

## ИЗУЧЕНИЕ АНТИАГРЕГАНТНОГО И АНТИТРОМБОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ 11-АМИНОКИСЛОТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ЭРИТРОПОЭТИНА, ПОЛУЧЕННЫХ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ BLAST СКРИНИНГА

Корокин М.В.<sup>1</sup>, Анциферов О.В.<sup>1</sup>, Гуреева А.В.<sup>2</sup>, Солдатов В.О.<sup>1</sup>, Корокина Л.В.<sup>1</sup>, Крупенькина Л.А.<sup>1</sup>, Авдеева Е.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, e-mail: korokin@bsu.edu.ru;

<sup>2</sup> ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», Курск

Высокий вклад сердечно-сосудистой патологии в общую структуру причин смертности и инвалидности населения развитых стран делает актуальными углубленное изучение и совершенствование методов лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Доклинические исследования *in vitro* и *in vivo* последних десятилетий продемонстрировали, что эндогенный стимулятор эритропоэза с массой 34 кДа эритропоэтин (ЭПО) обладает высокой цитопротекторной активностью, которая в основном связана с воздействием на митохондриальную дисфункцию и подтверждена на экспериментальных моделях ишемических и травматических поражений, в том числе эндотелия, миокарда и головного мозга. Появление информации о реализации тканезащитных эффектов эритропоэтина через активацию гетерокомплекса, состоящего из рецептора ЭПО и CD131, привело исследователей к идее поиска коротких молекул, имитирующих спираль эритропоэтина В для реализации цито- и атеропротекторной активности рекомбинантного эритропоэтина. В настоящем исследовании проведено изучение антиагрегантного и антитромботического действия 11-аминокислотных производных эритропоэтина – потенциальных лекарственных кандидатов для лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. В проведенном исследовании показана антиагрегантная способность у образцов пептидов с лабораторными шифрами EP-11-1 и EP-11-3, о чем свидетельствуют удлинение времени агрегации тромбоцитов и снижение ее степени. Внутрибрюшинное введение исходного пептида HBSP приводило к укорочению времени тромбообразования до полного прекращения кровотока до  $575 \pm 22,2$  с, что свидетельствует о протромбогенном эффекте соединения. Внутрибрюшинное введение исследуемых пептидов EP-11-1 и EP-11-3 приводило к статистически значимому ( $p < 0,05$ ) удлинению времени тромбообразования до полного прекращения кровотока до  $1097 \pm 40,3$  с и  $1285 \pm 57,5$  с соответственно. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии антитромботических свойств у исследуемых пептидов с шифрами EP-11-1 и EP-11-3 и их способности снижать агрегационную способность тромбоцитов.

Ключевые слова: эндотелий, эндотелиальная дисфункция, эритропоэтин, производные эритропоэтина, антиагрегантное действие.

## STUDY OF ANTI-AGGREGATE AND ANTITHROMBOTIC EFFECTS OF 11-AMINO ACID DERIVATIVES OF ERYTHROPOETIN OBTAINED USING BLAST SCREENING

Korokin M.V.<sup>1</sup>, Antsiferov O.V.<sup>1</sup>, Gureeva A.V.<sup>2</sup>, Soldatov V.O.<sup>1</sup>, Korokina L.V.<sup>1</sup>, Krupenikina L.A.<sup>1</sup>, Avdeeva E.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Belgorod State National Research University, Belgorod, e-mail: korokin@bsu.edu.ru;

<sup>2</sup>Kursk State Medical University, Kursk

The high contribution of cardiovascular pathology to the overall structure of the causes of mortality and disability in the population of developed countries remains relevant to the need for an in-depth study and improvement of methods of treatment and prevention of cardiovascular diseases. Preclinical studies *in vitro* and *in vivo* of recent decades have demonstrated that the endogenous stimulator of erythropoiesis with a mass of 34 kDa erythropoietin (EPO) has a high cytoprotective activity, which is mainly associated with the effect on mitochondrial dysfunction and has been confirmed in experimental models. ischemic and traumatic lesions, including endothelium, myocardium and brain. The emergence of information on the realization of the tissue protective effects of erythropoietin through the activation of a heterocomplex consisting of the EPO receptor and CD131 led researchers to the idea of finding short molecules that mimic the erythropoietin helix B for the implementation of the cyto- and athero-protective activity of recombinant erythropoietin. In the present study, we studied the antiplatelet and antithrombotic effects of 11-amino acid derivatives of erythropoietin, which are potential drug candidates for the treatment and prevention of cardiovascular diseases. The study showed the antiplatelet ability in peptide samples with laboratory codes EP-11-1 and EP-11-3, as evidenced by the

