

ФИЗИОЛОГИЯ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

УДК 612.115.3-577.35

ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ ЛЕЙЦИНСОДЕРЖАЩИХ ГЛИПРОЛИНОВ ПРИ ГИПЕРКОАГУЛЯЦИИ

© 2023 г. М. Е. Григорьева*, @, Т. Ю. Оберган*, Л. А. Ляпина*

*ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, лаборатория защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова, Ленинские горы, дом 1/12, Москва, 119234 Россия

@E-mail: mgrigorjeva@mail.ru

Поступила в редакцию 03.06.2022 г.

После доработки 01.07.2022 г.

Принята к публикации 11.06.2023 г.

Исследовали эффекты двух лейцинсодержащих пептидов глипролинового ряда Leu-Pro-Gly-Pro и Pro-Gly-Pro-Leu, включающих лейцин с N- и C-концов молекул, на показатели сосудисто-тромбоцитарного (первичного) и плазменного гемостаза. Пептиды применяли интраназально в течение 5 сут в ежедневной дозе 500 мкг/кг массы тела в условиях гиперкоагуляции, вызванной внутривенным введением тканевого тромбопластина крысам, у которых заранее индуцировали развитие метаболического синдрома высококалорийной диеты. Оба пептида способствовали повышению всех видов фибринолиза (суммарного, ферментативного и неферментативного), антикоагулянтной активности и снижению агрегации тромбоцитов в плазме крови крыс по сравнению с контролем. Максимум противосвертывающего действия установлен у пептида, содержащего лейцин с C-конца.

Ключевые слова: лейцинсодержащие пептиды, метаболический синдром, система гемостаза, гиперкоагуляция, противосвертывающая активность

DOI: 10.31857/S1026347022600509, **EDN:** LIYUG

В настоящее время известно, что такие регуляторные пептиды глипролинового ряда как Pro-Gly-Pro-Leu и Leu-Pro-Gly-Pro при интраназальном и внутривенном применении здоровым животным оказывают антикоагулянтно-фибринолитическое действие *in vitro* и *in vivo* (Оберган, Рочев, 2010; Шабалина и др., 2015). Выявлено также, что эти пептиды проявляют гипополипидемическую активность, что может быть обусловлено наличием аминокислоты лейцин в составе пептидов (Myasoedov *et al.*, 2016). Эта аминокислота входит в состав всех природных белков, участвует в их синтезе в мышцах и печени, служит источником энергии и ускоряет утилизацию жиров в митохондриях (Wilkinson *et al.*, 2017; López *et al.*, 2018). Установлено, что конформационные изменения остатков L-лейцина в молекуле пептидов, содержащих глицин и лейцин, влияют на их активность и зависят от места их расположения (Ichimura, Kasama, 2012; Okabayashi *et al.*, 2016).

Пептидные соединения способны регулировать компенсаторно-приспособительные реакции организма, одновременно предотвращая нарушения в системе гемостаза и восстанавливая метаболизм в органах и тканях, тогда как обычно при развитии атеросклеротических изменений в сосудах, метаболического синдрома, дислипиде-

миях рекомендуется применять антилипемические средства совместно с антитромботическими (Баркаган, Костюченко, 2006; Watson *et al.*, 2010; Kong *et al.*, 2011). Исходя из вышесказанного становится понятно, что проведение исследований, посвященных поиску средств фармакологической коррекции гемостаза и нарушений метаболизма, до сих пор не потеряло своей актуальности.

Цель настоящей работы заключалась в изучении действия новых пептидов, содержащих аминокислоту лейцин с разных концов молекулы глипролинов (Pro-Gly-Pro-Leu и Leu-Pro-Gly-Pro) при их интраназальном многократном применении на функциональное состояние свертывающей и противосвертывающей систем и выявлении их антитромботических эффектов в условиях гиперкоагуляции, вызванной внутривенным введением тканевого тромбопластина крысам, у которых заранее индуцировали развитие метаболического синдрома высококалорийной диеты.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы лейцин-содержащие пептиды — Leu-Pro-Gly-Pro (LPGP) и Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL), синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН.

Эксперименты проведены на 58 лабораторных белых крысах-самцах Wistar массой тела 250–280 г. в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейским научным фондом, Базельской декларацией, Европейской конвенцией по охране позвоночных животных (Стокгольм, 15.06.2006). Животных содержали в стандартных условиях вивария (искусственное освещение день/ночь — 12 ч/12 ч, принудительная вентиляция, температура 22–26 град, относительная влажность 50–70%).

