



КОНВЕРГЕНТНЫЙ СИНТЕЗ ГАЛАНИНА КРЫСЫ И ИЗУЧЕНИЕ ЕГО БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ

© 2020 г. М. В. Сидорова*., #, М. Е. Палькеева*, Д. В. Авдеев*, А. С. Молокоедов*,
М. В. Овчинников*, А. А. Азьмуко*, Л. И. Серебрякова*, О. М. Веселова*,
И. М. Студнева*, О. И. Писаренко*

*ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии» Минздрава России,
Россия, 121552, Москва, 3-я Черепковская ул. 15а

Поступила в редакцию 11.04.2019 г.

После доработки 19.06.2019 г.

Принята к публикации 26.06.2019 г.

Конвергентным твердофазным синтезом с использованием Fmoc-методологии получен полноразмерный галанин крысы GWTLSAGYLLGPHRIDNHRFSDKHGLT-NH₂ (G29). Пептидную цепь в ходе синтеза наращивали по одной аминокислоте и фрагментной конденсацией. Фрагменты с C-концевым остатком глицина получали твердофазным методом на 2-хлортритилхлоридной смоле или в растворе. После ВЭЖХ-очистки галанин имел корректную молекулярную массу и чистоту 98%. Кардиопротекторные свойства G29 изучали на модели острого инфаркта миокарда у крыс. Введение G29 уменьшало размеры инфаркта миокарда на 40% и снижало активность маркеров некроза МВ-креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в плазме. Пептид G29 улучшал метаболическое состояние сердца – увеличивал содержание АТФ, общего фонда адениннуклеотидов, фосфокреатина, общего креатина и снижал уровень лактата по сравнению с контролем. Результаты указывают на возможность использования пептида G29 в качестве препарата для уменьшения реперфузионных повреждений сердца и необходимость изучения механизмов его действия.

Ключевые слова: галанин крысы, пептидные кардиопротекторы, пептиды, твердофазный синтез, фрагментная конденсация, ишемия и реперфузия сердца, энергетический обмен

DOI: 10.31857/S0132342320010121

ВВЕДЕНИЕ

Нейропептид галанин (G29), состоящий из 29 аминокислотных остатков (а.о.) (29 а.о. – у большинства млекопитающих, 30 а.о. – у человека), синтезируется преимущественно в головном и спинном мозге и, в меньшей степени, в кишечнике, он широко распространен в центральной и периферической нервной системе [1]. Галанин ре-

гулирует ряд важных функций организма: запоминания, потребления пищи, засыпания, алкогольной зависимости, невропатической боли, выработки гормонов и др. Этот пептид участвует в центральной регуляции сердечно-сосудистой системы [2, 3], снижает резистентность к инсулину [4] и улучшает поглощение глюкозы в сердце экспериментальных животных на моделях сахарного диабета [5]. В сердце и периферических органах и тканях галанин действует не только через нейрональные механизмы, но и активируя клеточные рецепторы GalR1-3 [4, 5], которые являются потенциальной мишенью для лечения различных заболеваний [6]. Литературные данные [7, 8] позволяют предположить участие галанина в реализации различных механизмов защиты сердца от ишемического и реперфузионного повреждения. Однако до настоящего времени эти механизмы мало изучены и данных о влиянии галанина на сердечно-сосудистую систему немного [9].

Настоящая работа является продолжением наших исследований по поиску и изучению пептидов, обладающих кардиопротекторными свойствами. Ранее нами было показано, что N-концевые фраг-

Сокращения: Boc – *tert*-бутилоксикарбонил; Bzl – бензил; DCM – дихлорметан; DIEA – N,N-диизопропилэтиламин; DIC – N,N'-диизопропилкарбодимид; Fmoc – 9-флуоренилметоксикарбонил; GalR – рецептор галанина; MALDI – масс-спектрометрия методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации; 4-MePip – 4-метилпиперидин; NMM – N-метилморфолин; NMP – N-метилпирролидон; HONSu – N-гидроксисукцинимид; Pbf – 2,2,4,6,7-пентаметилдигидробензофуран-5-сульфонил; TIS – триизопропилсилан; TFA – трифтороуксусная кислота; Tos – тозил; Trt – тритил; ЗР – зона риска; Z – бензилоксикарбонил; ИМ – инфаркт миокарда; Кр – креатин; МВ-КК – креатинкиназа МВ; ЛЖ – левый желудочек; ПНА – правая нисходящая артерия; САД – систолическое артериальное давление; ТФС – твердофазный синтез; ФКр – фосфокреатин; ЧСС – частота сердечных сокращений.

Автор для связи: (тел. +7 (495) 414-67-16; эл. почта: peptide-cardio@yandex.ru).

Синтез защищенных фрагментов

Синтез фрагментов **ФI** и **ФIII** был проведен с использованием Fmoc-методологии на полимерном носителе с 2-хлортритил-хлоридной якорной группой [24], которая обеспечивает получение защищенных пептидных блоков со свободной C-концевой карбоксильной группой благодаря возможности “мягкого” расщепления якорной сложноэфирной связи (например, действием смеси уксусной кислоты и трифторэтанола в дихлорметане), при котором сохраняются защитные группы боковых цепей аминокислот.

Фрагмент **ФII** был получен классическими методами пептидной химии в растворе по схеме 1, исходя из бензильного эфира глицина. Пептидную

цепь наращивали с использованием Boc- и Z-производных соответствующих аминокислот последовательным синтезом с использованием избытков смешанных ангидридов [25]. Полупродукты синтеза выделяли из реакционных смесей путем экстракции и промывок с последующей кристаллизацией из подходящих растворителей. Индивидуальность полупродуктов получения фрагмента **ФII** контролировали с помощью ТСХ. Boc-группу удаляли действием трифторуксусной кислоты, а Z-защиту отщепляли каталитическим гидрогенолизом над 5% палладием на угле (Pd/C). На заключительной стадии синтеза **ФII** после отщепления Z-группы в пептид вводили Fmoc-защитную группу действием Fmoc-ONSu по известной методике [26].

