

DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-4-3-6
© Коллектив авторов, 2018

С. Ю. Цибульников¹, А. В. Мухомедзянов¹, Л. Н. Маслов¹,
М. В. Овчинников², М. В. Сидорова², Е. В. Кудрявцева²,
Ю. В. Бушов³, Ю. Б. Лишманов¹, И. Халиулин⁴

СИНТЕЗ И ИНФАРКТ-ЛИМИТИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА ПЕПТИДНЫХ АГОНИСТОВ ОПИОИДНЫХ РЕЦЕПТОРОВ

¹ НИИ кардиологии Томский НИМЦ, Россия, Томск; e-mail: maslov@cardio-tomsk.ru

² ЗАО "Синтез пептидов", Россия, Москва.

³ Томский государственный университет, Россия, Томск.

⁴ Университет Бристолья, Великобритания.

Синтезированы различные по структуре пептидные агонисты опиоидных рецепторов — глудалан, дельтолей и даларгин — и проведена оценка их инфаркт-лимитирующего эффекта. У крыс воспроизводили коронароокклюзию (45 мин) и реперфузию (2 ч). Опиоидные пептиды вводили за 5 мин до реперфузии: даларгин и глудалан в дозе 0,1 мг/кг; дельтолей — 0,03, 0,1 и 0,2 мг/кг. Установлено, что глудалан и дельтолей в дозе 0,1 мг/кг уменьшают соотношение размер инфаркта/область риска (РИ/ОР), а даларгин не влияет на размер инфаркта. Инфаркт-лимитирующий эффект дельтолея исчезает при уменьшении (0,03 мг/кг) или увеличении (0,2 мг/кг) дозы пептида. Антагонисты опиоидных рецепторов налтрексон (5 мг/кг) или налоксона метиодид (5 мг/кг), не проникающий через гематоэнцефалический барьер, устраняют инфаркт-лимитирующий эффект глудалана.

Ключевые слова: сердце; реперфузия; опиоиды; посткондиционирование.

Известно, что смертность и характер течения острого инфаркта миокарда (ОИМ) во многом зависит от величины зоны некроза [1, 2]. Единственным эффективным методом лечения ОИМ в настоящее время является реканализация в инфаркт-связанной коронарной артерии с помощью тромболитика или коронарной ангиопластики. Однако даже в случае своевременного и успешного восстановления коронарного кровотока пациенты могут погибнуть в результате ишемического и реперфузионного повреждения сердца. Поскольку предвидеть возникновение коронаротромбоза и предупредить ишемию миокарда при ОИМ в большинстве случаев невозможно, одной из важных задач лекарственной терапии считается именно профилактика реперфузионного повреждения сердца [3]. Определенный интерес в этом отношении представляют агонисты опиоидных рецепторов (ОР), поскольку морфин и некоторые опиоидные пептиды в условиях реперфузии способны оказывать инфаркт-лимитирующий эффект [4 – 6]. Вместе с тем выбор опиоидов, не проникающих через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и в силу этого не вызывающих зависимости, явно ограничен.