lengthening of the platelet aggregation time and the decrease in its degree. Intraperitoneal administration of the starting peptide - HBSP led to a shortening of the thrombus formation time to complete cessation of blood flow to  $575 \pm 22.2$  s, which indicates the prothrombogenic effect of the compound. Intraperitoneal administration of the studied peptides EP-11-1 and EP-11-3 led to a statistically significant ( $p < 0.05$ ) lengthening of the thrombus formation time to complete cessation of blood flow to  $1097 \pm 40.3$  s and  $1285 \pm 57.5$  s, respectively. The results of this study indicate the presence of antithrombotic properties in the studied peptides with codes: EP-11-1 and EP-11-3 and their ability to reduce the aggregation ability of platelets.

Keywords: endothelium, endothelial dysfunction, erythropoietin, erythropoietin derivatives, anti-aggregate effects.

Высокий вклад сердечно-сосудистой патологии в общую структуру причин смертности и инвалидности населения развитых стран делает актуальными углубленное изучение и совершенствование методов лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний. Одной из основных задач исследований в этой области является точный поиск способов профилактики и лечения атеросклеротического процесса как основной причины смертности от сердечно-сосудистых заболеваний. Атеросклеротическая окклюзия сосудов, а также тромбозы и эмболии с разрывом бляшки приводят к частичной или полной ишемии пораженного бассейна, клинические последствия которой зависят от расположения и размера сосуда.

Активация провоспалительных каскадов в макрофагах и эндотелии является важным патогенетическим звеном в атерогенезе. Активированные макрофаги склонны к повышенной генерации активных форм кислорода, повышенному поглощению холестерина и секреции цитокинов/хемокинов, что приводит к большему окислению ЛПНП, активации эндотелиальных клеток, рекрутированию моноцитов и вспениванию клеток. В этом случае окислительный стресс, модифицированные липопротеины и другие факторы (биоактивные липиды, молекулярные структуры, связанные с повреждением, цитокины) стимулируют воспаление через свои собственные рецепторы [1-4].

Исходя из имеющейся информации о патогенезе атеросклероза одним из подходов к влиянию на атерогенез является использование препаратов с цитопротекторной и митохондриально-ориентированной активностью. Доклинические исследования *in vitro* и *in vivo* последних десятилетий продемонстрировали, что эндогенный стимулятор эритропоэза с массой 34 кДа эритропоэтин (ЭПО) обладает высокой цитопротекторной активностью, которая в основном связана с воздействием на митохондриальную дисфункцию и подтверждена на экспериментальных моделях ишемических и травматических поражений, в том числе эндотелия, миокарда и головного мозга [5, 6].

Более 20 лет назад для лечения анемии, связанной с хронической болезнью почек, были разрешены лекарственные средства, стимулирующие эритропоэз. Эритропоэтин (ЭПО) является основным регулятором эритропоэза. Было показано, что терапия рекомбинантным ЭПО эффективна и безопасна для лечения анемии, связанной с хронической почечной недостаточностью. Появившиеся далее экспериментальные данные указывают на то, что

рецепторы ЭПО также широко распространены в сердечно-сосудистой системе, включая эндотелиальные, гладкие мышцы, кардиомиоциты и другие типы клеток, что обуславливает негематопозитические эффекты эритропоэтина [5]. Действительно, ЭПО потенциально оказывает положительное влияние на эндотелиоциты, включая выработку оксида азота (NO), антиапоптотические эффекты, митогенную и ангиогенную активность [6]. В то же время показано, что применение ЭПО в течение одной недели снижает стимулированный ацетилхолином синтез NO, не влияет на сосудорасширяющее действие нитропруссид натрия, что указывает на то, что сосудистые защитные эффекты ЭПО критически зависят от активации eNOS [7].

