

УДК 612.115.03–615.273.53

ПЕПТИДЫ ГЛИПРОЛИНОВОГО РЯДА И ИХ РОЛЬ В РЕГУЛЯЦИИ СОСУДИСТО-ТРОМБОЦИТАРНОГО И ПЛАЗМЕННОГО ГЕМОСТАЗА

© 2020 г. М. Е. Григорьева^{а, *}, Л. А. Ляпина^{а, **}

^аФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234, Москва, Россия

*e-mail: mgrigorjeva@mail.ru

**e-mail: lyapinal@mail.ru

Поступила в редакцию 12.12.2017 г.

После доработки 20.11.2018 г.

Принята к публикации 03.03.2019 г.

В обзоре представлены данные литературы о значимости регуляторных пептидов в процессах гемостаза и обобщенные результаты собственных экспериментов. Показан широкий спектр действия пептидов глипролинового ряда в физиологических условиях и при моделировании патологических состояний, сопровождающихся повышенной свертываемостью крови. Описываются механизмы антикоагулянтно-фибринолитического и антитромбоцитарного действия коротких пептидов и их биологические мишени. Особое внимание уделяется регуляторной роли пептидов глипролинового ряда при различных стрессогенных воздействиях, нарушениях углеводного и липидного метаболизма в сочетании с дисфункцией системы гемостаза. Суммированные в обзоре данные о свойствах глипролиновых пептидов позволяют установить общие закономерности пептидной регуляции в организме и оценить их вклад в функционирование системы свертывания крови, поскольку борьба с тромбозами и тромбоземболиями до настоящего времени остается актуальной задачей современной физиологии и медицины.

Ключевые слова: регуляторные пептиды, агрегация тромбоцитов, антикоагулянтно-фибринолитическая активность, гиперкоагуляция

DOI: 10.31857/S0301179820020058

ВВЕДЕНИЕ

Истоки формирования концепции о регуляторной роли пептидов в организме относятся к более чем 30-летней давности и связаны с именами крупных ученых, среди которых важное место занимают И.П. Ашмарин, Н.Ф. Мясоедов, В.Х. Хавинсон, Б.И. Кузник и другие [1, 3, 22, 35, 53]. Несомненный интерес представляют короткие пролинсодержащие ди- и три-пептиды, относящиеся к продуктам гидролиза коллагена или эластина [1, 3]. Повышенная секреция гипофизом адренкортикотропного гормона (АКТГ) в организме (в частности, при стрессе) также приводит к появлению в кровотоке олигопептидов, состоящих из небольшого числа аминокислотных остатков и являющихся фрагментами АКТГ. Главная роль в действии АКТГ принадлежит его фрагменту АКТГ_{4–10}, который, как и сам гормон, оказывает позитивный эффект на процессы памяти [1]. Институтом молекулярной генетики РАН совместно с Московским университетом имени М.В. Ломоносова были предложены разработки аналогов фрагментов АКТГ. Наиболее

изученными по специфичности и механизму действия оказались короткие пептиды, содержащие последовательность АКТГ_{4–7} и АКТГ_{6–9}. На основании этих разработок Институтом молекулярной генетики РАН совместно с ООО “Пептоген” был синтезирован пептид Семакс, внедренный в клиническую практику как специфический регулятор центральной нервной системы. Он представляет собой АКТГ_{4–7} с добавлением с N-конца трипептида Pro-Gly-Pro [4].

К настоящему времени синтезированы и другие пролинсодержащие аналоги АКТГ_{4–7} с широким спектром действия в организме, способные влиять на многие гомеостатические процессы, в том числе на состояние системы гемостаза [2]. Присоединение дополнительных аминокислотных остатков к молекуле пептида или замена их внутри этой молекулы делает их более устойчивым к метаболической деградации, в результате чего пептид достигает клеток-мишеней в больших концентрациях, чем это имеет место при введении природного соединения [2].

Как известно, физиологическая регуляция, направленная на обеспечение жидкого состояния крови в кровеносном русле, осуществляется путем регуляторного взаимодействия свертывающей и противосвертывающей (ПСС) систем организма. При многих физиологических состояниях (стрессогенные воздействия, физические нагрузки, болевая реакция и т.д.) изменения в системе гемостаза могут проявляться сначала повышением свертывания крови, которое в дальнейшем переходит в гипокоагуляцию, связанную с активацией противосвертывающих механизмов. При различных гомеостатических нарушениях возникающее состояние гиперкоагуляции может быть устойчивым на протяжении длительного времени и сопровождаться дисфункцией не только системы гемостаза, но и других систем организма. Эти патологические изменения могут наблюдаться при развитии таких заболеваний, как сахарный диабет, метаболический синдром, атеросклероз, инсульт, сердечно-сосудистые заболевания, а также в условиях хронического стресса. В случае нарушения механизмов, поддерживающих атромбогенность сосуда, а также при сочетании системной и локальной гиперкоагуляции, могут возникать тромбозы, вероятность которых возрастает при стазе и/или повреждении эндотелия [22].

Характерные диагностические признаки предтромбоза – понижение антикоагулянтной и фибринолитической активности крови (как ферментативной, так и неферментативной природы), возрастание концентраций фибриногена, антиплазмина, фибринстабилизирующего фактора, агрегации тромбоцитов, ингибиторов плазмина и тканевого активатора плазминогена, понижение липопротеидной липазы крови и другие. Возникающие гомеостатические изменения способствуют развитию не только повышенной свертываемости крови, но и гипергликемии, дислипотеидемии, дисфункции эндотелия, которые относятся к факторам риска возникновения атеротромбоза в сосудистом русле [7]. При этом основную роль в развитии патологических изменений в сосудах играет холестерин липопротеидов низкой плотности (Хс-ЛПНП). Поврежденный окисленным Хс-ЛПНП эндотелий утрачивает свою способность продуцировать эндогенные вазодилататорные вещества. Вследствие этого в сосудистой зоне повреждения возникает атеросклеротическая бляшка с включенным холестерином [6]. При этом возникает глубокая депрессия антикоагулянтного и фибринолитического звеньев ПСС. Механизмы активации свертывания при различных нозологических формах патологии могут в той или иной степени отличаться друг от друга, но в конечном итоге эти процессы приводят к развитию предтромбоза, переходящего в тромбоз.