Проведено 2 серии экспериментов. Первая серия включала создание эффективной модели гиперкоагуляции тремя методами: 1) введение тканевого тромбопластина (ТТ) из мозга крысы в дозе 0.6 мл/200 г (1%-й раствор); 2) индуцирование метаболического синдрома (МС) содержанием крыс на высококалорийной диете (ВКД), энергетическая ценность которой составляла не менее 3500 ккал/кг, в течение 8 нед. с использованием в качестве питья 10%-ный раствор глюкозы (Оберган, Григорьева, 2016); 3) сочетание длительного содержания крыс на ВКД (в течение 8 нед.), приводящего к развитию МС, с последующей однократной инъекцией ТТ. Оценивали в сравнительном аспекте вызванную у крыс гиперкоагуляцию каждым из методов. В результате в экспериментах использовали модель гиперкоагуляции, которая включала применение ТТ и ВКД.

Во второй серии экспериментов животные, которые предварительно в течение 2 мес. содержались на ВКД, были разделены на три группы (по 10 особей в каждой группе): первой группе (контроль) вводили 0.85%-ый раствор NaCl (физиологический раствор), второй группе (опыт 1) — PGPL и третьей группе (опыт2) — LPGP в течение 5 сут ежедневно через каждые 24 ч. Препараты применяли интраназально в ежедневной дозе 500 мкг/кг в объеме 0.2 мл/200 г массы тела крыс. В течение всего эксперимента животные этих групп продолжали получать ВКД.

Дополнительно использовали интактных здоровых крыс (норма), которые содержались на обычном лабораторном рационе (Лабораторкорм, 2800 ккал/кг) и не получали никаких препаратов.

Через 18 ч после последнего 5-го введения пептидов или физиологического раствора внутривенно каждой крысе вводили тканевой тромбопластин (по 0.6 мл/200 г) и через 6–8 мин после этого у них брали кровь через яремную вену (v. jugularis) с использованием в качестве консерванта 3.8%-го раствора цитрата натрия в соотношении 9 : 1. Кровь центрифугировали в двух режимах: при 1000 об./мин в течение 5 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы и при 2000 об./мин в течение 15 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы. В богатой тромбоцитами плазме определяли агрегацию тромбоцитов с использованием в

качестве индуктора агрегации АДФ в концентрации 10^{-6} М. Измерения проводили на агрегометре марки “Биола” (Россия). В бедной тромбоцитами плазме проводили измерения следующих биохимических показателей плазменного гемостаза: антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) на анализаторе свертывания крови марки “Астра 2-01” (Россия); фибринолиз по тестам: суммарной фибринолитической активности (СФА), неферментативного фибринолиза (НФ), ферментативного фибринолиза (ФФ) (Баркаган, Момот, 2008; Ляпина и др., 2012).

В работе использовали прикладной пакет статистических программ STATISTICA 8.0 (StatSoft Inc., США). Полученные данные выражали в виде $M \pm m$ (среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего). Статистическую обработку полученных результатов производили методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с пост-тестом Ньюмена-Кейлса. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведения сравнительной оценки развития гиперкоагуляции каждым из используемых методов, было показано, что через 10 мин после внутривенного однократного введения 1%-ого раствора ТТ в дозе 0.6 мл (модель 1) усиливается свертываемость крови, определяемая по тесту АЧТВ на 26%, снижаются СФА и НФ на 25 и 20% соответственно, что сопровождается резким повышением агрегации тромбоцитов на 45% по сравнению с соответствующими показателями в группе норма.

При использовании модели 2 (содержание крыс на ВКД в течение 8 нед.) было установлено, что в результате развития у крыс МС повышалась агрегация тромбоцитов под действием АДФ на 55%, снижались все виды фибринолиза (СФА — на 30%, НФ — на 44% и ФФ — на 22%) и АЧТВ — на 21% по сравнению с теми же показателями у интактных животных.

