

УДК 612.115.3:615.272:616-008.9

ВЛИЯНИЕ СМЕСИ ТИРОЛИБЕРИНА С ПЕПТИДОМ ARG-PRO-GLY-PRO НА ГЕМОСТАЗ, ЛИПИДНЫЙ И УГЛЕВОДНЫЙ ОБМЕН В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Шубина Т.А.

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва,
e-mail: tobergan@mail.ru

Представлены результаты исследования эффективности применения смеси тиролиберина с пептидом Arg-Pro-Gly-Pro в дозах 50 и 100 мкг/кг массы тела в условиях экспериментального метаболического синдрома. Показано, что интраназальное 7-кратное введение смеси пептидов крысам с метаболическими нарушениями, вызываемыми длительным содержанием животных на высококалорийной диете, способствовало нормализации показателей липидного спектра – снижению концентрации общего холестерина, холестерина ЛПНП и триглицеридов. Это сопровождалось повышением фибринолитической активности плазмы крови (суммарной, неферментативной и ферментативной) и снижением агрегации тромбоцитов. Усиление антикоагулянтного потенциала крови животных наблюдалось только после применения смеси в дозе 50 мкг/кг. Выявленные эффекты сохранялись в течение 7 суток после отмены введения препаратов. Установлена способность смеси пептидов в обеих дозах замедлять увеличение массы тела. Наибольший гипохолестеринемический и протромботический эффект отмечен для смеси пептидов, применяемой в дозе 50 мкг/кг.

Ключевые слова: пептиды, метаболический синдром, гемостаз, липидный обмен, масса тела

EFFECT OF THE COMPOUND TIROLIBERIN WITH PEPTIDE ARG-PRO-GLY-PRO ON HEMOSTASIS, LIPID AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN EXPERIMENTAL METABOLIC SYNDROME

Obergan T.Yu., Grigoreva M.E., Lyapina L.A., Shubina T.A.

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

It has been investigated the effects of a mixture of peptides Pyr-His-Pro-NH₂ + Arg-Pro-Gly-Pro at the doses of 50 and 100 mg/kg of body weight in experimental metabolic syndrome. It is shown that 7-fold (1 per day) intranasal introduction of a mixture of peptides rats with metabolic disorders, caused by prolonged maintenance of animals on a high-calorie diet, contributes to the normalization of lipid profile – reduction in the concentration of total cholesterol, LDL cholesterol and triglycerides. While there were an increase in fibrinolytic activity of blood plasma (total, non-enzymatic and enzymatic) and reduction of platelet aggregation. The enhancement of the anticoagulant activity of rat blood was only observed after application of the mixture at a dose of 50 mg/kg. These effects persisted for 7 days after termination of treatment. Discovered the ability of the mixture of peptides in doses 50 and 100 mkg/kg to slow the increase of body weight. A more pronounced cholesterol-lowering and anticlotting effect was observed for the mixture of peptides in dose 50 mkg/kg.

Keywords: peptides, metabolic syndrome, hemostasis, lipid metabolism, body weight

Метаболический синдром (МС), распространенность которого значительно возросла в последнее время, является одной из актуальных проблем современной медицины. Изучение патогенетических особенностей развития этого комплексного заболевания не вызывает сомнений, поскольку у пациентов с МС возникает повышенный риск появления атеросклероза, сахарного диабета 2-го типа, артериальной гипертензии, инсульта, инфаркта миокарда и других заболеваний [1]. Нарушения регуляции углеводного и жирового метаболизма в организме, возникающие при развитии МС вследствие инсулинорезистентности и гиперинсулинемии, приводят к ожирению, повышению свертываемости крови, атеросклеротическому изменению в сосудах [2, 3].

Клинические и экспериментальные исследования, посвященные исследованию функционирования системы гемостаза при

МС показали, что при данной патологии нарушается равновесие фибринолитической и протромботической активности крови вследствие гиперагрегации тромбоцитов в результате воздействия комплекса обменных нарушений и гемодинамических факторов, гиперкоагуляции за счет повышения активности факторов свертывания и уровня фибриногена, депрессии фибринолитической системы из-за уменьшения активности тканевого активатора плазминогена и возрастания его ингибитора ИАП-1 [2, 4, 5].

Таким образом, современное лечение МС предполагает многофакторный подход с применением средств, восстанавливающих метаболизм в органах и тканях, нормализующих функционирование системы гемостаза и углеводный обмен в организме.