Тромбозы, как артериальные, так и венозные, представляют важную проблему современной физиологии и медицины. Следствием артериальных тромбозов является развитие таких грозных осложнений, как инфаркт миокарда, инсульт, гангрена нижних конечностей. Венозные тромбозы объединяют два тесно связанных друг с другом заболевания: тромбоз глубоких вен нижних конечностей и тромбоэмболию легочной артерии. Они часто приводят к фатальному исходу и развитию таких осложнений, как легочная гипертензия и посттромбофлебитический синдром [7]. Разработка способов профилактики и лечения указанных состояний остается актуальной до настоящего времени. Одна из задач современной физиологии и медицины – создание высокоэффективных лекарственных средств, обладающих широким спектром действия с минимальным побочным влиянием, к которым относятся и полифункциональные пептидные биорегуляторы.

РОЛЬ ПЕПТИДОВ ГЛИПРОЛИНОВОГО РЯДА В РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОСТАЗА В ФИЗИОЛОГИЧЕСКИХ УСЛОВИЯХ ОРГАНИЗМА

Ингибирующая роль пептидов в сосудисто-тромбоцитарном гемостазе

В условиях нормального кровотока тромбоциты поддерживают жидкое состояние крови, выделяя антикоагулянтные, дезагрегирующие и фибринолитические агенты [36]. При повреждении сосудистой стенки основная роль тромбоцитов заключается в образовании тромбоцитарной пробки и активации свертывания крови. Известен ряд пептидов, влияющих на адгезию и агрегацию тромбоцитов. Так, пептид Ш (фактор активации тромбоцитов) – фосфолипидный медиатор воспаления, активирующий соединительную ткань и связывающийся с актином, усиливает агрегацию тромбоцитов [44]. С другой стороны, брадикинин, появляющийся в крови при активации калликреин-кининовой системы, препятствует процессам микротромбообразования в поврежденной сосудистой стенке. При этом отмечается увеличение синтеза простаглицина, участвующего в ингибировании агрегации тромбоцитов [17].

В составе некоторых белков свертывания – тромбина, фибриногена, фибронектина, коллагена, фактора фон Виллебранда имеется общая аминокислотная последовательность Arg-Gly-Asp, за счет которой тормозится связывание белков с поверхностью тромбоцитов и снижается их адгезия и агрегация [42]. Также показано снижение агрегации тромбоцитов пептидом с последовательностью аминокислот Arg-Pro-Pro-Gly-Phe через ингибирование активности тромбина [45]. Кроме того, установлено торможение агрегации тромбо-

цитов под влиянием пептида, входящего в состав коллагена III типа, с последовательностью аминокислот Lys-Pro-Gly-Glu-Pro-Gly-Pro-Lys. Подобные пептиды вмешиваются во взаимодействие между фибриногеном и его рецептором на тромбоцитах, препятствуя агрегации и адгезии тромбоцитов [40]. Показано, что включение остатков пролина в молекулу коротких пептидов усиливает их антиагрегационные эффекты от 7 до 13 раз. Авторы считают, что подобные пептиды могут способствовать разработке эффективных антиагрегационных пептидных препаратов [49].

Также известен пептид, блокирующий связывание фибриногена с тромбоцитами, со структурой H-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-Ala-Gly-Asp-Val-OH. Он соответствует участку γ -цепи фибриногена человека (последовательность 400–411), который способствует специфическому узнаванию рецепторов тромбоцитов и за счет этого снижает их агрегацию [26]. В экспериментах на животных, а также в наблюдениях за пациентами с сердечно-сосудистыми, инфекционными, эндокринными и другими заболеваниями установлено, что Lys-Glu и Ala-Glu-Asp-Gly ликвидируют явление гиперкоагуляции и стимулируют фибринолиз, что может быть объяснено усилением под влиянием пептидов экспрессии генов к антиагрегационному III, протеину C, тканевому активатору пламиногена и супрессией генов тканевого фактора [23].

При исследовании нами широкого спектра пептидов глипролинового ряда с последовательностью аминокислот Pro-Gly-Pro, которая имеется в Семаксе, Селанке и ряде других пептидов, синтезированных в Институте молекулярной генетики РАН, а также с включением в их структуру различных аминокислот (аргинина, лейцина и др.) показано их антиагрегационное действие. В условиях *in vitro* при добавлении этих пептидов к плазме крови здоровых крыс в концентрациях от 10^{-1} до 10^{-3} мг/мл и *in vivo* в дозах от 50 до 200 мкг/кг массы тела при разных способах введения (интраназальном, внутривенном, внутрибрюшинном) в организм здоровых животных наблюдалось снижение агрегации тромбоцитов на 20–60% [30].

Возможно, антиагрегационные свойства исследованных нами коротких пептидов, содержащих глицин и пролин, обусловлены их антиагрегационным действием, способностью взаимодействовать с рецепторным аппаратом тромбоцитов, а также наличием аминокислоты пролина с концов пептидов. Кроме того, вероятно, что аргининсодержащие пептиды снижают агрегацию тромбоцитов крови в организме за счет входящего в их состав аргинина. Известно, что аргинин является предшественником оксида азота, который способствует расширению сосудов и улучшению реологических свойств крови [32]. Отмечается

высокая стабильность аргининсодержащих пептидов в организме, имеющая значение при электростатическом взаимодействии образования фибрилл коллагена [52]. Наличие антиагрегационного эффекта аналогов АКТГ может быть обусловлено и их взаимодействием с постсинаптическими рецепторами, приводящим к образованию внутриклеточной цАМФ — природного ингибитора агрегации тромбоцитов [2].