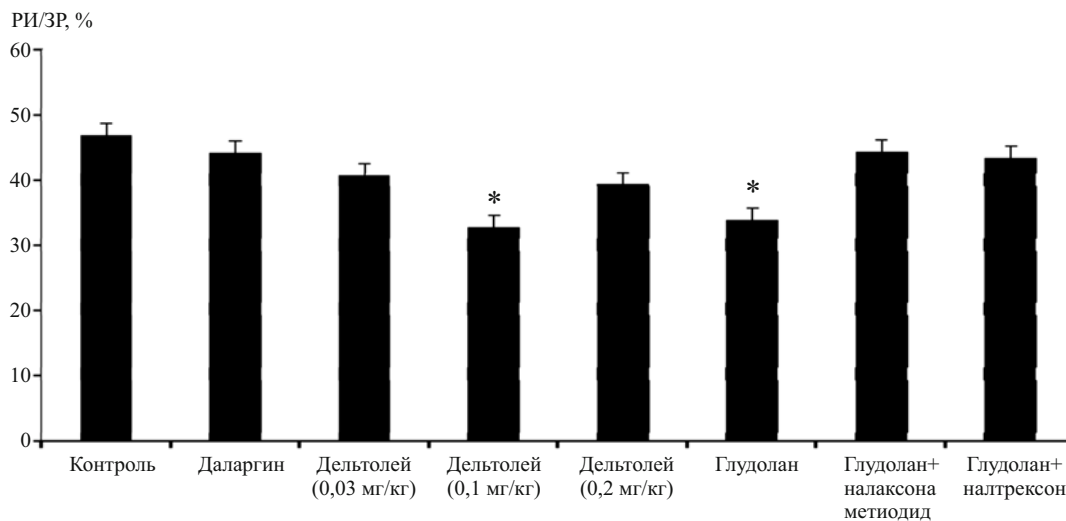
Цель исследования — синтез опиоидных пептидов, способных оказывать инфаркт-лимитирующий эффект при реперфузии сердца.

Экспериментальная химическая часть

В качестве препаратов, потенциально обладающих инфаркт-лимитирующими свойствами, исследовали

гексапептиды: даларгин (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg-OH), глудалан (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Glu-OH) и дельтолей (Tyr-D-Ala-Phe-Gly-Phe-Leu-NH₂), синтезированные в ЗАО "Синтез пептидов".

Твердофазный синтез дельтолея проводили в автоматическом режиме на синтезаторе Tribute-UV компании Protein Technologies, Inc. (США) в соответствии с программой для однократной конденсации Fmoc-аминокислот. В работе использовали производные аминокислот: Fmoc-Tyr(Bu^t)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-D-Ala-OH, Fmoc-Leu-OH, а также реагенты и растворители (4-метилпиперидин; 1,8-диазабидило [5.4.0]-ундец-7-ен (DBU), N-метилморфолин (NMM), трифторуксусную кислоту (TFA), N,N,N,N-тетраметил-О-(бензотриазол-1-ил)урония тетрафторборат (TBTU) компании Fluka (Швейцария). Реакции конденсации проводили при помощи TBTU в диметилформамиде (DMF) с использованием 4-кратных избытков производных аминокислот и NMM в качестве основания. Для деблокирования α-аминогрупп использовали раствор 10 % 4-метилпиперидина и 2 % DBU в DMF. Синтез проводили с С-конца, исходя из 0,52 г (0,375 ммоль) амидной смолы Rink amide-AMPS-resin компании SENN Chemicals со степенью замещения 0,72 ммоль/г. По окончании синтеза пептидил-полимер отфильтровывали, промывали DMF (3 × 30 мл), дихлорметаном (5 × 30 мл), сушили на воздухе. Получали 0,81 г пептидилполимера. Для отщепления пептида от полимера использовали смесь реагентов: 10,0 мл трифторуксусной кислоты + 0,5 мл деионизи-



Размер зоны инфаркта/зона риска при 45-минутной коронароокклюзии и 120-минутной реперфузии у крыс. Введение агонистов опиоидных рецепторов за 5 мин до реперфузии. ($M \pm SEM$). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

рованной воды + 0,5 мл триизобутилсилана. Время отщепления 1 ч. Сырой продукт осаждали диэтиловым эфиром, отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром. Получено 0,25 г технического продукта с содержанием основного вещества 58 % по результатам аналитической ВЭЖХ. Очистку проводили методом препаративной обращённо-фазной ВЭЖХ на хроматографе фирмы Knauer (ФРГ), используя колонку Kromasil 100-10-C18 (30 × 250 мм), размер частиц сорбента 10 мкм. Пептид детектировали при длине волны 220 нм. Получили 120 мг готового вещества с содержанием основного продукта 99,35 %. Выход 45,3 % в расчёте на стартовую аминокислоту.