Было также показано, что внутривенное однократное введение ТТ на фоне развившегося МС (модель 3) крысам способствовало значительному возрастанию агрегации тромбоцитов на 75%, повышению свертываемости крови по тесту АЧТВ на 31% и подавлению фибринолитической активности (СФА — на 43%, НФ — на 53%, ФФ — на 26%) по сравнению с параметрами у нормальных крыс. Эти данные свидетельствовали о развитии наиболее выраженной гиперкоагуляции на модели крыс при длительном их содержании на ВКД с последующим однократным внутривенным введением ТТ (табл. 1).

Таблица 1. Суммарная фибринолитическая активность (СФА), неферментативный фибринолиз (НФ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и агрегация тромбоцитов в плазме крыс на фоне гиперкоагуляции, вызванной введением тканевого тромбопластина (ТТ), содержанием крыс на ВКД в течение 2-х мес. и совместным воздействием ТТ и ВКД у крыс ($M \pm m$)

Показатели	Интактные крысы (норма)	Введение ТТ (модель 1)	ВКД (модель 2)	ТТ + ВКД (модель 3)
СФА, мм ² (%)	34.9 ± 1.0 (100%)	26.3 ± 0.8 ^{##} (75%)	24.4 ± 2.7 ^{##} (70%)	19.8 ± 1.4 ^{##} (57%)
НФ, мм ² (%)	22.4 ± 0.5 (100%)	18.0 ± 0.1 ^{##} (80%)	14.6 ± 1.7 ^{##} (56%)	10.6 ± 1.7 ^{##} (47%)
ФФ, мм ² (%)	12.5 ± 1.2 (100%)	9.2 ± 0.7 ^{##} (74%)	9.8 ± 1.5 ^{##} (78%)	9.2 ± 0.7 ^{##} (74%)
АЧТВ, с (%)	31.5 ± 1.9 (100%)	23.3 ± 1.4 ^{##} (74%)	24.8 ± 1.1 [#] (79%)	21.7 ± 1.4 ^{##} (69%)
Агрегация тромбоцитов, индекс (%)	4.9 ± 1.1 (100%)	7.1 ± 1.7 ^{##} (145%)	7.6 ± 1.7 ^{##} (155%)	8.6 ± 1.4 ^{##} (175%)

Примечание. ^{##} $p < 0.01$, [#] $p < 0.05$ — по сравнению с интактными крысами (группа “Норма”).

Таблица 2. Суммарная фибринолитическая активность (СФА), неферментативный фибринолиз (НФ), ферментативный фибринолиз (ФФ), активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) и агрегация тромбоцитов в плазме крыс после действия пептидов на фоне гиперкоагуляции, вызванной введением тромбопластина (ТТ) и развитием метаболического синдрома (МС) у крыс ($M \pm m$)

Показатели	МС + 0.85%-ый NaCl + ТТ (контроль)	МС + PGPL + ТТ (опыт 1)	МС + LPGP + ТТ (опыт 2)	Интактные крысы (норма)
СФА, мм ²	19.8 ± 1.4 ^{##} (100%)	34.4 ± 2.7 ^{**} (174%)	31.7 ± 2.7 ^{**} (160%)	36.7 ± 1.1
НФ, мм ²	10.6 ± 1.7 ^{##} (100%)	20.6 ± 1.7 ^{**} (194%)	18.5 ± 4.6 ^{**} (174%)	18.9 ± 1.4
ФФ, мм ²	9.2 ± 0.7 ^{##} (100%)	13.4 ± 1.5 ^{**} (146%)	12.5 ± 1.1 [*] (138%)	17.8 ± 1.2
АЧТВ, с	26.7 ± 1.4 [#] (100%)	42.7 ± 2.1 ^{**} (160%)	36.9 ± 2.8 [*] (138%)	37.8 ± 2.0
Агрегация тромбоцитов, индекс (%)	5.7 ± 1.4 ^{##} (100%)	2.6 ± 0.8 ^{**} (45%)	2.3 ± 0.7 ^{**} (41%)	3.2 ± 0.3 (56%)

Примечание. ^{**} $p < 0.01$, ^{*} $p < 0.05$ — по сравнению с группой контроль; ^{##} $p < 0.01$, [#] $p < 0.05$ — по сравнению с группой норма.

На основании результатов проведения сравнительной оценки гиперкоагуляционных сдвигов, возникающих в крови крыс при использовании каждого из трех используемых методов, для дальнейших экспериментов была выбрана модель 3, включающая развитие МС с последующим введением животным ТТ.