Ингибирующая роль пептидов в плазменном гемостазе

Антикоагулянтные пептиды. Степень проявления антикоагулянтного действия регуляторных пептидов в значительной мере зависит от их структурных особенностей. Наиболее эффективными ингибиторами тромбина являются соединения, комплементарные связывающему центру тромбина и обладающие жесткой вторичной структурой. К пептидам, оказывающим ингибирующее действие по отношению к тромбину, относятся фрагмент центрального участка гирудина, пептиды с аминокислотной последовательностью D-Phe-Pro-Arg [38].

Высокая антикоагулянтная активность пептидов обусловлена наличием в них таких аминокислот как пролин, аргинин, лизин. Одним из факторов, определяющих эту активность, служит присутствие в молекуле пептида последовательности Pro-Arg [57]. Установлено, что наличие в структуре пептида последовательности аминокислот Gly-Pro-Arg, идентичной N-концевой области α -цепи фибриногена, способствует ингибированию конечных стадий процесса свертывания крови. Стабилизировать структуру этого пептида удалось присоединением с C-конца аминокислоты пролин. Синтезированный таким образом тетрапептид обладал более высоким антикоагулянтным потенциалом [49].

В экспериментах *in vitro* установлена концентрационная зависимость антикоагулянтной активности исследуемых глипролинов в широком интервале концентраций от 10^{-1} до 10^{-7} мг/мл с максимумом при 10^{-1} мг/мл. В экспериментах *in vivo* на животных антикоагулянтная активность проявлялась с 1-ой мин после внутривенного введения и сохранялась в кровотоке на протяжении 60 мин, имея дозозависимый характер. При интраназальном и внутрибрюшинном введении глипролинов также отмечалась активация антикоагулянтного звена ПСС, что выражалось в удлинении времени образования сгустка по тесту АЧТВ на 30–50% [30].

Анти-(де)-фибринополимеризационные пептиды. Действие фибринопептидов и пептидов, содержащих на C-конце своих молекул аминокислотные группировки Pro-Arg или Arg-Pro, неодинаково проявляется на разных этапах самосборки молекул

фибрин-мономера. Отмечается достаточно высокая антиполимеризационная активность этих пептидов на первых этапах фибринообразования, которая в дальнейшем уменьшается и полностью исчезает. Это объясняется уменьшением центров полимеризации, с которыми взаимодействуют молекулы пептидов. Показано, что пептиды с последовательностью Gly-Pro-Arg, влияют как на ферментативную стадию свертывания, так и на стадию полимеризации. Регуляторные пептиды связываются с центральной областью молекулы фибриногена и за счет этого препятствуют гидролитическому действию тромбина. Ингибирование процесса полимеризации фибрина обусловлено и взаимодействием пептидов с периферическими D-доменами белка [25]. Известно, что содержащийся в плазме крови пептидный ингибитор самосборки фибрина, обладает антифибринополимеризационной активностью. Он образует комплексы с промежуточными продуктами самосборки фибрина и тормозит коагуляционные превращения фибриногена в фибрин под действием тромбина [9]. Наличие лизина на C-конце регуляторного пептида повышает его ингибирующее действие на ферментативную стадию фибринообразования. Блокирование Σ -аминогрупп лизина снижает активность пептида [25]. Показано также, что пептиды, содержащие Arg-Gly-Asp, ингибируют связывание фибриногена с тромбином [37].

Ранее было показано, что тетрапептиды Gly-Pro-Arg-Pro и Thr-Lys-Pro-Arg (тафцин) тормозят полимеризацию фибрина, образуя с ним комплекс за счет электростатических связей, задерживая тромбин-зависимое высвобождение фибринопептида В из молекулы фибриногена. Отмечают, что антиполимеризационная активность тафцина обусловлена главным образом последовательностью Pro-Arg на C-конце пептида [57].

В наших исследованиях установлено снижение полимеризации фибрина на 70–200% в условиях *in vitro* и *in vivo* при однократном и многократном внутривенном, интраназальном и внутрибрюшинном способах введения крысам широкого спектра пептидов глипролинового ряда, содержащих в структуре своих молекул Pro-Gly, Gly-Pro, Pro-Gly-Pro, а также дополнительные аминокислоты с N- или C-концов, такие как аргинин, лейцин, лизин и др. [29].

Фибринолитические пептиды. Показано, что иммунные пептиды тимоптин, тафцин, а также нейропептиды вазопрессин и окситоцин способны стимулировать фибринолиз в крови путем выброса в кровоток из эндотелия сосудов тканевого активатора плазминогена и ингибиторов фибринолиза [10, 1].

Известно, что регуляторные пептиды глипролинового ряда с добавленными аминокислотами

при разных способах введения (внутривенный, внутримышечный, интраназальный) ингибировали каждую из фаз процесса свертывания крови и оказывали в организме дозозависимый фибринолитический эффект [53]. Они достоверно повышали суммарную фибринолитическую активность плазмы крыс при различных способах введения здоровым животным. Детальный анализ роли пептидов при разных видах фибринолиза показал, что все они способствовали активации ферментативного фибринолиза в 2–3 раза за счет увеличения в крови активности плазмينا и тканевого активатора плазминогена. Особое внимание обращает на себя усиление активности неферментативного фибринолиза в крови после действия пептидов на 55–70% [29]. Таким образом, короткие пептиды глипролинового ряда, соединенные с различными аминокислотами и, особенно, с аргинином, в значительной степени повышают общий фибринолиз, обусловленный как ферментативной, так и неферментативной фибринолитической активностью. Вследствие этого они являются регуляторами процессов тромбообразования и растворения или лизиса образующихся в организме фибриновых сгустков.

РОЛЬ ПЕПТИДОВ ГЛИПРОЛИНОВОГО РЯДА В РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОСТАЗА ПРИ СТРЕССОГЕННЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Известно, что физиологические системы реагируют практически на любой стресс. Раздражители различной природы, превышающие физиологический уровень, вызывают закономерные реакции, направленные на приспособление к внешним воздействиям и сохранение гомеостаза [19]. При экстремальных условиях в организме инициируется секреция нескольких гормонов: кортикостерона, кортизола, катехоламинов, пролактина, вазопрессина, окситоцина, АКТГ и ренина, являющихся частью защитного механизма, направленного на выживание [58].