Пептиды даларгин и глудалан получены классическими методами пептидной химии в растворе, даларгин очищали с помощью ионообменной хроматографии на катионообменнике, а глудалан — кристаллизацией. Конечные образцы даларгина и глудалана имели чистоту, превышающую 98 %.

Аналитическую ВЭЖХ всех полученных пептидов проводили на хроматографе компании Gilson (Франция), на колонке Kromasil 100 C18, 5 мкм (4,6 × 250 мм) (Швеция), подвижная фаза: буфер А — 0,05 М KH_2PO_4 , pH 3,0, буфер Б — 70 % ацетонитрила в буфере А, элюция градиентом концентрации буфера Б в буфере А от 20 до 80 % за 30 мин, детекция при 220 нм. Структура полученных пептидов доказана спектрами ^1H ЯМР и данными масс-спектрометрии. Спектры ^1H ЯМР получены на спектрометре WM-500 компании Bruker (Германия) в DMCO-d_6 при 300 К. Масс-спектры регистрировали на приборе Ultraflex TOF/TOF компании BrukerDaltonics (Германия) с время-пролётной базой методом MALDI.

Экспериментальная биологическая часть

Исследование выполнено на 96 крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 300 г. Животных наркотизировали внутрибрюшинным введением α -хлоралозы

(60 мг/кг, внутривенно, Sigma) и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких “SAR-830 Series” (CWE Inc. США). Коронароокклюзию (45 мин), реперфузию (2 ч) и оценку соотношения размер инфаркта/область риска (PI/OP) осуществляли по методу [6]. Во время ишемии и реперфузии регистрировали систолическое и диастолическое артериальное давление и ЭКГ.

Пептиды вводили в бедренную вену за 5 мин до реперфузии в следующих дозах: даларгин — 0,1 мг/кг, глудалан — 0,1 мг/кг, дельтолей — 0,03, 0,1 и 0,2 мг/кг. При выборе дозы даларгина (0,1 мг/кг) мы исходили из собственных данных об антиаритмическом эффекте этого пептида при коронароокклюзии [7], поскольку молекулярная масса других гексапептидов (глудалан и дельтолей) близка молекулярной массе даларгина, то их также использовали в дозе 0,1 мг/кг. С целью найти оптимальную дозировку дельтолей его использовали в дозах 0,03, 0,1 и 0,2 мг/кг. Неселективные антагонисты ОР налтрексон (Sigma) и налоксона метиодид (Sigma) вводили внутривенно за 10 мин до реперфузии [8]. Налоксона метиодид является стандартным антагонистом ОР, не проникающим через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), поэтому с его помощью можно оценивать роль периферических ОР. В группу контроля вошли животные, которым вместо пептидов внутривенно вводили физиологический раствор.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакетов программы “Statistica 6.0”. Для оценки достоверности полученных результатов использовали критерий Манна — Уитни. Статистически значимыми считались различия при $p < 0,05$. Результаты всех экспериментов представлены в виде среднего арифметического (M) \pm стандартной ошибки среднего (SEM).

Нам не удалось обнаружить достоверных изменений частоты сердечных сокращений (ЧСС), систолического и диастолического артериального давления (АД) во время коронароокклюзии и реперфузии. Во время реперфузии после 45-минутной ишемии у от-

дельных крыс возникали единичные желудочковые экстрасистолы. Частота их возникновения в группах обычно составляла около 10 %, что согласуется с ранее опубликованными данными [6]. Кроме того, у крыс не зафиксировано реперфузионных злокачественных нарушений сердечного ритма (желудочковая тахикардия, желудочковая фибрилляция). По вышеуказанным причинам антиаритмический эффект опиоидов нам обнаружить не удалось. Следует отметить, что аритмогенного эффекта пептиды также не оказывали. Антагонисты ОР не влияли на показатели гемодинамики.

