

УДК 612.115.3: 599.323.4

ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ АРГИНИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ PRO-ARG-GLY И GLY-ARG-PRO НА СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ IN VITRO И IN VIVO

Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Сун Ю.

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

Впервые исследовано влияние регуляторных пептидов Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro на параметры гемостаза в условиях *in vitro* и при введении здоровым животным. В экспериментах *in vitro* во всем диапазоне исследуемых концентраций (от 10^{-5} до 1 мг/мл) у данных трипептидов выявлено наличие собственной антикоагулянтной активности. При этом они проявляли фибринолитическую активность неферментативного характера и снижали агрегацию тромбоцитов. В условиях *in vivo* ежедневное (1 раз в сутки) 5-кратное интраназальное введение Pro-Arg-Gly или Gly-Arg-Pro здоровым крысам в дозах 1 мг/кг массы тела приводило к достоверному снижению агрегации тромбоцитов. Также оба пептида вызывали повышение фибринолитической активности плазмы крови, усиливая активность тканевого активатора плазминогена. Увеличение антикоагулянтной активности крови животных установлено только после введения Pro-Arg-Gly. Сравнительный анализ противосвертывающих эффектов исследованных пептидов показал, что Pro-Arg-Gly обладает более выраженным антикоагулянтным, фибринолитическим и антитромбоцитарным действием.

Ключевые слова: пептиды, гемостаз, антикоагулянтная активность, фибринолиз, агрегация тромбоцитов

EVALUATION OF ARGININE-CONTAINING PEPTIDES PRO-ARG-GLY AND GLY-ARG-PRO EFFECTS ON THE HEMOSTATIC SYSTEM IN VITRO AND IN VIVO EXPERIMENTS

Obergan T.Yu., Grigorjeva M.E., Song Yu.

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

For the first time the effect of regulatory peptides Pro-Arg-Gly and Gly-Arg-Pro was studied on the parameters of hemostasis *in vitro* and administration of these peptides in healthy animals. It was established that *in vitro* these peptides at concentrations from 10^{-5} to 1 mg/mL has its own anticoagulant activity. In addition, these peptides showed non-enzymatic fibrinolytic activity and reduced platelet aggregation. *In vivo* daily (1 per day) 5-fold intranasal administration of Pro-Arg-Gly or Gly-Arg-Pro to healthy rats at doses of 1 mg/kg of body weight led to a significant decrease of platelet aggregation. Also both of the peptide caused an increase in fibrinolytic activity of blood plasma, due to increased activity of tissue plasminogen activator. The increase the anticoagulant activity of the blood of animals is established only after the introduction of Pro-Arg-Gly. A comparative analysis of the anticoagulant effects of the studied peptides showed that Pro-Arg-Gly has a more pronounced anticoagulant, fibrinolytic and antiplatelet activity.

Keywords: peptides, hemostasis, anticoagulant activity, fibrinolysis, platelet aggregation

Из многочисленных исследований известно, что многие регуляторные пептиды (РП) способны влиять на процессы гомеостаза, в том числе и свертывания крови [1, 6]. Среди РП известен ряд коротких глицин- и пролинсодержащих пептидов (глипролинов), являющихся фрагментами коллагена и эластина [2]. Было показано, что глипролины в условиях как *in vitro*, так и *in vivo* обладают антикоагулянтными свойствами, ускоряют фибринолиз, а также снижают адгезию и агрегацию тромбоцитов [6]. В настоящее время особое внимание уделяется изучению механизмов действия на гемостаз пептидов, имеющих в своем составе аминокислоту аргинин. По данным литературы известно, что аргинин усиливает антикоагулянтные свойства плазмы крови и препятствует процессам образования тромбов [10]. L-аргинин вырабатывает

в организме оксид азота NO, который принимает участие в осуществлении некоторых физиологических функций – снижении агрегации тромбоцитов, вазодилатации, регуляции тонуса гладких мышц [7]. Ранее было показано антитромбоцитарное и антикоагулянтно-фибринолитическое действие пептидов Pro-Gly-Arg, Pro-Gly-Pro-Arg, Arg-Pro-Gly и Gly-Pro-Arg в условиях экспериментального аллоксанового диабета и гипергликемии у животных [5]. Известно, что изменение аминокислотной последовательности в структуре пептидов может приводить к значительным изменениям их свойств [8]. В связи с этим, в настоящее время большой интерес продолжают вызывать исследования, посвященные проблемам изучения эффектов глипролинов на гемостаз и взаимосвязи механизмов действия РП с их структурными особенностями.

