

## АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ АКТИВНОСТЬ КОНЪЮГАТОВ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ И НЕЙРОТРОПНЫХ ПЕПТИДОВ ПРОГЛИПРОЛА И СЕМАКСА

В. В. Безуглов<sup>1</sup>, Н. М. Грецкая<sup>1</sup>, Т. М. Васильева<sup>2</sup>, Г. Н. Петрухина<sup>2</sup>,  
Л. А. Андреева<sup>3</sup>, Н. Ф. Мясоедов<sup>3</sup>, В. А. Макаров<sup>2</sup>

Исследовано влияние семакса и проглипрола, содержащих в своем составе арахидоновую кислоту, на агрегационную способность тромбоцитов человека *in vitro*. Показано, что оба производных, в отличие от немодифицированных пептидов, обладают умеренной антиагрегационной активностью и дозозависимо снижают межтромбоцитарное взаимодействие, индуцированное АДФ, адреналином или арахидоновой кислотой, в диапазоне концентраций 0,018 – 1,8 мМ. Эта активность более выражена у арахидоноилсемакса по сравнению с арахидоноилпроглипролом.

**Ключевые слова:** агрегация тромбоцитов; семакс; пептиды; арахидоновая кислота.

### ВВЕДЕНИЕ

Нарушения мозгового кровообращения занимают одно из ведущих мест среди основных причин смертности и инвалидизации населения в большинстве стран. В Российской Федерации инсульт занимает второе место после сердечно-сосудистых заболеваний и первое как причина стойкой утраты трудоспособности.

Известно, что повышение агрегационной активности тромбоцитов играет важную роль в патогенезе ишемического инсульта и других цереброваскулярных расстройств, а ингибирование тромбоцитарной агрегации, является одним из главных направлений в терапии данных заболеваний. Наряду с тромболитической терапией, применение которой требует инструментального подтверждения отсутствия геморрагического компонента при ишемическом инсульте, применяется и нейропротекторная терапия, которую можно проводить в первые минуты после установления диагноза [1]. Нейропротекторы разделяют на первичные, действующие на глутамат-кальциевый ответ нейронов, и вторичные, среди которых находятся нейропептиды, в частности — семакс [2].

Семакс (МЕНФРРРР), первый отечественный синтетический ноотропный препарат, не вызывающий побочных эффектов. Семакс и его стабильный активный метаболит — трипептидпроглипрол (РРР) — обладают выраженной нейропротекторной активностью, подтвержденной в многочисленных экспериментах [3, 4]. Для пептидов, содержащих в структуре остатки только глицина и пролина (глипролинов), установлена способность усиливать антикоагулянтные, фибринолитические, антифибринстабилизирующие и антитромбоцитарные свойства плазмы крови [5]. Однако

способность семакса и проглипрола ингибировать индуцированную АДФ или адреналином агрегацию тромбоцитов выражена слабо. Поэтому представляется перспективным модифицировать данные пептиды, чтобы усилить их способность тормозить индуцированную агрегацию тромбоцитов. Один из способов модификации пептидов — ацилирование свободной аминогруппы. При этом повышается устойчивость пептида к протеолизу [6]. Если в качестве ацильного компонента используется остаток полиненасыщенной жирной кислоты, то можно предполагать не только повышение стабильности пептида в составе модифицированной молекулы, но и изменение фармакокинетики и фармакологического спектра пептида.

Цель данной работы — исследование способности пептидов семакс и проглипрол, ацилированных арахидоновой кислотой, ингибировать агрегацию тромбоцитов человека под влиянием различных проагрегантов.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Ацилированные арахидоновой кислотой пептиды семакс (AA-Semax) и проглипрол (AA-PGP) были синтезированы в лаборатории оксипиринов (зав. — д.х.н. В. В. Безуглов) Института биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН как описано ранее [7]. Все соединения имели чистоту не менее 95 % по данным ВЭЖХ.

Эксперименты выполнены на венозной крови здоровых доноров ( $n = 50$ ), которую получали из локтевой вены и стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 (v:v). Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин, после чего верхний слой плазмы переносили в другую пробирку, а остаток повторно центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами.

Агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре фирмы “Viola” (Россия) по методу G. Born [8]. С этой целью в кювету прибора помещали 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы. Исследуемое вещество в

<sup>1</sup> ФГБУ науки Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, 117997 ГСП-7, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

<sup>2</sup> ФГБУ Гематологический научный центр Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125167, Москва, Новый Зыковский пр., 4 А;

<sup>3</sup> ФГБУ науки Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, площадь академика И. В. Курчатова, д. 2.

физиологическом растворе (30 мкл) добавляли в кювету агрегометра, инкубировали в течение 5 мин при 37 °С и затем индуцировали процесс тромбоцитарной агрегации. Оптическим контролем служил такой же объем плазмы, не содержащей тромбоцитов. Исходную оптическую плотность богатой тромбоцитами плазмы ( $A_0$ ) принимали за 100 %. О степени агрегации ( $A_{max}$ ) судили по максимальной величине падения оптической плотности после окончания агрегационного процесса по сравнению с  $A_0$ , при этом считали, что степень агрегации пропорциональна изменению оптической плотности исследуемого образца.

В качестве проагрегантов использовали АДФ (BoehringerMannheim, Австрия) в конечной концентрации  $1 \cdot 10^{-5}$  М, адреналин (Reanal, Венгрия) в конечной концентрации  $2 \cdot 10^{-6}$  М и арахидоновую кислоту в конечной концентрации  $1 \cdot 10^{-3}$  М. Арахидоновая кислота (АК), свободная от продуктов окисления, была получена в лаборатории оксипинов (зав. — д.х.н. В. В. Безуглов) ИБХ РАН.

Статистический анализ полученных данных проводили в соответствии с общепринятыми методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе изучено влияние на агрегационную способность тромбоцитов *in vitro* 2 модифицированных терапевтически значимых пептидов, содержащих в своем составе арахидоновую кислоту: арахидоилсемакс (AA-Semax) и арахидоилпроглипрол (AA-PGP). В качестве индукторов агрегации были выбраны 3 физиологических индуктора с разными механизмами инициации агрегации: аденозиндифосфат (АДФ), адреналин и арахидоновая кислота. Выбор АК в качестве проагреганта был обусловлен не только ее способностью вызывать агрегацию, но и тем, что это вещество послужило предшественником для синтеза исследуемых веществ.

Инкубирование богатой тромбоцитами плазмы с AA-Semax в течение 5 мин при 37 °С приводило к снижению АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов *in vitro* (табл. 1). В максимальных исследованных концентрациях (1,8 – 0,18 мМ) AA-Semax ингибировал тромбоцитарную агрегацию в среднем в 1,6 раза по сравнению с контрольной величиной. В концентрации 0,018 мМ он уменьшал тромбоцитарное взаимодей-

ствие с  $52,2 \pm 2,5$  % (в контрольном опыте) до  $39,6 \pm 3,4$  %. В более низкой концентрации данное соединение не проявляло антиагрегационной активности.

Как и в случае АДФ-индуцированной агрегации, AA-Semax достоверно снижал агрегацию тромбоцитов, индуцированную адреналином и арахидоновой кислотой, в диапазоне концентраций 0,018 – 1,8 мМ (табл. 1). При использовании AA-Semax в максимальной концентрации 1,8 мМ отмечали ингибирование агрегационной способности тромбоцитов в 2 раза (при использовании в качестве проагреганта адреналина) и 2,5 раза (при использовании в качестве проагреганта арахидоновой кислоты). При более низких концентрациях этого вещества наблюдали уменьшение тромбоцитарной активности в 1,3 – 1,4 раза. Таким образом, для всех 3 индукторов минимальная концентрация арахидоилсемакса, достоверно вызывающая снижение агрегации тромбоцитов, составила 0,018 мМ.