Как показано на рисунке, соотношение РИ/ОР в контрольной группе составило 48,2 %. После внутривенного введения дельтолея в дозе 0,1 мг/кг мы обнаружили достоверное уменьшение указанного индекса на 16 % по сравнению с контролем (рисунок). При использовании дельтолея в дозах 0,03 и 0,2 мг/кг его инфаркт-лимитирующий эффект не проявлялся (рисунок).

Исчезновение инфаркт-лимитирующего влияния дельтолея при увеличении дозы до 0,2 мг/кг не является артефактом, поскольку данный результат был подтверждён нами в независимых параллельных экспериментах. Сходные данные получены [9] при проведении экспериментов на изолированном перфузируемом сердце с неселективным пептидным агонистом δ -ОР DADLE. Оказалось, что добавление указанного пептида в перфузионный раствор в конечной концентрации 10 нМ способствует уменьшению соотношения РИ/ОР более чем в 2 раза. Однако, если DADLE использовали в конечной концентрации 1 мкМ, то кардиопротекторный эффект существенно ослабевал, а в случае совместного применения налтриндола (селективный антагонист δ -ОР) и DADLE (1 мкМ) было отмечено даже достоверное увеличение размера инфаркта [9]. Эти данные представляют особый интерес, поскольку в случае селективной блокады κ -ОР нор-биналторфиминном инфаркт-лимитирующий эффект DADLE (1 мкМ) наоборот, усиливался. Эти факты позволили авторам сделать вывод о том, что ускользание кардиопротекторного эффекта DADLE при увеличении концентрации этого пептида обусловлено активацией κ -ОР [9]. На наш взгляд, исчезновение протекторного действия дельтолея при увеличении дозы также может быть связано с активацией неидентифицированных опиоидных или неопиоидных рецепторов.

Внутривенное введение другого гексапептида глудолана в дозе 0,1 мг/кг также сопровождалось достоверным снижением соотношения РИ/ОР (рисунок). Антагонисты ОР налтрексон и налаксона метиодид (не проникает через ГЭБ) при введении за 5 мин до инъекции глудолана устраняли эффект данного пептида. Следовательно, можно предположить, что кардиопротекторный эффект глудолана связан с активацией периферических ОР. Сами по себе антагонисты ОР не влияли на соотношение РИ/ОР.

Следует отметить, что дельтолей и глудолан оказывали эффекты, сопоставимые в количественном отно-

шении. Это может быть связано с тем, что они имеют сходную аминокислотную последовательность и, возможно, взаимодействуют с одним и тем же субтипом ОР.

Известно, что даларгин в дозе 0,1 мг/кг способен оказывать антиаритмический эффект при коронаро-окклюзии [7]. Несмотря на то, что даларгин имеет близкую к глудолану и дельтолею структуру, при внутривенном введении нам не удалось обнаружить достоверного изменения индекса РИ/ОР (рисунок). Полученный результат может быть связан с тем, что даларгин, в отличие от вышеупомянутых пептидов, взаимодействует с другими субтипами ОР.

Наличие или отсутствие инфаркт-лимитирующего эффекта опиоидных пептидов, как и селективность и аффинность лиганда к ОР, по всей видимости, зависят от химической структуры пептида. Так, у даларгина, глудолана и дельтолея NH_2 -терминальные участки пептидной цепочки, осуществляющие связь с ОР [10, 11], идентичны Туг-*D*-Ala. При этом COOH -участок пептидной цепи у всех 3 пептидов различается. Можно предположить, что именно он и определяет наличие или отсутствие инфаркт-лимитирующего эффекта. У даларгина, который не влияет на размер инфаркта, в положении 6 имеется аргинин, который придаёт пептиду высокую гидрофильность, не позволяя ему пересекать ГЭБ [12], но нарушает взаимодействие с нужным ОР, обеспечивающим повышение толерантности к реперфузии.

