

## АРГИНИНСОДЕРЖАЩИЕ ПЕПТИДЫ PRO-ARG-GLY И GLY-ARG-PRO: ВЛИЯНИЕ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА, УГЛЕВОДНЫЙ И ЛИПИДНЫЙ ОБМЕН У КРЫС С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Сун Ю.

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

В экспериментах на крысах с метаболическим синдромом было исследовано влияние аргининсодержащих пептидов Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro на параметры гемостаза, углеводного и липидного обмена. В условиях развившегося метаболического синдрома ежедневное (1 раз в сутки) 5-кратное интраназальное введение и Pro-Arg-Gly, и Gly-Arg-Pro крысам в дозах 1 мг/кг массы тела приводило к повышению фибринолитической и антикоагулянтной активности крови и достоверному снижению агрегации тромбоцитов. Также оба пептида вызывали снижение концентрации триглицеридов и глюкозы крови. Обнаруженные эффекты наблюдались как через 1 ч после последнего введения препаратов, так и спустя 7 сут после прекращения их применения. Таким образом, в условиях моделирования метаболического синдрома у крыс исследованные нами аргининсодержащие пептиды Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro обладали сочетанным действием на систему гемостаза, параметры углеводного и липидного обмена. Сравнительный анализ эффектов исследованных пептидов показал, что Pro-Arg-Gly обладает наиболее выраженным и пролонгированным действием в организме.

Ключевые слова: пептиды, антикоагулянтная активность, фибринолиз, агрегация тромбоцитов, триглицериды, глюкоза крови.

## ARGININE-CONTAINING PEPTIDES PRO-ARG-GLY AND GLY-ARG-PRO: EFFECT ON THE HAEMOSTASIS SYSTEM, LIPID AND CARBOHYDRATE METABOLISM IN RATS WITH METABOLIC SYNDROME

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

*Lomonosov Moscow State University, biology faculty, department of human and animal physiology, Moscow, e-mail: mgrigorjeva@mail.ru*

The influence of arginine-containing peptides Pro-Arg-Gly and Gly-Arg-Pro was studied on the parameters of haemostasis, carbohydrate and lipid metabolism in experiments on rats with metabolic syndrome. In conditions of developed metabolic syndrome daily (1 per day) 5-fold intranasal administration of Pro-Arg-Gly and Gly-Arg-Pro to rats at doses of 1 mg/kg of body weight led to an increase in fibrinolytic and anticoagulant activity of blood and a significant decrease of platelet aggregation. Also both of the peptide caused an increase in triglycerides and glucose concentration. The observed effects was observed within 1 h after the last administration of peptides, and 7 days after the cancellation of their administration. Thus, the studied arginine-containing peptides Pro-Arg-Gly and Gly-Arg-Pro had a combined effect on haemostasis, parameters of carbohydrate and lipid metabolism in conditions of metabolic syndrome modeling in rats. A comparative analysis of the effects of the studied peptides showed that Pro-Arg-Gly has a more pronounced and prolonged action in the organism.

Keywords: peptides, anticoagulant activity, fibrinolysis, platelet aggregation, triglycerides, blood glucose.

Общеизвестно, что метаболический синдром (МС) представляет собой комплекс метаболических, гормональных и клинических нарушений, к основным признакам которого относятся абдоминально-висцеральное ожирение, нарушение метаболизма глюкозы и инсулина, инсулинорезистентность, дислипидемия, повышение уровня триглицеридов крови, артериальная гипертензия [1]. Также МС сопровождается эндотелиальной дисфункцией, прогрессирование которой может приводить к повышению свертываемости крови, развитию атеросклеротических изменений в сосудах и тромбозам [2].

К настоящему времени метаболическая терапия представлена целым рядом препаратов (статины, фибраты, ингибиторы  $\beta$ -окисления жирных кислот и др.), воздействующих практически на все стадии метаболизма липидов [3]. Кроме того, известны немногочисленные средства пептидной и аминокислотной природы [4,5]. Дополнительно с целью коррекции нарушенных функций свертывающей и противосвертывающей систем крови при этом заболевании проводят антитромботическую терапию [6]. В связи с этим, актуальность поиска препаратов, в действии которых сочетаются антитромботические и липолитические свойства, не вызывает сомнений [6,7].