Появление информации о реализации тканезащитных эффектов эритропоэтина через активацию гетерокомплекса, состоящего из рецептора ЭПО и CD131, привело исследователей к идее поиска коротких молекул, имитирующих спираль эритропоэтина В для реализации цито- и атеропротекторной активности рекомбинатного эритропоэтина. В исследовании, опубликованном Michael Brines et al., показано, что 11-членный пептид HBSP (QEQLERALNSS), не связанный в первичной последовательности с EPO, имитирует особенности трехмерной структуры спирали эритропоэтина и проявляет тканезащитные эффекты без гемопозитической активности [8]. Также в ранее проведенных исследованиях показаны проагрегантное действие исходного пептида HBSP [9] и выраженное эндотелиопротективное действие субэритропоэтических доз рекомбинантного эритропоэтина [10, 11].

В связи с этим мы пришли к выводу, что поиск новых препаратов для лечения эндотелий-ассоциированных сердечно-сосудистых заболеваний следует продолжить среди пептидов, родственных исходному пептиду HBSP. Поиск таких соединений может быть проведен несколькими способами, включая добавление аминокислотных мотивов с заданными свойствами к аминокислотной последовательности или нахождение групп родственных пептидов исходного соединения с помощью программы BLAST. Пептиды, проанализированные в данном исследовании, были получены с применением второго подхода – скрининга с использованием программы BLAST.

Цель исследования: изучение антиагрегантного действия и антитромботических свойств следующих производных 11-членного пептида HBSP (QEQLERALNSS): EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2 (UEQLERALNCS), EP- 11-3 (UEQLERALNTS) – *in vitro* и *in vivo*.

#### **Материал и методы исследования**

Экспериментальное исследование проведено на базе НИИ фармакологии живых систем НИУ «БелГУ». Все эксперименты были одобрены Этическим комитетом НИУ «БелГУ». Вивисекцию проводили в соответствии с этическими принципами обращения с

лабораторными животными «European Convention for the Protection of Vertebral Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes. CETS No. 123».

До и во время выполнения исследования животные содержались в помещениях с искусственным освещением (режим 12 ч/12 ч) при температуре 21–23°C, влажности 38–50% и имели свободный доступ к корму и воде.

Исследование антиагрегантной активности и антитромботических свойств проведено в 2 этапа. На первом этапе *in vitro* было изучено влияние производных 11-членного пептида рНBSP (QEQLERALNSS): EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2 (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNTS) на модели АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при инкубации цельной крови с изучаемыми пептидами. Определение показателей степени агрегации тромбоцитов производилось с использованием плазмы, обогащенной тромбоцитами самцов крыс линии Wistar. Кровь забирали из брюшного отдела аорты в пробирку с 3,8%-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 с последующим добавлением исследуемых полипептидов в конечной концентрации 30 мкг/мл. Инкубировали 30 мин. Затем центрифугировали при 1000 оборотов 10 мин. После этого вносили 270 мкл обогащенной тромбоцитами плазмы в кювету агрегометра объемом 0,3 мл. Спонтанную агрегационную способность тромбоцитов изучали без добавления индуктора. При изучении АДФ индуцированной агрегации в пробирку добавляли 30 мкл динатриевой соли аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) в конечной концентрации 5 мкМ. Антиагрегантную активность определяли по методу G. Vogt [12] в модификации З.А. Габбасова на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов АЛАТ-2 «Биола» с использованием реактивов производства НПО «Ренам». Анализ проводили через 60 мин после получения крови. При графической регистрации агрегации тромбоцитов на протяжении 5 мин получали кривые, отражающие падение оптической плотности плазмы. Степень агрегации тромбоцитов оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы и времени наступления максимальной светопропускной способности и времени наступления уровня 85% от максимальной светопропускной способности.

Второй этап исследования активности 11-аминокислотных производных эритропоэтина, полученных с использованием BLAST скрининга, проведен на 50 самцах мышей линии C57Bl/6J. После прохождения 14-дневного карантинного режима мыши были стратифицированы по массе и рассажены по 10 особей в отдельные конвенциональные клетки в соответствии с принадлежностью к экспериментальной группе: 1) рНBSP (соединение рНBSP внутрибрюшинно 1 раз в день в дозе 2,5 мкг/100 г в течение 7 дней, суммарная доза 17,5 мкг/100 г); 2) EP-11-1 (соединение EP-11-1 внутрибрюшинно 1 раз в день в дозе 2,5 мкг/100 г в течение 7 дней, суммарная доза 17,5 мкг/100 г); 3) EP-11-2

(соединение EP-11-2 внутривенно 1 раз в день в дозе 2,5 мкг/100 г в течение 7 дней, суммарная доза 17,5 мкг/100 г); 4) EP-11-3 (соединение EP-11-3 внутривенно 1 раз в день в дозе 2,5 мкг/100 г в течение 7 дней, суммарная доза 17,5 мкг/100 г); 5) контроль (растворитель внутривенно 1 раз в день в течение 7 дней в эквивалентном объеме).