Таким образом, результаты наших исследований свидетельствуют о том, что инфаркт-лимитирующий эффект глудолана связан с активацией периферических ОР. Кардиопротекторный эффект дельтолея зависит от использованной дозы. Он был обнаружен при введении пептида в дозе 0,1 мг/кг и исчезал при увеличении или уменьшении дозировки. Делтолей и глудолан можно рассматривать как перспективные вещества для предотвращения реперфузионного повреждения сердца.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда № 14-15-00008, исследования с даларгином выполнены в рамках государственного задания АААА-А15-115120910024-0.

ЛИТЕРАТУРА

1. J. Buber, A. Laish-Farkash, N. Koren-Morag, et al., *Coron. Artery Dis.*, **26**, 503 – 509 (2015).
2. T. Dohi, A. Maehara, S. J. Brener, et al., *Am. J. Cardiol.*, **115**, 563 – 570 (2015).
3. Л. Н. Маслов, Ю. Б. Лишманов, *Изд-во Томского гос. университета систем управления и радиоэлектроники*, Томск (2016), с. 271.
4. E. R. Gross, A. K. Hsu and G. J. Gross, *Circ. Res.*, **94**, 960 – 966 (2004).
5. L. N. Maslov, I. Khaliulin and P. R. Oeltgen, *Med. Res. Rev.*, **36**, 871 – 923 (2016).
6. A. V. Mukhomedzyanov, L. N. Maslov and M. V. Ovchinnikov, *Bul. Exp. Biol. Med.*, **162**, 306 – 309 (2017).
7. L. N. Maslov and Yu. B. Lishmanov, *Int. J. Cardiol.*, **40**, 89 – 94 (1993).

8. L. N. Maslov, Yu. B. Lishmanov and P. R. Oeltgen, *Life Sci.*, **84**, 657 – 663 (2009).
9. K. A. Aitchison, G. F. Baxter and M. M. Awan, *Basic Res., Cardiol.*, **95**, 1 – 10 (2000).
10. J. K. Chang, B. T. Fong, A. Pert, et al., *Life Sci.*, **18**, 1473 – 1481 (1976).
11. D. H. Coy and A. J. Kastin, *Peptides*, **1**, 175 – 177 (1980).
12. V. M. Polonskii, K. N. Yarygin and O. G. Krovosheev, *Bul. Exp. Biol. Med.*, **103**, 488 – 490 (1987).

Поступила 24.04.17

SYNTHESIS AND INFARCTION LIMITING PROPERTIES OF PEPTIDE AGONISTS OF OPIOID RECEPTORS

S. Yu. Tsibul'nikov¹, A. V. Mukhomedzyanov¹, L. N. Maslov¹, M. V. Ovchinnikov², M. V. Sidorova², Yu. V. Bushov³, Yu. B. Lishmanov¹, and I. Khaliulin⁴

¹ Cardiology Research Institute, Tomsk National Research Medical Centre, Russian Academy of Sciences, Tomsk, 634009 Russia

² Peptide Synthesis Company, Moscow, 121552 Russia

³ Tomsk State University, Tomsk, 634050 Russia

⁴ University of Bristol, Bristol BS8 1TH, United Kingdom

A series of structurally different peptide agonists of opioid receptors – gludolan, deltoley, and dalargin – were synthesized and experimentally evaluated for their infarction-limiting effect in rats with coronary occlusion (45 min) and reperfusion (2 h). Opioid peptides were administered 5 min before reperfusion: gludolan (0.1 mg/kg), dalargin (0.1 mg/kg), and deltoley (0.03, 0.1 and 0.2 mg/kg). It was found that gludolan and deltoley (0.1 mg/kg) reduced the infarction size/area at risk (IS/AAR) ratio, whereas Dalargin did not affect the infarction size. The infarction-reducing effect of deltoley disappeared at reduction (0.03 mg/kg) or increase (0.2 mg/kg) of the peptide dose. Antagonists of opioid receptors – naltrexone (5 mg/kg) or naloxone methiodide (5 mg/kg) – eliminated the infarction limiting effect of gludolan. Naloxone methiodide (5 mg/kg) did not penetrate the blood-brain barrier.

Keywords: heart; reperfusion; opioids; postconditioning.