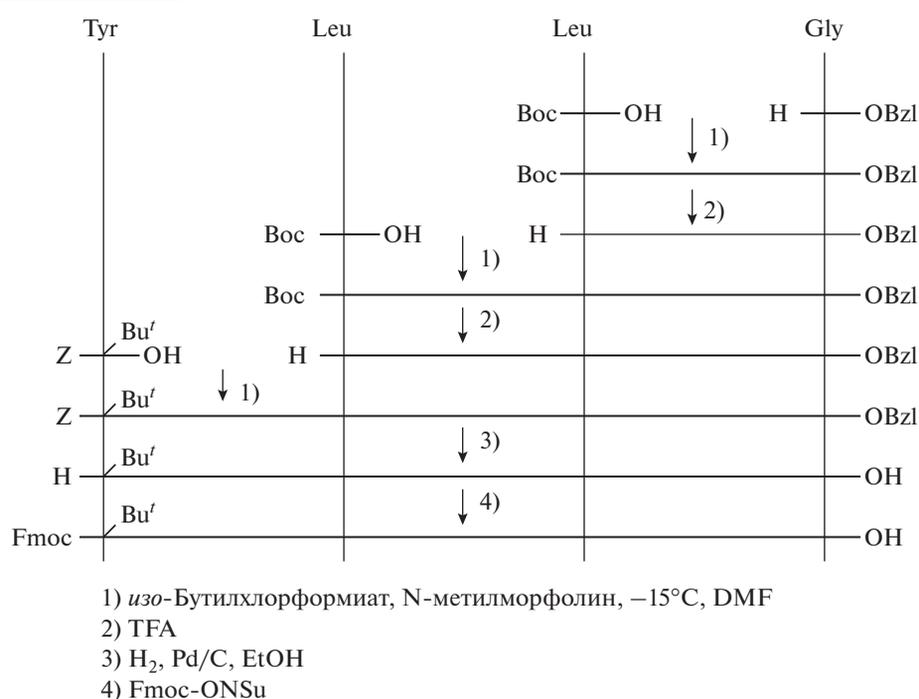


Схема 1. Синтез пептидного фрагмента Fmoc-Tyr(Bu^t)-Leu-Leu-Gly-OH (**ФII**).

Индивидуальность полученных фрагментов **ФI–ФIII** анализировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ (после полного деблокирования соответствующих образцов). По данным аналитической ВЭЖХ чистота полученных фрагментов была не менее 90%. Структура пептидных фрагментов **ФI–ФIII** подтверждена данными ¹H-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Характеристики фрагментов приведены в эксп. части.

Синтез галанина G29

ТФС G29 проводили с C-конца (см. схему 2) с использованием 3-кратных избытков N^α-Fmoc-защищенных аминокислот и пептидных фрагментов на амидном полимере Ринка. На первом этапе

синтеза ступенчато присоединяли остатки Thr²⁹ и Leu²⁸, затем к дипептидилполимеру **PI** присоединяли пептапептид **ФI** и получали гептапептидилполимер **PII**. Начиная с Phe²² и до Pro¹³ (в течение 10 циклов ТФС) синтез вели ступенчато, присоединяя по одной аминокислоте DIC/NOBt-методом. На завершающем этапе к пептидилполимеру **PIII** последовательно присоединяли блоки **ФII** и **ФIII**. Для конденсации пептидных фрагментов мы использовали комплекс F (аддукт N,N'-дициклогексилкарбодиимида и пентафторфенола в мольном соотношении 1 : 3) [21], хорошо зарекомендовавший себя в блочном ТФС [27]. Полноту протекания фрагментных конденсаций контролировали тестом Кайзера с нингидрином [28].

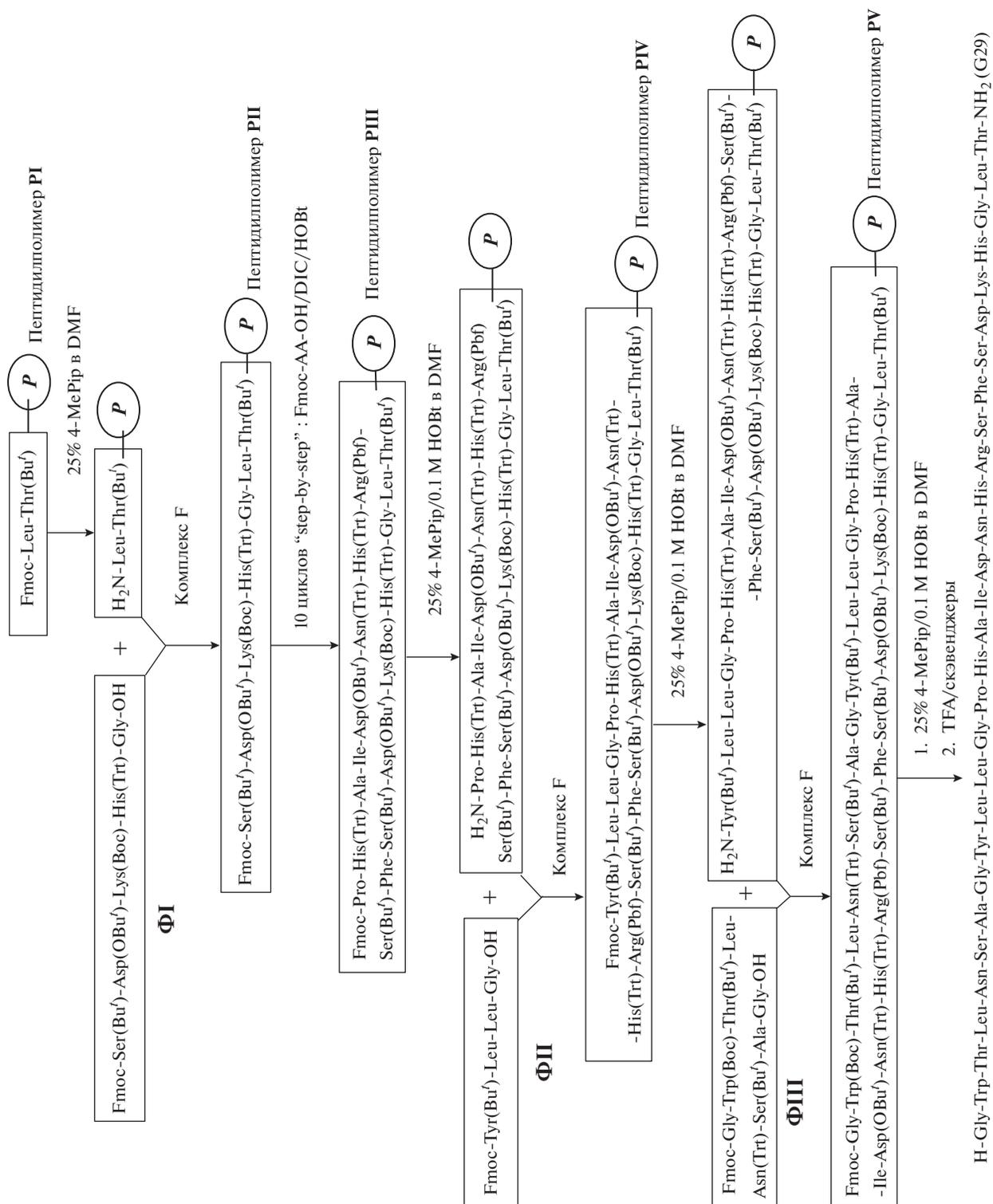


Схема 2. Конвергентный синтез галанина крысы G29. (Комплекс F – аддукт N,N'-дициклогексилкарбодиимида и пентафторфенола в мольном отношении 1 : 3.)

