

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-12-23-26

ВЛИЯНИЕ АРГИНИНСОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ НА АНТИКОАГУЛЯНТНУЮ И ФИБРИНОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Э. Я. Рогозинская*, Л. А. Ляпина¹

Исследовано действие олигопептидов глипролинового ряда — His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (АКТГ₍₆₋₉₎PGP), Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанк) и Pro-Gly-Pro (PGP) — в различных концентрациях от 1 до 10^{-5} мг/мл в условиях *in vitro* на плазму крови крыс посредством тестов АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время) и определения пластин нестабилизированного фибрина. Удлинение времени свертывания плазмы (по тесту АЧТВ) от 158 до 210 % в зависимости от концентрации пептидов при $p < 0,01$ указывает на гипокоагуляцию под действием АКТГ₍₆₋₉₎PGP и селанка. Выявлены суммарные фибринолитические эффекты пептидов в концентрациях от 1 до 10^{-5} мг/мл методом измерения зоны лизиса на пластинах нестабилизированного фибрина в норме и под влиянием пептидов. Наибольшей фибриндеполимеризационной активностью по данным суммарной фибринолитической активности обладал пептид АКТГ₍₆₋₉₎PGP от 117 до 148 % в концентрациях от 10^{-3} до 1 мг/мл при $p < 0,05$.

Ключевые слова: регуляторные пептиды; фибринолитическая активность; антикоагулянтная активность; плазма крови крыс.

ВВЕДЕНИЕ

Пептиды глипролинового ряда, имеющие в своей структуре аминокислотную последовательность Gly-Pro, образуются в процессе протеолиза коллагена и других родственных ему белков. Они обеспечивают гомеостаз свертывающей, противосвертывающей, инсулярной и других систем организма [1, 3]. Ранее было показано, что глипролины Pro-Gly, Pro-Gly-Pro, Gly-Pro демонстрируют антикоагулянтную, фибриндеполимеризационную и антифибринстабилизирующую активность [5, 8]. Аргининсодержащий пептид глипролинового ряда семакс и иммунопептид тафцин оказывают в организме антикоагулянтно-фибринолитическое действие [8, 4].

В настоящее время в процессе исследований пептидов глипролинового ряда к ним добавляют различные аминокислоты, в том числе аргинин. Аргинин является предшественником оксида азота (NO), который образуется под воздействием NO-синтазы. Регулирование выброса NO в кровь протекает по механизму отрицательной обратной связи гуанилатциклазой. NO участвует в ряде физиологических функций, включая вазодилатацию, синаптическую передачу, ингибирование агрегации тромбоцитов, регуляцию тонуса гладких мышц [10]. Таким образом, аргинин косвенно (являясь субстратом синтеза NO) ингибирует свертывание крови и улучшает реологические свойства крови, активизирует фибринолиз, повышает антитромбоцитар-

ную активность крови, нормализует уровень глюкозы в крови [6] и нейтрализует накопленные свободные радикалы [7]. Аргинин, вырабатываемый в организме, потребляемый с пищей, снижает риск развития ряда сердечно-сосудистых заболеваний, а также атеросклероза и сахарного диабета [9].

Цель настоящей работы заключалась в установлении влияния пептидов His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (АКТГ₍₆₋₉₎PGP), Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (селанка) и Pro-Gly-Pro (PGP) на антикоагулянтное и фибринолитическое звенья гемостаза.

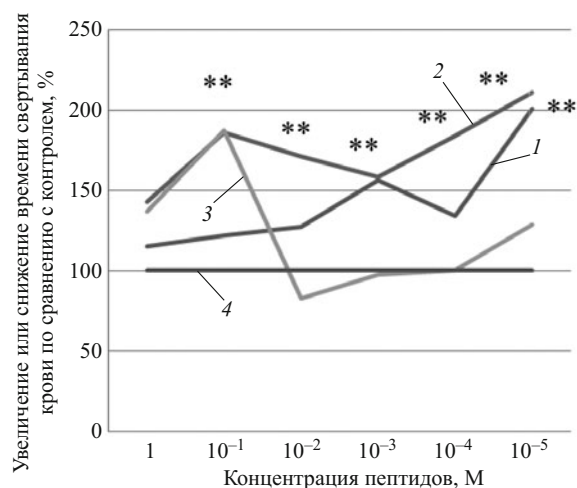
МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах использовали пептидные препараты АКТГ₍₆₋₉₎PGP, селанка и PGP, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН (Россия) в отделе химии физиологически активных веществ (зав. — академик РАН Н. Ф. Мясоедов). Исследованы эффекты веществ в разных концентрациях — от 1 до 10^{-5} мг/мл. В качестве растворителя применяли физиологический раствор.

