ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 612.115.3:612.115.064

Влияние пептидов KKRRPGP (Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro) и KRRKPGP (Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro) на параметры гемостаза, липидный профиль, уровень глюкозы крови и изменение массы тела крыс на фоне метаболического синдрома и дисфункции эндотелия

Н.Ф. Мясоедов[1], Л.А. Ляпина[2], Т.Ю. Оберган[2,*], М.Е. Григорьева[2], Т.А. Шубина[2], Л.А. Андреева[1]

[1]Институт молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Россия, 123182, г. Москва, площадь акад. Курчатова, д. 2;
[2]Лаборатория защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова, кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12
[*]e-mail: tobergan@mail.ru

Лизин- и аргининсодержащие пептиды Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro и Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro были введены интраназальным способом (ежедневно через каждые 24 ч в течение 7 сут в дозе 100 мкг/кг) животным (лабораторным крысам) с экспериментальным метаболическим синдромом и дисфункцией эндотелия. Метаболический синдром моделировали высококалорийной диетой в течение всего периода эксперимента, дисфункцию эндотелия – внутрибрюшинной инъекцией L-NAME (ежедневно через каждые 24 ч в дозе 10 мг/кг в течение 5 сут). Пептиды вызывали противосвертывающий, гипогликемический, гиполипидемический эффекты и замедляли рост массы тела подопытных крыс. Они влияли как на первичный (сосудисто-тромбоцитарный) гемостаз, снижая агрегацию тромбоцитов, так и на все звенья плазменного гемостаза, повышая антикоагулянтную, фибриндеполимеризационную и ферментативную фибринолитическую активность, а также улучшая антифибринстабилизирующие свойства плазмы, и снижали в ней концентрацию фибриногена. Одновременно с этим исследуемые пептиды уменьшали содержание общего холестерина, холестерина липопротеидов низкой плотности и триглицеридов, увеличивая концентрацию холестерина липопротеидов высокой плотности. Указанные эффекты проявлялись через 20 ч после последнего введения пептидов и сохранялись, хотя и в меньшей степени, через 7 сут после отмены их введения. В связи с этим можно говорить о пролонгированном действии в организме обоих пептидов глипролинового ряда, которые имеют в своей структуре лизиновые и аргининовые аминокислотные остатки, и о способности данных соединений защищать организм от развития метаболического синдрома и дисфункции эндотелия. Максимальный эффект вызывал Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro что, возможно, обусловлено структурными особенностями данного пептида.

Ключевые слова: *метаболический синдром, лизин- и аргининсодержащие пептиды, дисфункция эндотелия, масса тела, уровень глюкозы, липидный профиль, система гемостаза*

Метаболический синдром (МС) – в настоящее время широко распространенная в мире патология, связанная с нарушением обмена веществ, которая способствует развитию сердечно-сосудистых заболеваний и относится к важной клинической проблеме. Основными детерминантами МС являются абдоминальное ожирение – предиктор развития сахарного диабета 2 типа, инсулинорезистентность (ИР), гипертония, гипергликемия, дислипидемия, а также отрицательное воздействие на эндотелий [1, 2]. Общим механизмом, связывающим все эти нарушения, служит взаимодействие между эндотелием и клетками, участвующими в воспалительных реакциях [3]. Чрезмерное увеличение жировой ткани при МС запускает секрецию провоспалительных цитокинов и хемокинов [4], что приводит к развитию воспалительных процессов. Ключевым для развития ИР, индуцированой ожирением, считается взаимодействие CC-хемокина – MCP-1 (моноцитарный хемоаттрактантный протеин-1) с его рецептором CCR2. Также установлено, что хемокиновый рецептор CCR5 усиливает воспалительную реакцию в жировой ткани мыши [5]. Ухудшение утилизации глюкозы и дислипидемии, которые возникают вследствие ИР, приводят к развитию диабе-

тических микро- и макрососудистых осложнений [6] и, в дальнейшем, к органным повреждениям и атеросклерозу [7–9].

При нарушениях обмена веществ часто отмечается дисфункция эндотелия, т.е. уменьшение эндотелий-зависимого расслабления артерий, опосредуемого оксидом азота (NO). NO – важный биологический медиатор, обеспечивающий нормальное функционирование сердечно-сосудистой системы, что связано с его вазодилататорным действием, торможением пролиферации гладкомышечных клеток, а также участием в процессах агрегации и адгезии тромбоцитов [10]. NO синтезируется в организме из L-аргинина NO-синтазами в ходе комплексной окислительной реакции. Обнаружено, что введение экзогенного L-аргинина больным с гиперхолестеринемией улучшает эндотелий-зависимую вазодилатацию сосудов, нарушенную окисленными липопротеидами низкой плотности, ограничивает дисфункцию эндотелия и предотвращает повышенную свертываемость крови [11].