Целью работы являлось изучение влияния на параметры гемостаза аргининсодержащих пептидов Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro в условиях *in vitro* и при их многократном интраназальном введении здоровым животным.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали трипептиды Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro, синтезированные в лаборатории регуляторных пептидов Института молекулярной генетики РАН. Исследуемые пептиды растворяли в 0,85 % физиологическом растворе NaCl.

В условиях *in vitro* определяли антикоагулянтную активность исследуемых препаратов пептидов по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) общепринятым способом с использованием полуавтоматического анализатора АСКА-02 «Астра»; суммарную (СФА) и неферментативную (НФ) фибринолитическую активность препаратов определяли на пластинах нестабилизированного фибрина по методу Кудряшова и др. [4]. Антитромбоцитарное действие пептидов оценивали по изменению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в богатой тромбоцитами плазме крови по методу Борна с использованием в качестве индуктора раствор АДФ в конечной концентрации 2 мкМ [4]. При этом в образцы, содержащие 0,1 мл нормальной плазмы крыс, добавляли по 0,05 мл растворов пептидов в исследуемых концентрациях (от 10^{-5} до 1 мг/мл). Контролем служили образцы нормальной плазмы, к которой вместо исследуемых препаратов добавляли 0,89 % физиологический раствор NaCl.

Эксперименты *in vivo* были проведены на 30 белых крысах-самцах Wistar (250 ± 20 г). Животные содержались в стандартных условиях вивария (при искусственном освещении по 12 ч темного и светлого времени, принудительной вентиляции, температуре 20–23 °C и относительной влажности 60–70%) при свободном доступе к пище и воде. Содержание и использование животных осуществляли с соблюдением принципов биоэтики в соответствии с международными принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей.

Производили интраназальное ежедневное (1 раз в сутки) в течение 5 дней введение препаратов пептидов Pro-Arg-Gly (1 группа) и Gly-Arg-Pro (2 группа) в дозах 1 мг/кг массы тела животного в объеме 0,02 мл. Контрольным животным (3 группа) интраназально вводили по 0,02 мл 0,85 % физиологического раствора NaCl. Кровь на исследование биохимических параметров гемостаза брали через 1 ч после последнего введения пептидов из вены *jugularis* в количестве 1,5 мл с использованием в качестве консерванта 3,8% лимоннокислый натрий (9:1). Образцы крови центрифугировали при 1000g в течение 5 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы, в которой измеряли агрегацию тромбоцитов (АТ) по Борну. Повторное центрифугирование образцов осуществляли при 3000g в течение 15 мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами, в которой определяли антикоагулянтную активность по тесту АЧТВ, СФА и НФ на пластинах нестабилизированного фибрина, ферментативную фибринолитическую активность (ФФ) и активность тканевого активатора плазминогена (ААП) на пластинах стабилизированного фибрина [4].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

В первой серии экспериментов пептиды Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro были исследованы на наличие антикоагулянтных, фибринолитических и антиагрегационных свойств в условиях *in vitro*.

Как видно из табл. 1, оба пептида при добавлении к плазме крови при всех исследуемых концентрациях обладали заметной антикоагулянтной активностью, т.е. замедляли время образования фибринового сгустка. По тесту АЧТВ отмечено достоверное удлинение времени свертывания плазмы при добавлении к пробам и Gly-Arg-Pro (на 37 – 89 % по сравнению с контролем), и пептида Pro-Arg-Gly (на 44 – 98 % по сравнению с контролем).

Изучение влияния пептидов на фибринолитическую активность плазмы крови показало, что добавление пептида Pro-Arg-Gly приводило к достоверному повышению СФА на 53 – 122 % по сравнению с контролем во всем исследуемом диапазоне концентраций (табл. 1). Наряду с этим, при всех концентрациях от 10^{-5} до 1 мг/мл данный пептид обладал неферментативной фибринолитической активностью, которая возрастала на 69 – 103 % по сравнению с контролем.

При этих условиях добавление пептида Gly-Arg-Pro в концентрациях 1 мг/мл и 10^{-3} мг/мл к плазме крови приводило к достоверному повышению СФА на 60 и 50 % соответственно по сравнению с контролем за счет увеличения НФ на 43 – 70 %.

Исследование влияния Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro на агрегацию тромбоцитов показало уменьшение этого показателя на 10 и 14 % при концентрациях Pro-Arg-Gly 10^{-3} и 1 мг/мл соответственно, а для Gly-Arg-Pro – на 12 % по сравнению с контрольными образцами только при концентрации 1 мг/мл (табл. 1).

