

УДК 612.115.3:612.115.064

ЗАЩИТНЫЕ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ КОМПЛЕКСА ГЕПАРИНА С АРГИНИНСОДЕРЖАЩИМ ГЛИПРОЛИНОМ ARG-PRO-GLY-PRO В УСЛОВИЯХ ИММОБИЛИЗАЦИОННОГО СТРЕССА У КРЫС

Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Майстренко Е.С.

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва,
e-mail: mgrigorjeva@mail.ru*

В экспериментах на крысах исследовали влияние комплекса высокомолекулярного гепарина с аргининсодержащим глипролином Arg-Pro-Gly-Pro на антикоагулянтное, фибринолитическое и тромбоцитарное звенья противосвертывающей системы в условиях острого и многократного иммобилизационного стресса. При многократном интраназальном применении комплекса в условиях гиперкоагуляции, развивающейся в ответ на иммобилизационный стресс разной степени, показано его защитное антистрессорное действие, проявляющееся в активации функции противосвертывающей системы. Исследуемый комплекс оказывал профилактический эффект в отношении системы гемостаза против повышенной свертываемости крови, возникающей при длительном иммобилизационном стрессе. Обнаруженные свойства комплекса вносят значительный вклад в сохранение нормального гомеостаза организма при стрессогенных нарушениях и позволяют расширить сферу исследования регуляторных пептидов глипролинового ряда как препаратов, предохраняющих организм от возможных тромботических осложнений при стрессогенных воздействиях.

Ключевые слова: аргининсодержащий глипролин, комплексы гепарина, фибринолиз, антикоагулянтная активность, агрегация тромбоцитов

PROTECTIVE ANTITHROMBOTIC EFFECTS OF HEPARIN COMPLEX WITH ARGININCONTAINING GLYPROLINE ARG-PRO-GLY-PRO IN CONDITIONS OF RATS IMMOBILIZATION STRESS

Grigorieva M.E., Lyapina L.A., Maistrenko E.S.

Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

The influence of high molecular weight heparin complex with arginine-containing glyproline Arg-Pro-Gly-Pro on anticoagulant, fibrinolytic and platelet units of anticoagulation system was investigated in acute and repeated immobilization stress in experiments on rats. Protective antistress complex effect, resulting in the activation of anticoagulation system function, was shown at repeated intranasal complex administration in a hypercoagulation state, developing in response to immobilization stress of different degree. The complexes has a prophylactic effect on the haemostatic system against increased blood clotting that occurs with prolonged immobilization stress. The observed properties of the complex made a significant contribution to the preservation of the normal homeostasis of the organism in stressful disorders and allow to extend the scope of the study of regulatory glyproline peptides like drugs, protecting the organism from potential thrombotic complications during stressful influences.

Keywords: arginincontaining glyproline, complexes of heparin, fibrinolysis, anticoagulant activity, platelet aggregation

В проявлении функциональной активности многих систем организма, в том числе свертывающей и противосвертывающей систем крови, наряду с ферментами, гормонами и другими биологически активными веществами, участвуют пептидные биорегуляторы, к которым относятся короткие пролин- и глицинсодержащие пептиды (так называемые глипролины) [1]. Ранее было выявлено, что глипролины способствуют активации функционального состояния противосвертывающей системы (ПСС), оказывая антикоагулянтное, фибринолитическое и антитромбоцитарное действие в кровотоке [6]. В то же время, многие регуляторные пептиды, обладая широким спектром биологической активности, участвуют в поддержании нормального гомеостаза при стрессе [1]. В литературе имеются единичные сообщения о влиянии пролинсодержащих пептидов на

свертывание крови при стрессогенных нарушениях [2, 3].

В ответные реакции практически на любой стресс вовлекаются все системы организма, среди которых определенное место принадлежит системе гемостаза. При этом в зависимости от продолжительности и силы стрессора наблюдается или активация, или угнетение отдельных ее звеньев [7]. Активация функции ПСС и возникновение в крови агентов неферментативного фибринолиза, к каковым относятся и глипролины [6], установлена при непродолжительном (10-30 мин) иммобилизационном стрессе. В условиях же продолжительной иммобилизации (60-90 мин) угнетается фибринолитическая и антикоагулянтная активность крови и активируется тромбоцитарное звено гемостаза [8].