Исследуемые соединения вводили в концентрации 0,00025%, в качестве солюбилизатора использовали апирогенный раствор NaCl 0,9%.

Через 8 ч после последнего введения животных наркотизировали (золазепам 5 мг/100 г + ксилазин 2 мг/100 г внутривенно) и фиксировали к операционному столику абдоминальной поверхностью вверх. Затем выполняли разрез длиной 10 мм слева от срединной линии шеи, выделяли общую сонную артерию и аккуратно отделяли ее от окружающих тканей, не повреждая блуждающий нерв. С использованием ультразвукового доплерографа «Минимакс-Допплер» (Санкт-Петербург, Россия) на выделенной артерии определяли точку наилучшего сигнала, после чего прикладывали ватку, смоченную 50%-ным раствором FeCl<sub>3</sub>, и засекали время до полного прекращения сигнала. Для исключения влияния биоритмов животных брали в эксперимент последовательно по одному из каждой группы. Терминальный этап эксперимента с непосредственной оценкой времени FeCl<sub>3</sub>-индуцированного тромбообразования был выполнен последовательно в течение 2 дней. После окончания эксперимента животных эвтаназировали передозировкой наркоза (золетил 25 мг/100 г).

Статистическую обработку проводили с использованием программной среды вычислений R. Характер распределения признаков в статистической выборке определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка и критерия Шпигельхальтера (библиотека `normtest`), оценку равенства дисперсий – с помощью критерия Левене (библиотека `lawstat`). В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела–Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа, а в качестве *post-hoc* анализа для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна–Уитни соответственно, с поправкой Бенджамини–Хохберга на множественную проверку гипотез. Результаты считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### **Результаты исследования и их обсуждение**

Добавление индуктора агрегации АДФ к плазме, обогащенной тромбоцитами группы интактных животных, приводило к снижению максимальной светопропускной способности на  $123,4 \pm 3,33$  с и составляло  $36,9 \pm 1,79\%$ . Инкубирование крови с исходным пептидом rHBSF приводило к усилению агрегационных свойств тромбоцитов. Это выразилось в

укорочении времени наступления максимальной светопропускной способности плазмы до  $105,8 \pm 2,66$  с, которая составила  $48,0 \pm 1,23\%$ . Инкубирование крови с исследуемыми пептидами EP-11-1 и EP-11-3 приводило к ослаблению агрегационной способности тромбоцитов. Об этом свидетельствуют статистически значимое уменьшение максимальной светопропускной способности плазмы до  $31,5 \pm 0,85\%$  и  $30,4 \pm 0,62\%$  соответственно и отсрочивание во времени ее наступления до  $132,6 \pm 2,73$  с и  $137,5 \pm 3,80$  с соответственно (рис. 1). При этом наблюдается закономерное смещение кривой светопропускания плазмы, которая характеризует процесс агрегации тромбоцитов, вправо по отношению к группе интактных животных.

Исследуемый образец EP-11-2 на агрегационную способность тромбоцитов в проводимом эксперименте влияния не оказывал. Об этом свидетельствует отсутствие статистически достоверного отличия максимального уровня светопропускания плазмы и времени его наступления от показателей группы контрольных животных.

Закономерная тенденция наблюдается и при анализе времени наступления 85% от максимального уровня светопропускания. У образцов EP-11-1 и EP-11-3 время его наступления больше по отношению к группе интактных животных, и данное обстоятельство также способствует смещению кривой агрегационной способности тромбоцитов вправо (таблица).

Таким образом, на основании проведенного исследования выявлена антиагрегантная способность у образцов EP-11-1 и EP-11-3, о чем свидетельствуют удлинение времени агрегации тромбоцитов и снижение ее степени.

Время тромбообразования в сонной артерии у интактных самцов мышей линии C57Bl/6J от момента индукции FeCl<sub>3</sub> до полного прекращения кровотока составило  $920 \pm 43,7$  с (рис. 2).