Система гемостаза, находящаяся под контролем нервной и эндокринной систем [20] как любой физиологический процесс, способна реагировать на стресс и регулировать выраженность стрессорного ответа, что необходимо для адаптации организма к изменяющимся условиям. При этом в зависимости от продолжительности и силы стрессора наблюдается или активация, или угнетение отдельных ее звеньев [41]. При непродолжительном (не более 30 мин) иммобилизационном стрессе установлена активация функции ПСС и возникновение в крови агентов неферментативного фибринолиза [29]. В условиях же продолжительного стресса (например, при иммобилизации длительностью 60–90 мин) активируется тромбоцитарное звено гемостаза и угнетается антикоагулянтно-фибринолитическая активность

крови, что может привести к тромботическим осложнениям [59].

В формировании компенсаторно-приспособительных реакций организма на изменение гомеостатического баланса наряду с ферментами, гормонами и другими биологически активными веществами, участвуют пептидные биорегуляторы [1, 35], в том числе пептиды глипролинового ряда [2, 53]. Применение глипролинов предотвращает или существенно ослабляет стрессогенные нарушения поведения крыс [21] и расстройство микроциркуляции в брыжейке [34]. Такие пептиды обладают прямым действием на клеточные элементы слизистой желудка, снижая воспаление [5]. Показано, что фрагмент АКТГ – Семакс и продукт протеолиза коллагена – трипептид Pro-Gly-Pro обладают антигипоксическими свойствами [1]. Семакс дополнительно проявляет анксиолитическое и антидепрессантное действие в условиях повышенного уровня тревожности и депрессивности [24]. В экспериментах на крысах с использованием теста “открытое поле”, являющегося разновидностью эмоционального стресса, применение нейрогипофизарного пептида окситоцина вызывало снижение ориентировочно-исследовательской реакции крыс и сохраняло вызванные изменения в системе гемостаза [10].

В настоящее время имеется широкий набор препаратов антидепрессантного, анксиолитического действия, однако ни один из них не является универсальным. В связи с этим актуальной задачей современной физиологии остается изучение реакций организма на стрессогенные воздействия и поиск новых препаратов для предупреждения и лечения постстрессорных нарушений в организме.

В наших экспериментах было установлено, что у крыс, подвергнутых острому или многократному иммобилизационному стрессу, возникает состояние гиперкоагуляции. Оно обусловлено усилением агрегации тромбоцитов под действием АДФ и уменьшением антикоагулянтной и фибринолитической активности плазмы крови как неферментативной, так и ферментативной природы. Предварительное интраназальное введение в течение 4–7 сут исследованных нами пептидов (Gly-Pro, Pro-Gly, Pro-Gly-Pro, Gly-Pro-Arg, Arg-Pro-Gly-Pro и Семакса) предотвращало развитие гиперкоагуляции и гипофиринолиза [11, 13]. В условиях однократной иммобилизации максимальным фибринолитическим действием обладал Gly-Pro, тогда как Arg-Pro-Gly-Pro проявлял наиболее выраженное антикоагулянтное и антитромбоцитарное действие. При многократном иммобилизационном стрессе значительным противосвертывающим действием обладал препарат Семакс, что возможно обусловлено его структурными особенностями.

В экспериментах по моделированию у животных состояния эмоционального напряжения, обусловленного появлением депрессивных компонентов поведения, был использован тест “принудительное плавание”. Через 60 мин после окончания этого теста установлены угнетение фибринолитической и антикоагулянтной активности крови и активация тромбоцитарного звена гемостаза. Пептид Arg-Pro-Gly-Pro оказывал как профилактический, так и лечебный эффекты в ответ на гиперкоагуляцию, возникающую при выполнении животными этого теста, повышая противосвертывающий потенциал крови [12].

Противосвертывающие эффекты исследуемых глипролинов объясняются известной способностью пептидов этого ряда ингибировать активность тромбина и за счет этого оказывать антикоагулянтно-фибринолитические эффекты. Возможно, это обусловлено структурными особенностями глипролинов, а именно наличием в каждом из пептидов аминокислоты глицин, которая препятствует развитию стресса, в частности, оксидативного, участвует в синтезе глутатиона, приводя к увеличению компенсаторных возможностей клетки в период окислительного стресса [51]. Антиагрегационное действие аргининсодержащих пептидов, вероятно, может быть связано с наличием в их структуре аминокислоты аргинин, которая являясь предшественником оксида азота, также может проявлять антитромбиновые и антитромбоцитарные свойства [54]. Кроме того, снижение агрегации тромбоцитов под действием исследованных нами пептидов происходит за счет их взаимодействия с рецепторами тромбоцитов, в том числе гликопротеином IIb-IIIa, с последующим их блокированием [22].

Таким образом, исследованные нами при разных стрессогенных воздействиях пептидные препараты защищали организм животных от постстрессорных нарушений, приводящих к фибрино- и тромбообразованию.

РОЛЬ ПЕПТИДОВ ГЛИПРОЛИНОВОГО РЯДА В РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОСТАЗА В УСЛОВИЯХ ГИПЕРГЛИКЕМИИ

Сахарный диабет 1-го типа занимает третье место среди тяжелых хронических заболеваний. Распространенность диабета 2-го типа повышается в мире по мере урбанизации. Одно из различий между этими типами диабета состоит в феномене инсулинорезистентности, характерном только для диабета 2-го типа, который выступает как компонент синдрома множественных метаболических нарушений. Считается, что главную роль в патогенезе всех этих нарушений играет гипергликемия [18]. С развитием сахарного диабета также наблюдаются изменения функционального состояния системы гемостаза в сторону гиперкоагу-

ляции. В основе патогенеза гипергликемии лежат нарушения микроциркуляции, которые определяют развитие таких осложнений, как острая почечная и полиорганная недостаточность, тромбозы [46, 60]. Важнейшей причиной снижения микроциркуляции является ухудшение гемореологии, обусловленное гиперагрегацией клеток крови, в том числе тромбоцитов. Возникающее при этом повышение агрегации тромбоцитов может быть связано с изменением как состава плазмы, так и свойств самих тромбоцитов [32]. При гипергликемии в плазме крови повышается количество индукторов агрегации тромбоцитов, прежде всего тромбина, становятся активными многие его рецепторы, в том числе PAR1 и PAR4 [50], которые через ряд реакций в конечном итоге приводят к усилению агрегации тромбоцитов [47]. Кроме того, гипергликемия характеризуется увеличением уровня свертывающих факторов крови и уменьшением активности антикоагулянтно-фибринолитических компонентов в организме.