Один из природных антикоагулянтов крови – гепарин блокирует свертывающую

активность тромбина и других коагуляционных белков [9] и одновременно проявляет в организме гипополидемическое, гипогликемическое и противовоспалительное действие. Экспериментальные данные, полученные ранее, свидетельствуют о наличии противосвертывающих свойств у комплексных соединений гепарина с некоторыми низкомолекулярными веществами [5].

Основываясь на том, что пептиды глипролинового ряда оказывают антикоагулянтно-фибринолитическое действие в организме, можно предположить, что в условиях гиперкоагуляции, возникающей при длительном иммобилизационном стрессе, они будут проявлять защитное антитромботическое действие, которое может быть усилено гепарином вследствие образования с ним комплексных соединений.

Цель исследования заключалась в изучении действия комплекса аргининсодержащего глипролина Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) с высокомолекулярным гепарином на параметры системы гемостаза в условиях острого и многократно повторяющегося иммобилизационного стресса у крыс.

Материалы и методы исследования

В работе использовались пептид RPGP, синтезированный в Институте молекулярной генетики РАН (Москва), высокомолекулярный гепарин фирмы «Serva» и созданное нами комплексное соединение этого пептида с гепарином при молярном соотношении 1 : 1.

В опытах использовано более 70 белых лабораторных крыс-самцов с массой тела 200–250 г (в возрасте 8–9 мес), содержащихся на обычном лабораторном рационе. Учитывая, что в экспериментах на интактных крысах оптимальной дозой пептида RPGP для проявления противосвертывающих эффектов установлена доза 1 мг/кг массы тела [2], в наших исследованиях использовалась именно эта доза. Животным интраназально вводили по 0.05 мл раствора

комплекса RPGP с гепарином в дозе 1 мг/кг массы тела (опытная группа) или 0.85 %-ного раствора NaCl (контрольная группа) через каждые 24 ч в течение 6-ти суток. Взятие крови у крыс на анализ параметров гемостаза осуществляли шприцем из *v. jugularis* с использованием в качестве консерванта 3.8 %-ный раствор лимоннокислого натрия в соотношении кровь : консервант как 9 : 1.

Эксперименты на животных включали две серии. В первой серии выявляли защитное антистрессорное действие комплекса в ситуации острого иммобилизационного стресса, для чего сначала крысам вводили комплекс (или 0.85 %-ный раствор NaCl), как описано выше, а затем через 1 ч после последнего введения препаратов животных подвергали иммобилизационному стрессу путем фиксации на спине в течение 60 мин. Во второй серии экспериментов выявляли защитное антистрессорное действие комплекса в условиях многократного иммобилизационного стресса, для чего крысам ежедневно вводили комплекс (или 0.85 %-ный раствор NaCl), а затем через 1 ч после каждого введения в течение 6-ти суток подвергали 60-минутной иммобилизации. Кровь на анализы брали через 1 ч после начала иммобилизации животных при остром опыте и спустя 1 ч после последней иммобилизации в условиях многократно повторяющегося стресса.

Дополнительно в экспериментах использовали нормальных интактных крыс, которые содержались на обычном лабораторном рационе, не подвергались никаким манипуляциям и не получали никаких препаратов.

В плазме крови определяли показатели антикоагулянтной активности по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), суммарной (СФА) и неферментативной (НФ) фибринолитической активности (с использованием нестабилизированного фибрина), ферментативной фибринолитической активности (ФФА) и активность тканевого активатора плазминогена (ТАП) – на стабилизированных фибриновых пластинах, АДФ-индуцированную агрегацию богатой тромбоцитами плазмы [4].

Статистическая обработка данных была проведена по методу Стьюдента и с использованием непараметрических критериев достоверности.

