ДОКЛАДЫ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК. НАУКИ О ЖИЗНИ, 2022, том 506, с. 333–337

УДК 612.115.3

УЧАСТИЕ ОКСИДА АЗОТА В РЕАЛИЗАЦИИ ГЕМОСТАТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПЕПТИДОВ ГЛИПРОЛИНОВОГО РЯДА

© 2022 г. М. Е. Григорьева[1,*], академик РАН Н. Ф. Мясоедов[2], Л. А. Ляпина[1]

Поступило 22.04.2022 г.
После доработки 06.06.2022 г.
Принято к публикации 10.06.2022 г.

В экспериментах на крысах изучено участие оксида азота в реакциях системы гемостаза на появление в крови ряда пролинсодержащих пептидов. Показано, что однократное интраназальное введение пептидов PGP, RPGP и PGPL крысам приводило к повышению фибринолитического, антикоагулянтного и антитромбоцитарного потенциала крови. Применение неселективного блокатора NO-синтаз L-NAME практически полностью ингибировало противосвертывающие эффекты эффектов глипролинов (глицил-пролил-содержащие пептиды). Установлен механизм антикоагулянтно-фибринолитического и антитромбоцитарного действия пептидов глипролинового ряда, обусловленный активацией ферментативного пути образования оксида азота. Полученные результаты позволили выявить участие оксида азота в реализации гемостатических и сосудисто-эндотелиальных функций организма.

Ключевые слова: оксид азота, L-NAME, пептиды глипролинового ряда, система гемостаза, сосудисто-эндотелиальная функция

DOI: 10.31857/S2686738922050092

Продуцируя различные биологически активные вещества, сосудистый эндотелий играет существенную роль в реализации регуляторных влияний в организме. Одним из важнейших синтезируемых эндотелием соединений является оксид азота (NO), который принимает участие в регуляции сосудистого тонуса, системы гемостаза и других физиологических систем. NO является вазодилататором, ингибитором агрегации тромбоцитов и модулирует высвобождение тканевого активатора плазминогена эндотелиальными клетками, способствует нормальному кровотоку и улучшает реологические свойства крови, что позволяет рассматривать его как значимый агент для сердечно-сосудистой системы [1–3].

Одним из основных механизмов действия NO в организме является активирование кальциевых каналов через стимуляцию цГМФ. При этом в тромбоцитах и гладких мышцах уменьшается содержание ионов кальция, принимающего активное участие во всех фазах процесса свертывания крови [2, 4]. Итогом этого являются антитромбоцитарный, противосвертывающий и вазодилататорный эффекты NO.

В организме NO образуется из L-аргинина в ходе комплексной окислительной реакции, катализируемой группой белков (ферментов) – NO-синтазами [4, 5].

В физиологических условиях сосудистый эндотелий проявляет защитное действие по отношению к гомеостазу сосудов путем его регуляции [6]. Однако при многих патологических состояниях, в том числе осложняющихся повышенной свертываемостью крови (артериальная гипертензия, сердечно-сосудистые, неврологические заболевания, метаболический синдром, сахарный диабет и др.), имеет место повреждение эндотелия и нарушаются синтез и выделение NO и возникает дисфункция эндотелия [7]. В связи с этим большую актуальность приобретает проблема нарушения при этом функционирования многих систем организма, в том числе и свертывания крови.

Ранее было показано, что пролинсодержащие пептиды оказывают антикоагулянтно-фибринолитические эффекты в плазме крови и снижают агрегацию тромбоцитов [8]. Пептиды глипролинового ряда в значительной степени активируют выброс в кровоток продуктов распада (нитратов/нитритов) оксида азота, что свидетельствует

[1] *Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия*
[2] *НИЦ "Курчатовский институт" – Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Москва, Россия*
**e-mail: mgrigorjeva@mail.ru*

о его повышенном синтезе из эндотелия [9]. Однако до сих пор в проблеме о влиянии регуляторных пептидов на сосудистый эндотелий отсутствуют систематизированные данные.

Поскольку основным путем возникновения оксида азота в организме считается его синтез из L-аргинина NO-синтазами (NOS) [5, 10], представляло интерес изучить возможность участия оксида азота в реакциях системы гемостаза на появление в крови ряда пролинсодержащих пептидов в эксперименте.