Ранее было показано, что короткие пептиды, имеющие в своем составе аминокислоты пролин и глицин, обладают широким

спектром биологических активностей и оказывают в организме противосвертывающее, гипохолестеринемическое, гипогликемическое действие, а также замедляют накопление жировой ткани [4]. В экспериментах *in vivo* установлено, что пептид Arg-Pro-Gly-Pro проявляет антитромботические, антикоагулянтно-фибринолитические эффекты и гипогликемическую активность при экспериментальной гипергликемии и гиперхолестеринемических состояниях организма [4, 6]. Также известно, что тиреотропные гормоны, в том числе тиролиберин, оказывают влияние на метаболические процессы в организме: подавляют синтез холестерина, триацилглицеридов, активируют метаболизм глюкозы и снижают массу тела [7].

Мы предположили, что смесь двух пептидов может обладать большей эффективностью при коррекции параметров системы гемостаза, а также метаболизма жиров и углеводов.

Цель работы – исследовать эффективность действия разных доз смеси коротких пролинсодержащих пептидов «Pyr-His-Pro-NH₂ + Arg-Pro-Gly-Pro» на липидный и углеводный обмен, состояние системы гемостаза и изменение массы тела в условиях экспериментального метаболического синдрома у крыс.

Материалы и методы исследования

Исследования проведены на 40 беспородных белых крысах-самцах массой 300 ± 20 г (питомник «Столовая») с соблюдением принципов биоэтики в соответствии с международными принципами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или других научных целей. Все животные были разделены на 4 группы (в каждой группе $n = 10$): «Норма» – здоровые крысы без лечения; «МС» – крысы с метаболическим синдромом без лечения; «МС + смесь 100» – крысы с МС, которым вводили смесь пептидов в дозе 100 мкг/кг массы тела; «МС + смесь 50» – крысы с МС, которым вводили смесь пептидов в дозе 50 мкг/кг массы тела.

В работе применяли пептиды Pyr-His-Pro-NH₂ (тиролиберин, Pyr-HP) и Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP), синтезированные и предоставленные Институтом молекулярной генетики РАН (Москва). Смесь пептидов в весовом соотношении 1:1 готовили ежедневно, навеску растворяли в физиологическом растворе непосредственно перед использованием.

Моделирование МС осуществляли содержанием крыс на разработанной нами ранее высококалорийной диете (ВКД) [4]. В качестве питья животные получали 10%-ный раствор глюкозы. Энергетическая ценность диеты составляла 355 ккал/100 г рациона. Для развития метаболических нарушений крысы групп «МС», «МС + смесь 50» и «МС + смесь 100» получали ВКД в течение 3 месяцев (90 дней). Затем животным групп «МС + смесь 100» и «МС + смесь 50» с 90-го по 96-й день эксперимента 7-кратно 1 раз в сутки интраназальным способом вводили смесь пептидов в дозах 50

или 100 мкг/кг соответственно, а группе «МС» – в те же сроки и подобным образом – 0,85%-ный физиологический раствор. Животные группы «Норма» в течение всего периода эксперимента содержались на стандартном гранулированном рационе «Лабораторкорм» (энергетическая ценность – 295 ккал/100 г) при свободном доступе к пище и воде.

Отбор образцов крови для проведения исследований производили дважды: на 97-й день эксперимента (через 20 ч после 7-го введения препаратов/физиологического раствора) и на 104-й день (через 7 суток после прекращения применения препаратов). Взятие крови с цитратом натрия в качестве консерванта осуществляли натошак из яремной вены. В цельной крови измеряли уровень глюкозы на биохимическом анализаторе One Touch Horizon (США), используя тест-полоски для данного прибора.

Далее образцы крови центрифугировали 5 мин при 1000 g для получения плазмы, богатой тромбоцитами (PRP), а затем – 12 мин при 3000 g для получения бедной тромбоцитами плазмы (PPP).

В PRP определяли агрегацию тромбоцитов по Борну; в PPP – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) с использованием набора «АЧТВ-тест» (Технология-Стандарт, Россия), суммарную фибринолитическую активность (СФА), неферментативный (НФ) и ферментативный фибринолиз (ФФ) на пластинах нестабилизированного фибрина [8].