Деблокирование α-аминогруппы в ходе синтеза G29 проводили 25% раствором 4-MePip в DMF. Выше уже говорилось о том, что последовательность Asp-Asn, присутствующая в молекуле галанина, склонна к образованию аспартимида и по-

следующей α→β-перегруппировке амидной связи в условиях ТФС с использованием Fmoc-методологии [15]. Для минимизации этой побочной реакции, начиная со стадии деблокирования остатка Asn¹⁸, для отщепления Fmoc-защиты мы

использовали модифицированный деблокирующий реагент – 25% раствор 4-метилпиперидина с добавкой 0.1 М 1-гидроксibenзотриазола, как было предложено в работе [29]. В результате конвергентного синтеза, проведенного в соответствии со схемой 2, был получен пептидилполимер PV, после удаления N^α-Fmoc-защиты целевой продукт был отщеплен от полимера и полностью деблокирован действием трифторуксусной кислоты со специальными добавками. Неочищенный продукт G29 содержал по данным аналитической ВЭЖХ 77.1% основного вещества (рис. 2а). Для дополнительной оценки содержания аспартимидов в неочищенном продукте ТФС галанина G29 образец N^α – свободного пептидилполимера PV был обработан деблокирующей смесью, не содержащей воды. Масс-спектрометрия полученного продукта показала, что, наряду с целевым пептидом G29 (m/z 3165.48), в его состав входит вещество с молекулярной массой на 18 Да меньше (m/z 3147.306), которое может быть побочным аспартимидом (продуктом дегидратации) по остатку аспарагиновой кислоты, участвующей в образовании связи Asp-Asn. Соотношение интенсивностей целевого и побочного продуктов в масс-спектре составило 100 : 4.6 ($\Delta - 18$). Галанин был очищен с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой (рис. 2б). Полученный пептид имел корректную молекулярную массу (по данным масс-спектрометрии) и оказался идентичен коммерческому образцу галанина крысы (GeneCust, Люксембург).

Таким образом, использованные нами конвергентный подход и модифицированный реагент для отщепления Fmoc-защит обеспечили получение неочищенного галанина крысы с хорошей чистотой и относительно низким содержанием побочных продуктов транспептидации (менее 2.5%); продукт, как видно на рис. 2а, не содержал трудноотделимых примесей с близкими временами удерживания. Выбранные для фрагментной конденсации пептидные блоки были хорошо растворимы в NMP, реакции образования амидной связи в присутствии комплекса F протекали достаточно быстро (в течение 4 ч) и с высокими выходами.

Оценка биологической активности пептида G29 у крыс *in vivo*

Нами была использована модель региональной ишемии и реперфузии сердца крыс Вистар. На начальном этапе было изучено дозозависимое влияние внутривенного введения G29 в начале реперфузии (после периода региональной ишемии) на размеры инфаркта миокарда (ИМ). Гистохимический анализ срезов левого желудочка (ЛЖ) сердца в конце реперфузии не выявил различий между экспериментальными группами в зоне

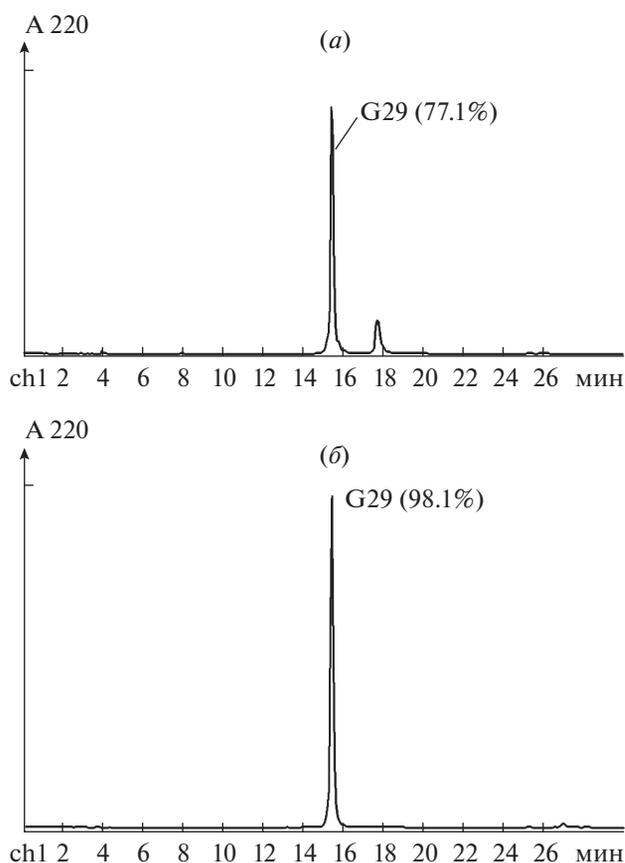


Рис. 2. Профили ВЭЖХ неочищенного (а) и очищенного (б) галанина крысы. Колонка Kromasil C18-100-5 4.6 × 250 мм, размер частиц сорбента 5 мкм; пептиды элюировали со скоростью 1 мл/мин градиентом буфера Б в буфере А от 20 до 80% за 30 мин, буфер А – 0.05 М КН₂Р₄, рН 3.0, буфер Б 70% ацетонитрил в буфере А, детекция при 220 нм (условия 1).

риска (ЗР). Величина ЗР/ЛЖ, % в контроле, в группе G29 и растворителя пептида G29 (0.2% DMSO) была близкой и составляла в среднем $41.1 \pm 0.9\%$. Это означает, что повреждение сердца было стандартно моделировано у всех животных. В контроле величина инфаркта миокарда, выраженная отношением ИМ/ЗР, составила $43.0 \pm 2.0\%$. Введение 0.2% DMSO не влияло на этот показатель. Любая из изученных доз G29 достоверно ограничивала размеры ИМ ($P < 0.005 - 0.001$) (рис. 3а). В наибольшей степени отношение ИМ/ЗР (в %) снижалось под действием дозы 0.5 мг/кг – до 60% от величины в контроле. В дальнейшем она была использована в качестве оптимальной для изучения влияния пептида на активность маркеров некроза в плазме и метаболическое состояние ЗР.

Активность маркеров некроза креатинкиназы МВ (МВ-КК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме крови в исходном состоянии (перед окклюзией ПНА) составляла 270.2 ± 28.5 и $92.8 \pm$