Ранее было показано, что короткие пептиды, которые имеют в своем составе аргинин, оказывают антикоагулянтное и фибринолитическое действие на процессы гемостаза в условиях развития МС. Подобным образом действуют и лизинсодержащие пептиды [12]. В то же время доказано, что аминокислота лизин снижает среднесуточный прирост брюшного жира и потребление корма у цыплят [13]. Однако остается открытым вопрос, каково влияние аргинин- и лизинсодержащих пептидов глипролинового ряда на ряд функций организма.

Целью настоящего исследования было изучение нейтрализации нарушений гемостаза, липидного и углеводного обмена, вызванных развитием МС с углубленной дисфункцией эндотелия, под влиянием регуляторных пептидов Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro (KKRRPGP) и Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro (KRRKPGP), одновременно содержащих в своей структуре аргинин и лизин.

Материалы и методы

В настоящем исследовании использованы пептиды глипролинового ряда KKRRPGP и KRRKPGP, которые были синтезированы в Институте молекулярной генетики РАН (Москва, Россия).

В экспериментах, проведенных с соблюдением этических принципов работы с лабораторными животными и одобренных локальным этическим комитетом (Институт молекулярной генетики РАН, Москва), были использованы крысы-самцы линии Wistar массой тела 300–400 г. Животных содержали в пластиковых клетках в стандартных лабораторных условиях при искусственном освещении (12 ч/12 ч светлое/темное время), принудительной (12 раз в час) вентиляции, температуре 22–26°С и относительной влажности 50–70%.

Для индуцирования метаболических нарушений животных содержали на высококалорийной диете (ВКД), энергетическая ценность которой составляла не менее 3500 ккал/кг [14]. Состав ВКД, включающей избыток углеводов, холестерина и насыщенных жирных кислот: жир свиной (15%), манная каша на молоке (30%), мука пшеничная и хлеб (15%), сахарный песок (5%), животные жиры (25%), стандартный гранулированный комбикорм «Лабораторкорм» (Москва, Россия) (10%). В качестве питья животные получали 10%-ный раствор глюкозы.

Проведено 2 серии экспериментов.

В **первой** серии осуществляли моделирование дисфункции эндотелия введением L-NAME у крыс с МС (рис.). Для этого животные (N=32) в течение 6 нед находились на ВКД для развития метаболических нарушений, после чего, при продолжающейся ВКД, крысы (группа «МС + L-NAME», N=24) получали препарат L-NAME (Sigma, США) (метиловый эфир N-нитро-L-аргинина) внутрибрюшинно ежедневно в течение 5 сут в ежедневной дозе 10 мг/кг массы тела для индуцирования дисфункции эндотелия сосудов. Животным групп «Здоровые» (в качестве контро-

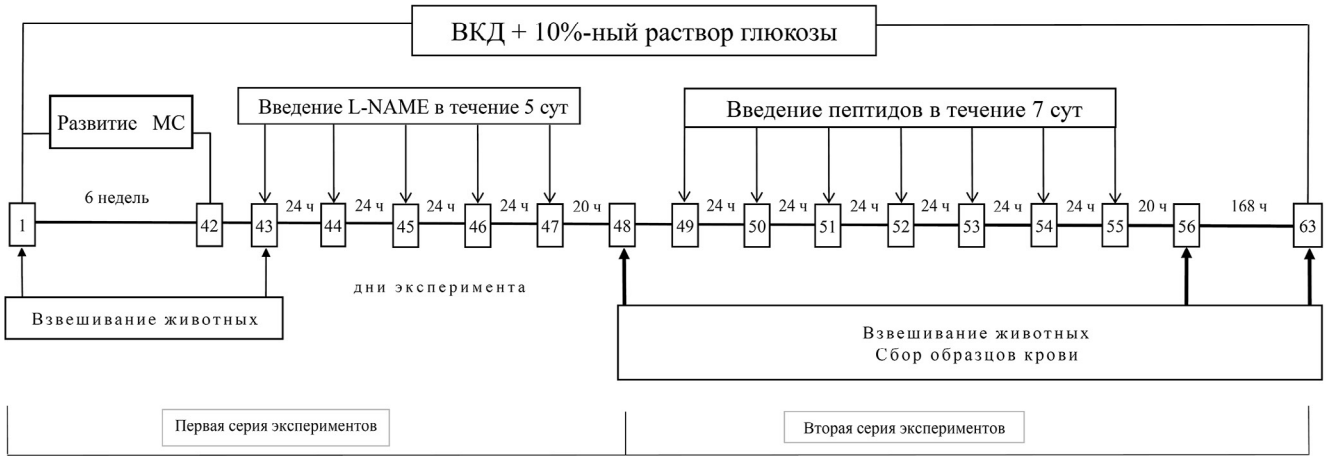

Рисунок. Схема проведения эксперимента. ВКД – высококалорийная диета, МС – метаболический синдром.