Показатели липидного спектра (концентрацию общего холестерина (ОХс), холестерина липопротеидов высокой плотности (Хс-ЛПВП), триглицеридов (ТГ)) в PPP измеряли энзиматическим колориметрическим методом с использованием реактивов «Ольвекс-Диагностикум» (Россия). Суммарную концентрацию Хс-(ЛПНП + ЛПОНП), обозначенную как Хс-ЛПНП, рассчитывали по формуле Хс-ЛПНП = ОХс – Хс-ЛПВП.

Для контроля динамики изменения массы тела животных осуществляли их взвешивание в 1 (перед началом ВКД), на 30, 60, 90 (перед началом лечения), 97 (после 7-кратного введения препаратов) и 104-й (через 7 суток после отмены лечения) дни эксперимента.

Статистическую обработку данных выполняли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 8.0. Результаты представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее арифметическое, m – ошибка средней. Данные в исследуемых группах проверяли на нормальность распределения с помощью критерия Колмогорова – Смирнова. Определение различий сравниваемых независимых выборок проводили с использованием t -критерия Стьюдента (в случае нормального распределения) и непараметрического критерия Вилкоксона, Манна – Уитни (при отличии от нормального распределения). Уровень статистической значимости p принимали равным 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение

Как показали наши эксперименты, содержание крыс на ВКД в течение 3 месяцев приводило к развитию у животных нарушений липидного и углеводного обмена, а также дисфункции системы гемостаза. Так, в плазме крови этих животных (группа «МС») наблюдалось повышение концен-

трации ОХс на 18 % ($p < 0,05$), значительное увеличение концентрации ТГ и Хс-ЛПНП – на 143 и 132 % соответственно ($p < 0,01$) и снижение концентрации Хс-ЛПВП – на 14 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой «Норма» (таблица). При этом отмечено повышение уровня глюкозы в крови животных с МС в 2 раза ($p < 0,01$) по сравнению со здоровыми животными. Также содержание крыс на ВКД способствовало развитию у них ожирения, поскольку за 3 месяца диеты масса тела в группах с МС возросла на 162 ± 5 г, что составило 191 % от значений группы «Норма» (рисунок). Это сопровождалось развитием гиперкоагуляции и угнетением фибринолиза: время свертывания по тесту АЧТВ было снижено на 27 % ($p < 0,01$), а СФА, НФ и ФФ уменьшались на 40, 37 и 54 % соответственно ($p < 0,01$) относительно «Нормы». Также у этих животных отмечено усиление агрегации тромбоцитов на 20 % ($p < 0,05$) по сравнению с соответствующим показателем у здоровых животных.

Полученные данные свидетельствовали о развитии основных признаков МС у крыс, которых в течение длительного времени содержали на ВКД. В дальнейшем с этими животными проводили эксперименты по введению исследуемых препаратов.

Через 20 ч после 7-кратного интраназального применения смеси пептидов в дозах 100 и 50 мкг/кг в крови животных отмечалось снижение концентрации Хс-ЛПНП на 37 и 45 % соответственно ($p < 0,01$) по сравнению с группой «МС». Достоверное уменьшение концентрации ОХс на 18 % ($p < 0,05$) и ТГ на 52 % ($p < 0,01$) отмечено только в группе «МС + смесь 50». Через 7 суток после прекращения лечения в группе «МС + смесь 50» показатели липидного спектра оставались достоверно сниженными, а в группе «МС + смесь 100» концентрация Хс-ЛПНП сохранила прежние значения и отмечено снижение ОХс на 15 % ($p < 0,05$) относительно «МС». Следовательно, по характеру влияния на показатели липидного профиля наибольший эффект, сохраняющийся в течение недели после отмены лечения, установлен при дозе 50 мкг/кг.

В этих условиях эксперимента уровень глюкозы в крови животных с МС, которым вводили смесь пептидов, не отличался от значений в группе «МС» ни после введения препаратов, ни через неделю после их отмены.