Таблица 1

Параметры системы гемостаза в плазме крови крыс в условиях острого иммобилизационного стресса в течение 60 мин на фоне интраназально 6-кратно вводимого комплекса RPGP с гепарином в дозе 1 мг/кг массы тела ($M \pm m$)

Условия опыта	Показатели крови, %					
	АЧТВ	СФА	НФ	ФФА	ААП	АТ
Норма	100 ± 5.6	100 ± 7.7	100 ± 5.7	100 ± 10.2	100 ± 19.5	100 ± 17.2
Иммобилизация на фоне 0.85% NaCl (контроль)	83.6 ± 6.4*	78 ± 6.7*	83 ± 6.7*	102 ± 12.3	54.4 ± 15.6**	110 ± 10.6
Иммобилизация на фоне комплекса (опыт)	151.7 ± 8.3** (##)	126.8 ± 3.4* (##)	148.5 ± 11.4** (##)	188.6 ± 13.6** (##)	218.4 ± 26.2** (##)	58 ± 8.7* (#)

Примечание. Здесь и в табл. 2: показатели крови выражены в % относительно соответствующих показателей у нормальных животных, принятых за 100%.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с нормой; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ по сравнению с контролем.

Таблица 2

Параметры системы гемостаза в плазме крови крыс в условиях многократного в течение 6-ти суток иммобилизационного стресса на фоне интраназально 6-кратно вводимого комплекса RPGP с гепарином в дозе 1 мг/кг массы тела ($M \pm m$)

Условия опыта	Показатели крови, %					
	АЧТВ	СФА	НФ	ФФА	ААП	АТ
Норма	100 ± 5.2	100 ± 6.3	100 ± 7.4	100 ± 9.8	100 ± 10.6	100 ± 9.1
Иммобилизация на фоне 0.85% NaCl (контроль)	$73.6 \pm 6.7^*$	$77.5 \pm 5.9^*$	$71.3 \pm 6.4^*$	$67 \pm 7.4^*$	$45.7 \pm 7.3^{**}$	$117 \pm 3.4^*$
Иммобилизация на фоне комплекса (опыт)	$126.4 \pm 8.5^*$ (##)	113.8 ± 2.6 (##)	119.2 ± 3.6 (##)	86.6 ± 6.4	79.4 ± 12.9 (#)	96.5 ± 3.4 (##)

Результаты исследования и их обсуждение

В экспериментах на крысах, подвергнутых иммобилизационному стрессу в течение 60 мин (как однократно, так и ежедневно в течение 6-ти суток), было показано, что у животных возникает состояние гиперкоагуляции и гипофибринолиза за счет усиления агрегации тромбоцитов под действием АДФ, а также уменьшения антикоагулянтной и фибринолитической активности плазмы крови как неферментативной, так и ферментативной природы (табл. 1, 2).

Надо отметить, что при многократном иммобилизационном стрессе происходило более значительное изменение параметров системы гемостаза в сторону гиперкоагуляции и снижения ферментативного фибринолиза.

В дальнейшем изучали влияние интраназального введения комплекса RPGP с гепарином на изменение всех звеньев системы гемостаза у крыс при иммобилизационном стрессе разной степени.

Было показано, что как при однократном, так и при многократном 60-минутном иммобилизационном стрессе предварительное интраназальное введение в течение 6-ти суток комплекса предотвращало развитие гиперкоагуляции. Антикоагулянтная активность плазмы крови увеличивалась по сравнению с нормой на 26.4% при однократной иммобилизации и на 51.7% – при многократной. АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов при многократном стрессе не изменялась по сравнению с показателями у интактных крыс, а при однократной иммобилизации происходило ее снижение до 58% (табл. 1, 2). Что касается изменений в системе фибринолиза, то в обеих сериях эксперимента на фоне введенного комплекса неферментативный фибринолиз крови увеличивался на 19–48.5% по сравнению с нормальными показателями. Однако, после введения комплекса в условиях острого стресса ФФА плазмы повышалась на 88.6%

за счет значительного (более чем в 2 раза) и достоверного увеличения активности ТАП (табл. 1), а при ежедневном многократном стрессе ФФА и ААП недостоверно и не так значительно, как в контрольной группе крыс, снижались по сравнению с нормой (табл. 2).