ля, N=8) и «МС» (без L-NAME, N=8) с целью сравнения параметров крови в условиях метаболических нарушений как при дополнительном введении L-NAME, так и без него в те же сроки и тем же способом вводили 0,85%-ный NaCl. Через 20 ч после последнего введения L-NAME у животных брали кровь из *v. jugularis* с использованием в качестве консерванта 3,8%-го цитрата натрия для проведения биохимических анализов. Затем животных групп «МС + L-NAME» и «Здоровые» использовали в дальнейших экспериментах.

Во **второй** серии опытов выявляли влияние на параметры гемостаза, липидного профиля, уровень глюкозы и массу тела двух пептидов KKRRPGP и KRRKPGP после их многократного интраназального введения животным с МС и дисфункцией эндотелия. Животные «МС + L-NAME» (N = 24) были разделены на 3 группы по 8 крыс в каждой: группа «МС + L-NAME» (положительный контроль) получала ежедневно в течение 7 сут один раз в сутки 0,85%-й NaCl в объеме 20 мкл; группа «МС + L-NAME + KKRRPGP» получала пептид KKRRPGP, а группа «МС + L-NAME + KRRKPGP» – пептид KRRKPGP в дозе 100 мкг/кг в 20 мкл 0,85%-ного NaCl в те же сроки и подобным же образом. Дополнительно использовали группу интактных крыс («Здоровые», отрицательный контроль), которых содержали на стандартном гранулированном комбикорме (калорийность 2950 ккал/кг). Через 20 ч после последнего (7-го) введения препаратов (56-е сут эксперимента) и через 7 сут после их отмены (63-е сут) у животных натощак забирали образцы крови из *v. jugularis* для проведения биохимических анализов.

В плазме крови определяли фибринолиз по следующим тестам: суммарной (СФА), неферментативной (или фибриндеполимеризационной – ФДПА) и ферментативной (ФФ) фибринолитической активности, активности тканевого активатора плазминогена (ТАП), времени лизиса эуглобулинового сгустка (ВЛЭС); антикоагулянтную активность по тестам: активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбинового времени, агрегации тромбоцитов (АТ), индуцированной 10^{-6} М АДФ с использованием наборов фирмы «Технология-Стандарт» (Россия); концентрацию фибриногена и активность фактора XIIIa с использованием наборов реагентов фирмы «Ренам» (Россия) [15].

Показатели липидного обмена в плазме крови исследовали энзиматическим колориметрическим методом с использованием набора реагентов фирмы «Ольвекс Диагностикум» (Россия). При этом определяли концентрации общего холестерина, холестерина липопротеидов высокой плотности (Хс-ЛПВП), холестерина липопротеидов низкой плотности (Хс-ЛПНП) и триглицеридов.

Концентрацию тощаковой глюкозы в крови определяли на биохимическом анализаторе One Touch Horison (США) с использованием специальных тест-полосок для данного прибора.

В течение эксперимента определяли массу тела животных: до начала ВКД (1-е сут), через 6 нед ВКД перед введением L-NAME (43-е сут), перед началом введения пептидов (48-е сут), а также через 20 ч (56-е сут) и спустя 7 сут (168 ч) после окончания введения пептидов (63-е сут).

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли с помощью программы STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Распределение данных оценивали по тесту Шапиро-Уилка (Shapiro-Wilk). Статистическую значимость различий определяли с использованием непараметрического критерия межгруппового сравнения Крускала-Уоллиса (Kruskal-Wallis).

Результаты и обсуждение

Первая серия экспериментов. Показатели гемостаза, липидного профиля, уровня глюкозы крови и масса тела при моделировании у крыс с МС дисфункции эндотелия. Известно, что при развитии МС у крыс происходит повышение концентрации холестерина, триглицеридов, глюкозы крови, развивается ожирение, а также активируются процессы коагуляции крови. Как видно из данных табл. 1, содержание крыс в течение 6 нед на ВКД приводило к развитию гиперкоагуляции в крови животных группы «МС»: повысилась свертываемость крови по тесту АЧТВ на 11,5%, тромбиновое время – на 8,7%, активность FXIIIa – на 20%, концентрация фибриногена – на 50%, снизился фибринолиз по данным оценки СФА, ФДПА, ФФ, активности ТАП, ВЛЭС – на 36, 40, 42, 28, 83% соответственно; АТ повысилась на 15% по сравнению с контролем (здоровые животные). На этом фоне введение препарата L-NAME способствовало еще более значительной гиперкоагуляции и гипофибринолизу в крови крыс. Так, АТ и активность фактора XIIIa повысились на 39% и 13%, АЧТВ укоротилось на 20%, а показатели фибринолиза снизились на 21–30% по сравнению с группой «МС». При этом в обеих группах с МС (с L-NAME и без него) отмечено достоверное повышение концентрации общего холестерина, триглицеридов, Хс-ЛПНП и снижение концентрации Хс-ЛПВП по сравнению с контролем (хотя различия между группами «МС» и «МС + L-NAME» были недостоверны). Кроме того, прирост массы тела с 43-х по 48-е сут эксперимента в группах «МС» и «МС + L-NAME» превышал этот показатель на 32% и 19% соответственно, по сравнению с группой «Здоровые». Полученные данные свидетельствовали о наличии МС и дисфункции эндотелия в организме крыс, которым в дальнейшем проводили терапию пептидами.