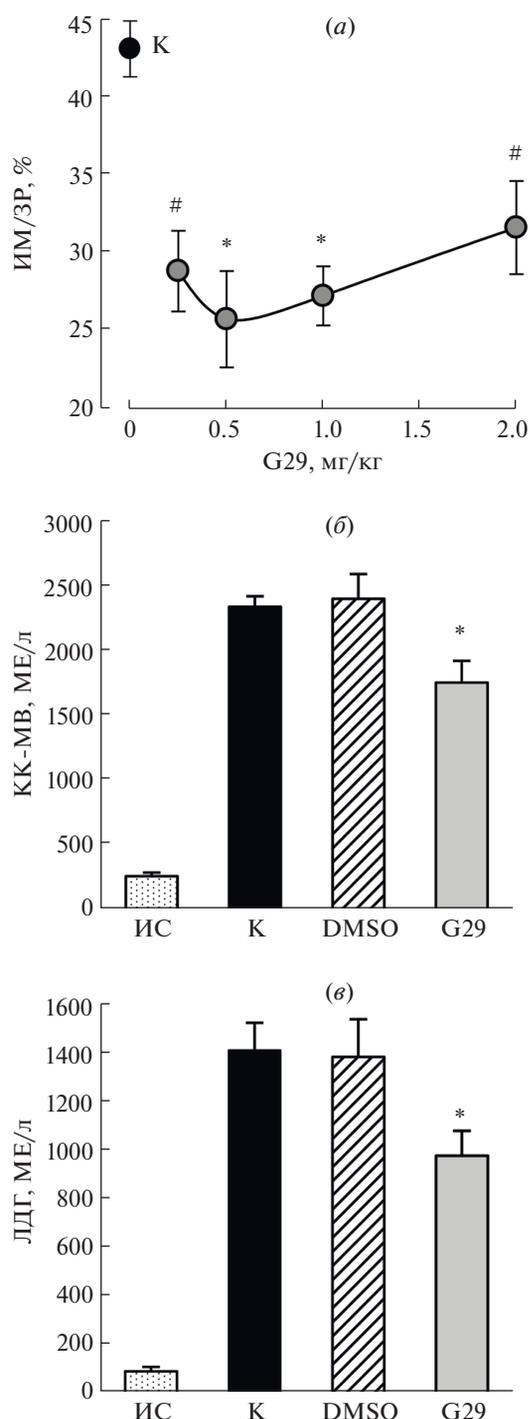


Рис. 3. Уменьшение повреждения сердца пептидом G29 у крыс *in vivo*. (а) Дозозависимое снижение размеров инфаркта миокарда (ИМ/ЗР, %) при внутривенном введении G29 после региональной ишемии. Данные представлены как $M \pm m$ для серий из 8 опытов. К – контроль. * $P < 0.001$ от К, # $P < 0.005$ от К. (б, в) Влияние внутривенного введения оптимальной дозы G29 (0.5 мг/кг) на активность креатинкиназы-МВ (-МВ- КК) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме в конце реперфузии. Данные представлены как $M \pm m$ для серий из 8 опытов. ИС – исходное состояние; К – контроль; DMSO – введение 0.2% DMSO. * $P < 0.05$ от К и DMSO.

± 18.5 ME/л соответственно. Развитие ИМ в контроле сопровождалось увеличением активности обоих ферментов в конце реперфузии по сравнению с исходным состоянием – до 2350.1 ± 80.7 и 1415.0 ± 112.6 ME/л для МВ-КК и ЛДГ соответственно (рис. 3б, 3в). Введение оптимальной дозы G29 перед началом реперфузии достоверно снижало активность МВ-КК и ЛДГ на 25 и 30% соответственно, по сравнению с контролем.

Влияние введения пептида G29 на показатели метаболического состояния ЗР в конце реперфузии представлено в табл. 1. Ишемическое и реперфузионное повреждение вызывало значительные изменения в содержании метаболитов энергетического обмена и лактата в сердце. В контроле в конце реперфузии содержание АТФ было снижено в 4.5 раза, а общий пул адениннуклеотидов (Σ АН) за счет уменьшения АДФ – в 3 раза по сравнению с исходным состоянием. Содержание ФКр снижалось до 35%, что вызывало уменьшение общего креатина (Σ Кр) до 64% от исходных значений при практически неизменном уровне Кр. Недостаточное восстановление аэробного обмена в ЗР к окончанию реперфузии сопровождалось активацией гликолиза/гликогенолиза. Это приводило к накоплению лактата, содержание которого увеличивалось почти на порядок по сравнению с исходным значением. Введение пептида G29 увеличивало содержание АТФ ($P = 0.088$) и достоверно АДФ и АМР ($P < 0.01$) по сравнению с контролем. В результате Σ АН был увеличен в 1.7 раза. Одновременно отмечено лучшее восстановление ФКр (на 48% по сравнению с контролем), что сопровождалось сохранением более высокого содержания Σ Кр и отношения ФКр/Кр, отражающего фосфорилирование Кр. Эти данные свидетельствуют о более эффективном энергообеспечении ЗР под действием G29, одновременно наблюдалось снижение содержания лактата в ткани сердца до значения, близкого к исходному.

Полученные результаты однозначно указывают на способность пептида G29 уменьшать летальные повреждения кардиомиоцитов при ишемии и реперфузии сердца *in vivo*. Кардиозащитное действие пептида проявляется в ограничении размеров острого инфаркта, уменьшении активности маркеров некроза в кровотоке и в улучшении энергетического состояния инфарцированного миокарда.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы производные L-аминокислот (Novabiochem, Швейцария), DIEA, HOBT, TBTU, TIS, DMF, N-метилпирролидон, дихлорметан и трифторуксусная кислота (Fluka, Швейцария), ацетонитрил и изопропиловый спирт (Panreac, Испания).

Для ТСХ пептидных фрагментов использовали пластинки Kieselgel 60 F254 (Merck, ФРГ) и системы растворителей хлороформ–метанол–АсОН (90 : 8 : 2) (система 1), хлороформ–метанол–АсОН (9 : 1 : 0.5) (система 2), пептиды проявляли в УФ-свете и парами Cl_2 –бензидин [30].

ВЭЖХ проводили на хроматографах Gilson (Франция) и Knauer (ФРГ). Аналитическую ВЭЖХ галанина выполняли на колонке Kromasil 100-5 C18 с сорбентом C18, размер пор 100 Å, на хроматографе Gilson (Франция). Элюенты: буфер А – 0.05 М KH_2PO_4 , рН 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 (условия 1). Для аналитической ВЭЖХ пептидных фрагментов использовали буфер А – 0.1% ТФА, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А, градиент от 10 до 70% буфера Б в А (условия 2). Препаративная ВЭЖХ проводилась на колонке Kromasil C18 (30 × 250 мм), размер частиц сорбента 10 мкм. Элюенты: буфер А – 0.1% ТФА, буфер Б – 80% ацетонитрила в буфере А. Элюцию проводили градиентом 0.5% в минуту буфера Б в буфере А от 100% буфера А со скоростью 10 мл/мин. Детекция при длине волны 220 нм. Фракции, соответствующие целевому веществу, объединяли, концентрировали в вакууме и лиофилизовали.

1H -ЯМР-спектры регистрировали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (ФРГ) в $DMSO-d_6$ при 300 К, концентрация пептидов составляла 2–3 мг/мл, химические сдвиги (δ , м.д.) измеряли относительно тетраметилсилана, константы спин-спинового взаимодействия (J) – в герцах. Отнесение сигналов к определенным группам протонов аминокислотных остатков проводилось с помощью метода дифференциального двойного резонанса. Масс-спектры регистрировали на масс-спектрометре Bruker Autoflex speed (Bruker Daltonics Inc., ФРГ), оснащенном твердотельным УФ-лазером с λ 355 нм и рефлектроном, в режиме регистрации положительно заряженных ионов. Для регистрации масс-спектров MALDI использовали стальную мишень MTP 384 ground steel. Энергия лазера подбиралась индивидуально для каждого образца, частота облучения 50 Гц, при регистрации масс-спектра суммировались данные, полученные при 10 последовательных облучениях.