При этом введение животным с МС препаратов «Смесь 50» и «Смесь 100» оказывало влияние на состояние системы гемостаза. Так, через 20 ч после 7-го введения препаратов в группе «МС + смесь 50»

выявлено достоверное удлинение времени свертывания (по АЧТВ) на 40 % ($p < 0,01$) относительно значений группы «МС». Антикоагулянтная активность плазмы крови крыс этой группы оставалась повышенной (на 27 %, $p < 0,05$) по сравнению с группой «МС» и через 7 суток после отмены лечения. Введение препарата в дозе 100 мкг/кг приводило к менее выраженному противосвертывающему эффекту, поскольку удлинение АЧТВ относительно группы «МС» носило недостоверный характер ($p > 0,05$). По другим параметрам гемостаза (фибринолитическая активность и агрегация тромбоцитов) наблюдались практически одинаковые эффекты при введении обеих доз смеси пептидов. Как видно из данных таблицы, через 20 ч после введения смеси пептидов в дозе 50 мкг/кг в плазме крови животных происходило повышение СФА, НФ и ФФ на 100, 72 и 165 % соответственно ($p < 0,01$), а при дозе 100 мкг/кг увеличение этих показателей составило 115, 90 и 181 % соответственно ($p < 0,01$) по сравнению с группой «МС». АТ плазмы крови крыс в группе «МС + смесь 50» была снижена на 74 % ($p < 0,01$), а в группе «МС + 100» – на 67 % ($p < 0,01$) относительно значений группы «МС». Через 7 суток после отмены лечения фибринолитическая активность плазмы крови животных в группах «МС + смесь 50» и «МС + смесь 100» оставалась повышенной по сравнению с группой «МС»: СФА, НФ, ФФ на 77–98 %, 69–76 % и 130 % соответственно ($p < 0,01$). При этом АТ была значительно снижена в обоих случаях на 65 % ($p < 0,01$) относительно «МС».

Изучение изменения массы тела крыс показало, что в группах животных с МС, подвергавшихся лечению, прирост массы тела (привес) был достоверно ниже, чем в группе «МС». В группе «МС + смесь 100» привес массы тела составил $22 \pm 4,3$ г, что на 41 % ниже, чем у животных с МС без лечения ($p < 0,01$). При введении животным смеси в дозе 50 мкг/кг привес за этот же период был еще меньше и составил $6,7 \pm 1,6$ г, что на 82 % меньше, чем в группе «МС» ($p < 0,01$). Следовательно, наибольший эффект замедления роста массы тела оказывала смесь пептидов, используемая в дозе 50 мкг/кг.

Представленные в настоящей работе данные указывают, что смесь пептидов Руг-НР + RPGP восстанавливала нормальные значения показателей общего холестерина, липидного профиля и предотвращала накопление жировой массы (т.е. прибавку в весе) даже при одновременном употреблении в пищу продуктов, приводящих

к повышению уровня холестерина и атерогенных липопротеидов в крови. Это, возможно, связано со структурными особенностями указанных пептидов, поскольку присутствие аргинина в структуре молекулы пептида способствует появлению в кровотоке оксида азота, который обеспечивает гиполлипидемический эффект, присутствие гистидина обеспечивает нормальный жировой обмен [6]. Наличие в составе пептидов пролина, глицина, аргинина и гистидина способствовало восстановлению тканей после повреждений, оказывая положительное влияние на общее состояние и обмен веществ организма. С другой стороны, это может быть обусловлено нормохолестериновым действием самих пептидов. Обращает на себя внимание тот факт, что по влиянию на липидный профиль и способности препаратов пептидов замедлять прирост массы тела животных низкая доза смеси пептидов (50 мкг/кг) более эффективна, чем доза 100 мкг/кг.

Также впервые установлены антикоагулянтно-фибринолитические и антитромбоцитарные эффекты смеси этих пептидов в крови крыс, постоянно употребляющих жирную пищу с избытком глюкозы. У подопытных животных при этом активировалось функциональное состояние противосвертывающей системы крыс: снижалась агрегация тромбоцитов, повышалась фибриндеполимеризационная (неферментативная фибринолитическая) активность и антикоагулянтные свойства плазмы кро-

