

УДК 612.115.3

ВЛИЯНИЕ АРГИНИН-СОДЕРЖАЩИХ ОЛИГОПЕПТИДОВ НА ПЕРВИЧНЫЙ И ПЛАЗМЕННЫЙ ГЕМОСТАЗ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ПРИМЕНЕНИИ ЗДОРОВЫМ ЖИВОТНЫМ

¹Ляпина Л.А., ²Мясоедов Н.Ф., ²Андреева Л.А., ¹Григорьева М.Е.,
¹Оберган Т.Ю., ¹Шубина Т.А., ¹Рогозинская Э.Я.

¹ФГБОУ «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
Москва, e-mail: lyapinal@mail.ru;

²ФГБУН «Институт молекулярной генетики» РАН, Москва

Исследовано влияние аргинин-содержащих регуляторных пептидов Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro (RERP-GP) и Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) на процессы сосудисто-тромбоцитарного и плазменного гемостаза при их многократном (в течение 7 суток через каждые 24 часа) пероральном применении. Установлено, что через 24 часа после последнего 7-го введения пептидов агрегация тромбоцитов или имела тенденцию к снижению (RERP-GP), или достоверно снижалась на 18% (RPGP). При этом параметры плазменного гемостаза претерпевали следующие изменения: достоверно повышалась фибринолитическая активность как в отсутствие ингибиторов ферментативного фибринолиза по данным времени лизиса эуглобулинового сгустка, так и в их присутствии при использовании фибриновых пластин. Отмечено значительное повышение неферментативной фибринолитической активности плазмы, а также активности тканевого активатора плазминогена (в присутствии плазменных ингибиторов ферментативного фибринолиза), особенно после воздействия RPGP. Антикоагулянтная активность (по тестам активированного частичного тромбопластинового времени и тромбинового времени) не снижалась по сравнению с контролем, а имела тенденцию к повышению в случае многократного применения обоих пептидов. Отмечено, что пероральное применение обоих пептидов способствует появлению антифибринстабилизирующей активности в кровотоке. При этом концентрация фибриногена плазмы крыс не изменялась при применении RPGP и несколько повышалась при использовании RERP-GP, что требует проведения дополнительных исследований.

Ключевые слова: аргинин, регуляторные пептиды, фибринолиз, фибриноген, кровь, гемостаз, агрегация тромбоцитов

INFLUENCE ARGININEMIA OLIGOPEPTIDES IN THE PRIMARY AND PLASMA HEMOSTASIS WHEN ADMINISTERED ORALLY TO HEALTHY ANIMALS

¹Lyapina L.A., ²Myasoedov N.F., ²Andreeva L.A., ¹Grigoreva M.E.,
¹Obergan T.Yu., ¹Shubina T.A., ¹Rogozinskaya E.Ya.

¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: lyapinal@mail.ru;

²Institute of molecular genetics RAS, Moscow

The influence arginine-containing regulatory peptides Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro (RERP-GP) and Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) on the processes of vascular-platelet and plasma hemostasis with their multiple (within 7 days every 24 hours) oral administration. It was found that platelet aggregation either tended to decrease (RERP-GP), or significantly decreased by 18% (RPGP) 24 hours after the last 7-th administration of peptides. At the same time, the parameters of plasma hemostasis underwent the following changes: fibrinolytic activity was significantly increased both in the absence of enzymatic fibrinolysis inhibitors according to the time of the euglobulin clot lysis and in their presence when using fibrin plates. There was a significant increase in the non-enzymatic fibrinolytic activity of plasma, as well as the activity of tissue plasminogen activator (in the presence of plasma inhibitors of enzymatic fibrinolysis), especially after exposure to RPGP. Anticoagulant activity (according to tests of activated partial thromboplastin time and thrombin time) did not decrease compared to the control, but tended to increase in the case of repeated use of both peptides. Noted that oral administration of both peptides contributes to the emergence of antifibrin stabilizing activity in the bloodstream. The fibrinogen concentration of the plasma of the rats was not changed when applying RPGP and somewhat increased when using RERP-GP that requires additional research.