Синтез пептидных фрагментов (общие методики)

Пептидные фрагменты **ФI** и **ФIII** получали на 2-хлортритилхлоридной смоле (Iris Biotech, ФРГ), содержащей 1.2 экв. Cl /г. К 3.0 г (3.6 ммоль) смолы прибавляли раствор 3.2 г (10.8 ммоль) Fmoc-Gly-OH в 30 мл DCM, в полученную суспензию приливали 4.25 мл (15.0 ммоль)

Таблица 1. Влияние внутривенного введения пептида G29 на метаболическое состояние зоны риска сердца крысы в конце реперфузии

	Исходное состояние	Конец реперфузии	
		контроль	G29, 0.5 мг/кг
АТР	21.35 ± 1.18	4.73 ± 0.73*	6.25 ± 0.39*
АDP	5.52 ± 0.43	3.38 ± 0.16*	7.62 ± 0.28*#
АМР	1.36 ± 0.25	1.24 ± 0.18	2.25 ± 0.18*#
ΣАН	28.24 ± 1.24	9.35 ± 0.74*	16.12 ± 0.43*#
ФКр	23.56 ± 1.78	8.18 ± 1.38*	12.18 ± 0.97*#
Кр	46.43 ± 4.52	37.53 ± 4.17	40.12 ± 5.05
ΣКр	69.98 ± 4.27	44.91 ± 3.34*	52.31 ± 4.17*
ФКр/Кр	0.51 ± 0.04	0.21 ± 0.02*	0.30 ± 0.03*#
Лактат	1.15 ± 0.11	10.82 ± 0.93*	2.14 ± 0.17*#

Данные представлены как $M \pm m$ для серий из 8 опытов. Σ АН = АТР + АDP + АМР. Σ Кр = ФКр + Кр. $P < 0.05$ от: * исходного состояния, # от контроля.

DIEA и перемешивали 30 мин при 25°C, полимер отфильтровывали, промывали DCM 2 × 30 мл, DMF 2 × 30 мл, DCM 2 × 30 мл. Остаточный хлор отщепляли смесью DCM–MeOH–DIEA (32 : 6 : 2 v/v), промывали DCM 2 × 30 мл и DMF 2 × 30 мл. Содержание стартовой аминокислоты составило 0.46 ммоль Fmoc-Gly/г аминокислотного полимера. При синтезе фрагментов **ФI** и **ФIII**, исходили из 3 г (1.4 ммоль) Fmoc-Gly-аминокислотного полимера. Цикл ТФС включал следующие основные стадии: 1) деблокирование α -аминогрупп 25% 4-Me Pip/DMF в течение 10 мин, 2) промывка DMF, 3) конденсация 4-кратного избытка Fmoc-AA/DIC/NOBt в смеси DMF/NMP (1 : 1) в течение 2 ч, 4) промывка DMF. Защищенные пептиды отщепляли от полимерного носителя смесью (40 мл) АсОН–трифторэтанол–DCM (1 : 2 : 7) в течение 40 мин. Полимер отфильтровывали, промывали 2 × 30 мл деблокирующей смеси, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим эфиром и после высушивания кристаллизовали из подходящего растворителя.

Фрагмент (**ФII**) Fmoc-Tyr(Bu')-Leu-Leu-Gly-OH получали, исходя из 6.74 г (20 ммоль) H-Gly-OBzl · Tos-OH, методом смешанных ангидридов по приведенной ниже методике.

К охлажденному до –15°C раствору 24.0 ммоль карбоксильного компонента в 80 мл DMF прибавляли 2.66 мл (24 ммоль) NMM и 3.12 мл (24 ммоль) *изо*-бутилхлорформиата, выдерживали 5 мин и приливали охлажденный до –15°C раствор 20 ммоль аминокислотного компонента и 2.22 мл (20.0 ммоль) NMM в 30 мл DMF. Реакционную смесь выдерживали 20 мин при –15°C и 1 ч при 0°C. Ход реакции контролировали с помощью ТСХ в системе 1. В реакционную смесь прибавля-

ли раствор KHCO_3 до начала слабого выделения углекислого газа и перемешивали 30 мин. Реакционную смесь упаривали, остаток растворяли в 200 мл этилацетата и промывали 2% раствором H_2SO_4 (3×50 мл), водой (3×50 мл), 5% раствором NaHCO_3 (3×50 мл) и водой до нейтральной реакции. Органический слой сушили над безводным сульфатом натрия, осушитель отфильтровывали, фильтрат упаривали. Остаток обрабатывали трифторуксусной кислотой в течение 1 ч, реакционную смесь упаривали, трифторацетат пептида осаждали диэтиловым эфиром, осадок отфильтровывали, промывали на фильтре диэтиловым эфиром, высушивали и вводили в конденсацию с новым карбоксильным компонентом.

К раствору 10.7 г (14.4 ммоль) тетрапептида Z-Tyr(Bu')-Leu-Leu-Gly-OBzl в 300 мл этанола прибавляли 1.4 г 5% Pd/C и в эту суспензию при перемешивании пропускали ток водорода в течение 2 ч, затем в реакционную смесь приливали 14 мл 1 М NaOH. По окончании реакции катализатор отфильтровывали, фильтрат упаривали. В полученный пептид H-Tyr(Bu')-Leu-Leu-Gly-OH вводили N^α -Fmoc-защиту по описанной методике [26]. Фрагмент **ФII** кристаллизовали из смеси *изо*-пропиловый спирт–гексан.

Ниже приведены выходы и характеристики фрагментов **ФI–ФIII**. Кроме этого образцы полученных фрагментов были полностью деблокированы, после чего их чистоту анализировали с помощью ВЭЖХ. Содержание основного вещества в полученных образцах составило 90–95%.

Fmoc-Ser(Bu')-Asp(OBu')-Lys(Boc)-His(Trt)-Gly-OH (ФI). Получено 1.3 г (74.0% в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру), R_f 0.23 (система 1), 0.62 (система 2). MS, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 1241.756 (100) [$M + \text{Na}$] $^+$, 1257.777 (38) [$M + \text{K}$] $^+$, 1263.772 (14) [$M + 2\text{Na}-\text{H}$] $^+$. Спектр ^1H -ЯМР: 1.21 (с, 9H, –Ser(Bu')), 1.32–1.37 (м, 1H, γCH_2 , Lys), 1.37–1.42 (м, 19H, –Asp(OBu')), –Boc, γCH_2 , Lys), 1.41–1.60 (м, 2H, δCH_2 , Lys), 1.64–1.74 (м, 2H, βCH_2 , Lys), 2.45 (дд, 1H, J 16.5, 7.3, $\beta'\text{CH}_2$, Asp), 2.69 (дд, 1H, J 16.5, 7.4, $\beta''\text{CH}_2$, Asp), 2.74–2.96 (м, 4H, ϵCH_2 , Lys; βCH_2 , His), 3.72 (дд, 2H, J 6.0, 3.0, βCH_2 , Ser), 3.69 (д, 2H, J 5.8, αCH_2 , Gly), 4.11–4.21 (м, 1H, αCH , Lys), 4.24–4.28 (м, 1H, αCH , Ser), 4.22–4.27 (м, 3H, O(CH_2), CH , Fmoc), 4.46–4.51 (м, 1H, αCH , His), 4.60–4.66 (м, 1H, αCH , Asp), 6.69–6.75 (м, 1H, ϵNH , Lys), 6.92–7.05 (м, 5H, – CH , Trt), 7.16–7.21 (м, 1H, αNH , Ser), 7.23–7.47 (м, 19H, CH , Trt, Fmoc; C(4) H , His), 7.59–7.62 (м, 1H, C2H, His), 7.82 (д, 1H, J 9.3, αNH , Lys), 7.98 (д, 1H, J 9.3, αNH , Gly), 8.1 (д, 1H, J 9.4, αNH , His), 8.23 (т, 1H, J 5.8, αNH , Asp).