Известно, что при нарушении гомеостатического баланса в организме немаловажная роль принадлежит пептидэргической регуляции [8]. К пептидным биорегуляторам относятся глицин- и пролинсодержащие олигопептиды – глипролины [9], которые, обладая широким спектром биологической активности, участвуют в сохранении нормальной функциональной активности свертывающей и противосвертывающей систем организма и положительно влияют на липидный и углеводный обмен [10]. Известно также, что некоторые аминокислоты, такие как пролин, лизин, аргинин, лейцин, снижают риск развития атеротромбоза, сахарного диабета и атеросклероза, предотвращая отложение преатерогенного холестерина липопротеидов низкой плотности на стенках артерий [5]. Аргинин способствует появлению в кровотоке оксида азота, обеспечивающего гиполипидемический, гипогликемический и противосвертывающий эффекты [11,12]. Мы предположили, что введение аргинина в молекулу глипролина может улучшить корригирующее действие физиологически активных коротких пептидов на ключевые звенья патогенеза МС.

Цель исследования – изучение противосвертывающего, гипогликемического и гиполипидемического действия аргининсодержащих глипролинов Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro у крыс в условиях экспериментального метаболического синдрома.

#### **Материалы и методы исследования**

В работе применяли пептиды Pro-Arg-Gly (PRG) и Gly-Arg-Pro (GRP), синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН.

Эксперименты были проведены на самцах белых беспородных крыс массой тела 300–350 г с соблюдением этических принципов Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 15.06.2006). Для развития метаболических нарушений животные в течение 6-ти недель находились на высококалорийной диете (ВКД), содержащей избыточное количество углеводов, жиров и насыщенных жирных кислот (маргарин, плавленый сыр, свиное сало и др.). В качестве питья животные получали 10 % раствор глюкозы. Калорийность ВКД составляла не менее 3500 ккал/кг. Через 6 недель при продолжающемся

получении ВКД животные были разделены на 3 группы – 2 опытные (Опыт), получавшие интраназально 1 раз в сутки ежедневно в течение 5 суток PRG или GRP в дозе 1 мг/кг и контрольную (Контроль), получавшую в те же сроки и тем же способом 0.85 % раствор NaCl. Дополнительно в экспериментах использовали нормальных здоровых крыс (Норма), которые содержались на стандартном гранулированном комбикорме (Лабораторкорм, 2950 ккал/кг) и не получали никаких препаратов. В каждой группе было по 12 животных.

Образцы крови получали через 1 час после последнего введения пептидов (или 0.85 % раствора NaCl) и через 7 суток после прекращения применения препаратов при продолжающемся содержании животных на ВКД. Взятие крови осуществляли из *v. jugularis* с использованием в качестве консерванта 3.8 % раствора цитрата натрия в соотношении кровь : консервант как 9 : 1.

В цельной крови определяли концентрацию глюкозы на биохимическом анализаторе «One Touch Horizon» (США) с использованием тест-полосок; в плазме крови – показатели суммарной (СФА) и неферментативной (НФА) фибринолитической активности на нестабилизированных пластинах фибрина, антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), агрегацию тромбоцитов (АТ), индуцированную АДФ [13], концентрацию триглицеридов энзиматическим калориметрическим методом с использованием набора реагентов фирмы «Ольвекс-Диагностикум» (Россия).

Статистическая обработка полученных данных проводилась по методу Стьюдента и с использованием непараметрических статистических критериев.

### **Результаты и их обсуждение**

Эксперименты показали, что содержание крыс на ВКД, обогащенной жирами и углеводами, в течение 6-ти недель приводило к развитию нарушений липидного и углеводного обмена: в плазме крови животных наблюдалось достоверное повышение концентрации ТГ на 84 % и глюкозы крови в 3 раза по сравнению с группой Норма (табл.1). По параметрам гемостаза у контрольной группы (животные на ВКД) отмечалась гиперкоагуляция: достоверно повысилась свертываемость крови по данным АЧТВ на 10 %, снизился фибринолиз по тестам СФА и НФА на 19 % и 15 % по сравнению с Нормой соответственно. При этом агрегация тромбоцитов в крови контрольных крыс повысилась на 30 % по сравнению с нормальными значениями.