Вторая серия экспериментов. Влияние пептидов KKRRPGP , KRRKPGP на параметры гемостаза, липидного профиля, уровень глюкозы крови и мас-

су тела после их многократного интраназального введения при дисфункции эндотелия (введение L-NAME) на фоне МС. На 56-е сут эксперимента через 20 ч после 7-го введения пептидов KKRRPGP и KRRKPGP у крыс групп «МС + L-NAME + KKRRPGP » и «МС + L-NAME + KRRKPGP» в плазме крови повышался фибринолиз: СФА – на 87% и 113% соответственно, ФДПА – на 94% и 110%, ФФ – на 58%, активность ТАП – на 16% и 57%, активность плазмина – на 57% и 151%, а ВЛЭС сокращалось на 15% и 42% по сравнению с «МС + L-NAME» (положительный контроль). Максимальным эффектом обладал препарат KRRKPGP. Одновременно применение указанных пептидов вызывало снижение концентрации фибриногена и активности фактора XIIIa на 29% и 18% соответственно, относительно «МС + L-NAME». Также отмечено наличие у KKRRPGP и KRRKPGP антифибринстабилизирующего действия, т.е. снижение активности фактора XIIIa на 40% и 38% относительно контроля (табл. 2).

При этом интраназальное введение и KKRRPGP, и KRRKPGP приводило к изменению показателей липидного профиля. Так, через 20 ч после последнего введения пептидов в крови животных выявлено достоверное снижение концентрации общего холестерина (на 23–26%), Хс-ЛПНП – на 59% (KKRRPGP) и 66% (KRRKPGP), триглицеридов – на 52% (KKRRPGP) и 63% (KRRKPGP), а также повышение Хс-ЛПВП на 21% (KKRRPGP) и 46% (KRRKPGP) относительно контроля.

Следует отметить, что у животных после введения обоих пептидов параметры гемостаза (АЧТВ, активность фактора XIIIa, СФА, ФДПА, ФФ, ВЛЭС) и липидного профиля (ОХ и Хс-ЛПВП) были близки к значениям, наблюдаемым у здоровых крыс.

На 63-е сут эксперимента, т.е. через 7 сут (168 ч) после прекращения применения пептидов на фоне продолжающейся ВКД в группах «МС + L-NAME + KKRRPGP» и «МС + L-NAME + KRRKPGP» сохранялась повышенная фибринолитическая активность плазмы крови животных. Так, СФА на 38% (KKRRPGP) и 48% (KRRKPGP) превышала значение этого показателя в контроле (22,5 ± 0,7 мм^2), ФДПА была выше на 24% и 56% соответственно (15,2 ± 0,9 мм^2 в контроле); ФФ – на 55% и 81% (7,4 ± 0,9 мм^2 в контроле); активность плазмина – на 296% (KRRKPGP) по сравнению с контролем «МС+L-NAME» (9,5 ± 1,0 мм^2 в контроле). Также выявлено снижение активности фактора XIIIa – на 36% (KKRRPGP) и 26% (KRRKPGP) относительно контрольных значений (95 ± 5,0 усл.ед.) и достоверное падение агрегации тромбоцитов под влиянием пептида KRRKPGP на 27% по сравнению с группой «МС+L-NAME» (2,2 ± 0,3 усл.ед.). В этот период времени концентрация Хс-ЛПНП в крови животных сохраняла пониженные значения и составляла 53% (KKRRPGP) и 56% (KRRKPGP) относительно

Таблица 1

Изменение параметров гемостаза, липидного профиля, уровня глюкозы и прироста массы тела через 20 ч после 5-кратного внутрибрюшинного введения крысам L-NAME (10 мг/кг) на фоне развития МС (M ± m)