В отдельной серии экспериментов были исследованы антиагрегационные свойства арахидоилпроглипрола (AA-PGP) (табл. 2). АДФ-индуцированная агрегация достоверно снижалась только при применении AA-PGP в максимальной концентрации (1,8 мМ). При этом тромбоцитарная активность уменьшалась с  $52,3 \pm 1,6$  % (в контроле) до  $40,9 \pm 3,9$  %. В концентрациях 1,8 мМ и 0,18 мМ AA-PGP ингибировал индуцированную арахидоновой кислотой агрегацию в 2,1 и 1,7 раза соответственно. Незначительное ингибирование агрегации, индуцированной адреналином, было зафиксировано при использовании AA-PGP в концентрациях 0,18 и 1,8 мМ. Таким образом, AA-PGP оказался менее эффективным ингибитором агрегации тромбоцитов, чем AA-Semax, как по диапазону активных концентраций, так и по величине антиагрегационного эффекта.

Немодифицированные семакс и проглипрол в данных условиях эксперимента не проявляли выраженной антиагрегационной активности по отношению к богатой тромбоцитами плазме человека. Так, семакс в максимальной концентрации 1,2 мМ не показал значимого снижения агрегации тромбоцитов ни в случае индуцирования агрегации АДФ, ни адреналином. Проглипрол в максимальной концентрации 2,2 мМ незначительно ингибировал только агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ ( $A_{max}$ , %  $40,9 \pm 2,2$ , контроль  $57,4 \pm 5,1$ ,  $p < 0,05$ ). Арахидоноильное производное проглипрола проявляло подобное антиагрегационное

Таблица 1. Влияние арахидоил-семакса (AA-Semax) на индуцированную агрегацию тромбоцитов человека *in vitro* ( $A_{max}$ , %,  $M \pm SE$ )

Индуктор агрегации, концентрация	Контрольные значения	Концентрация AA-Semax, мМ			
		1,8	0,18	0,018	0,0018
АДФ, $1 \cdot 10^{-5}$ М	$52,2 \pm 2,5$	$31,8 \pm 2,8^*$	$33,2 \pm 1,3^*$	$39,6 \pm 3,4^*$	$45,1 \pm 4,1$
Адреналин, $2 \cdot 10^{-6}$ М	$53,8 \pm 2,3$	$26,1 \pm 5,6^*$	$38,1 \pm 3,1^*$	$39,0 \pm 1,8^*$	$45,2 \pm 2,6$
Арахидоновая кислота, $1 \cdot 10^{-3}$ М	$42,1 \pm 2,5$	$17,1 \pm 3,5^*$	$24,5 \pm 3,5^*$	$31,1 \pm 1,7^*$	$37,2 \pm 1,2$

\* — Достоверно по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

Таблица 2. Влияние арахидоноил-проглипрола (AA-PGP) на индуцированную агрегацию тромбоцитов человека *in vitro* ( $A_{max}$ , %,  $M \pm SE$ )

Индуктор, концентрация	Контрольные значения	Концентрация AA-PGP, мМ			
		1,8	0,18	0,018	0,0018
АДФ, $1 \cdot 10^{-5}$ М	$52,3 \pm 1,6$	$40,9 \pm 3,9^*$	$43,7 \pm 3,7$	$46,1 \pm 3,3$	$51,2 \pm 1,9$
Адреналин, $2 \cdot 10^{-6}$ М	$50,7 \pm 2,3$	$41,6 \pm 2,3^*$	$44,1 \pm 0,9^*$	$45,3 \pm 1,2$	$45,3 \pm 1,6$
Арахидоновая кислота, $1 \cdot 10^{-3}$ М	$42,0 \pm 2,4$	$19,5 \pm 4,2^*$	$24,1 \pm 2,7^*$	$31,1 \pm 4,1$	$35,9 \pm 1,2$

\* — Достоверно по отношению к контролю ( $p < 0,05$ ).

действие в концентрации 1,8 мМ. Однако, в отличие от проглипрола, AA-PGP достоверно (хотя и в небольшой степени) ингибировал агрегацию тромбоцитов, индуцированную адреналином, в концентрации 0,18 мМ, тогда как проглипрол не влиял на межтромбоцитарное взаимодействие и в максимальной концентрации 2,2 мМ.

