.*, **285**, 32627-32637, doi: 10.1074/jbc.M110.127167.
 106. Pitkin, S., Macaluso, N., Maguire J., Glen, R., and Davenport, A. (2009) Role for apelin in human atherosclerosis and discovery of novel agonist for its receptor APJ, *Proc. Br. Pharmacol. Soc.*, URL: <http://www.pa2online.org/abstracts/Vol7Issue4abst027P.pdf>.
 107. Macaluso, N. J., Pitkin, S. L., Maguire, J. J., Davenport, A. P., and Glen, R. C. (2011) Discovery of a competitive apelin receptor (APJ) antagonist, *Chem. Med. Chem.*, **6**, 1017-1023, doi: 10.1002/cmdc.201100069.
 108. Sidorova, M. V., Azmuko, A. A., Pal'keeva, M. E., Molokoedov, A. S., and Bushuev, V. N. (2012) Synthesis and cardioprotective properties of apelin-12 and its structural analogs [in Russian], *Bioorg. Khim.*, **38**, 40-51, doi: 10.1134/s1068162012010177.
 109. Молокоедов А. С., Беспалова Ж. Д., Пелогейкина Ю. А., Азьмуко А. А., Масенко В. П., Писаренко О. И., Шульженко В. С., Терещенко С. Н., Сидорова М. В., Палькеева М. Е. (2012) Додекапептиды, обладающие кардиопротекторными свойствами, Патент РФ № 2457216 (27.07.2012).
 110. Филатова М. П., Крит Н. А., Комарова О. М.,

- Орехович В. И., Рейссманн З., Лиепиня И. Т., Никифорович Г. В. (1986) Синтез и исследование конформационно ограниченных аналогов пептидных ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента, *Биоорг. Хим.*, **12**, 59-70.
111. Janecka, A., Kruszynski, R., Fichna, J., Kosson, P., and Janecki, T. (2006) Enzymatic degradation studies of endomorphin-2 and its analogs containing N-methylated amino acids, *Peptides.*, **27**, 131-135, doi: 10.1016/j.peptides.2005.06.015.
 112. Pisarenko, O., Shulzhenko, V., Studneva, I., Pelogeykina, Yu., Timoshin, A., Anesia, R., Valet, P., Parini, A., and Kunduzova, O. (2015) Structural apelin analogues: mitochondrial ROS inhibition and cardiometabolic protection in myocardial ischaemia-reperfusion injury, *Br. J. Pharmacol.*, **172**, 2933-2945, doi: 10.1111/bph.13038.
 113. Pisarenko, O. I., Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Serebryakova, L. I., Shulzhenko, V. S., Timoshin, A. A., Tskitishvili, O. V., Pelogeykina, Y. A., and Studneva, I. M. (2014) Apelin-12 and its structural analog enhance antioxidant defense in experimental myocardial ischemia and reperfusion, *Mol. Cell. Biochem.*, **391**, 241-250, doi: 10.1007/s11010-014-2008-4.
 114. Pelogeykina, Y. A., Konovalova, G. G., Pisarenko, O. I., and Lankin, V. Z. (2015) Antioxidant action of apelin-12 peptide and its structural analog *in vitro*, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **159**, 604-606, doi: 10.1007/s10517-015-3024-4.
 115. Pisarenko, O. I., Shulzhenko, V. S., Pelogeykina, Y. A., and Studneva, I. M. (2015) Enhancement of crystalloid cardioplegic protection by structural analogs of apelin-12, *J. Surg. Res.*, **194**, 18-24, doi: 10.1016/j.jss.2014.11.007.
 116. Pisarenko, O. I., and Studneva, I. M. (2023) Modified APJ receptor peptide ligands as postconditioning drugs in myocardial ischaemia/reperfusion injury, *Int. J. Pept. Res. Ther.*, **29**, 23, doi: 10.1007/s10989-023-10498-2.
 117. Tao, J., Zhu, W., Li, Y., Xin, P., Li, J., Liu, M., Li, J., Redington, A. N., and Wei, M. (2011) Apelin-13 protects the heart against ischemia-reperfusion injury through inhibition of ER-dependent apoptotic pathways in a time-dependent fashion, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, H1471-H1486, doi: 10.1152/ajpheart.00097.2011.
 118. Hausenloy, D. J., and Yellon, D. M. (2007) Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion, *Pharmacol. Ther.*, **116**, 173-191, doi: 10.1016/j.pharmthera.2007.06.005.
 119. Sidorova, M., Studneva, I., Bushuev, V., Pal'keeva, M., Molokoedov, A., Veselova, O., Ovchinnikov, M., and Pisarenko, O. (2020) [MeArg1, NLe10]-apelin-12: Optimization of solid-phase synthesis and evaluation of biological properties *in vitro* and *in vivo*, *Peptides*, **129**, 170320, doi: 10.1016/j.peptides.2020.170320.

APELIN C-TERMINAL FRAGMENTS: BIOLOGICAL PROPERTIES AND THERAPEUTIC POTENTIAL

Review

O. I. Pisarenko* and I. M. Studneva

*National Medical Research Center of Cardiology named after Academician E. I. Chazov,
121552 Moscow, Russia; e-mail: olpi@live.ru*

The creation of bioactive molecules for the treatment of cardiovascular diseases based on natural peptides stimulates intensive experimental research. In recent years, it has been established that the C-terminal fragments of apelin, an endogenous ligand of the APJ receptor, reduce metabolic and functional disorders in experimental heart damage. The review presents literature data and generalized results of our own experiments on the effect of apelin-13, [Pyr]apelin-13, apelin-12, and their chemically modified analogues on the heart in normal conditions and when modeling pathophysiological conditions *in vitro* and *in vivo*. It has been shown that the spectrum of action of apelin peptides on the damaged myocardium covers a decrease in the death of cardiomyocytes from necrosis, a decrease in cardiomyocyte membrane damage, an improvement in the metabolic state of the myocardium, and a decrease in the formation of reactive oxygen species and lipid peroxidation products. The mechanisms of the protective action of these peptides associated with the activation of the APJ receptor and the manifestation of antioxidant properties are discussed. The data presented in the review indicate the promise of molecular design of pharmacological APJ receptor agonists, which can serve as the basis for the development of cardioprotectors that affect the processes of free radical oxidation and metabolic adaptation.

Keywords: apelin, structural analogs, heart, experimental pathology, metabolism, cardiomyocyte membranes, lipid peroxidation, reactive oxygen species, antioxidant enzymes