Таблица 1

Биохимические параметры крови крыс с метаболическим синдромом (МС)  
через 1 ч после многократного интраназального введения PRG или GRP ( $M \pm m$ )

| Условие опыта              | Биохимические параметры |                      |                  |                  |                   |                  |
|----------------------------|-------------------------|----------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
|                            | СФА, мм <sup>2</sup>    | НФА, мм <sup>2</sup> | АЧТВ, с          | АТ, индекс       | ТГ, ммоль/л       | Глюкоза, ммоль/л |
| Норма (интактные крысы)    | 92.7 ± 3.6              | 66.7 ± 2.1           | 26.7 ± 0.3       | 14.2 ± 0.7       | 0.81 ± 0.08       | 3.7 ± 0.4        |
| Контроль (МС + 0.85% NaCl) | 75.5 ± 3.9<br>**        | 56.7 ± 1.9<br>**     | 24.2 ± 0.2<br>*  | 18.4 ± 0.9<br>** | 1.49 ± 0.07<br>** | 11.2 ± 0.7<br>** |
| Опыт 1 (МС + PRG)          | 79.7 ± 2.8              | 61.1 ± 2.7           | 28.7 ± 1.2<br>## | 13.5 ± 0.6<br>## | 0.47 ± 0.09<br>## | 4.8 ± 0.4<br>##  |
| Опыт 2 (МС + GRP)          | 92.6 ± 3.9<br>##        | 61.5 ± 3.8           | 25.9 ± 1.2       | 11.2 ± 0.5<br>## | 0.52 ± 0.03<br>## | 4.5 ± 0.5<br>##  |

Примечание: здесь и в табл. 2: \* –  $p < 0.05$ , \*\* –  $p < 0.01$  по сравнению с нормой; ## –  $p < 0.01$  по сравнению с контролем.

Полученные данные свидетельствовали о развитии МС в организме крыс, с которыми в дальнейшем проводились эксперименты по изучению действия пептидов на липидный обмен, уровень глюкозы крови и систему гемостаза.

Было установлено, что 5-кратное интраназальное введение пептидов PRG и GRP на фоне ВКД приводило к усилению антитромбоцитарных и антикоагулянтных свойств плазмы крови опытных животных. Так, через 1 час после последнего введения PRG или GRP в крови животных наблюдалось достоверное снижение АТ на 23 % и 39 % по сравнению с контрольными значениями соответственно (табл. 1). Сниженный уровень АТ сохранялся и через 7 сут после прекращения применения обоих пептидов на фоне продолжающегося содержания крыс на ВКД (табл. 2). Время образования сгустка по тесту АЧТВ в опытных группах при введении пептида PRG достоверно удлинялось как через 1 час, так и через 7 сут после последнего введения, на 18 % и 24 % относительно контрольных значений соответственно. Введение GRP вызывало недостоверное удлинение времени образования сгустка на 7–8 % по сравнению с контролем (табл. 1, 2).

Таблица 2

Биохимические параметры крови крыс с метаболическим синдромом (МС) через 7 сут после прекращения интраназального введения PRG или GRP ( $M \pm m$ )

| Условие опыта           | Биохимические параметры |                      |            |            |             |                  |
|-------------------------|-------------------------|----------------------|------------|------------|-------------|------------------|
|                         | СФА, мм <sup>2</sup>    | НФА, мм <sup>2</sup> | АЧТВ, с    | АТ, индекс | ТГ, ммоль/л | Глюкоза, ммоль/л |
| Норма (интактные крысы) | 90.5 ± 2.5              | 68.4 ± 4.6           | 31.2 ± 0.7 | 18.0 ± 0.9 | 0.83 ± 0.04 | 4.9 ± 0.4        |
| Контроль                |                         |                      |            |            |             |                  |

|                   |                  |                  |                  |                  |                   |                  |
|-------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-------------------|------------------|
| (МС + 0.85% NaCl) | 58.4 ± 4.0<br>** | 50.6 ± 3.5<br>** | 26.7 ± 0.7<br>** | 23.1 ± 1.3<br>*  | 1.12 ± 0.12<br>*  | 10.0 ± 0.2<br>** |
| Опыт 1 (МС + PRG) | 83.6 ± 3.5<br>## | 66.5 ± 2.2<br>## | 33.2 ± 1.3<br>## | 11.3 ± 0.5<br>## | 0.69 ± 0.06<br>## | 8.7 ± 0.5<br>#   |
| Опыт 2 (МС + GRP) | 72.4 ± 3.7<br>#  | 60.1 ± 1.5<br>#  | 28.9 ± 0.7       | 15.7 ± 0.8<br>#  | 1.05 ± 0.10       | 6.5 ± 0.4<br>##  |

Примечание: # –  $p < 0.05$  по сравнению с контролем.