Наши эксперименты осуществлялись на моделях животных с аллоксановым диабетом (сахарный диабет 1-го типа) и стойкой гипергликемией, подобной развитию диабета 2-го типа у человека. Аллоксановый диабет у крыс вызывали однократной внутривенной инъекцией аллоксана в дозе 37.5 мг/кг. Стойкую гипергликемию моделировали длительным (более 2-х недель) пероральным введением 40%-ной глюкозы. В обоих случаях возникающая гипергликемия сопровождалась депрессией функции ПСС, проявляющейся снижением суммарного и неферментативного фибринолиза, активности тканевого активатора плазминогена, повышением агрегации тромбоцитов [28].

Полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о защитных сочетанных противосвертывающих и гипогликемических эффектах глипролинов в этих моделируемых условиях. При этом в крови крыс отмечалось полное восстановление показателей функционального состояния ПСС до значений, характерных для здоровых животных. Установлены однонаправленные изменения свертывания крови: увеличение антикоагулянтной, всех видов фибринолитической (суммарной, ферментативной, неферментативной) и антитромбоцитарной активности плазмы крови при интраназальном многократном введении глипролинов животным [14, 15]. Отметим, что близкие по структуре пептиды глипролинового ряда оказывали однонаправленное действие на систему гемостаза, хотя и часто неодинаково выраженное по отношению к различным ее звеньям. Pro-Gly-Pro обладал максимальной антитромбоцитарной активностью, что приводило к 100%-ной выживаемости животных при развитии аллоксанового диабета; Gly-Pro-Arg — максимальной ферментативной фибринолитической активностью, обусловленной эндотелиза-

висимой реакцией выброса в кровоток тканевого активатора плазминогена из сосудистой стенки. Возможно, включение аргинина в состав глипролинов приводит к их стабильному антикоагулянтно-фибринолитическому эффекту, что подтверждает данные других исследователей [45, 52]. Лейцинсодержащие глипролины на фоне сахарной нагрузки также оказывали, хотя и в разной степени, гипогликемическое, антитромбоцитарное, антикоагулянтное и фибринолитическое действия ферментативной и неферментативной природы [28].

Таким образом, регуляторные пептиды глипролинового ряда, проявляя сочетанное антидиабетогенное и антитромботическое действие и не вызывая побочных отрицательных явлений, могут быть отнесены к перспективным универсальным средствам, защищающим организм от тромботических осложнений и развития сахарного диабета любого типа. Немалую роль в этих эффектах играют аргинин и лейцин, включенные в состав молекул пептидов.

РОЛЬ ПЕПТИДОВ ГЛИПРОЛИНОВОГО РЯДА В РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОСТАЗА ПРИ РАЗВИТИИ МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

Установлено, что при нарушении сложной системы нейрогуморальной регуляции обмена жиров и углеводов в организме может наблюдаться избыточное отложение жира в жировой ткани [43], что в конечном итоге приводит к повышению свертываемости крови [6, 7] и атеросклеротическим изменениям в сосудах [23, 48]. Указанные изменения, происходящие в организме, сопровождают развитие метаболического синдрома. При этом в кровотоке нарушаются функции факторов системы свертывания, увеличивается экспрессия гена PAI-1 [39], снижается содержание гепарина, повышается уровень глюкозы и артериальное давление [18]. Главную роль в развитии патологических изменений в сосудах играет холестерин липопротеинов низкой плотности (Хс-ЛПНП). Поврежденный окисленным Хс-ЛПНП эндотелий утрачивает свою способность продуцировать эндогенные вазодилататорные вещества [6].

При метаболической терапии применяют ряд лекарственных препаратов, воздействующих практически на все стадии метаболизма липидов (статины, фибраты, ингибиторы окисления жирных кислот), а также немногочисленные средства аминокислотной и пептидной (L-лизил-L-глутамил-L-триптофан) природы [31, 55, 56]. В целях коррекции нарушенных функций свертывающей и противосвертывающей систем крови при этих заболеваниях проводят также антитромботическую терапию, однако их применение ограничено крат-

косрочным действием и побочными эффектами [8, 61].

Таким образом, для современного лечения метаболического синдрома необходим многофакторный подход, поэтому актуальность поиска нетоксичных антилипемических средств, восстанавливающих метаболизм в органах и тканях и одновременно нормализующих функции гемостатической системы организма, не вызывает сомнений.

В наших экспериментах моделирование гиперхолестеринемических состояний и метаболического синдрома у крыс вызывалось их содержанием в течение 6 нед на высококалорийной диете, обогащенной жирами и углеводами, приводящими к развитию нарушений липидного обмена, ожирению, гипергликемии и гиперкоагуляции [33], что согласуется с данными литературы [43]. Возможно, эти изменения в различных системах организма связаны с ответственным за жировое перерождение артериальной стенки цитокином из семейства аларминов HMGB1 (высокомобильный хромосомальный белок 1). Под его влиянием уменьшается содержание тромбомодулина, возрастает экспрессия тканевого фактора, в результате чего в крови возникают гиперкоагуляция и тромботические осложнения [23].