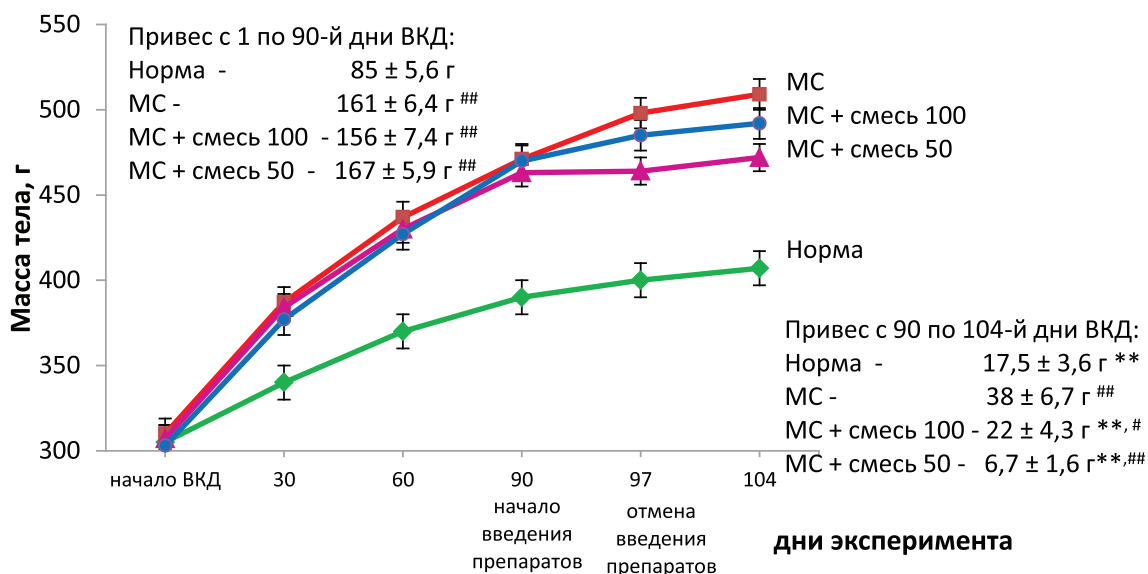
ви под действием пептидов. Антитромбоцитарный и фибриндеполимеризационный эффекты пептидов, вероятно, обусловлены взаимодействием их с фибриногеном и исключением его из процессов свертывания крови, поскольку есть данные о связи фибриногена с его рецепторами на тромбоцитах [9]; антикоагулянтный – ингибированием активности тромбина [10].

При сравнении действия двух доз смеси пептидов на параметры гемостаза наиболее значимый эффект по АЧТВ отмечается при дозе 50 мкг/кг, по разным видам фибринолиза и агрегации тромбоцитов эффекты при обеих дозах были сходны.

Таким образом, применение смеси исследованных нами коротких пролин-содержащих пептидов может обогатить современную метаболическую терапию и исключить возможные нежелательные последствия вмешательства в липидный метаболизм в отличие от применяемых в настоящее время медикаментов (фибраторов, статинов, ингибиторов β -окисления жирных кислот).

Выводы

Следовательно, на фоне ВКД многократное интраназальное введение смеси пептидов «тиролиберин + RPGP» приводило к усилению антикоагулянтно-фибринолитического потенциала и проявлению их антитромбоцитарного эффекта в крови животных, причем эта картина сохранялась и после отмены введения препаратов.



Изменение массы тела животных в процессе проведения эксперимента.

– $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$ – по сравнению с группой «Норма»,

* – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – по сравнению с группой «МС»

Параметры гемостаза, показатели липидного спектра и уровень глюкозы после 7-кратного введения и через неделю после отмены введения смеси пептидов в дозах 50 и 100 мкг/кг на фоне МС