Исходя из этого цель настоящей работы заключалась в выявлении влияния пептидов глипролинового ряда Pro-Gly-Pro, Pro-Gly-Pro-Leu и Arg-Pro-Gly-Pro на изменение параметров первичного и плазменного гемостаза на фоне предварительной блокады NOS в эксперименте на крысах.

Использовали препараты пептидов Pro-Gly-Pro (PGP), Arg-Pro-Gly-Pro (RPGP) и Pro-Gly-Pro-Leu (PGPL), синтезированные в Институте молекулярной генетики (ИМГ) РАН. Для блокады NOS применяли неселективный N-нитро-L-аргинин метиловый эфир (L-NAME, Sigma, США) в дозе 10 мг/кг внутрибрюшинно предварительно за 60 мин до последнего взятия крови. Доза и время введения блокатора выбраны на основании работ, проводимых другими исследователями [11].

Исследования были разрешены Локальным этическим Комитетом по биомедицинским исследованиям ИМГ РАН (протокол № 2 от 04.06.2019) и проводились с соблюдением этических принципов работы с животными в соответствии с международной Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в эксперименте. Животные были получены из питомника “Столбовая” Московской области и содержались в стандартных условиях вивария на стандартном лабораторном рационе (стандартный гранулированный корм “Лабораторкорм”, Россия, калорийность 2950 ккал/кг).

В экспериментах было использовано 60 лабораторных белых крыс-самцов линии Wistar, разделенных на несколько групп: I группа (Опыт 1) включала 3 подгруппы (по 8 крыс в каждой), животным которых интраназально однократно вводился один из пептидов в дозе 100 мкг/кг на фоне предварительной (за 30 мин) внутрибрюшинной инъекции 0.85%-го NaCl; II группа (Опыт 2) также включала 3 подгруппы (по 8 крыс в каждой), животным которых интраназально однократно вводился один из пептидов в той же дозе на фоне предварительной (за 30 мин) инъекции L-NAME; III группа (Контроль, 8 крыс), которой вместо всех препаратов аналогичным образом в те же сроки вводился 0.85%-ный NaCl. Дозы пептидов выбраны на основании ранее проведенных нами исследований [8].

Взятие крови для исследования биохимических показателей осуществляли у животных натощак из *v. jugularis* через 30 мин после последнего введения препаратов, т.е. через 60 мин после введения L-NAME. У 8 крыс группы Опыт 2 выборочно забирали кровь перед введением пептидов, т.е. через 30 мин после применения L-NAME. В качестве консерванта использовали 3.8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении кровь: консервант как 9:1.

В богатой тромбоцитами плазме после центрифугирования крови при 250 g в течение 5 мин исследовали агрегацию тромбоцитов (АТ), индуцированную 10^{-6} М АДФ, по турбодиметрическому методу *Born* на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (BIOLA, Россия); в бедной тромбоцитами плазме, полученной после центрифугирования крови при 1200 g в течение 10 мин, определяли параметры плазменного гемостаза – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), суммарную (СФА), ферментативную (ФФА) и неферментативную (НФА) фибринолитическую активность на нестабилизированных пластинах фибрина [12].

Статистический анализ данных выполняли с помощью пакета статистических программ STATISTIKA 8.0 (StatSoft Inc., США). Оценку нормальности эмпирических распределений проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Поскольку распределение данных отличалось от нормального, применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Полученные данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (M ± m). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

В наших экспериментах однократное интраназальное введение всех исследованных пептидов без предварительного применения L-NAME (Опыт 1) приводило к возрастанию фибринолитической и антикоагулянтной активности крови и снижению агрегации тромбоцитов, вызванной АДФ. Было установлено повышение СФА на 40, 75 и 20% через 30 мин после введения PGP, RPGP и PGPL соответственно, что связано с увеличением в плазме крови как ФФА на 20, 95 и 50%, так и НФА на 50, 65 и 15% по сравнению с контрольными показателями (табл. 1). Одновременно с этим после применения PGP, RPGP и PGPL увеличивалась антикоагулянтная активность плазмы крови (по тесту АЧТВ) на 22, 30 и 10%, а также снижение АТ на 30, 18 и 12% относительно контрольных показателей. Практически все изменения исследуемых параметров гемостаза были достоверными, однако после введения PGPL наблюдалась лишь тенденция к повышению НФА и АЧТВ.