Нами впервые установлены антикоагулянтно-фибринолитические и антитромбоцитарные свойства ряда глипролиновых пептидов в крови крыс с нарушениями углеводного и жирового обмена. В условиях моделирования гиперхолестеринемических состояний у крыс различные по структуре глипролины имеют не только антитромботические эффекты, но и обладают уникальным сочетанным действием на параметры жирового и углеводного обмена [16, 53]. Показано, что из всех исследованных нами пептидов, применяемых при экспериментальном метаболическом синдроме, наиболее эффективными являются АКТГ₍₆₋₉₎ Pro-Gly-Pro, Pуг-Arg-Pro и Селанк [27]. Они оказывают одновременное позитивное влияние на гемостатическую, инсулярную системы организма и липидный обмен, и проявляют сочетанное антикоагулянтное, фибринолитическое, антитромбоцитарное, гипохолестеринемическое, липолитическое и нормогликемическое действие. Как указано выше, снижение агрегации тромбоцитов под действием пептидов, может быть обусловлено их взаимодействием с рецепторами тромбоцитов с последующим ингибированием этих рецепторов [22]. Весьма вероятно, противосвертывающие эффекты пептидов можно объяснить их способностью ингибировать тромбин [45], усилить экспрессию генов к антиромбину III, протеину С, тканевому активатору плазминогена и супрессию генов тканевого фактора [23], а также вызывать эндотелий-зависимые

реакции выброса в кровоток оксида азота и тканевого активаторов плазминогена.

Обобщая полученный нами экспериментальный материал и анализируя данные литературы, необходимо отметить, что многие пептиды глипролинового ряда могут быть отнесены к терапевтическим средствам, с нормогликемическими и гиполлипидемическими свойствами, которые обладают противосвертывающим и антитромботическим действием, а также блокируют накопление новых жировых отложений в организме при нарушениях углеводного и жирового обмена. Таким образом, исследованные нами короткие пептиды глипролинового ряда могут обогатить современную метаболическую терапию и исключить возможные нежелательные последствия вмешательства в липидный метаболизм в отличие от применяемых в настоящее время медикаментов с высоким цитопротекторным эффектом (фибратов, статинов, ингибиторов β -окисления жирных кислот) [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном обзоре описаны оригинальные свойства пептидов глипролинового ряда и сформулированы основные положения их регуляторной роли в организме при физиологических и патофизиологических состояниях. Анализ результатов собственных экспериментальных исследований и данных литературы доказывает наличие у пептидов как специфической (нейропротективной, нейромодуляторной), так и универсальной (гемостазиологической, инсулиноподобной и липидемической) активности. Установлены различия в противосвертывающей эффективности пептидов глипролинового ряда, обусловленные преимущественным ингибированием разных звеньев процесса свертывания крови в организме. Пептиды обладали сочетанием антикоагулянтных, фибриндеполимеризационных, антитромбоцитарных и антифибринстабилизирующих свойств. Механизм их действия может быть как прямым, за счет наличия собственной противосвертывающей активности, так и опосредованным через взаимодействие пептидов с рецепторным аппаратом эндотелия сосудов и клеток крови. Кроме того, благодаря наличию регуляторного континуума пептидов глипролинового ряда, в организме создается непрерывность процессов регуляции и осуществления ответных физиологических реакций. Нами была продемонстрирована корректирующая роль пролин- и глицинсодержащих коротких пептидов у животных с исходно выраженной депрессией функции противосвертывающей системы (острый и многократный стресс, стойкая гипергликемия, сахарный диабет, метаболический синдром). При интраназальном введении глипролинов нормализовались сниженная антикоагу-

лянтно-фибринолитическая активность плазмы крови, повышенные агрегация тромбоцитов и активность свертывающего фактора XIIIа крови при одновременном восстановлении параметров углеводного и жирового обмена.