Итак, из полученных результатов следует, что иммобилизационный стресс путем фиксации животных на спине в течение 60 мин, однократно или ежедневно в течение 6-ти суток, способствовал угнетению функции противосвертывающей системы и повышению свертывания крови. При этом многократный иммобилизационный стресс приводил к более значительному сдвигу параметров системы гемостаза в сторону гиперкоагуляции и гипофибринолиза, особенно в отношении ферментативного фибринолиза. При интраназальном введении комплекса RPGP с гепарином животным в условиях иммобилизационного стресса разной степени наблюдалось повышение антикоагулянтной активности плазмы крови, что может быть обусловлено как способностью комплекса RPGP и гепарина повышать антикоагулянтный потенциал крови, так и известным свойством регуляторных пептидов ингибировать активность тромбина [9]. АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов в этих условиях достоверно снижалась или не отличалась от нормы, что также находит свое объяснение в антитромботическом действии глипролинов и их способности вмешиваться в процессы агрегации тромбоцитов [6]. Возможно, антиагрегационный эффект исследуемого комплекса обусловлен и наличием в структуре пептида RPGP аминокислоты аргинин, поскольку известно, что аргинин, являясь предшественником оксида азота, также может проявлять антитромботические свойства. Кроме того, после однократной иммобилизации на фоне предварительного введения комплекса установлено повышение фибринолитической активности крови,

как неферментативной, так и ферментативной природы, а также активности ТАП, что свидетельствовало о способности комплекса RPPG с гепарином вызывать эндотелий-зависимую реакцию высвобождения в кровотоке активатора плазминогена. После многократного стресса не наблюдалось столь значительных изменений в системе фибринолиза, однако применение комплекса также способствовало повышению фибринолитического потенциала крови животных. Следует отметить, что в условиях однократной иммобилизации исследуемый комплекс в большей степени оказывал противосвертывающие эффекты, чем при многократном стрессе.

Обобщая полученный материал, можно сделать вывод, что предварительное (до иммобилизации) введение комплекса пептида RPPG с высокомолекулярным гепарином в дозе 1 мг/кг, или одновременное его применение при многократно повторяющемся стрессе, защищает организм животного от гиперкоагуляции, возникающей в ответ на длительный иммобилизационный стресс.

Заключение

Таким образом, на основании проведенных исследований, были установлены антикоагулянтно-фибринолитические и антитромбоцитарные эффекты комплексного соединения аргининсодержащего глипролина RPPG с высокомолекулярным гепарином, примененного у животных при стрессогенных воздействиях, что позволяет говорить о его способности восстанавливать нарушенную функцию ПСС крови. Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследуемый комплекс RPPG с гепарином оказывает защитный профилактический эффект в отношении системы гемостаза против повышенной свертываемости крови, возникающей при длительном им-

мобилизационном стрессе. Обнаруженные свойства комплекса вносят значительный вклад в сохранение нормального гомеостаза организма при стрессогенных нарушениях и позволяют расширить сферу исследования регуляторных пептидов глипролинового ряда как препаратов, предохраняющих организм от патологически повышенной свертываемости крови и возможных последующих тромботических осложнений при стрессогенных воздействиях.

Список литературы

1. Ашмарин И.П., Ещенко Н.Д., Каразеева Е.П. Нейрохимия в таблицах и схемах. – М.: Экзамен, 2007. – 143 с.
2. Григорьева М.Е., Казанчева М.Х., Ляпина Л.А. Противосвертывающие эффекты аргининсодержащего пептида Arg-Pro-Gly-Pro в условиях иммобилизационного стресса // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2012. – Т. 154 – С. 687-692.
3. Григорьева М.Е., Ляпина Л.А. Противосвертывающие и антитромбоцитарные эффекты препарата семакс в условиях острого и хронического иммобилизационного стресса // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2010. – Т. 149 – С. 49-53.
4. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. – М.: Адвансед Солюшнз, 2012. – 160 с.
5. Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е. Противосвертывающие эффекты комплексного соединения аргинина с высокомолекулярным гепарином // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – Т. 147. – № 3. – С. 300-303.
6. Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Оберган Т.Ю., Самонина Г.Е., Ашмарин И.П., Мясоходов Н.Ф. Сравнение противосвертывающих эффектов регуляторных пролинсодержащих олигопептидов. Специфичность действия глипролинов, семакса и селанка: возможности их практического применения // Изв. РАН. Сер. биол. – 2006. – № 2. – С. 193-203.
7. Furay A.R., Bruestle A.E., Herman J.P. The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress // Endocrinology. – 2008. – V. 149. – № 11. – P. 5482–5490.
8. Spiezia L., Tormene D., Pesavento R. Thrombophilia as a predictor of persistent residual vein thrombosis // Haematologica. – 2008. – V. 93. – P. 479-480.
9. Stief T.W. Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine // Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2007. – V. 13. – № 2. – С. 146-153.