В работе использовали 16 линейных белых крыс-самцов массой 200 – 220 г. Все эксперименты на животных проводили в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейским научным фондом и Хельсинской Декларацией о гуманном отношении к животным. У животных натошак из яремной вены забирали по 2 мл крови в пробирку с консервантом — 3,8 % раствором цитрата натрия (соотношение крови и консерванта 9:1 по объему). Образцы крови центрифугировали при 2000 g в течение 10 мин при комнатной температуре (ОПн-8, ДАСТАН, Киргизия), получая бедную тромбоцитами

¹ ФГОУ Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119234, Москва, Ленинские Горы, д. 1, строение 12/1.

* e-mail: elinamiss007@mail.ru



Влияние препаратов пептидов на антикоагулянтную активность по тесту АЧТВ; статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля без плазмы, принятого за 100 %, достоверность различий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Динамика изменения времени свертывания крови в зависимости от концентрации препарата: 1 — АКТГ₍₆₋₉₎PGR; 2 — селанк; 3 — PGR; 4 — контроль (NaCl).

плазму. Измеряли следующие биохимические параметры крови: разные виды фибринолиза определением зон лизиса — суммарную (СФА), неферментативную (НФА) и ферментативную (ФФА) фибринолитическую активность крови на нестабилизированном фибрине на чашках Петри, а также антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). В тесте АЧТВ коагулограмму записывали на анализаторе свертывания крови АСКа 2-01-Астра (Россия). Определяли время свертывания рекальцифицированной плазмы в условиях стандартизованной контактной (каолином) и фосфолипидной (кефалином) активации процесса в присутствии ионов кальция [2].

Результаты были статистически обработаны по непараметрическому критерию Манна – Уитни (Statistica 8.0).

Таблица 1. Собственная неферментативная фибринолитическая активность препаратов АКТГ₍₆₋₉₎PGR, селанк, PGR (мм² (%), $M \pm m$)

Препарат	Концентрация					
	1 мг/мл	10 ⁻¹ мг/мл	10 ⁻² мг/мл	10 ⁻³ мг/мл	10 ⁻⁴ мг/мл	10 ⁻⁵ мг/мл
АКТГ ₍₆₋₉₎ PGR	33,0 ± 3,0** (206)	29,0 ± 1,0** (181)	24,0 ± 0,0** (184)	24,0 ± 0,0** (200)	20,0 ± 0,0** (190)	9,0 ± 0,0** (150)
Селанк	29,0 ± 1,0** (181)	28,0 ± 0,0** (175)	26,5 ± 1,5** (203)	21,0 ± 3,0** (175)	20,0 ± 0,0** (190)	16,0 ± 0,0** (266)
PGR	16,0 ± 0,0 (100)	16,0 ± 0,0 (100)	13,0 ± 1,0 (100)	12,0 ± 0,0 (100)	10,5 ± 1,5 (100)	6,0 ± 0,0 (100)

Примечание: в контроле с NaCl НФА на нестабилизированном фибрине составляла 0,0; статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб PGR без плазмы, принятого за 100 %, достоверность различий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При оценке собственной НФА препаратов на нестабилизированных фибриновых пленках в отсутствие плазмы крови АКТГ₍₆₋₉₎PGR и селанк оказались активнее, чем PGR в отношении НФА (табл. 1).

Высокая эффективность данных препаратов, вероятно, связана с содержанием в их структуре аминокислоты аргинин.

Установлено, что из всех препаратов АКТГ₍₆₋₉₎PGR оказывал наибольшее влияние на ферментативную фибринолитическую активность плазмы крови. С уменьшением концентрации препаратов наблюдалось заметное снижение фибринолитической активности (табл. 2), корреляция (ρ) составила 0,6 (по ранговой корреляции Спирмена).

Данные табл. 2 свидетельствуют о том, что под влиянием пептидов в различных концентрациях происходит увеличение зон лизиса при ферментативном фибринолизе. Активация процесса ферментативного фибринолиза напрямую связана с увеличением активности тканевого активатора плазминогена (t-PA), то есть чем больше зоны лизиса фибрина, тем больше величина активности тканевого активатора плазминогена.

Наибольшую фибриндеполимеризационную активность по данным СФА проявил пептид АКТГ₍₆₋₉₎PGR: 117 % в концентрации 10⁻³ мг/мл, 120 % в концентрации 10⁻² мг/мл, 136 % в концентрации 10⁻¹ мг/мл, 148 % в концентрации 1 мг/мл при $p < 0,05$.