Исследованные нами пептиды глипролинового ряда обладают широким спектром противосвертывающих свойств. При этом их использование позволяет исключить побочные геморрагические осложнения, часто возникающие при применении сочетания антиагрегантов с антикоагулянтами. Поэтому перспективным можно считать использование в клинической практике глипролиновых пептидов, обладающих антитромбоцитарной и антикоагулянтной активностью и одновременно улучшающих реологические свойства крови. Таким образом, регуляторные олигопептиды позволяют оптимизировать имеющиеся резервы организма для восстановления его физиологических и патофизиологических функций. Они могут найти успешное применение при многих сосудистых заболеваниях, осложняющихся тромбозами и претромбозами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Ашмарин И.П.* Патологическая физиология и биохимия. Учебное пособие для вузов. М.: Экзамен, 2005. 478 с.
2. *Ашмарин И.П., Ещенко Н.Д., Каразеева Е.П.* Нейрохимия в таблицах и схемах. М.: Экзамен, 2007. 143 с.
3. *Ашмарин И.П., Каразеева Е.П., Ляпина Л.А., Самонина Г.Е.* Простейшие пролинсодержащие пептиды PG, GP, GPR и GPGG: регуляторная активность и возможные источники биосинтеза // Биохимия. 1998. Т. 63. № 2. С. 134–141.
4. *Ашмарин И.П., Левещика Н.Г., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф.* Семакс - новое лекарственное средство для коррекции кровообращения мозга, гипоксических состояний и повышения умственной трудоспособности // Фарматека. 1997. № 4. С. 32–33.
5. *Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Умарова Б.А. и др.* Исследование противовоспалительных свойств глипролинов на экспериментальной модели острого перитонита у крыс // Цитокины и воспаление. 2008. № 2. С. 11–15.
6. *Баркаган З.С., Костюченко Г.И.* Метаболически-воспалительная концепция атеротромбоза и новые подходы к терапии больных // Бюлл. СО РАМН. 2006. Т. 120. № 2. С. 132–138.
7. *Бокарев И.Н., Попова Л.В.* Современные представления о тромбофилиях // Тромбы, кровоточивость и болезни сосудов. 2014. № 13. С. 5–12.
8. *Бородулин В.И., Ланцман М.Н.* Болезни. Синдромы. Симптомы. М.: Оникс, Мир, Образование, 2006. 896 с.
9. *Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П. и др.* Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения // Мед наука и образование Урала. 2012. Т. 13. № 1. С. 163–170.
10. *Григорьева М.Е., Голубева М.Г.* Окситоцин: строение, синтез, рецепторы и основные эффекты // Нейрохимия. 2010. Т. 27. № 2. С. 93–101.
11. *Григорьева М.Е., Казанчева М.Х., Ляпина Л.А.* Противосвертывающие эффекты аргининсодержащего пептида Arg-Pro-Gly-Pro в условиях иммобилизационного стресса // Бюлл. exper. биол. и мед. 2012. Т. 154. № 12. С. 687–692.
12. *Григорьева М.Е., Ляпина Л.А.* Защитные противотромботические эффекты пептида Arg-Pro-Gly-Pro при эмоциональном напряжении в условиях принудительного плавания у крыс // Бюлл. exper. биол. и мед. 2016. Т. 162. № 9. С. 277–280.
13. *Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф.* Сравнительные исследования антикоагулянтных и фибринолитических эффектов глипролинов Gly-Pro и Gly-Pro-Arg в условиях иммобилизационного стресса // Известия РАН. Серия биол. 2009. № 5. С. 585–590.
14. *Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Шубина Т.А. и др.* Защитные эффекты Pro-Gly-Pro-Arg в условиях повышенной свертываемости крови при экспериментальной гипергликемии // Тромбоз, гемостаз и реология. 2011. Т. 47. № 3. С. 41–46.
15. *Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Шубина Т.А. и др.* Влияние пептида Pro-Gly-Pro-Leu на параметры гемостаза при экспериментальной гиперхолестеринемии // Тромбоз, гемостаз и реология. 2015. Т. 61. № 1. С. 46–50.
16. *Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Сун Ю.* Аргининсодержащие пептиды Pro-Arg-Gly и Gly-Arg-Pro: влияние на систему гемостаза, углеводный и липидный обмен у крыс с метаболическим синдромом // Современные проблемы науки и образования. 2017. № 3. С. 1–8.
17. *Гомазков О.А.* Пептиды в кардиологии: Биохимия, физиология, патология, информация, анализ. М.: Материк Альфа, 2000. 143 с.
18. *Дедов И.И., Балаболкин М.И., Марова У.И.* Болезни органов эндокринной системы. М.: Медицина, 2000. 568 с.
19. *Дубынин В.А., Каменский А.А., Сапин М.Р., Сивоглазов В.И.* Регуляторные системы организма человека. М.: Дрофа, 2003. 368 с.
20. *Зубаиров Д.М., Зубаирова Л.Д.* Микровезикулы в крови: функции и их роль в тромбообразовании. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2009. 168 с.
21. *Копылова Г.Н., Бакаева З.В., Бадмаева С.Е. и др.* Терапевтические эффекты глипролинов (GPR, GP, PG) в отношении стрессогенных нарушений поведения крыс // Бюлл. exper. биол. и мед. 2007. Т. 143. № 2. С. 124–127.
22. *Кузник Б.И.* Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство, 2010. 832 с.
23. *Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С.* Эпигенетическое действие регуляторных пептидов на цитокиновый профиль и систему гемостаза // Вестник гематол. 2013. Т. 9. № 2. С. 29–33.
24. *Левещика Н.Г., Виленский Д.А., Себенцова Е.А. и др.* Влияние семакса на эмоциональное состояние белых крыс в норме и на фоне действия холецисто-