Таблица 1. Изменение параметров гемостаза через 30 мин после интраназального введения пептидов на фоне NaCl (Опыт 1) или L-NAME (Опыт 2) ($M \pm m$)

Условия опыта	СФА, мм^2	НФА, мм^2	ФФА, мм^2	АЧТВ, с	АТ, индекс
Опыт 1 (RPGP), $n = 8$	52.5 ± 0.3**	33.0 ± 0.3**	19.5 ± 0.5**	43.6 ± 2.8**	1.4 ± 0.10*
Опыт 1 (PGPL), $n = 8$	36.0 ± 0.3*	23.0 ± 0.2	15.0 ± 0.2**	36.9 ± 0.6	1.5 ± 0.08*
Опыт 1 (PGP), $N = 8$	42.0 ± 0.5**	30.0 ± 0.3**	12.0 ± 0.2*	40.9 ± 1.1**	1.2 ± 0.12**
Опыт 2 (RPGP), $n = 8$	34.4 ± 1.1$^{\#\#}$	20.2 ± 0.9$^{\#\#}$	14.2 ± 0.7*$^{\#}$	31.3 ± 4.8$^{\#\#}$	1.7 ± 0.14$^{\#\#}$
Опыт 2 (PGPL), $n = 8$	30.0 ± 0.9$^{\#}$	20.0 ± 0.9$^{\#}$	10.0 ± 0.5$^{\#}$	30.8 ± 1.7$^{\#\#}$	1.7 ± 0.14$^{\#}$
Опыт 2 (PGP), $n = 8$	30.0 ± 0.6$^{\#\#}$	21.3 ± 0.7$^{\#\#}$	8.7 ± 0.5$^{\#}$	31.2 ± 2.6$^{\#\#}$	1.6 ± 0.07$^{\#\#}$
Контроль (NaCl + NaCl), $n = 8$	30.0 ± 1.0	20.0 ± 0.7	10.0 ± 0.4	33.5 ± 1.1	1.7 ± 0.10

n – количество крыс в каждой группе. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ при сравнении показателей опытных групп по сравнению с таковыми в контрольной группе, $^{\#}$ $p < 0.05$, $^{\#\#}$ $p < 0.01$ при сравнении показателей соответствующих групп Опыта 2 (L-NAME + + пептид) и Опыта 1 (NaCl + пептид). СФА – суммарная фибринолитическая активность, НФА – неферментативная фибринолитическая активность, ФФА – ферментативная фибринолитическая активность, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, АТ – агрегация тромбоцитов.

Следующей группе крыс (Опыт 2) с целью неселективной блокады NOS вводили L-NAME за 30 мин до интраназального однократного применения одного из пептидов. На фоне предварительного использования блокатора исследование фибринолитического фона плазмы крови показало увеличение СФА на 14.6% и ФФА на 42% (в отличие от НФА) относительно контрольных показателей только после введения RPGP. Показатели фибринолитической активности крови животных, которым вводили два других пептида, практически не отличались от соответствующих показателей контрольной группы крыс.

Аналогичные тенденции были установлены при анализе антикоагулянтной активности и агрегатного состояния крови после применения всех исследованных пептидов на фоне предварительного введения L-NAME, а именно: показатели АЧТВ и АТ были сравнимы с соответствующими показателями у контрольной группы животных. При этом исследуемые показатели гемостаза в группе крыс, которым вводился каждый из пептидов на фоне предварительной блокады NOS L-NAME (Опыт 2), достоверно отличались от наблюдаемых параметров при введении только пептидов (Опыт 1).

Необходимо отметить, что внутрибрюшинное применение L-NAME само по себе оказывает влияние на систему гемостаза в сторону повышения свертываемости крови, в основном за счет выраженного состояния гипофибринолиза. Происходило снижение СФА, НФА и ФФА на 25–40% относительно контрольных значений. При этом практически не наблюдалось изменений в антикоагулянтном звене гемостаза и влияния на агрегацию тромбоцитов.