Во второй серии экспериментов при оценке параметров гемостаза у контрольных животных (МС + 0.85%-ый NaCl + ТТ) была подтверждена значительная гиперкоагуляция, проявляющаяся резким снижением фибринолиза на 44–48%, АЧТВ на 30% и повышением агрегации тромбо-

цитов на 78% по сравнению с показателями у интактных крыс (табл. 2).

Как видно из табл. 2 в выбранных условиях эксперимента (МС + пептид + ТТ) у опытных крыс многократное применение лейцин-содержащих пептидов при продолжении содержания крыс на ВКД приводило к достоверному подавлению агрегации тромбоцитов на 55–59%, повышению антикоагулянтной активности по тесту АЧТВ на 38–60% и всех видов фибринолиза плазмы крови, причем СФА увеличивалась на 60–74%, НФ — на 74–94%, ФФ — на 38–46%. Следует отметить, что противосвертывающие эффекты превалировали после применения пептида PGPL.

Настоящее исследование было проведено с целью выявления антитромботических свойств пептидов, включающих лейцин с N- или C-концов молекулы в сравнительном аспекте. Для этого была создана эффективная модель гиперкоагуляции, включающая применение свертывающего фактора III (тканевой тромбопластин) на фоне уже развившегося метаболического синдрома. Ранее было показано, что содержание крыс на ВКД в течение длительного времени приводит к метаболическим нарушениям в организме, сопровождающимся повышенной свертываемостью крови (Оберган, Григорьева, 2016). Использование в этих условиях тканевого тромбопластина способствовало выраженному состоянию гиперкоагуляции вследствие усиленного тромбообразования (Баркаган, Костюченко, 2006).

Было установлено, что оба пептида в этих условиях обладали антитромбоцитарной, антикоагулянтной и фибринолитической активностью ферментативной и неферментативной природы и предотвращали самосборку фибрина, о чем свидетельствовало наличие неферментативной фибриндеполимеризационной активности. Существуют данные, что лейцин, входящий в состав ферментов, оказывает положительные эффекты не только на организм животных, но и растений (He *et al.*, 2018). В процессе самосборки фибрина участвуют не только различные регуляторные пептиды глипролинового ряда (Myasodov *et al.*, 2016), но и растительные гепариноподобные компоненты (Бышевский и др. 2012). Механизм действия этих веществ обусловлен наличием у них фибриндеполимеризационных и антиагрегационных в отношении тромбоцитов свойств. Следовательно, пептиды глипролинового ряда, содержащие лейцин с разных концов молекулы, обладая противосвертывающим эффектом, могут быть отнесены к перспективным антитромботическим агентам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая представленный экспериментальный материал, можно утверждать, что действие обоих пептидов при атравматичном интраназальном их применении в условиях провокации длительной гиперкоагуляции направлено в сторону возрастания противосвертывающих свойств крови с максимальным эффектом у пептида Pro-Gly-Pro-Leu, содержащего аминокислоту лейцин с C-конца.

Полученные в настоящем исследовании результаты свидетельствуют о перспективности изучения лейцин-содержащих коротких пептидов глипролинового ряда в качестве средств, предупреждающих длительно протекающие тромбоопасные состояния организма. Это указывает на потенциальные возможности регуляторных пептидов, включающих лейцин, влиять на функциональное состояние

системы гемостаза. На основе представленных данных получен новый фактический материал, который позволяет охарактеризовать структурно-функциональную обусловленность эффектов регуляторных пептидов. Актуальным представляется проведение дальнейших исследований коротких лейцин-содержащих пептидов при патологиях, осложняющихся тромбофилиями или тромбозами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность академику РАН Мясонову Н.Ф. и Андреевой Л.А. за любезное предоставление пептидов, синтезированных в ИМГ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке МГУ имени М.В.Ломоносова по госбюджетной фундаментальной теме "Регуляторы свертывающей и противосвертывающей систем в норме и при патологии" Номер Цитис 121032300076-3.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баркаган З.С., Костюченко Г.И. Метаболически-воспалительная концепция атеротромбоза и новые подходы к терапии больных // Бюл. СО РАМН. 2006. № 2 (120). С. 132–138.
- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия системы гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2008.
- Бышевский А.Ш., Галан С.Л., Калинин Е.П., Карпова И.А., Русакова О.А., Самойлов М.А., Созонюк А.Д., Сулкарнаева Г.А., Тарасов Д.Б., Чирятев Е.А., Шаповалов П.Я., Шаповалова Е.М. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения // Медицинская наука и образование Урала. 2012. Т. 13. № 1. С. 163–170.
- 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.
- Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е. Исследование параметров гемостаза, липидного и углеводного обмена у крыс с модифицированной моделью экспериментального метаболического синдрома // Современные технологии в медицине. 2016. Т. 8. № 4. С. 303–305.
- Оберган Т.Ю., Рочев Д.Л. Противосвертывающие и антитромбоцитарные эффекты пептида Pro-Gly-Pro-Leu и лейцина при внутривенном введении животным // Сборник: Физиологическая активность регуляторных пептидов. М.: 2010. С. 67–68.
- Шабалина А.А., Ляпина Л.А., Рочев Д.Л., Костырева М.В., Танащян М.М., Суслина З.А. Гиполипидемические и фибриндеполимеризационные эффекты регуляторных лейцинсодержащих глипролинов в крови человека *in vitro* // Изв. РАН. Сер. биол. 2015. № 42 (1). С. 85–89.