- кина-тетрапептида // Известия РАН. Серия биол. 2010. № 2. С. 231–237.
25. *Луговской Э.В.* Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза. Киев: Наук. Думка, 2003. 223 с.
 26. *Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Комисаренко С.В.* Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Киев: Наук. Думка, 2013. 230 с.
 27. *Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю. и др.* Пептидная регуляция метаболических процессов при гиперхолестеринемических состояниях организма // Известия РАН. Серия биол. 2015. № 6. С. 634–644.
 28. *Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е. и др.* Современная концепция регуляторной роли пептидов глипролинового ряда в коррекции функции системы гемостаза при развитии сахарного диабета // Известия РАН. Серия биол. 2013. № 4. С. 1–10.
 29. *Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Оберган Т.Ю.* Функциональное состояние противосвертывающей системы при воздействии на организм пептидов Pro-Gly, Pro-Gly-Pro, семакса и тафцина в соединении с природным гепарином // Нейрохимия. 2008. Т. 25. № 1–2. С. 23–29.
 30. *Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Оберган Т.Ю. и др.* Сравнение противосвертывающих эффектов регуляторных пролинсодержащих пептидов. Специфичность действия глипролинов, Семакса и Селанка, возможности их практического применения // Известия РАН. Серия биол. 2006. № 2. С. 193–203.
 31. *Маколкин В.И.* Метаболический синдром. М.: МИА, 2010. 144 с.
 32. *Муравьев А.В.* Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). Ярославль: ЯГПУ, 2009. 178 с.
 33. *Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е.* Исследование параметров гемостаза, липидного и углеводного обмена у крыс с модифицированной моделью экспериментального метаболического синдрома // Современные технологии в медицине. 2016. Т. 8. № 4. С. 303–305.
 34. *Смирнова Е.А.* Протекторное действие глипролинов и семакса на стрессогенные нарушения микроциркуляции в брызжейке крыс: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М.: МГУ, 2004. 23 с.
 35. *Хавинсон В.Х., Квегной И.М., Южаков В.В. и др.* Пептидергическая регуляция гомеостаза. СПб: Наука, 2003. 194 с.
 36. *Шиффман Ф.Д.* Патология физиологии крови. М.; СПб.: Випом, Невский диалект, 2000. 448 с.
 37. *Abumiya T., Fitridge R., Mazur C. et al.* Integrin α IIb β 3 inhibitor preserves microvascular patency in experimental acute focal cerebral ischemia // Stroke. 2000. V. 31. P. 1402–1410.
 38. *Bajusz S., Barabas E., Fauszt J. et al.* Active site-directed thrombin inhibitors: alpha-hydroxydeyl-prolyl-arginin. New orally active stable analogs of D-Phe-Pro-Arg-H // Bioorg. Med. Chem. 1995. V. 3. № 8. P. 1079–1089.
 39. *Cesari M., Pahor M., Incalzi R.A.* Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions // Cardiovasc. Ther. 2010. V. 28. № 5. P. 72–91.
 40. *Farndale R.W., Sixma J.J., Barends M.L. de Groot P.G.* The role of collagen in thrombosis and Haemostasis // J. Thromb. Haemost. 2004. V. 2. № 4. P. 561–573.
 41. *Furay A.R., Bruestle A. E., Herman J. P.* The role of the forebrain glucocorticoid receptor in acute and chronic stress // Endocrinology. 2008. V. 149. № 11. P. 5482–5490.
 42. *Ganguly K., Krasik T., Medinilla S. et al.* Blood clearance and activity of erythrocyte-coupled fibrinolytics // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2005. V. 312. P. 1106–1113.
 43. *Gorbachisky I., Akpinar H., Assimos D.G.* Metabolic syndrome and urological diseases // Rev. Urol. 2010. V. 12. № 4. P. 157–180.
 44. *Gouwy M., Struyf S., Catusse J. et al.* Synergy between proinflammatory ligands of G protein-coupled receptors in neutrophil activation and migration // J. Leukoc. Biol. 2004. V. 76. P. 185–194.
 45. *Hasan A.A.K., Warnock M., Nieman N. et al.* Mechanisms of Arg-Pro-Pro-Gly-Phe inhibition of thrombin // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2003. V. 285. № 1. P. 183–193.
 46. *Hermanides J., Cohn D.M., Devries J.H. et al.* Venous thrombosis is associated with hyperglycemia at diagnosis: a case-control study // Thromb. Haemost. 2009. V. 7. № 6. P. 945–949.
 47. *Jackson S.P., Nesbitt W.S., Kulkarni S.* Signaling events underlying thrombus formation // Thromb. Haemost. 2003. V. 1. P. 1602–1612.
 48. *Jaeger B., Richter Y., Nagel D. et al.* Longitudinal cohort study on the effectiveness of lipid apheresis treatment to reduce high lipoprotein (a) levels and prevent major adverse coronary events // Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 2009. V. 6. № 3. P. 229–239.
 49. *Kini R., Evans H.A.* Novel approach to the design of potent bioactive peptides by incorporation of proline brackets: antiplatelet effects of Arg-Gly-Asp peptides // FEBS Lett. 1995. V. 375. № 1. P. 15–17.
 50. *Macfarlane S.R., Seatter M.J., Kanke T. et al.* Proteinase activated receptors // Pharmacol. Rev. 2001. V. 53. № 2. P. 245–282.
 51. *Martínez-Chantar M.L., Corrales F.J., Martínez-Cruz L.A. et al.* Spontaneous oxidative stress and liver tumors in mice lacking methionine adenosyltransferase 1A // FASEB J. 2002. V. 16. P. 1292–1294.
 52. *McConell G.K.* Effects of L-arginine supplementation on exercise metabolism // Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care. 2007. V. 10. № 1. P. 46–51.
 53. *Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E. et al.* Mechanism for glyproline protection in hypercholesterolemia // Pathophysiology. 2016. V. 23. № 1. P. 27–33.
 54. *Napoli C.C., Stanley W.C., Ignarro L.J.* Nutrition and cardiovascular disease: Putting a pathogenetic framework into focus // Cardiovasc. Res. 2007. V. 73. № 2. P. 253–256.
 55. *Noël J., Fouque D., Leverve X.* Application of branched-chain amino acids in human pathological states: renal failure. Branched-chain amino acids: metabolism, physiological function and application: Session IV // Am. Society for Nutrition J. Nutr. 2006. V. 136. P. 299S–307S.

56. *Pierpaoli W., Lesnikov V.A.* Effects of long-term intra-peritoneal injection of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on aging- and obesity-related changes in body weight, lipid metabolism, and thyroid functions // *Curr. Aging. Sci.* 2011. V. 4. № 1. P. 25–32.
57. *Pratt K.R., Cote H.C.F., Chung D.N.* The fibrin polymerization pocket: three-dimensional structure of a 30 kDa C-terminal γ -chain fragment complexed with the peptide Gly-Pro-Arg-Pro // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 7176–7181.
58. *Samson W.K., Bagley S.L., Ferguson A.V., White M.M.* Hypocretin/orexin type 1 receptor in brain: role in cardiovascular control and the neuroendocrine response to immobilization stress // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007. V. 292. P. R382–R387.
59. *Spiezia L., Tormene D., Pesavento R. et al.* Thrombophilia as a predictor of persistent residual vein thrombosis // *Haematologica.* 2008. V. 93. P. 479–480.
60. *Vasiljevi A., Busadi B., Kora A. et al.* Beneficial effects of L-arginine-nitric oxide-producing pathway in rats treated with alloxan // *J. Physiol.* 2007. V. 584. № 3. P. 921–933.
61. *Watson T., Arya A., Sulke N., Lip G.Y.H.* Antithrombotic therapy: relationship of Indices of Inflammation and Thrombogenesis to Arrhythmia Burden in Paroxysmal Atrial Fibrillation // *Chest.* 2010. V. 137. P. 869–876.

Glyproline Peptides and their Role in Regulation of Vascular-Platelet and Plasma Haemostasis

M. E. Grigorjeva¹, * and L. A. Lyapina¹, **

¹*Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234, Moscow, Russia*

**e-mail: mgrigorjeva@mail.ru*

***e-mail: lyapinal@mail.ru*

The review presented literature data on the importance of regulatory peptides in haemostasis processes and generalized results of their own experiments. A wide spectrum of action of glyproline peptides is shown in physiological conditions and in the modeling of pathological conditions accompanied by increased blood coagulation. The mechanisms of anticoagulant-fibrinolytic and antiplatelet action of short peptides and their biological targets are described. Particular attention is paid to the regulatory role of glyproline peptides under various stressful effects, disorders of carbohydrate and lipid metabolism in combination with dysfunction of the haemostasis system. Summarized in the review data on the properties of glyproline peptides allow us to establish general patterns of peptide regulation in the organism and evaluate their contribution to the functioning of the blood coagulation system, since the fight against thrombosis and thromboembolism is still an actual task of modern physiology and medicine.

Keywords: regulatory peptides, platelet aggregation, anticoagulant-fibrinolytic activity, hypercoagulation