Keywords: arginine, regulatory peptides, fibrinolysis, fibrinogen, blood, hemostasis, platelet aggregation

Известно, что регуляторные пептиды глипролинового ряда обладают антикоагулянтной и фибринолитической активностью неферментативной природы [1, 2]. При внутривенном и интраназальном применении пептидов Pro-Gly-Pro, Pro-Gly, Gly-Pro в крови обнаруживаются антикоагулянтные эффекты и повышается фибринолитическая активность ферментативной и неферментативной природы благодаря присутствию этим

пептидам указанным свойствам. Их антикоагулянтная активность обусловлена ингибированием активности тромбина, а фибринолитическая – способностью вызывать эндотелий-зависимую реакцию, вследствие чего в кровоток выделяются факторы, способствующие активации противосвертывающих свойств крови [3]. Из большого числа биологически активных веществ, секретруемых эндотелием, оксид азота регулирует

активность других медиаторов: стимулирует продукцию эндотелием простаглицина, который ингибирует адгезию тромбоцитов к эндотелию и их агрегацию [4, 5], повышает тромборезистентность сосудов [6], блокируя стимулируемую цитокинами экспрессию адгезивных молекул эндотелия (СAM-1, Е-селектин, МСР) и экспрессию фактора, активирующего тромбоциты [7, 8]. Активация тромбоцитов приводит не только к развитию острого артериального тромбоза [9], но и способствует возникновению хронических заболеваний, таких как атеросклероз, метаболический синдром [10]. Установлено также, что сосудистый эндотелий выделяет в кровоток тканевый активатор плазминогена, приводящий к развитию фибринолитического процесса, ряд гликозаминогликанов, в том числе антикоагулянт гепарин и другие вазодилататоры [11].

Регуляторные пептиды глипролинового ряда, содержащие аргинин, должны обладать более значительной антитромбоцитарной активностью, нежели глипролины, не включающие эту аминокислоту в свою структуру, поскольку аргинин способствует значительному выбросу из эндотелия сосудов антитромботических компонентов [12]. Кроме того, не исследовано действие пептидов глипролинового ряда, включающих аргинин, на систему гемостаза при их пероральном применении здоровым животным.

Цель исследования заключалась в изучении влияния двух аргинин-содержащих пептидов глипролинового ряда – Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro (RERPGP) и Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) на состояние первичного (сосудисто-тромбоцитарного) и плазменного (коагуляционного) гемостаза при их многократном пероральном введении здоровым животным.

Материалы и методы исследования

В работе были использованы препараты пептидов глипролинового ряда, содержащие аргинин, – RERPGP и RPGP, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН.

В качестве подопытных животных использовались лабораторные белые крысы-самцы линии Вистар массой тела 250–280 г, которые относились к старшим возрастным группам. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейским Научным Фондом и Хельсинкской Декларацией о гуманном отношении к животным. Всего в экспериментах было использовано 25 животных. Животные были разделены на 3 группы: первой группе (контроль, $n = 9$) вводили физиологический раствор (0,85 %-ный раствор NaCl), второй группе (опыт 1, $n = 8$) – пептид RERPGP, третьей группе (опыт 2, $n = 8$) – пептид RPGP. Пептиды впервые вводились пероральным способом в дозах 100 мкг/кг массы тела крыс в течение 7 суток через каждые 24 часа.

Исследуемые пептиды, предварительно разведенные в 0,85 %-ном физиологическом растворе NaCl, вводили каждому животному в объеме 0,2 мл. Взятие крови осуществляли через яремную вену (*vein jugularis*) через 24 часа после последнего 7-го введения препаратов. Кровь брали с использованием в качестве консерванта 3,8 %-ного раствора цитрата натрия в соотношении кровь: консервант, как 9: 1. Образцы крови центрифугировали в двух режимах: сначала при 1000 об/мин в течение 5 мин (для получения богатой тромбоцитами плазмы) и затем при 3000 об/мин в течение 10–12 мин (для получения бедной тромбоцитами плазмы). В богатой тромбоцитами плазме измеряли агрегацию тромбоцитов. В бедной тромбоцитами плазме крови определяли следующие биохимические параметры: для характеристики антикоагулянтной активности плазмы – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и тромбиновое время (ТВ); для характеристики системы фибринолиза – суммарную фибринолитическую активность (СФА), фибриндеполимеризационную или неферментативную фибринолитическую (НФ) активность, параметры ферментативного фибринолиза – активность тканевого активатора плазминогена (ТАП) и время лизиса эуглобулинового сгустка (ВЛЭС). Производили также измерение активности фактора XIIIa (фибринстабилизирующего фактора) и концентрации фибриногена [13].