Fmoc-Tyr(Bu')-Leu-Leu-Gly-OH (ФII). Получено 10.7 г (71.5% в расчете на исходный бензило-

вый эфир глицина), R_f 0.19 (система 1), 0.50 (система 2). MS, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 765.471 (100) [$M + \text{Na}$] $^+$, 781.455 (16) [$M + \text{K}$] $^+$, 787.456 (10) [$M + 2\text{Na}-\text{H}$] $^+$. Спектр ^1H -ЯМР: 0.86 (дд, 12H, J 9.2, 6.8, $\delta(\text{CH}_3)_2$, Leu), 1.18 (с, 9H, Bu'), 1.46–1.53 (м, 4H, βCH_2 , Leu), 1.59–1.61 (м, 2H, γCH_2 , Leu), 2.71 (т, 1H, J 1.0, $\beta'\text{CH}$, Tyr), 2.93 (т, 1H, J 1.0, $\beta''\text{CH}$, Tyr), 3.69–3.74 (м, 2H, αCH_2 , Gly), 4.16–4.21 (м, 3H, O(CH_2), CH , Fmoc), 4.25 (дт, 1H, J 9.1, 7.5, αCH , Tyr), 4.30–4.37 (м, 2H, αCH , Leu), 6.77–6.90 (м, 2H, C(3,5)H, Tyr), 7.12–7.19 (м, 2H, C(2,6)H, Tyr), 7.23–7.34 (м, 2H, CH , Fmoc), 7.37–7.42 (м, 2H, CH , Fmoc), 7.56 (д, 1H, J 3.5, αNH , Tyr), 7.59–7.65 (м, 2H, CH , Fmoc), 7.82–7.90 (м, 3H, CH , Fmoc, αNH , Leu), 8.08 (д, 1H, J 7.7, αNH , Leu), 8.13 (т, 1H, J 5.8, αNH , Gly).

Fmoc-Gly-Trp(Boc)-Thr(Bu')-Leu-Asn(Trt)-Ser(Bu')-Ala-Gly-OH (ФIII). Получено 1.7 г (81.8% в расчете на стартовую аминокислоту, присоединенную к полимеру), R_f 0.42 (система 1), 0.69 (система 2). MS, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 1458.627 (100) [($M-\text{Bu}'$) + $\text{CH}_3\text{OH} + \text{H}$] $^+$, 1504.030 (27) [$M + \text{Na}$] $^+$. Спектр ^1H -ЯМР: 0.88 (дд, 6H, J 20.0, 6.7, $\delta(\text{CH}_3)_2$, Leu), 0.97 (д, 3H, J 5.8, γCH_3 , Thr), 1.06–1.18 (м, 21H, Bu'; βCH_3 , Ala), 1.49–1.54 (м, 2H, βCH_2 , Leu), 1.58 (с, 9H, –Boc), 1.60–1.62 (м, 1H, γCH , Leu), 2.49–2.53 (м, 1H, $\beta'\text{CH}$, Asn), 2.71–2.78 (м, 1H, $\beta''\text{CH}$, Asn), 2.91–2.97 (м, 1H, $\beta'\text{CH}$, Trp), 2.99–3.12 (м, 1H, $\beta''\text{CH}$, Trp), 3.29–3.36 (м, 1H, $\beta'\text{CH}$, Ser), 3.38–3.44 (м, 1H, $\beta''\text{CH}$, Ser), 3.68 (дд, 4H, J 9.0, 6.6, αCH_2 , Gly), 3.75–3.93 (м, 1H, βCH , Thr), 3.99–4.14 (м, 3H, αCH , Ala; – CH , Fmoc; αCH , Ser), 4.19 (д, 2H, J 5.4, O(CH_2), Fmoc), 4.28–4.40 (м, 2H, αCH , Thr; αCH , Leu), 4.60 (дт, 1H, J 9.3, 7.3, αCH , Asn), 4.78 (дд, 1H, J 9.0, 6.6, αCH , Trp), 7.05–7.47 (м, 18H, C5H, C6H, Trp; CH , Trt; αNH , Gly), 7.50–7.64 (м, 7H, C2H, Trp; CH , Fmoc; αNH , Ser), 7.66–7.75 (м, 4H, CH , Fmoc; αNH , Leu; C4H, C7H, Trp); 7.79–8.00 (м, 4H, CH , –Fmoc; αNH , Gly; αNH , Thr), 8.01 (д, 1H, J 9.2, αNH , Ala), 8.13 (д, 1H, J 9.3, αNH , Trp), 8.32 (т, 1H, J 5.8, αNH , Asn).

H-Gly-Trp-Thr-Leu-Asn-Ser-Ala-Gly-Tyr-Leu-Leu-Gly-Pro-His-Ala-Ile-Asp-Asn-His-Arg-Ser-Phe-Ser-Asp-Lys-His-Gly-Leu-Thr-NH₂ (G29). Синтез галанина крысы проводили с C-конца (см. схему 2) исходя из 0.53 г (0.25 ммоль) полимера Ринка с содержанием аминокрупп 0.47 ммоль/г. Цикл ТФС включал следующие стадии: 1) деблокирование α -аминогрупп 25% 4-Me Pip/DMF (2×5 мл в течение 5 мин); начиная со стадии пептидилполимера **PIII** деблокирование проводили смесью 25% 4-MePip/0.1 М HOBT в DMF (2 раза по 5 мл в течение 5 мин); 2) промывка DMF, 3) конденсация 0.75 ммоль (3-кратного избытка) Fmoc-AA/DIC/HOBT в 3 мл смеси DMF/NMP (1 : 1) в течение 2 ч; конденсацию 0.75 ммоль фрагментов

ФI–ФIII в присутствии 0.75 ммоль комплекса F проводили в 3–4 мл NMP в течение 4 ч; 4) промывка DMF. Заключительное отщепление от носителя и деблокирование галанина осуществляли действием 10 мл смеси TFA–вода–триизопротилсилан–дитиотреитол–1,3-диметоксибензол (80 : 5 : 5 : 5 : 5) в течение 1.5 ч. По окончании реакции полимер отфильтровывали, промывали 2 × 2 мл деблокирующей смеси, фильтрат упаривали, продукт осаждали сухим диэтиловым эфиром, отфильтровывали, промывали на фильтре эфиром и DCM. Неочищенный продукт TFC лиофилизовали из 2% AcOH для полного отщепления Trp(Вос) [31]. Было получено 0.52 г неочищенного продукта с чистотой 77.1%, затем пептид очищали методом ВЭЖХ, как описано выше, до 98% чистоты. Получено 0.22 г соединения G29 (28% в расчете на стартовую аминокислоту). G29 MS, m/z : 3163.474 ($M_{\text{расчет}} = 3164.45$).