Внутрибрюшинное введение исходного пептида rHBSP приводило к укорочению времени тромбообразования до полного прекращения кровотока до  $575 \pm 22,2$  с, что свидетельствует о протромбогенном эффекте. Внутрибрюшинное введение исследуемых пептидов EP-11-1 и EP-11-3 приводило к статистически значимому ( $p < 0,05$ ) удлинению времени тромбообразования до полного прекращения кровотока до  $1097 \pm 40,3$  с и  $1285 \pm 57,5$  с соответственно. Полученные данные свидетельствуют о наличии у исследуемых пептидов антитромбогенных свойств. Внутрибрюшинное введение образца EP-11-2 не приводило к статистически значимому изменению времени тромбообразования.

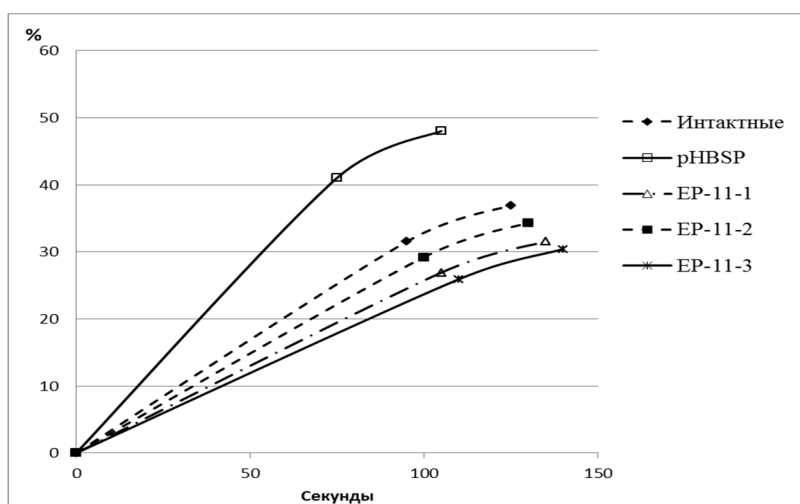


Рис. 1. Влияние исследуемых пептидов на агрегационную способность тромбоцитов

Влияние инновационных пептидов, имитирующих  $\alpha$ -спираль В эритропоэтина, на агрегационную способность тромбоцитов ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )

Группа	Время наступления		Максимальный уровень светопропускания, %
	85% от максимальной, с	Максимальная агрегация, с	
Интактные	94,0 $\pm$ 3,85	123,4 $\pm$ 3,33	36,9 $\pm$ 1,79
rHBSP	75,0 $\pm$ 2,11*	105,8 $\pm$ 2,60*	48,0 $\pm$ 1,23*
EP-11-1	104,0 $\pm$ 2,29*	132,6 $\pm$ 2,73*	31,5 $\pm$ 0,85*
EP-11-2	98,6 $\pm$ 3,76	129,9 $\pm$ 3,69	34,3 $\pm$ 0,70
EP-11-3	108,9 $\pm$ 4,00*	137,5 $\pm$ 3,80*	30,4 $\pm$ 0,62*

Примечание: \* – при  $p < 0,05$  по отношению к интактным животным.

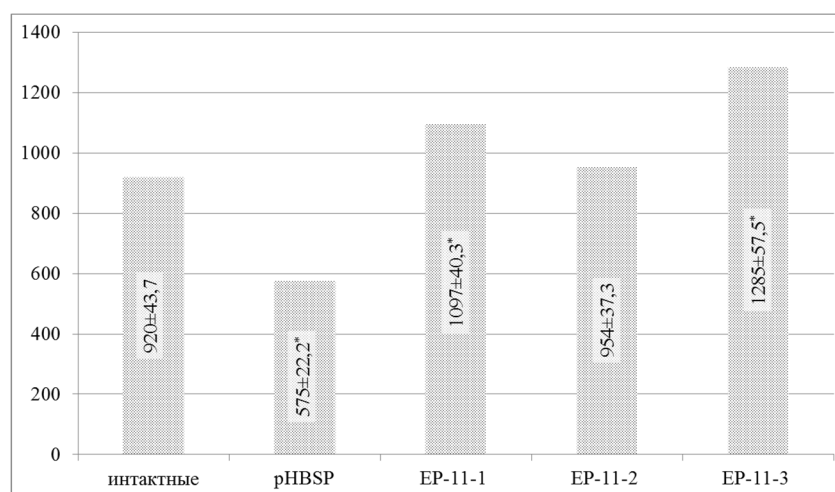


Рис. 2. Влияние исследуемых пептидов на время FeCl<sub>3</sub>-индуцированной тромботической окклюзии сонной артерии у мышей