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке по непараметрическому критерию Манна – Уитни (STATISTICA 8.0).

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении первичного гемостаза через 24 часа после последнего седьмого перорального введения аргинин-содержащих регуляторных пептидов здоровым животным установлено снижение агрегации тромбоцитов по сравнению с контролем на 18 %, что выявлено при действии пептида RPGP и на 9 %, что наблюдалось при действии RERPGP (таблица).

Представленные результаты свидетельствовали не только об антитромбоцитарной активности аргинин-содержащих пептидов RERPGP и особенно RPGP в кровотоке, но и об отсутствии появления даже малейших признаков тромбоцитопении в ответ на вводимые пептиды глипролинового ряда, что имеет немаловажное значение для организма. Эти результаты указывают на безопасность и перспективность дальнейшего использования аргинин-содержащих пептидов. Известно, что широко применяемый в клинике антикоагулянтный препарат высокомолекулярного гепарина может вызвать в крови появление тромбоцитопении [14]. В наших же исследованиях, напротив, более короткий аргинин-содержащий пептид глипролинового ряда RPGP достоверно препятствует процессам склеивания кровяных телец, что считается начальной стадией формирова-

ния тромба. Как установлено [7, 8], возникновение процессов образования тромбов осуществляется путем соединения друг с другом тромбоцитов, которые прикрепляются к стенке кровеносного сосуда (адгезия), куда затем вовлекаются другие компоненты биологической жидкости. В итоге образуется большой тромб, закрывающий поступление крови в сосуд [15]. Нами впервые показано, что перорально вводимые аргинин-содержащие пептиды блокируют вышеописанный процесс начальных стадий образования фибриновых сгустков.

По результатам наших исследований оба аргинин-содержащих пептида предупреждают также развитие коагуляционного или плазменного гемостаза. Об этом свидетельствуют следующие данные: через 24 часа после семикратного перорального введения пептидов СФА, ее НФ достоверно повышались на 43–80%, причем наибольший эффект наблюдался при действии более короткого пептида RPGP (таблица). Эти активности проявлялись даже в присутствии в плазме крови крыс ингибиторов ферментативного фибринолиза. На подобное возрастание фибринолитического процесса указывают и данные ВЛЭС, а именно, наступление лизиса фибринового сгустка по сравнению с контролем ускорено в опытных пробах, но уже в отсутствие ингибиторов ферментативного фибринолиза после введения RERPGP (на 21%) и RPGP (на 33%). Что касается ФФ и активности ТАП в присутствии ингибиторов ферментативного фибринолиза, то показано, что пептид RPGP оказывает значительный ферментативный фибринолитический эффект, повышая ТАП и ФФ на 50 и 53% соответственно, в то время как пептид RERPGP усиливает ТАП на 23%, при этом слабо влияя на ФФ (таблица).

Представляют интерес данные, полученные по заключительной стадии процесса образования фибрина. Нами показано, что оба пептида снижают активность фактора XIII а (фибринстабилизирующего фактора). Кроме того, выявлено или уменьшение концентрации фибриногена, как это наблюдается при применении пептида RPGP, или же достоверное ее повышение после действия пептида RERPGP. Вероятно, наблюдаемое повышение уровня фибриногена может быть объяснено возрастными изменениями крыс. Используемые в экспериментах животные находились в нормальном физиологическом состоянии, но имели исходный уровень фибриногена, соответствующий верхней границе нормы (свыше 4 г/л). Результаты этих экспериментов

показывают, что при применении пептида RERPGP следует учитывать, что он может вызвать некоторое, хотя и недостоверное, повышение концентрации фибриногена в старших возрастных группах. Однако это требует в дальнейшем детального изучения. Тем не менее указанные пептиды глипролинового ряда, содержащие аргинин, способны предотвращать процессы повышенной свертываемости крови за счет своего фибринолитического эффекта ферментативной и неферментативной природы. Они не увеличивают агрегацию тромбоцитов и не снижают антикоагулянтную активность плазмы крови, что установлено по тестам АЧТВ и ТВ.