Для дополнительной оценки содержания аспаргимидов в неочищенном продукте TFC G29 50 мг N^{α} – свободного пептидполимера PV обрабатывали 3 мл смеси TFA–TIS–дитиотреитол–1,3-диметоксибензол (85 : 5 : 5 : 5) в течение 1.5 ч. Продукт (16 мг) выделяли, как описано выше. MS, m/z ($I_{\text{отн}}$, %): 3165.480 (100) [$M + H$]⁺, 3147.306 (4.6) [$M - H_2O$]⁺, 3221.481 (8.0) [$M + Bu$]⁺, 2690.148 (5.8).

Изучение пептида G29 на модели региональной ишемии и реперфузии сердца у крыс *in vivo* проведено на самцах крыс Wistar (300–350 г) в соответствии с “Международными рекомендациями по проведению биомедицинских исследований с использованием животных”, принятым Международным советом медицинских научных обществ в Женеве в 1985 г.

У наркотизированных 20% уретаном (1200 мг/кг веса, внутривенно) животных в условиях торакотомии осуществляли искусственную вентиляцию легких комнатным воздухом с помощью аппарата KTR-5 (Hugo Sacks Elektronik, Германия). Яремную вену катетеризировали для окрашивания сердца 1% раствором Эванса в конце опыта. Сонную артерию катетеризировали для регистрации артериального давления. После присоединения артериального катетера к тензометрическому датчику регистрировали систолическое артериальное давление (САД) и ЧСС на полиграфе Biograph-4 (Санкт-Петербургский госуниверситет аэрокосмического приборостроения). Запись на компьютер выполнена с помощью аналого-цифрового преобразователя USB 6210 (National Instruments, США) и программы в системе LabVIEW 7 (National Instruments, США) [10]. После препарирования животного следовал 30-минутный период стабилизации гемодинамических показателей (исходное состояние), затем окклюзия передней нисходящей коронарной артерии (ПНА) в течение 40 мин, продолжительность по-

следующей реперфузии составляла 60 мин. Пептид G29 вводили внутривенно болюсом в дозах 0.25; 0.5; 1.0 или 2.0 мг/кг веса одновременно с началом реперфузии. В контрольной серии опытов – такой же объем физиологического раствора (0.5 мл).

В отдельной серии опытов было изучено влияние растворителя пептида G29 (0.2% раствора DMSO). В конце опыта для идентификации зоны риска (ЗР) и интактной области миокарда реоклюдировали ПНА и в яремную вену вводили болюсно 2% раствор Эванса (2 мл). Затем вырезали сердце и выделяли левый желудочек (ЛЖ) для последующего определения размеров инфаркта миокарда (ИМ). Замороженный ЛЖ разрезали перпендикулярно длинной оси сердца на 4–5 срезов толщиной около 1.5–2.0 мм, которые затем инкубировали 10 мин в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолий хлорида в 0.1 М калий фосфатном буфере (pH 7.4 при 37°C). Полученные образцы сканировали, площади ИМ и ЗР определяли методом компьютерной планиметрии, используя программу Imagescal. После этого срезы взвешивали для определения массы ЛЖ. В каждой группе рассчитывали отношения зона риска/вес левого желудочка (ЗР/ЛЖ) и инфаркт миокарда/зона риска (ИМ/ЗР) в %.

Повреждение мембран кардиомиоцитов оценивали по увеличению активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и МВ-фракции креатинкиназы (МВ-КК) в плазме крови. Около 0.5 мл крови собирали в гепаринизированные пробирки из венозного катетера в исходном состоянии (перед окклюзией ПНА) и после 1 ч реперфузии. Активность ферментов в плазме определяли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 (Япония) при λ 340 нм, используя наборы фирмы BioSystems.

В отдельной серии опытов оценивали влияние внутривенного введения оптимальной дозы пептида (0.5 мг/кг) на энергетическое состояние ЗР. По окончании реперфузии ЗР быстро выделяли из ЛЖ и замораживали щипцами Волленбергера, охлажденными в жидком азоте. Замороженную ткань гомогенизировали в холодной 6% $HCIO_4$ (10 мл/г ткани) в гомогенизаторе Ultra-Turrax T-25 (IKA-Labortechnik, Германия). Белки осаждали центрифугированием (центрифуга Sorvall RT1, Thermo Fisher Scientific, США) при 2800 g в течение 10 мин при 4°C. Супернатанты нейтрализовали 5 М K_2CO_3 до pH 7.4. Осадок $KCIO_4$ отделяли центрифугированием в тех же условиях. Безбелковые экстракты хранили при –20°C до определения метаболитов. Сухой вес гомогенизированной ткани определяли после высушивания образцов в течение 1 сут при 110°C. Содержание адениннуклеотидов, фосфокреатина (ФКр), креатина (Кр) и лактата в тканевых экстрактах определяли энзиматическими методами [32], используя спектрофотометр Shimadzu UV-1800 (Япония). Таким же

образом оценивали метаболическое состояние ЗР в конце реперфузии в контроле (в опытах с внутривенным введением физиологического раствора) и в исходном состоянии (до окклюзии ПНА).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Конвергентный подход был успешно применен для получения 29-членного галанина крысы на твердой фазе. Использование очищенных пептидных блоков для наращивания пептидной цепи исключило возможность образования в синтезе трудноотделимых “ложных” пептидов с близкими к целевому пептиду свойствами, благодаря этому пептид G29 был получен с высокими выходами и чистотой. Введение G29 уменьшало размеры инфаркта миокарда на 40% и снижало активность маркеров некроза МВ-креатинкиназы и лактатдегидрогеназы в плазме к концу реперфузии по сравнению с контролем. Пептид G29 (0.5 мг/кг) улучшал метаболическое состояние сердца – увеличивал содержание АТР, общего фонда адениннуклеотидов, фосфокреатина, общего креатина и снижал уровень лактата по сравнению с контролем. Результаты указывают на возможность использования пептида G в качестве препарата для уменьшения реперфузионных повреждений сердца и необходимость изучения механизмов его действия.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДРЕЖКА

Работа выполнена при поддержке Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант 18-015-00009).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов исследований.