Таким образом, предварительное введение блокатора NOS L-NAME практически полностью снимало фибринолитическое, антикоагулянтное и антитромбоцитарное действие всех исследованных пептидов в организме здоровых крыс.

В связи с ростом сердечно-сосудистых и других заболеваний, связанных с нарушением функций сосудистого эндотелия, большую актуальность в настоящее время приобретает проблема изучения механизмов свертывания крови в условиях дисфункции эндотелия. Дисфункция эндотелия, как наиболее ранняя фаза повреждения сосуда, связана с дефицитом синтеза оксида азота [1].

Оксид азота обладает широким диапазоном действия, в том числе принимает участие в реализации ряда физиологических функций организма – нейротрансмиссии, ингибировании свертывания крови, регуляции тонуса мелких и средних кровеносных сосудов и структурных изменений сосудистой стенки. Продуцируемый эндотелиальной изоформой NOS оксид азота является физиологически значимым вазодилататором, ингибитором агрегации тромбоцитов и индуктором тканевого активатора плазминогена [1, 6].

Субстратом для группы ферментов NOS, под действием которых в ходе комплексной окислительной реакции образуется оксид азота, является L-аргинин. Появление в кровотоке этой аминокислоты улучшает реологические свойства крови, активирует фибринолиз, антикоагулянтную и антитромбоцитарную активность [11].

Известно также, что пролинсодержащие пептиды обладают эндотелий-зависимой реакцией экскреции в кровоток тканевого активатора плазминогена (ТАП), который участвует в процессах ферментативного фибринолиза. Кроме того, короткие регуляторные пептиды оказывают антитромбоцитарный и антикоагулянтный эффекты в организме [8, 13]. Доказана защитная роль пептидов глипролинового ряда при нарушениях функ-

ции гемостаза [14, 15]. Они в условиях моделирования у крыс МС способствовали увеличению в крови маркеров продуцирующей функции эндотелия в сторону противосвертывающих механизмов, а именно, возрастанию активности ТАП и уровня конечных метаболитов оксида азота, что свидетельствует о повышенном его синтезе из эндотелия [9].

В настоящем исследовании в экспериментах на крысах изучали участие оксида азота в реакциях системы гемостаза на появление в крови ряда пролинсодержащих пептидов. Нами было показано, что однократное интраназальное введение пептидов PGP, RPGP и PGPL крысам приводило к повышению фибринолитического, антикоагулянтного и антитромбоцитарного потенциала крови. Применение неселективного блокатора NOS L-NAME практически полностью ингибировало противосвертывающие эффекты эффектов глипролинов.

Таким образом, на основании полученных результатов было установлено, что механизм антикоагулянтно-фибринолитического действия и снижение агрегации тромбоцитов под влиянием пептидов глипролинового ряда в значительной степени связаны с образованием оксида азота. Подобным образом за счет активации NOS происходило увеличение образования NO и в других условиях, а именно при гипокинезии крыс. Так, в экспериментах авторов [16] было установлено, что применение L-NAME подавляет эффект активации синтеза NO в условиях ограничения двигательной активности до уровня, значительно ниже значения у контрольных животных [16]. Перспективность исследований проблемы NO при развитии патологических состояний связана с тем, что в организме при этом может наблюдаться либо гиперпродукция оксида азота, либо снижение его генерации [10, 17].