Исследования антикоагулянтного звена гемостаза в тесте АЧТВ показали ярко выраженное увеличение времени свертывания крови под влиянием двух аргининсодержащих пептидов: АКТГ₍₆₋₉₎PGR на 200 % и селанка на 210 % в концентрациях пептидов 10⁻⁵ мг/мл; селанка на 184 % в концентрации пептида 10⁻⁴ мг/мл; АКТГ₍₆₋₉₎PGR и селанка на 158 % в концентрации пептидов 10⁻³ мг/мл; селанка на 170 % в концентрации пептида 10⁻² мг/мл; селанка на 187 % в концентрации пептида 10⁻¹ мг/мл (рисунок). АЧТВ — тест, чувствительный к дефициту всех плазменных факторов свертывания, кроме фактора VII. АЧТВ-реагент состоит из контактного активатора (каолина) и фосфолипида (кефалина). При контакте плазмы с час-

тицами каолина происходит активация фактора XII – XIIa, предоставляя поверхность для функционирования высокомолекулярного кининогена, калликреина и фактора XIIa. Фосфолипиды образуют комплекс с активным фактором X (Ха) и протромбином. После инкубации (3 мин при температуре + 37 °С) в реакционную смесь добавляют хлорид кальция. Далее воспроизводится запуск свертывания по внутреннему пути. Удлинение АЧТВ под влиянием пептидов указывает на гипокоагуляцию, обусловленную или активацией функции ПСС, или появлением в крови ингибиторов факторов свертывания.

Таким образом, аминокислота аргинин в составе олигопептидов глипролинового ряда способствует

усилению активации противосвертывающей системы крови, а именно ее антикоагулянтного и фибринолитического звеньев.

ВЫВОДЫ

1. У всех исследованных препаратов пептидов обнаружена антикоагулянтная активность, при этом аргининсодержащие пептиды АКТГ₍₆₋₉₎PGP и селанк были наиболее эффективными по сравнению с PGP: удлинение времени свертывания плазмы от 158 до 210 % в зависимости от концентраций пептидов при $p < 0,01$.

2. Наибольшей фибриндеполимеризационной активностью по данным суммарной фибринолитической

Таблица 2. Влияние препаратов на фибринолитическую активность плазмы крови *in vitro* ($M \pm m$)

Условия опыта		С плазмой		
препарат	концентрация, мг/мл	СФА, мм ² (%)	НФА, мм ² (%)	ФФА, мм ² (%)
АКТГ ₍₆₋₉₎ PGP	1	44,3 ± 3,3** (148)	32,0 ± 2,8** (128)	12,3 ± 0,5** (247)
	10 ⁻¹	40,7 ± 1,9** (136)	27,0 ± 1,4 (108)	10,3 ± 2,9** (207)
	10 ⁻²	36,0 ± 0,0* (120)	24,0 ± 0,0 (96)	12,0 ± 0,0** (240)
	10 ⁻³	35,0 ± 1,0* (117)	22,5 ± 2,5 (90)	12,5 ± 1,5** (250)
	10 ⁻⁴	27,5 ± 2,5 (92)	20,0 ± 0,0 (80)	7,5 ± 2,5** (150)
	10 ⁻⁵	18,0 ± 2,0 (60)	9,0 ± 0,0 (36)	9,0 ± 2,0** (180)
Селанк	1	36,0 ± 0,0* (120)	28,0 ± 0,0* (112)	8,0 ± 0,0** (160)
	10 ⁻¹	36,0 ± 0,0* (120)	28,0 ± 0,0* (112)	8,0 ± 0,0** (160)
	10 ⁻²	30,0 ± 0,0 (100)	25,0 ± 0,0 (100)	5,0 ± 0,0 (100)
	10 ⁻³	29,0 ± 1,0 (97)	20,0 ± 0,0 (80)	9,0 ± 1,0** (180)
	10 ⁻⁴	27,5 ± 2,5 (92)	20,0 ± 0,0 (80)	7,5 ± 2,5** (150)
	10 ⁻⁵	24,0 ± 0,0 (80)	16,0 ± 0,0 (64)	8,0 ± 0,0** (160)
PGP	1	25,0 ± 0,0 (83)	16,0 ± 0,0 (64)	9,0 ± 0,0** (180)
	10 ⁻¹	25,0 ± 0,0 (83)	16,0 ± 0,0 (64)	9,0 ± 0,0** (180)
	10 ⁻²	25,0 ± 0,0 (83)	12,0 ± 0,0 (48)	13,0 ± 0,0** (260)
	10 ⁻³	24,5 ± 0,5 (82)	12,0 ± 0,0 (48)	12,5 ± 0,5** (250)
	10 ⁻⁴	22,5 ± 2,5 (75)	11,0 ± 1,0 (44)	11,5 ± 3,5** (230)
	10 ⁻⁵	20,0 ± 0,0 (67)	6,5 ± 2,5 (26)	13,5 ± 2,5** (270)
NaCl, контроль	-	30,0 ± 0,0 (100)	20,0 ± 0,0 (100)	10,0 ± 0,0 (100)