Показатель	Норма (здоровые)		МС		МС + смесь 50 (Опыт 1)		МС + смесь 100 (Опыт 2)	
	После введения	После отмены	После введения	После отмены	После введения	После отмены	После введения	После отмены
Глюкоза, ммоль/л	3,4 ± 0,3	3,5 ± 0,3	6,9 ± 0,3 ^{##}	7,2 ± 0,7 ^{##}	7,1 ± 0,5	7,6 ± 0,6	7,0 ± 0,8	6,9 ± 0,9
Общий холестерин, ммоль/л	1,384 ± 0,048	1,519 ± 0,049	1,630 ± 0,067 [#]	1,955 ± 0,04 ^{##}	1,335 ± 0,024 [*]	1,568 ± 0,034 [*]	1,478 ± 0,087	1,670 ± 0,083 [*]
Хс-ЛПВП, ммоль/л	0,979 ± 0,043	0,978 ± 0,056	0,841 ± 0,855 [#]	0,850 ± 0,013 [#]	0,82 ± 0,059	0,842 ± 0,041	0,884 ± 0,053	0,812 ± 0,072
Хс-ЛПНП, ммоль/л	0,405 ± 0,021	0,541 ± 0,022	0,943 ± 0,03 ^{##}	1,099 ± 0,029 ^{##}	0,514 ± 0,044 ^{**}	0,726 ± 0,042 ^{**}	0,593 ± 0,064 ^{**}	0,859 ± 0,094 [*]
Триглицериды, ммоль/л	0,454 ± 0,054	0,592 ± 0,044	1,101 ± 0,115 ^{##}	2,086 ± 0,221 ^{##}	0,529 ± 0,079 ^{**}	0,938 ± 0,067 ^{**}	0,859 ± 0,063	1,814 ± 0,052
АЧТВ, с	27,3 ± 2,6	26,8 ± 3,2	19,9 ± 2,5 ^{##}	21,1 ± 4,3 [#]	27,8 ± 1,3 ^{**}	26,7 ± 2,9 [*]	22,2 ± 1,3	23,4 ± 2,9
СФА, мм ²	36,6 ± 0,7	40,0 ± 0,9	21,8 ± 0,8 ^{##}	23,5 ± 0,9 ^{##}	43,5 ± 1,4 ^{**}	41,5 ± 1,3 ^{**}	46,8 ± 1,3 ^{**}	46,6 ± 1,3 ^{**}
НФ, мм ²	24,6 ± 0,3	27,3 ± 0,8	15,4 ± 2,1 ^{##}	17,0 ± 0,5 ^{##}	26,5 ± 0,9 ^{**}	28,7 ± 1,1 ^{**}	29,3 ± 0,9 ^{**}	30,0 ± 1,0 ^{**}
ФФ, мм ²	14,0 ± 0,7	12,3 ± 0,8	6,4 ± 0,5 ^{##}	6,5 ± 1,4 ^{##}	17,0 ± 0,9 ^{**}	15,0 ± 0,9 ^{**}	18,0 ± 1,1 ^{**}	15,0 ± 1,1 ^{**}
АТ, %	84 ± 4,3	82 ± 3,5	100 ± 2,5 [#]	100 ± 3,7 [#]	26,0 ± 3,6 ^{**}	37,0 ± 1,0 ^{**}	33,0 ± 6,3 ^{**}	34,0 ± 3,4 ^{**}

Примечание. # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$ – различия между группами «МС» и «Норма», * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – различия между группами «МС» и «Опыт 1», «МС» и «Опыт 2».

Наибольший гипохолестеринемический и противосвертывающий эффект отмечен для смеси пептидов, применяемой в дозе 50 мкг/кг.

Список литературы

1. Hanefeld M., Pistrosch F., Schulze J., Rothe U. The metabolic syndrome and cardiovascular diseases: an update of medical treatment // *J. Metabolic Syndr.* – 2014. – V. 3. – № 4. – P. 1–8.
2. Сумеркина В.А., Чулков Вл. С., Чулков В.С., Ожигина Е.В. Состояние системы гемостаза и цитокиновый профиль у пациентов с метаболическим синдромом // *Казанский медицинский журнал.* – 2015. – Т. 96, № 5. – С. 728–734.
3. Шабров А.В., Соколова Л.А. Метаболический синдром как ведущий фактор риска сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности // *Профилактическая и клиническая медицина.* – 2010. – № 3–4. – С. 9–14.
4. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А., Андреева Т.А., Мясоедов Н.Ф. Пептидная регуляция метаболических процессов при гиперхолестеринемических состояниях организма // *Известия РАН. Серия биологическая.* – 2015. – № 6. – С. 634–644.
5. Панченко В.М., Ершов А.А., Зимовченко Г.С., Исаев В.А., Лютова Л.В. Метаболический синдром и вторичная профилактика его осложнений // *Тромбоз, гемостаз и реология.* – 2008. – № 3. – С. 62–67.
6. Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A. Mechanisms for glyproline protection in hypercholesterolemia // *Pathophysiology.* – 2016. – V. 23. – № 1. – P. 27–33.
7. Mullur R., Liu Y.-Y., Brent G.A. Thyroid hormone regulation of metabolism // *Physiol. Rev.* – 2014. – V. 94. – P. 355–382.
8. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. – М.: «Авансес Солюшнз», 2012. – 160 с.
9. Ferrel J.E., Martin G.S. Tyrosine-specific protein phosphorylation is regulated by glycoprotein IIb-IIIa in platelets // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1989. – V. 86. – P. 2234–2238.
10. Kini R.M., Evans H.J. A novel approach to the design of potent bioactive peptides by incorporation of profile brackets: antiplatelet effects of Arg-Gly-Asp peptides // *FEBS Lett.* – 1995. – V. 375. – № 1–2. – P. 15–17.