Таким образом, с одной стороны, введение остатка арахидоновой кислоты по концевой аминогруппе пептидов семакс и проглипрол существенно усиливает их способность предотвращать агрегацию тромбоцитов, вызванную различными физиологически значимыми индукторами. С другой стороны, модификация арахидоновой кислоты присоединением пептидного фрагмента посредством амидной связи превращает её из индуктора агрегации тромбоцитов в ингибитор. Подобный эффект мы наблюдали для амидного конъюгата арахидоновой кислоты и дофамина [9].

Полученные данные позволяют заключить, что модификация пептидов ацилированием жирными кислотами способна изменить их фармакологический профиль, существенно усиливая способность тормозить индуцированное межтромбоцитарное взаимодействие. Эта способность более выражена у арахидоноильного производного семакса, что открывает новые перспективы для создания на его основе гибридных лекарственных препаратов, регулирующих тромбоцитарную агрегацию.

## ВЫВОДЫ

1. Конъюгат арахидоновой кислоты и нейротропно-го пептида семакс обладает выраженной способно-

стью снижать агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную АДФ, адреналином и арахидоновой кислотой, в диапазоне концентраций 1,8 – 0,018 мМ.

2. Конъюгат арахидоновой кислоты и пептида проглипрола проявляет антиагрегационные свойства в отношении всех трёх индукторов только в максимальной концентрации 1,8 мМ, уступая в эффективности арахидоноилсемаксу.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, грант № 13-04-40085-Н.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, *Ишемия головного мозга*, Медицина, Москва (2001).
2. Е. И. Гусев, В. И. Скворцова, Н. Ф. Мясоедов и др., *Журн. неврол. и психиатрии им. С. С. Корсакова*, **97**(6), 26 – 34 (1997).
3. V. G. Dmitrieva, O. V. Povarova, V. I. Skvortsova, et al., *Cellular and Molecular Neurobiology*, **30**(1), 71 – 79 (2010).
4. К. В. Мартынова, Л. А. Андреева, П. А. Климова и др., *Биоорганическая химия*, **35**(2), 165 – 171 (2009).
5. Л. А. Ляпина, Н. Ф. Мясоедов, М. Е. Григорьева и др., *Известия Российской академии наук. Сер. биол.*, № 4, 453 – 462 (2013).
6. К. В. Шевченко, И. Ю. Нагаев, Л. А. Андреева и др., *Докл. Академии наук.*, **449**(6), 733 – 735 (2013).
7. В. В. Безуглов, Н. М. Грецкая, А. В. Блаженева и др., *Биоорганическая химия*, **32**(3), 258 – 267 (2006).
8. G. Born, *Nature*, **194**(5), 927 – 929 (1962).
9. Т. М. Васильева, Г. Н. Петрухина, В. А. Макаров и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **65**(6), 41 – 45 (2002).

Поступила 02.04.14

## ANTIAGGREGATION ACTIVITY OF ARACHIDONIC ACID CONJUGATES WITH NEUROTROPIC PEPTIDES PROGLYPROL AND SEMAX

V. V. Bezuglov<sup>1</sup>, N. M. Gretskeya<sup>1</sup>, T. M. Vasil'eva<sup>2</sup>, G. N. Petrukhina<sup>2</sup>, L. A. Andreeva<sup>3</sup>, N. F. Myasoedov<sup>3</sup>, and V. A. Makarov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow V-437, GSP-7, 117997 Russia

<sup>2</sup> National Heatological Scientific Center, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Novo-Zykovskii pr. 4A, Moscow, 125167 Russia

<sup>3</sup> Institute of Molecular Genetics, pl. Kurchatova 1, Moscow, 123182 Russia

The influence two original derivatives of a therapeutically important peptide, bearing arachidonic acid residue with semax and proglyprol, upon platelet aggregation have been studied *in vitro*. It is established that both derivatives, in contrast to the parent peptide, possess moderate anti-aggregant properties and produce a dose-dependent decrease in the interplatelet interaction induced by ADP, epinephrine, and arachidonic acid within the concentration range of 0.018 – 1.8 мМ. This activity was more pronounced for arachidonoylsemax in comparison with arachidonoylproglyprol.

**Keywords:** platelet aggregation; semax; proglyprol; peptides; arachidonic acid