Параметры	Здоровые крысы (контроль)	МС	МС + L-NAME
АТ, индекс	2,03 ± 0,8	2,3 ± 0,4	3,2 ± 0,6$^{\#\#,*}$
АЧТВ, с	31,5 ± 3,7	27,9 ± 2,2$^{\#}$	22,3 ± 1,2$^{\#\#,*}$
Тромбиновое время, с	18,4 ± 0,8	16,8 ± 0,9 $^{\#}$	17,1 ± 1,1$^{\#}$
СФА, мм^2	36,0 ± 0,9	23,0 ± 0,5$^{\#\#}$	18,1 ± 0,9$^{\#\#,*}$
ФДПА, мм^2	23,0 ± 0,3	13,8 ± 0,5$^{\#\#}$	9,7 ± 0,6$^{\#\#,**}$
ФФ, мм^2	16,0 ± 1,1	9,3 ± 0,9$^{\#\#}$	6,8± 0,7$^{\#\#,**}$
Активность ТАП, мм^2	42,0 ± 10,6	30,2 ± 4,0	28,4 ± 0,9$^{\#}$
ВЛЭС, мин	62,3 ± 2,3	114,6 ± 11,3$^{\#\#}$	92,4 ± 2,2$^{\#\#,*}$
Активность плазмина, мм^2	38,0 ± 3,5	38,8 ± 2,7	35,4 ±4,3
Фактор XIIIa, усл.ед./мл	71,7 ± 5,1	86,0 ± 1,9$^{\#}$	97,5 ± 2,4$^{\#\#,*}$
Концентрация фибриногена, г/л	3,8 ± 0,4	5,7 ± 0,2$^{\#\#}$	4,5 ± 0,2$^{\#,*}$
Уровень глюкозы, ммоль/л	3,9 ± 0,3	5,5 ± 0,45$^{\#}$	6,9 ± 0,5$^{\#\#,**}$
Общий холестерин, ммоль/л	1,939 ± 0,184	2,542 ± 0,175$^{\#}$	2,601 ± 0,214$^{\#\#}$
Хс-ЛПВП, ммоль/л	1,204 ± 0,184	0,989 ± 0,076$^{\#}$	0,891 ± 0,089$^{\#}$
Хс-ЛПНП, ммоль/л	0,735 ± 0,038	1,582 ± 0,193$^{\#\#}$	1,651 ± 0,129$^{\#\#}$
Триглицериды, ммоль/л	0,375 ± 0,075	1,409 ± 0,119$^{\#\#}$	1,383 ± 0,116$^{\#\#}$
Прирост массы тела за время введения L-NAME (с 43 по 48-е сут), г	4,8 ±0,57	6,33 ± 0,49$^{\#\#}$	5,71±0,56$^{\#,*}$

Примечание: # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ – статистическая значимость различий по сравнению с контролем («Здоровые крысы»); * $p < 0,05$, ** $p < 0,1$ – статистическая значимость различий между группами «МС» и «МС + L-NAME»; M – среднее, m – стандартная ошибка среднего.

Обозначения: АТ – агрегация тромбоцитов, АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, СФА – суммарная фибринолитическая активность, ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, ФФ – ферментативный фибринолиз, ТАП – тканевой активатор плазминогена, ВЛЭС – время лизиса эуглобулинов, Хс-ЛПНП – холестерин липопротеидов низкой плотности, Хс-ЛПВП – холестерин липопротеидов высокой плотности

контроля (0,854 ± 0,046 ммоль/л). Отмечено дальнейшее уменьшение концентрации триглицеридов до 35% (KKRRPGP) и до 31% (KRRKPGP) относительно «МС+L-NAME» (1,449 ± 0,128 ммоль/л). При этом после отмены применения пептидов KKRRPGP и KRRKPGP параметры гемостаза и липидного обмена приближались, хотя и в разной степени, к значениям, соответствующим таковым у здоровых животных.

Учитывая, что развитие МС сопровождается гипергликемией, определение концентрации глюкозы в крови животных с данной патологией после введения исследуемых пептидов представляет особый интерес. Из применяемых препаратов максимальный гипогликемический эффект был обнаружен после введения KRRKPGP (66% относительно группы «МС+L-NAME» через 20 ч после последнего введения пептида и 88% – через неделю после его отмены на фоне продолжающейся ВКД), в то время как пептид KKRRPGP слабо влиял на изменение уровня глюкозы (табл. 2).

Наблюдая в течение эксперимента изменение массы тела крыс, мы установили, что через 20 ч после последнего введения пептидов (56-е сут) или прирост массы тела с 48-х по 56-е сут эксперимента не наблюдался (KRRKPGP), или крысы даже худели (KKRRPGP) (табл. 2). За 7 сут после отмены применения пептидов (63-е сут) прирост массы тела в группах «МС+L-NAME + KKRRPGP» и «МС+L-NAME + KRRKPGP» составил –4,0±0,5 г и –9,2±1,2 г (животные худели), в группе «Здоровые» – +4,0 ± 0,4 г, а животные контрольной группы «МС+L-NAME» поправились на 9,8 ± 2,1 г.

При МС возникает абдоминальное ожирение в сочетании с повышенным уровнем глюкозы натощак, ИР, повышенным кровяным давлением и липидами плазмы [1–3, 5]. Это ключевые факторы риска развития сахарного диабета 2-го типа, а также сердечно-сосудистых осложнений и смертности. Установлено, что дисфункция эндотелия, повышение активности тромбоцитов и ИР служат причиной хронического метаболического воспаления [16]. При этом отмечают снижение продукции NO и нарушение эндотелий-зависимой вазодилатации [17]. Это объясняется гиперактивацией β-адренорецепторов клеток эндотелия, что приводит к усилению синтеза медиаторов воспаления, нарушению трансдукции инсулинового сигнала через путь PI3K-Akt и уменьшению активации эндотелиальной синтазы eNOS [18, 19]. Также показано, что длительное воздействие на клетки эндотелия высоких уровней глюкозы индуцирует клеточную дисфункцию [4], производство CCR5 и его лигандов [20].