Наряду с увеличением антикоагулянтной и антитромбоцитарной активности исследуемые пептиды вызвали возрастание показателей фибринолитической системы плазмы крови животных с МС. Введение PRG приводило к незначительному увеличению СФА через 1 час после введения, тогда как применение пептида GRP вызывало достоверное увеличение СФА на 23 % по сравнению с контролем. Следует отметить, что введение и пептида PRG, и пептида GRP вызывало повышение НФА плазмы крови животных, но эти отличия от контрольных значений (на 8–9 %) носили недостоверный характер (табл. 1). Через 7 сут после прекращения применения обоих пептидов наблюдалось еще более выраженное относительно контроля повышение СФА на 43 % и 31 % за счет увеличения НФА на 31 % и 20 % после применения PRG и GRP соответственно (табл. 2).

Таким образом, пептиды PRG и GRP при многократном интраназальном введении крысам с экспериментальным МС способствовали усилению антикоагулянтно-фибринолитического фона плазмы крови и снижали АДФ-вызванную агрегацию тромбоцитов. Показатели гемостаза опытных животных приближались к значениям параметров у здоровых крыс или даже превышали таковые.

Многократное интраназальное введение пептидов PRG и GRP (через 1 час после введения) вызывало значительное достоверное снижение уровня глюкозы крови на 57–60 % концентрации ТГ на 65–68 % относительно контроля (табл. 1). Гипогликемическое и гиполипидемическое действие исследованных пептидов, хотя и менее выраженное, сохранялось и через 7 сут после прекращения их применения (табл. 2). Следовательно, пептиды PRG и GRP проявляли гипогликемический и гиполипидемический эффекты в организме животных на фоне такой патологии, как МС.

Из анализа полученных данных можно утверждать, что содержание крыс на ВКД, обогащенной жирами и углеводами, приводило к нарушениям углеводного и липидного обменов веществ, в результате чего в крови повышалось содержание триглицеридов и глюкозы крови, что согласуется с ранее полученными данными [10]. Наряду с этим у таких животных отмечалось увеличение свертываемости крови, что выражалось в снижении

антиагрегационных, антикоагулянтных и фибринолитических свойств крови. Возможно, это связано с жировым перерождением артериальной стенки, развитием дисфункции эндотелия, повышением уровня факторов свертывания, в том числе тканевого фактора, с последующим развитием гиперкоагуляции [14]. Эти признаки характеризуют развитие у экспериментальных животных МС, являющегося комплексным заболеванием, затрагивающим многие системы организма [1].

Исследованные препараты пептидов в этих условиях способствовали восстановлению нормальных значений показателей глюкозы и триглицеридов крови. Это может быть обусловлено как антилипемическим и гипогликемическим действием самих пептидов, так и эффектами аминокислот, входящих в состав пептидов [5]. Возможно, исследованные пептиды способствуют, подобно природному антикоагулянту гепарину, активации липопротеидной липазы крови и уменьшению инсулинорезистентности с последующим снижением атерогенных свойств крови и нормализации уровня глюкозы [10,13].

Противосвертывающие эффекты исследованных пептидов обусловлены способностью глипролинов вызывать эндотелий-зависимую реакцию выброса в кровоток активатора плазминогена и ингибировать активность тромбина [9]. Кроме того, антиагрегационное действие исследуемых пептидов может быть обусловлено и наличием в структуре PRG и GRP аргинина, который может проявлять антиагрегационные свойства, поскольку является предшественником оксида азота [11]. Также известно, что под влиянием ряда коротких пептидов происходит усиление экспрессии генов к антитромбину III, протеину С и ТАП, а также супрессия генов тканевого фактора, в результате чего уменьшается гиперкоагуляция и стимулируется фибринолиз [14].

### **Заключение**

Таким образом, в условиях моделирования метаболического синдрома у крыс исследованные нами аргининсодержащие пептиды PRG и GRP обладают сочетанным действием на систему гемостаза, параметры липидного обмена и содержание глюкозы в крови. Введение PRG и GRP крысам с развившимся МС приводило к нормализации антикоагулянтно-фибринолитических и антиагрегационных по отношению к тромбоцитам свойств крови, а также снижению триглицеридов и глюкозы крови. Наиболее выраженным и пролонгированным действием в организме обладал пептид PRG. В перспективе эти регуляторные пептиды могут быть отнесены к терапевтическим средствам, которые одновременно обладают противосвертывающим, гипогликемическим и гиполипидемическим действием при метаболических нарушениях в организме.