Таким образом, наши эксперименты показали эффективность действия аргинин-содержащих пептидов глипролинового ряда на процессы первичного и плазменного гемостаза при их многократном пероральном введении животным (крысам). Следует отметить способность указанных пептидов предупреждать начальные стадии процесса тромбообразования за счет присущих им антитромбоцитарных, антикоагулянтных и фибриндеполимеризационных свойств. Они также вызывают в кровотоке активацию ферментативного фибринолитического процесса путем выброса из эндотелия сосудов тканевого активатора плазминогена, вследствие чего наблюдается повышенный уровень всех видов фибринолитической активности крови.

Ранее было установлено, что регуляторные пептиды глипролинового ряда обладают антикоагулянтной и фибринолитической активностью неферментативной природы не только в условиях *in vitro*, но и при их внутривенном и интраназальном применении [2, 3]. Мы показали, что исследуемые нами пептиды глипролинового ряда с добавлением аргинина в структуру их молекул оказывают в кровотоке подобные эффекты и при пероральном многократном их введении в организм.

В последние годы регуляторные пептиды глипролинового ряда, такие как Семакс, Селанк, применяются в качестве лекарственных препаратов. Описано участие пептидов глипролинового ряда в нормальном функционировании не только системы гемостаза, но и других систем организма (пищеварительной, нервной) [2, 3]. В то же время регуляторные пептиды глипролинового ряда с добавлением тех или иных аминокислот могут использоваться при разработке терапевтических препаратов или включаться в системы для доставки активных веществ в клетки-мишени организма.

Исследование агрегации тромбоцитов; фибринолиза – по тестам определения суммарной фибринолитической активности (СФА), неферментативного фибринолиза (НФ), ферментативного фибринолиза (ФФ), по времени лизиса эуглобулинового сгустка (ВЛЭС) и активности тканевого активатора плазминогена (ТАП); антикоагулянтной активности по тестам активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбинового времени (ТВ); концентрации фибриногена (Ф) и активности фактора XIIIа в плазме крови крыс через 24 часа после последнего 7-го перорального введения здоровым крысам пептидов RERPGP и RPGP в ежедневной дозе 100 мкг/200 г массы тела (M ± m)

Параметры гемостаза	Группа 1 – контроль (введен 0,85%-ный NaCl)	Группа 2 – опыт 1 (введен RERPGP)	Группа 3 – опыт 2 (введен RPGP)
Агрегация тромбоцитов, %	100 ± 6,8	91,4 ± 7,4	82,0 ± 2,8**
СФА, мм ² (%)	30,0 ± 0,7 (100%)	42,3 ± 1,3** (143%)	51,5 ± 1,3** (174%)
НФ, мм ² (%)	18,9 ± 0,4 (100%)	25,5 ± 1,0** (157%)	34,3 ± 0,9** (180%)
ФФ, мм ² (%)	11,2 ± 1,1 (100%)	13,8 ± 0,9* (123%)	17 ± 2,0** (153%)
ВЛЭС, мин (%)	52,3 ± 9,7 (100%)	41,7 ± 16,6* (79%)	35,9 ± 1,5** (67%)
ТАП, мм ² (%)	51,0 ± 13,7 (100%)	53,0 ± 14,1 (104%)	97,0 ± 27,7** (150%)
АЧТВ. С (%)	30,4 ± 1,6 (100%)	31,7 ± 1,5 (105,4%)	31,0 ± 0,9 (106%)
ТВ, с (%)	20,0 ± 2,3 (100%)	18,0 ± 1,1 (90%)	20,2 ± 0,5 (101%)
Концентрация фибриногена, г/л (%)	4,3 ± 0,1 (100%)	5,4 ± 0,2 (126%)	3,7 ± 0,3 (86%)
Активность фактора XIII а, ед. (%)	62,5 ± 1,42 (100%)	57,5 ± 1,13* (92%)	50 ± 2,42** (80%)

Примечание: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля. Обозначения: ** – p < 0,01, * – p < 0,05.

Делая общее заключение, необходимо отметить, что атравматичный (пероральный) способ применения исследуемых пептидов позволяет считать их перспективными лекарственными средствами с положительными для организма анти-тромбоцитарными, антикоагулянтными, фибриндеполимеризационными, антифибринстабилизирующими и ферментативными фибринолитическими свойствами.