Ранее нами было показано, что у животных с экспериментальным МС наблюдается уменьшение уровня метаболитов (нитратов и нитритов) синтеза NO, что свидетельствует об угнетении функции эндотелия [21]. В настоящей работе введение крысам с МС препарата L-NAME (широко используемого ингибитора eNOS [22]) приводило к усугублению гиперкоагуляции, проявляющейся значительным возрастанием агрегации тромбоци-

Таблица 2

Изменение параметров гемостаза, липидного профиля, уровня глюкозы и прироста массы тела крыс через 20 ч после 7-кратного интраназального введения пептидов KKRRPGP и KRRKPGP в ежедневной дозе 100 мкг/кг на фоне дисфункции эндотелия (введение L-NAME) при развитии метаболического синдрома (M ± m)

Параметры	Здоровые крысы	МС+ L-NAME (Контроль)	МС+ L-NAME + KKRRPGP	МС+ L-NAME + KRRKPGP
АТ, индекс	1,6 ± 0,2*	2,1 ± 0,5	1,9 ± 0,5#	2,1 ± 0,2#
АЧТВ, с	39,8 ± 3,2*	36,7 ± 1,2	39,8 ± 0,6	38,7 ± 2,5
Тромбиновое время, с	24,1 ± 2,1*	19,4 ± 0,1	26,2 ± 0,9*	28,0 ± 0,6**
СФА, мм^2	36,0 ± 0,7**	19,6 ± 1,0	36,6 ± 0,1**	41,8 ± 0,9**
ФДПА, мм^2	22,6 ± 0,7**	10,4 ± 0,9	22,0 ± 0,7**	20,6 ± 0,7**
ФФ, мм^2	13,3 ± 0,9*	9,2 ± 1,0	14,6 ± 0,9**	14,6 ± 0,9**
Активность ТАП, мм^2	55,8 ± 5,3**	25,0 ± 1,2	29,0 ± 1,1*	39,2 ± 1,1**
ВЛЭС, мин	58,0 ± 9,2**	106,0 ± 6,9	90,5 ± 7,6	61,6 ± 5,0*
Активность плазмина, (мм^2	33,0 ± 2,1**	7,0 ± 1,2	11,0 ± 1,1*	17,6± 1,6**
Фактор XIIIa, усл.ед./мл	65,0 ± 2,9**	112,4 ± 4,0	67,2 ± 2,7**	70,0 ± 7,2**
Концентрация фибриногена, г/л	3,5 ± 0,2**	5,75 ± 0,2	4,1 ± 0,7*	4,7 ± 0,3**
Уровень глюкозы, ммоль/л	3,7 ± 0,2**	6,8 ± 0,3	5,9 ± 0,5	4,5 ± 0,7**
Общий холестерин, ммоль/л	1,191± 0,041**	1,593 ± 0,093	1,180 ± 0,048**	1,231 ± 0,045**
Хс-ЛПВП, ммоль/л	0,759 ± 0,026*	0,659 ± 0,035	0,798 ± 0,033*	0,963 ± 0,033**
Хс-ЛПНП, ммоль/л	0,454 ± 0,022*	0,935 ± 0,205	0,382 ± 0,042*	0,319 ± 0,048*
Триглицериды, ммоль/л	0,515 ± 0,072**	1,622 ± 0,159	0,777 ± 0,073**	0,604 ± 0,037**
Прирост массы тела за время введения пептидов (с 48 по 56-е сут), г	6,2 ± 0,49*	7,2 ± 0,86	– 1,5 ± 1,45**	0,17 ± 0,97**

Примечание: # $p < 0,05$, ## $p < 0,1$ – статистическая значимость различий по сравнению с группой «Здоровые»; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ – статистическая значимость различий по сравнению с группой «МС + L-NAME».

Обозначения: см. табл. 1.

тов и ослаблением антикоагулянтно-фибринолитического потенциала крови.