Примечание: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля (NaCl + плазма), принятого за 100 %, достоверность различий: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

активности обладал пептид АКТГ₍₆₋₉₎PGP от 117 до 148 % в концентрациях от 10^{-3} до 1 мг/мл при $p < 0,05$.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. П. Ашмарин, Л. А. Ляпина, Л. А. Андреев и др., *Тромбоз, гемостаз и реология*, **34**(2), 38 – 43 (2008); eLIBRARY ID: 13062727.
2. Л. А. Ляпина, М. Е. Григорьева, Т. Ю. Оберган и др., *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*, Адвансед солишнз, Москва (2012).
3. Н. Ф. Мясоедов, Л. А. Андреева, Л. А. Ляпина и др., *Докл. РАН*, **438**(2), 1 – 4 (2011).
4. I. P. Ashmarin, V. E. Pastorova, L. A. Lyapina, et al., *Izv. Akad. Nauk SSSR. Ser. Biol.*, № 2, 302 – 308 (1991).
5. I. P. Ashmarin, A. A. Kamensky, L. A. Lyapina, et al., *Vopr. Biol. Med. i Farm. Khimii*, **1**, 24 – 27 (2002).
6. Z. S. Barkagan, G. I. Kostyuchenko, *Bul. Sib. Otd. Ross. Akad. Med. Nauk*, **2**, 132 – 138 (2006).
7. T. M. C. Brunini, A. C. Mendes-Ribeiro, J. C. Ellory, *Cardiovasc. Res.*, **73**, 359 – 367 (2007); doi: 10.1016 / j.cardiores.2006.09.019.
8. L. A. Lyapina, V. E. Pastorova, T. J. Obergan, et al., *Izv. Akad. Nauk, Ser. Biol.*, № 2, 193 – 203 (2006).
9. G. K. McConnel, *Cur. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **10**, 46 – 51 (2007); doi: 10.1097 / MCO.0b013e32801162fa.
10. C. Napoli, W. C. Stanley, L. J. Ignarro, *Cardiovasc. Res.*, **73**, 253 – 256 (2007); doi: 10.1016 / j.cardiores.2006.11.032.

Поступила 15.10.19

ARGININ-CONTAINING PEPTIDES INFLUENCE THE ANTICOAGULANT AND FIBRINOLYTIC ACTIVITY OF BLOOD PLASMA *IN VITRO*

E. Ya. Rogozinskaya* and L. A. Lyapina

Bbiological Faculty, Moscow State University, Moscow, 119234Russia

* e-mail: elinamiss007@mail.ru

The action of oligopeptides of the glyproline series, including His-Phe-Arg-Trp-Pro-Gly-Pro (ACTH(6 – 9)PGP), Thr-Lys-Pro-Arg-Pro-Gly-Pro (Selank) and Pro-Gly-Pro (PGP) in various concentrations from 1 mg/mL to 10^{-5} mg/mL *in vitro* on blood plasma taken from laboratory rats was studied using APTT (activated partial thromboplastin time) test and determination of unstabilized fibrin plates. Elongation of the plasma coagulation time (according to the APTT test) from 158 to 210% depending on the concentration of peptides ($p < 0.01$) indicated hypocoagulation under the influence of ACTH(6 – 9)PGP and Selank. The total fibrinolytic effects of peptides in concentration range from 1 mg/mL to 10^{-5} mg/mL were detected by measuring the lysis zone on unstabilized fibrin plates under normal conditions and under the action of peptides. According to SFA, the highest fibrin depolymerization activity (from 117 to 148%) was shown by the ACTH(6 – 9)PGP at concentrations from 10^{-3} mg/mL to 1 mg/mL at $p < 0.05$.

Keywords: regulatory peptides; fibrinolytic activity; anticoagulant activity; rat blood plasma.