## Заключение

В результате проведенного исследования показана антиагрегантная способность у образцов пептидов с лабораторными шифрами EP-11-1 и EP-11-3, о чем свидетельствуют удлинение времени агрегации тромбоцитов и снижение ее степени. Внутривентриальное введение исходного пептида HBSP приводило к укорочению времени тромбообразования до полного прекращения кровотока до  $575 \pm 22,2$  с, что свидетельствует о протромбогенном эффекте соединения. Внутривентриальное введение исследуемых пептидов EP-11-1 и EP-11-3 приводило к статистически значимому ( $p < 0,05$ ) удлинению времени тромбообразования до полного прекращения кровотока до  $1097 \pm 40,3$  с и  $1285 \pm 57,5$  с соответственно. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о наличии антиагрегантных свойств у исследуемых пептидов с шифрами EP-11-1 и EP-11-3 и их способности снижать агрегационную способность тромбоцитов.

*Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ № МД-757.2020.7.*

### Список литературы

1. Colin S., Chinetti-Gbaguidi G., Staels B. Macrophage phenotypes in atherosclerosis. Immunological reviews. 2014. V. 262. P. 153-166.
2. Adamson S., Leitinger N. Phenotypic modulation of macrophages in response to plaque lipids. Current opinion in lipidology. 2011. V. 22. P. 335-342.
3. Peled M., Fisher E.A. Dynamic Aspects of Macrophage Polarization during Atherosclerosis Progression and Regression. Frontiers in immunology. 2014. V. 5. P. 579.
4. Chinetti-Gbaguidi G., Staels B. Macrophage polarization in metabolic disorders: functions and regulation. Current opinion in lipidology. 2011. V. 22. P. 365-372.
5. Wright G.L., Hanlon P., Amin K., Steenbergen C., Murphy E., Arcasoy M.O. Erythropoietin receptor expression in adult rat cardiomyocytes is associated with an acute cardioprotective effect for recombinant erythropoietin during ischemia-reperfusion injury. FASEB J. 2004. V. 18 (9). P. 1031-1033.
6. Banerjee D., Rodriguez M., Nag M., Adamson J.W. Exposure of endothelial cells to recombinant human erythropoietin induces nitric oxide synthase activity. Kidney Int. 2000. V. 57 (5). P. 1895-904.
7. Sultan F., Singh T.U., Kumar T., Rungsung S., Rabha D.J., Vishwakarma A., Sukumaran S.V., Kandasamy A., Parida S. Short-term exposure of erythropoietin impairs endothelial function through inhibition of nitric oxide production and eNOS mRNA expression in the rat pulmonary artery. Pharmacol Rep. 2017. V. 69 (4). P. 658-665.



8. Brines M., Patel N.S., Villa P., Brines C., Mennini T., De Paola M., Erbayraktar Z., Erbayraktar S., Sepodes B., Thiernemann C., Ghezzi P., Yamin M., Carla C. Hand, Qiao-wen Xie, Coleman T., Cerami F. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. V. 105 (31). P. 10925-10930.
9. Puchenkova O.A., Nadezhdin, SV., Soldatov V.O., Zhuchenko M.A., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Pokrovskiy M. V. Study of antiatherosclerotic and endothelioprotective activity of peptide agonists of EPOR/CD131 heteroreceptor. *Farmatsiya i Farmakologiya*. 2020. V. 8 (2). P. 100-111.
10. Denisyuk T. Pharmacotherapeutic strategies for endothelial dysfunction correction with use of statines in syndrome of systemic inflammatory response. *Research Results in Pharmacology*. 2017. V. 3 (4). P. 35-77.
11. Денисюк Т.А., Покровский М.В. Сочетанное применение рекомбинантного эритропоэтина и статинов при эндотоксининдуцированной эндотелиальной дисфункции // *Аллергология и иммунология*. 2016. № 17 (1). С. 64-65.
12. Born G.V. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962. V. 194. P. 927-929.