Нами впервые показано, что на фоне развития метаболических нарушений, сочетающихся с дисфункцией эндотелия, многократное интраназальное введение аргинин- и лизинсодержащих пептидов животным восстанавливает нарушенные функции эндотелия, гемостатической системы, липидного и углеводного обмена. Об этом свидетельствовало повышение в крови активности ТАП, выделяющегося из эндотелия под влиянием исследуемых пептидов. При этом отмечалась активация функции противосвертывающей системы, на что указывало повышение антикоагулянтной и фибринолитической активности плазмы крови. ФДПА (или неферментативная фибринолитическая) активность плазмы животных характеризует ее способность предотвращать процессы начинающегося фибрино- или тромбообразования. Это можно объяснить присутствием в пептидах аминокислоты лизин, которая, облегчая фибринолитические процессы в кровотоке, способствует нормальному кровоснабжению тканей [23]. В более ранних работах с пептидными препаратами был установлен антифибринстабилизирующий эффект коротких пролинсодержащих пептидов (Pro-Gly, Pro-Gly-Pro), т.е. подавление полимеризации фибрина [14, 24]. Исследуемые нами более сложные пептиды глипролинового ряда, содержащие в своей структуре аргинин и лизин, также снижают уровень свертывающих факторов крови – фактора XIIIa, фибриногена и тромбина. Кроме того, они положительно влияют на углеводный обмен, снижая уровень глюкозы крови, и на липидный обмен, снижая концентрацию преатерогенного Хс-ЛПНП и триглицеридов, поэтому у таких крыс не только не наблюдалось ожирения, как это было у животных с МС, а напротив, масса тела снижалась к концу эксперимента даже при потреблении крысами высококалорийного корма. Ранее нами было показано, что интраназальное введение аргининсодержащего пептида PGPR приводит к ослаблению резистентности к инсулину при гипергликемии [25]. Возможно, исследованные пептиды KKRRPGP и KRRKPGP также способствуют уменьшению ИР и увеличению активности липопротеидной липазы крови, снижению атерогенных свойств крови и восстановлению уровня глюкозы до значений, соответствующих норме, поскольку подобные эффекты установлены для других глипролинов [26].

На основании проведенного исследования можно заключить, что лизинсодержащие пептиды при многократном ежедневном интраназальном введении в дозе 100 мкг/кг животным с дисфункцией эндотелия на фоне МС оказывают противосвертывающий, гипогликемический, гиполипидемический эффекты и снижают прирост массы тела. Пептиды влияют как на первичный (сосудисто-тромбоцитарный) гемостаз, снижая агрегацию тромбоцитов, так и на все звенья плазменного гемостаза, повышая антикоагулянтную, фибриндеполимеризационную и ферментативную фибринолитическую активность, а также антифибринстабилизирующие свойства плазмы и снижают в ней концентрацию фибриногена. Одновременно с этим исследуемые пептиды уменьшают содержание общего холестерина, Хс-ЛПНП, триглицеридов и увеличивают концентрацию Хс-ЛПВП. Эти эффекты проявляются через 20 ч после последнего введения пептидов и сохраняются, хотя и в меньшей степени, и через 7 сут после отмены их введения, поэтому можно говорить о длительности действия в организме обоих пептидов глипролинового ряда, включающих в свою структуру лизиновые остатки, и об их способности защищать организм от развития МС и дисфункции эндотелия. Максимальный эффект вызывает пептид KRRKPGP, что, возможно, обусловлено местонахождением аминокислотных остатков аргинина между двумя остатками лизина. В результате протеолиза исследуемых в данной работе пептидов могут образовываться разные дериваты – короткие пептиды и аминокислоты, обладающие разной биологической активностью Возможно, в результате биодеградации KRRKPGP повышается биодоступность аргинина, входящего в состав этой молекулы.

Таким образом, оба препарата регуляторных пептидов в перспективе могут оказать положительное корригирующее действие при развитии предтромбозов, дисфункции эндотелия, нарушений обмена веществ в организме.

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме № АААА-А16-16021660094-0 «Физиологические регуляторы свертывающей и противосвертывающей систем в норме и при патологии» на базе ФГБУ Института молекулярной генетики Национального исследовательского центра «Курчатовский институт». Эксперименты проведены с соблюдением этических норм работы с животными и одобрены локальным этическим комитетом Института молекулярной генетики РАН. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *McCracken E., Monaghan M., Sreenivasan S.* Pathophysiology of the metabolic syndrome // Clin. Dermatol. 2018. Vol. 36. N 1. P. 14–20.

2. *Lee S.K., Khambhati J., Bhagava A., Engels M.C., Sandesara P.B., Quyyumi A.A.* Endothelial dysfunction and metabolic syndrome // Hypertens. J. 2017. Vol. 3. N 2. P. 72–80.

3. *Lumeng C.N., Bodzin J.L., Saltiel A.R.* Obesity induces a phenotypic switch in the polarization of adipose tissue macrophages // J. Clin. Invest. 2007. Vol. 117. N 1. P. 175–184.

4. *Brownlee M.* Pathobiology of diabetic complications: unifying mechanism // Diabetes. 2005. Vol. 54. N 6. P. 1615–1625.

5. *Kitade H., Sawamoto K., Nagashimada M., Inoue H., Yamamoto Y., Sai Y.* CCR5 plays an important role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance, regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status // Diabetes. 2012. Vol. 61. N 7. P. 1680–1690.

6. *Forbes J.M., Cooper M.E.* Mechanisms of diabetic complications // Physiol. Rev. 2013. Vol. 93. N 1. P. 137–188.