Во второй серии экспериментов исследовали действие Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro при их многократном интраназальном введении здоровым животным.

Как видно из табл. 2, введение Pro-Arg-Gly вызывало повышение антикоагулянтного фона плазмы крови животных группы 1, поскольку время образования сгустка по тесту АЧТВ достоверно удлинялось на 22 % относительно контрольных значений. При введении Gly-Arg-Pro достоверных отличий изменения времени свертывания по сравнению с контрольными значениями не выявлено.

Таблица 1

Показатели гемостаза при действии пептидов Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro в условиях *in vitro*

Показатели гемостаза	Препараты	Концентрации пептидов, мг/мл			
		10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻¹	1
АЧТВ, с	1. Pro-Arg-Gly	39.3 ± 0.446 **	37.0 ± 2.07**	32.3 ± 0.74*	31.7 ± 1.6
	2. Gly-Arg-Pro	39.3 ± 0.4 **	31.7 ± 3.69*	31.9 ± 1.02**	29.4 ± 2.66*
	3. Контроль	20.8 ± 0.92	18.6 ± 0.9	22.4 ± 1.01	21.5 ± 1.05
СФА, мм ²	1. Pro-Arg-Gly	50 ± 4.5*	26.25 ± 4.32	30.5 ± 3.05*	39.5 ± 3.9*
	2. Gly-Arg-Pro	36 ± 1.0**	31.75 ± 4.9	30 ± 1.2**	27.75 ± 3.1
	3. Контроль	22.5 ± 1.21	25 ± 1.12	20 ± 0.9	22.5 ± 0.95
НФ, мм ²	1. Pro-Arg-Gly	28.5 ± 1.72**	12 ± 1.2*	27 ± 1.14**	30 ± 1.4**
	2. Gly-Arg-Pro	23.75 ± 4.0*	23.75 ± 1.44	30.12 ± 0.14**	25 ± 1.1**
	3. Контроль	14 ± 1.1	20.5 ± 2.06	16 ± 0.8	17.5 ± 0.9
Агрегация тромбоцитов, %	1. Pro-Arg-Gly	18.3 ± 0.34	17.5 ± 0.35*	18.4 ± 0.42	18.6 ± 0.46*
	2. Gly-Arg-Pro	20.3 ± 0.34	19.6 ± 0.46	20.0 ± 0.46	18.2 ± 0.40*
	3. Контроль	19.0 ± 0.4	20.4 ± 0.5	19.8 ± 0.9	20.6 ± 0.38

Примечание: **p* < 0,05; ***p* < 0,01 – различия достоверны по сравнению с контролем (группа 3).

Таблица 2

Показатели гемостаза через 1 ч после 5-кратного интраназального введения пептидов Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro в дозах 1 мг/кг здоровым животным

Группы животных	АЧТВ, с	СФА, мм ²	НФ, мм ²	ФФ, мм ²	ААП, мм ²	АТ, %
Группа 1 Pro-Arg-Gly (<i>n</i> = 10)	32.3 ± 1.24**	122.4 ± 6.15**	87.5 ± 2.02	31.8 ± 6.19*	34.25 ± 6.01**	11.8 ± 0.78**
Группа 2 Gly-Arg-Pro (<i>n</i> = 10)	27.8 ± 1.02	100.4 ± 2.23	88.9 ± 2.75	11.7 ± 3.59	16.8 ± 2.79*	18.9 ± 0.92**
Группа 3 NaCl (контроль) (<i>n</i> = 10)	26.5 ± 0.43	97 ± 3.17	78.1 ± 4.83	17.2 ± 2.37	9.15 ± 1.11	24.4 ± 0.90

Примечание: **p* < 0,05; ***p* < 0,01 – различия достоверны по сравнению с контролем (группа 3), *n* – количество животных в каждой группе.

Наряду с этим, Pro-Arg-Gly вызывал изменение показателей фибринолитической системы плазмы крови экспериментальных животных: увеличение СФА на 26% по сравнению с контролем происходило главным образом за счет возрастания ферментативной фибринолитической активности плазмы (на 85% по сравнению с контролем), обусловленного значительным (в 3,74 раза относительно контрольных значений) усилением активности тканевого активатора плазминогена (табл. 2).

Введение пептида Gly-Arg-Pro приводило к достоверному повышению только ААП в 1,84 раза по сравнению с контролем. При этом достоверного изменения показателей СФА и ФФ не было выявлено.

Следует отметить, что введение и Pro-Arg-Gly, и Gly-Arg-Pro вызывало повышение неферментативной фибринолитической

активности плазмы крови животных, но эти отличия от контрольных значений носили недостоверный характер.