- He X., Feng T., Zhang D., Zhuo R., Liu M. Identification and comprehensive analysis of the characteristics and roles of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase (LRR-RLK) genes in *Sedum alfredii* Hance responding to cadmium stress // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. № 167. P. 95–106.
- Ichimura N., Kasama T. Identification of valine- or leucine-containing glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium*-intracellular complex // *Curr. Microbiol.* 2012. V. 64. № 6. P. 561–568.
- Kong X., Zhang D.Y., Wu H.B., Li F.X. Losartan and pioglitazone ameliorate nephropathy in experimental metabolic syndrome rats // *Biol. Pharm. Bull.* 2011. V. 34. № 5. P. 693–698.
- López N., Sónchez J., Palou A., Serra F. Gender-Associated Impact of Early Leucine Supplementation on Adult Predisposition to Obesity in Rats // *Nutrients.* 2018. V. 10. № 1. P. E76.
- 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.
- Okabayashi H.F., Kanbe H.H., O'Connor C.J. The role of an L-leucine residue on the conformations of glycyl-L-leucine oligomers and its N- or C-terminal dependence: infrared absorption and Raman scattering studies // *Euk. Biophys. J.* 2016. № 1. P. 23–34.
- Watson T., Arya A., Sulke N., Lip G.Y.H. Antithrombotic therapy: relationship of indices of inflammation and thrombogenesis to arrhythmia burden in paroxysmal arterial fibrillation // *Chest.* 2010. V. 137. P. 869–876.
- Wilkinson D.J., Bukhari S.S.I., Phillips B.E., Limb M.C., Cegielski J., Brook M.S., Rankin D., Mitchell W.K., Kobayashi H., Williams J.P., Lund J., Greenhaff P.L., Smith K., Atherton P.J. Effects of leucine-enriched essential amino acid and whey protein bolus dosing upon skeletal muscle protein synthesis at rest and after exercise in older women // *Clin. Nutr.* 2017. № 17. P. 31340–31347.

Anticoagulation Effects of Leucine-Containing Glyprolines in Hypercoagulation

M. E. Grigorieva^{1, #}, T. Y. Obergan¹, and L. A. Lyapina¹

¹ Lomonosov Moscow State University, Biology Faculty, Department of Human and Animal Physiology, Laboratory of Protective Blood Systems named after prof. B.A. Kudryashov, Leninsky Gory, 1/12, Moscow, 119234 Russia

[#]e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

The effects of two leucine-containing glyproline peptides Leu-Pro-Gly-Pro and Pro-Gly-Pro-Leu, including leucine from the N- and C-ends of the molecules, on the parameters of platelet (primary) and plasma hemostasis were studied. Peptides were administered intranasally for 5 days at a daily dose of 500 mcg/kg of body weight under conditions of hypercoagulation caused by intravenous administration of tissue thromboplastin to metabolic syndrome rats on high-calorie diet. Both peptides contributed to an increase in all types of fibrinolysis (total, enzymatic and non-enzymatic), anticoagulant activity and a decrease in platelet aggregation in rat blood plasma compared with the control. The maximum anticoagulant effect was established in a peptide containing leucine from the C-terminus.

Keywords: leucine-containing peptides, metabolic syndrome, hemostasis system, hypercoagulation, anticoagulation activity