Полученные в настоящем исследовании результаты позволяют раскрыть роль оксида азота в функционировании не только системы гемостаза, но и в механизмах формирования и развития многих физиологических и патологических состояний организма, в том числе обусловленных изменениями в реологии крови и сосудисто-эндотелиальной функции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выносят благодарность сотруднику Института молекулярной генетики РАН Андреевой Людмиле Александровне за синтез пептидов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Giannarelli C., De Negri F., Virdis A., et al.* Nitric oxide modulates tissue plasminogen activator release in normotensive subjects and hypertensive patients // Hypertension. 2007. V. 49. № 4. P. 878–884.
2. *Гайнуллина Д.К., Софронова С.И., Тарасова О.С.* Эндотелий и оксид азота // Природа. 2014. № 9. С. 3–10.
3. *Беловол А.Н., Князькова И.И.* Функция эндотелия: фокус на оксид азота // Здоровье Украины. 2012. № 4. С. 50–51.
4. *Лупинская З.А., Зарифьян А.Г., Гурович Т.Ц., Шлейфер С.Г.* Эндотелий, функция и дисфункция. Б.: КРСУ, 2008. 373 с.
5. *Daff S.* NO synthase: structures and mechanisms // Nitric Oxide. 2010. V. 23. № 1. P. 1–11.
6. *Rodríguez C., Slevin M., Rodríguez-Calvo R., et al.* Modulation of endothelium and endothelial progenitor cell function by low-density lipoproteins: implication for vascular repair, angiogenesis and vasculogenesis // Pathobiology. 2009. V. 76. № 1. P. 11–22.
7. *Brzoska T., Tanaka-Murakami A., Suzuki Y., et al.* Endogenously generated plasmin at the vascular wall injury site amplifies lysine binding site-dependent plasminogen accumulation in microthrombi // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. P. e0122196.
8. *Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю. и др.* Пептидная регуляция метаболических процессов при гиперхолестеринемических состояниях организма // Известия РАН. Сер. Биол. 2015. № 6. С. 634–644.
9. *Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю.* Регуляция глипролинами первичного гемостаза и сосудисто-эндотелиальной функции организма при метаболическом синдроме // Тромбоз, гемостаз и реология. 2019. Т. 79. № 3. С. 32–38.
10. *Forstermann U., Sessa W.C.* Nitric oxide synthases: regulation and function // European Heart Journal. 2012. V. 33. P. 829–837.
11. *Vitecek J., Lojek A., Valacchi G., Kubala L.* Arginine-Based Inhibitors of Nitric Oxide Synthase: Therapeutic Potential and Challenges // Mediators of Inflammation. 2012. V. 2012. P. 22.
12. *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.
13. *Rengasamy K.R., Khan H., Ahmad I., et al.* Bioactive peptides and proteins as alternative antiplatelet drugs // Med. Res. Rev. 2019. V. 39. № 6. P. 2153–2171.
14. *Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., et al.* Mechanism for glyproline protection in hypercholes-

terolemia // Pathophysiology. 2016. V. 23. № 1. P. 27–33.

15. *Григорьева М.Е., Мясоедов Н.Ф., Ляпина Л.А. и др.* Состояние системы гемостаза при действии пролинсодержащих пептидов в условиях развития экспериментального метаболического синдрома // ДАН. 2018. Т. 479. № 1. С. 88–91.
16. *Zaripova R.I., Gainutdinov Kh.L., Zefirov T.L.* The effect of NO-synthase blockade on the production of nitric oxide in the hearth of rats with hypokinesia // Bull. Experim. Biol. Med. 2014. V. 157. № 5. P. 554–556.
17. *Godo S., Shimokawa H.* Endothelial Functions // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2017. V. 37. № 9. P. e108–e114.

PARTICIPATION OF NITRIC OXIDE IN THE REALIZATION OF HEMOSTATIC GLYPROLINE PEPTIDES EFFECTS

M. E. Grigorieva[a,#], Academician of the RAS N. F. Myasoedov[b], and L. A. Lyapina[a]

[a] *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[b] *Research Center "Kurchatov Institute" – Institute of Molecular Genetics of the RAS, Moscow, Russian Federation*

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

The participation of nitric oxide in the reactions of the hemostasis system to the appearance of proline-containing peptides in the blood was studied in experiments on rats. It was shown that a single intranasal administration of peptides PGP, RPGP and PGPL to rats led to an increase in fibrinolytic, anticoagulant and antiplatelet potential of blood. The use of the non-selective NO-synthase blocker L-NAME almost completely inhibited the anticoagulant effects of the glyprolines. Has been established that the mechanism of anticoagulant-fibrinolytic and antiplatelet action of glyproline peptides caused by activation of the enzymatic pathway of nitric oxide formation. The obtained results revealed the participation of nitric oxide in the implementation of hemostatic and vascular-endothelial functions of the organism.

Keywords: nitric oxide, L-NAME, glyproline peptides, hemostasis system, vascular endothelial