В то же самое время введение и Pro-Arg-Gly, и Gly-Arg-Pro приводило к усилению антитромбоцитарных свойств плазмы крови животных. Так, после многократного применения пептида Gly-Arg-Pro в крови животных группы 2 наблюдали достоверное снижение агрегации тромбоцитов на 27% по сравнению с контрольными значениями. Введение пептида Pro-Arg-Gly приводило к более выраженному снижению агрегации тромбоцитов (на 52% по сравнению с контролем).

Заключение

Делая сравнительный анализ влияния исследованных пептидов на показатели гемостаза, можно отметить, что пептиды Pro-

Arg-Gly и Gly-Arg-Pro при их многократном интраназальном введении здоровым животным влияли на состояние свертывающей и противосвертывающей систем крови в разной степени: Pro-Arg-Gly вызывал умеренное увеличение антикоагулянтной активности, повышал фибринолитический потенциал плазмы крови за счет усиления ФФ, которое было обусловлено эндотелий-зависимой реакцией выброса в кровоток тканевого активатора плазминогена и возрастанием ААП; пептид Gly-Arg-Pro усиливал только активность ААП. Вероятно, это действие исследуемых пептидов неспецифично, так как и другие глипролины ингибируют свертывание крови при интраназальном применении [6].

Помимо этого, применение обоих пептидов приводило к снижению агрегации тромбоцитов, и более сильный антитромбоцитарный эффект был у Pro-Arg-Gly. Снижение агрегации тромбоцитов под действием исследованных нами пептидов может быть обусловлено их взаимодействием с рецепторами тромбоцитов, в том числе гликопротеином П_b-III_a, с последующим блокированием этих рецепторов [3]. Также по данным Hasan et al. [9] пептиды, содержащие аминокислоту аргинин, ингибируют активность тромбина, что в итоге приводит к антикоагулянтному действию этих пептидов.

Таким образом, трипептиды Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro при исследовании *in vitro* и при введении в организм здоровых животных проявляли выраженные в разной степени антикоагулянтные, фибринолитические и антитромбоцитарные свойства. При этом пептид Pro-Arg-Gly обладал более сильным противосвертывающим действием. Следовательно, полученные нами результаты позволяют предположить, что применение ар-

гининсодержащих коротких регуляторных пептидов может быть перспективно при гиперкоагуляционных нарушениях в системе гемостаза, сопровождающих многочисленные патологии организма.

Список литературы

1. Ашмарин И.П., Каменский А.А., Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Самонина Г.Е. Глипролины как самостоятельные регуляторы и стабилизаторы других пептидов // Вопросы биол., мед. и фармацевт. химии. – 2002. – № 1. – С. 24-27.
2. Ашмарин И.П., Каразеева Е.П., Ляпина Л.А., Самонина Г.Е. Простейшие пролинсодержащие пептиды PG, GP, PGP и GPGG: регуляторная активность и возможные источники биосинтеза // Биохимия. – 1998. – Т.63. – № 2. – С. 134-141.
3. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии / Б.И.Кузник. Чита: Экспресс-издательство, 2010. – 832 с.
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 Соллошнз, 2012. – 160 с.
5. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Андреева Л.А. Современная концепция регуляторной роли пептидов глипролинового ряда в коррекции функции системы гемостаза при развитии сахарного диабета // Известия РАН. Сер. биол. – 2013. – № 4. – С. 453-462.
6. Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Оберган Т.Ю., Самонина Г.Е., Ашмарин И.П., Мясоедов Н.Ф. Сравнение противосвертывающих эффектов регуляторных пролинсодержащих пептидов. Специфичность действия глипролинов, Семакса и Селанка, возможности их практического применения // Известия РАН. Сер.биол. – 2006. – № 2. – С. 193-203.
7. Freedman J.E., Loscalzo J. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders // J.Thromb. Haemost. – 2003. – V. 1. – P. 1183-1188.
8. Golubeva M., Grigorjeva M. Influence of arginine-containing peptides on the haemostasis system // Arginine amino acid / Ed.: N.L.Jacobs. – New York: Nova Science Publishers, Inc., 2011. – P.229-235.
9. Hasan A.A., Warnock M., Nieman M., Srikanth S., Mahdi F., Krishnan R., Tulinsky A., Schmaier A.H. Mechanisms of Arg-Pro-Gly-Phe inhibition of thrombin // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2003. – V. 285 (1). – P. 183-193.
10. McConell G.K. Effects of L-arginine supplementation on exercise metabolism // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. – 2007. – V. 10, № 1. – P. 46-51.