## Список литературы

1. Mamedov M.N. Metabolic syndrome in Russia: prevalence, clinical peculiarities and treatment / M.N. Mamedov. – Moscow: MIG Meditsinskaya kniga, 2011. – 140 p.
2. Alessi M-C., Juhan-Vague I. Metabolic syndrome, haemostasis and thrombosis // *Thromb. Haemost.* – 2008. – Vol. 99. – P. 995-1000.
3. Kong X. Losartan and pioglitazone ameliorate nephropathy in experimental metabolic syndrome rats / X. Kong, D.Y. Zhang, H.B. Wu, F.X. Li // *Biol Pharm Bull.* – 2011. – Vol. 34, № 5. – P. 693-699.
4. Pierpaoli W., Lesnikov V.A. Effects of long-term intraperitoneal injection of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on aging- and obesity-related changes in body weight, lipid metabolism, and thyroid functions // *Curr Aging Sci.* – 2011. – № 4(1). – P. 25-32.
5. The effects of branched chain aminoacids on HDL-cholesterol in experimental animals subjected to dietary hypercholesterolemia / E. Cojocaru, C. Zamfir, N. Zamosteanu, M. Trandafirescu, C. Cotutiu // *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* – 2012. – Vol. 116, № 1. – P. 200-206.
6. Antithrombotic therapy: relationship of Indices of Inflammation and Thrombogenesis to Arrhythmia Burden in Paroxysmal Atrial Fibrillation / T. Watson, A. Arya, N. Sulke, G.Y.H. Lip // *Chest.* – 2010. – Vol. 137. – P. 869-876.
7. Longitudinal cohort study on the effectiveness of lipid apheresis treatment to reduce high lipoprotein (a) levels and prevent majoradverrse coronary events / B. Jaeger, Y Richter, D. Nagel, F. Heigl, A. Vogt, E. Roeseler, K. Parhofer, W. Ramlow, M. Koch, G. Utermann, C. Laberrere, D. Seidel // *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine.* – 2009. – Vol. 6, № 3. – P. 229-239.
8. Пептидергическая регуляция гомеостаза / В.Х. Хавинсон, И.М. Кветной В.В. Южаков и др. – СПб.: Наука, 2003. – 194 с.
9. Сравнение противосвертывающих эффектов регуляторных пролинсодержащих олигопептидов. Специфичность действия глипролинов, семакса и селанка: возможности их практического применения / Л.А. Ляпина, В.Е. Пасторова, Т.Ю. Оберган, Г.Е. Самонина, И.П. Ашмарин, Н.Ф. Мясоедов // *Изв. РАН. Сер. биол.* – 2006. – № 2. – С. 193-203.
10. Mechanism for glyproline protection in hypercholesterolemia / N.F. Myasoedov, L.A. Lyapina, M.E. Grigorjeva, T.Y. Obergan, T.A. Shubina, L.A. Andreeva // *Pathophysiol.* – 2016. – Vol. 23, № 1. – P. 27-33.
11. Beneficial effects of L-arginine-nitric oxide-producing pathway in rats treated with alloxan / A. Vasiljevi, B. Busadi, A. Kora, V. Petrovi, A. Jankovi, B. Kora // *J. Physiol.* – 2007. – Vol. 584, № 3. – P. 921-933.

12. McConnell G.K. Effects of L-arginine supplementation on exercise metabolism / G.K. McConnell // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* – 2007. – Vol. 10, № 1. – P. 46-51.
13. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови / Л.А. Ляпина, М.Е. Григорьева, Т.Ю. Оберган, Т.А. Шубина. – Москва: Адвансед солюшнз, 2012. – 160 с.
14. Эпигенетическое действие регуляторных пептидов на цитокиновый профиль и систему гемостаза / Б.И. Кузник, В.Х. Хавинсон, С.И. Тарновская, Н.С. Линькова // *Вестник гематологии.* – 2013. – Т. 9, № 2. – С. 29-33.
15. Защитные эффекты Pro-Gly-Pro-Arg в условиях повышенной свертываемости крови при экспериментальной гипергликемии / М.Е. Григорьева, Л.А. Ляпина, Т.А. Шубина, Л.А. Андреева, Т.Ю. Оберган, В.Е. Пасторова, Н.Ф. Мясоедов, А.М. Ульянов // *Тромбоз, гемостаз и реология.* – 2011. – № 3 (47). – С. 41-46.