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Seta Y., Kataoka S., Toyono T., Toyoshima K. // Arch. Histol. Cytol. 2006. V. 69(4). P. 273–280.
2. Diaz-Cabiale Z., Parrado C., Vela C., Razani H., Covenas R., Fuxe K., Narvaez J.A. // Neuropeptides. 2005. V. 39. P. 185–190.
3. Abbott S., Pilowsky P. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2009. V. 296(4). R1019–1026.
4. He B., Shi M., Zhang L., Li G., Zhang L., Shao H., Li J., Fang P., Ma Y., Shi Q., Sui Y. // Physiol. Behav. 2011. V. 103(3–4). P. 284–289.
5. Fang P., Sun J., Wang X., Zhang Z., Bo P., Shi M. // Life Sciences. 2013. V. 92. P. 628–632.
6. Lang R., Gundlach A. L., Kofler B. // Pharmacology & Therapeutics. 2007. V. 115. P. 177–207.
7. Alston E.N., Parrish D.C., Hasan W., Tharp K., Pahlmeyer L., Habecker B.A. // Neuropeptides. 2011. V. 45(1) P. 33–42.
8. Kocic I. // J. Pharm. Pharmacol. 1998. V. 50(12). P. 1361–1364.
9. Wang J., Gareri C., Rockman H.A. // Circulation Research. 2018. V. 123(6). P. 716–735.
10. Шульженко В.С., Серебрякова Л.И., Студнева И.М., Пелогейкина Ю.А., Веселова О.М., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Палькеева М.Е., Сидорова М.В., Писаренко О.И. // Кардиологический вестник. 2016. Т. 11(3). С 12–21.
11. Timotin A., Pisarenko O., Sidorova M., Studneva I., Shulzhenko V., Palkeeva M., Serebryakova L., Molokoe-dov A., Veselova O., Cinato M., Tronchere H., Boall F., Kunduzova O. // Oncotarget. 2017. V. 8(13). P. 21241–21252.
12. Stathopoulos P., Papas S., Kostidis S., Tsikaris V. // J. Peptide Sci. 2005. V. 11(10). P. 658–664.
13. Subirós-Funosas R., El-Faham A., Albericio F. // Tetra-hedron. 2011. V. 67(45). P. 8585–8593.
14. Mergler M., Dick F., Sax B., Staehelin C., Vorherr T. // J. Pept. Sci. 2003. V. 9. P. 518–526.
15. Behrendt R., Huber S., Martí R., White P. // J. Pept. Sci. 2015. V. 21. P. 680–687.
16. Weber U., André M. // Hoppe-Seyler Z. Phys. Chem. 1975. V. 356(s1). P. 701–714.
17. Lloyd-Williams P., Albericio F., Giralt E. // Tetrahe-dron. 1993. V. 49(48). P. 11065–11133.
18. Вольпина О.М., Михалева И.И., Иванов В.Т. // Биорганич. химия. 1982. Т. 8(1). С. 5–49.
19. Vasileiou Z., Barlos K., Gatos D. // J. Pept. Sci. 2009. V.15. P. 824–831.
20. Barlos K., Gatos D. // Biopolymers (Peptide Science). 1999. V. 51. P. 266–278.
21. Goulas S., Gatos D., Barlos K. // J. Pept. Sci. 2006. V. 12. P. 116–123.
22. Сидорова М.В., Молокоедов А.С., Овчинников М.В., Беспалова Ж.Д., Бушуев В.Н. // Биоорганич. химия. 1997. Т. 23. № 1. С. 41–50. [Sidorova M.V. Moloko-edov A.S., Ovchinnikov M.V., Bespalova Zh.D., Bushuev V.N. // Russ. J. Bioorgan. Chem. V. 23. № 1. P. 46–55.]
23. Сидорова М.В., Палькеева М.Е., Азьмуко А.А., Овчинников М.В., Молокоедов А.С., Шарф Т.В., Ефремов Е.Е., Голицын С.П. // Биоорганич. химия. 2017. Т. 43(4). С. 339–346. [Sidorova M.V., Palkeeva M.E., Az'muko A.A., Ovchinnikov M.V., Molokoe-dov A.S., Sharf T.V., Efremov E.E., Golitsyn S.P. // Russ. J. Bioor-gan. Chem. 2017. V. 43(4). P. 351–358.]
24. Barlos K., Gatos D. // Convergent peptide synthesis // Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Ap-proach. Ed. by Chan W.C., White P.D. Oxford Univ. Press, 2001. P. 215–228.

25. *Van Zon A., Beyerman H.C.* // *Helv. Chim. Acta.* 1973. V. 56. P. 1729–1740.
26. *Гершкович А.А., Кибирев В.К.* Химический синтез пептидов. Киев: Наукова думка, 1992.
27. *Kovacs J., Kisfaludy L., Ceprini M.Q.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1967. V. 89(1). P. 184–184.
28. *Kaiser E., Colescott R.L., Bossinger C.D., Cook P.I.* // *Anal. Biochem.* 1970. V. 34. P. 595–598.
29. *Michels T., Dölling R., Haberkorn U., Mier W.* // *Org. Lett.* 2012. V. 14(20). P. 5218–5221.
30. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. 1991. М.: Мир. С. 391.
31. *Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis. A Practical Approach.* Ed. Chan W.C., White P.D. Oxford Univ. Press, 2001. P. 65–67.
32. *Bergmeyer H.U.* *Methods of Enzymatic Analysis.* New York: Academic Press, 1974. P. 1464–1467, 1772–1776, 1777–1778, 2127–2131.

Convergent Synthesis of the Rat Galanin and Study of Its Biological Activity

M. V. Sidorova*^{#,}, M. E. Palkeeva*, D. V. Avdeev*, A. S. Molokoedov*, M. V. Ovchinnikov*, A. A. Azmuko*, L. I. Serebryakova*, O. M. Veselova*, I. M. Studneva*, and O. I. Pisarenko*

[#]Phone +7(495)4146716; e-mail: peptide-cardio@yandex.ru

*National Medical Research Cardiological Center of Russian Health Ministry,
3-ya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

This work is devoted to synthesis of the full-length rat galanin and study of its biological activity. Galanin (G29) sequence GWTLNSAGYLLGPH AIDNHRFSFDKHGLT-NH₂ is seems to be difficult for stepwise SPS. Impurities similar in composition and properties that accumulate during stepwise synthesis of long peptides, significantly complicate the selection of the target product. Concerning, solid phase – fragmentary (convergent) method of synthesis was chosen for preparation of peptide G29. N^α-Fmoc, C-Gly-terminated fragments were prepared by solid phase synthesis on 2-chlorotrityl chloride resin or by mix anhydride method in solution and then purified fragments are condensed on polymer in the presence of complex “F”. Crude product of synthesis had 77.1% of major substance. Galanin was purified by reversed phase HPLC, the peptide was identical to the commercial sample, it had the correct molecular weight and 98% of purity. We studied cardioprotective properties of G29 in a model of acute myocardial infarction in anesthetized Wistar rats *in vivo*. Peptide G29 was administered intravenously after a period of regional ischemia in the dose range from 0.5 to 3.0 mg/kg. G29 administration reduced infarct size by 40% and decreased the activity of necrosis markers (CK-MB and LDH) in plasma by the end of reperfusion compared to control. Peptide improved metabolic state of infarcted heart, increased ATP content, total adenine nucleotide pool, phosphocreatine and total creatine, and decreased lactate level compared to control. These results indicate the possibility of using G29 as a drug to reduce myocardial reperfusion injury and the need to study the mechanisms of its action.

Keywords: rat galanin, peptide cardioprotectors, peptides, solid phase synthesis, fragment condensation, ischemia and reperfusion of the heart, energy metabolism