Выводы

1. Впервые показано, что перорально вводимые аргинин-содержащие регуляторные пептиды Arg-Glu-Arg-Pro-Gly-Pro (RERPGP) и Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) оказывают ингибирующее влияние на процессы сосудисто-тромбоцитарного и плазменного гемостаза при их многократном (в течение 7 суток через каждые 24 часа) применении.
2. Установлены антитромбоцитарные эффекты исследуемых пептидов, поскольку после их введения агрегация тромбоцитов или имела тенденцию к снижению (RERPGP), или достоверно снижалась на 18% (RPGP). Полученные данные свидетель-

ствуют об отсутствии возникновения в ответ на применяемые препараты пептидов такого отрицательного для организма явления, как тромбоцитопения.

3. Выявлено, что после многократного перорального введения пептидов здоровым крысам повышался фибринолитический потенциал крови: возрастали фибринолитическая активность ферментативной и неферментативной природы, а также активность тканевого активатора плазминогена.

4. Обнаружено, что по тестам активированного частичного тромбопластинового и тромбинового времени исследуемые аргинин-содержащие пептиды повышают антикоагулянтные свойства крови.

5. Исследование заключительной стадии свертывания крови у здоровых крыс после перорального применения аргинин-содержащих глипролиновых пептидов указывает также на их ингибирующий эффект в отношении фибринстабилизирующего фактора. Концентрация фибриногена снижалась при применении более короткого пептида RPGP, однако она недостовер-

но повышалась лишь при использовании RERPGP, что требует проведения дополнительных исследований.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта КИАС-РФФИ № 18-04-00260.

Список литературы

1. Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Действие пептида PRO-GLY-PRO на параметры гемостаза и жировой обмен в условиях гиперхолестеринемии у крыс // Доклады АН. 2013. Т. 453. № 3. С. 346–349.
2. Ашмарин И.П. Патологическая физиология и биохимия: учебное пособие для вузов. М.: Экзамен. 2005. 478 с.
3. Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A. Mechanism for glyproline protection in hypercholesterolemia. *Pathophysiology*. 2016. vol. 23. no. 1. P. 27–33.
4. Heiss C., Rodriguez-Mateos A., Kelm M. Central role of eNOS in the maintenance of endothelial homeostasis. *Antioxidants & redox signaling*. 2015. vol. 22. no. 14. P. 1230–1242.
5. Vieceli Dalla Sega F., Aquila G., Fortini F., Vaccarezza M., Secchiero P., Rizzo P., Campo G. Context-dependent function of ROS in the vascular endothelium: The role of the Notch pathway In Development-A New Paradigm for Understanding Vascular Disease. *Biofactors*. 2017. Apr. 17. DOI: 10.1002.
6. Trashkov A.P., Kovalenko A.L., Vasil'ev A.G., Valeev V.V. L-arginine as dietary supplement for improving microvascular function. *Pathophysiological and clinical aspects of using L-arginine in cardiology and angiology. Angiol. Sosud. Khir.* 2016. vol. 22. no. 3. P. 9–15.
7. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс издательство. 2010. 832 с.
8. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С. Эпигенетическое действие регуляторных пептидов на цитокиновый профиль и систему гемостаза // Вестник гематологии. 2013. Т. 9. № 2. С. 29–33.
9. Бокарев И.Н., Попова Л.В. Современные представления о тромбофилиях // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. 2014. № 13. С. 5–12.
10. Xiao C., Hsieh J., Adeli K., Lewis G.F. Gut-liver interaction in triglyceride-rich lipoprotein metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2011. vol. 301. P. E429–E446.
11. Kramkowski K., Leszczynska A., Buczko W. Pharmacological modulation of fibrinolytic response – in vivo and in vitro studies. *Pharmacol Rep.* 2015. vol. 67. no. 4. P. 695–703. DOI: 10.1016/j.pharep.2015.05.022.
12. Freedman J.E., Loscalzo J. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *J. Thromb. Haemost.* 2003. no. 1. P. 1183–1188.
13. 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.
14. Casu B., Naggi A., Torri G. Re-visiting the structure of heparin. *Carbohydr Res.* 2015. vol. 403. P. 460.
15. Spezia L., Tormene D., Pesavento R., Salmaso P., Simioni P., Prandoni P. Thrombophilia as a predictor of persistent residual vein thrombosis. *Haematologica*. 2008. vol. 93. P. 479–480.