7. *Beverly J.K., Budoff M.J.* Atherosclerosis: pathophysiology of insulin resistance, hyperglycemia, hyperlipidemia, and inflammation // J. Diabetes. 2020. Vol. 12. N 2. P. 102–104.

8. *Zhang Z., Liu J., Wang H., Wu H., Wu X., Dong J., Liao L.* Association between a variant of the chemokine receptor 5 (CCR5) delta32 gene and atherosclerosis: meta analysis of 13 studies // Int. J. Clin. Exp. Med. 2015. Vol. 8. N 1. P. 658–665.

9. *Pothineni N.V.K., Subramany S., Kuriakose K., Shirazi L.F., Romeo F., Shah P.K., Mehta J.L.* Infections, atherosclerosis, and coronary heart disease // Eur. Heart J. 2017. Vol. 38. N 43. P. 3195–3201.

10. *Gresele P., Momi S.* Nitric oxide-enhancing or – releasing agents as antithrombotic drugs // Biochem. Pharmacol. 2019. Vol. 166. P. 300–312.

11. *Kawano H., Motoyama T., Hirai N., Kigiyama K., Yasue H., Ogawa H.* Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is improved by L-arginine administration: on possible role of oxidative stress // Atherosclerosis. 2002. Vol. 161. N 2. P. 375–380.

12. *Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Andreeva L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A.* The modern view on the role of glyprolines by metabolic syndrome // Med. Res. Rev. 2020. DOI: 10.1002/med.21748.

13. *Tian D.L., Guo R.J., Li Y.M., Chen P.P., Zi B.B., Wang J.J, Liu R.F., Min Y.N., Wang Z.P., Niu Z.Y., Liu F.Z.* Effects of lysine deficiency or excess on growth and the expression of lipid metabolism genes in slow-growing broilers // Poultry Sci. 2019. Vol. 98. N 7. P. 2927–2932.

14. *Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A.* Mechanism for glyproline protection in hypercholesterolemia // Pathophysiol. 2016. Vol. 23. N 1. P. 27–33.

15. *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.

16. *Yao L., Herlea-Pana O., Heuser-Baker J., Chen Y., Barlic-Dicen J.* Roles of the chemokine system in the development of obesity, insulin resistance and cardiovascular disease // J. Immunol. Res. 2014. Vol. 2014: 181450.

17. *Grandi G., Wolfrum C.* Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome // Semin. Immunopathol. 2018. Vol. 40. N 2. P. 215–224.

18. *Davel A.P., Wenceslau C.F., Akamine E.H., Xavier F.E., Couto G.K., Oliveira H.T., Rossoni L.V.* Endothelial dysfunction in cardiovascular and endocrine-metabolic diseases: an update // Braz. J. Med. Biol. Res. 2011. Vol. 44. N 9. P. 920–932.

19. *Rask-Madsen C., King G.L.* Mechanisms of disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes // Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab. 2007. Vol. 3. N 1. P. 46–56.

20. *Li G., Zhu G., Gao Y., Xiao W., Xu H., Liu S.* Neferin inhibits upregulation of CCL5 and CCR5 in vascular endothelial cells during chronic high glucose processing // Inflammation. 2013. Vol. 36. N 2. P. 300–308.

21. *Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю.* Регуляция глипролинами первичного гемостаза и сосудисто-эндотелиальной функции организма при метаболическом синдроме // Тромбоз, гемостаз и реол. 2019. № 3. С. 32–37.

22. *Kopincová J., Púzserová A., Bernátová I.* L-NAME in the cardiovascular system – nitric oxide synthase activator? // Pharmacol. Rep. 2012. Vol. 64. N 3. P. 511–520.

23. *Grandl G., Wolfrum C.* Hemostasis, endothelial stress, inflammation, and the metabolic syndrome // Semin. Immunopathol. 2018. Vol. 40. N 2. P. 215–224.

24. *Lyapina L.A., Myasoedov N.F., Grigor'eva M.E., Shubina T.A., Andreeva L.A.* The modern conception of the regulatory role of peptides of the glyproline family in the correction of hemostasis system function during development of diabetes mellitus // Biol. Bull. 2013. Vol. 40. N 2. P. 381–393.

25. *Григорьева М.Е., Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Андреева Л.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е., Мясоедов Н.Ф., Ульянов А.М.* Защитные эффекты пептида Pro-Gly-Pro-Arg в условиях повышенной свертываемости крови при экспериментальной гипергликемии // Тромбоз, гемостаз и реол. 2011. № 3. С. 41–46.

26. *Shabalina A.A., Kostyreva M.V., Tanashyan M.M., Susina Z.A., Lyapina L.A., Rochev D.L. In vitro* lipid-lowering and fibrinolytic effects of regulatory leucine-containing glyprolines in human blood // Biol. Bull. 2015. Vol. 42. N 1. P. 74–77.

Поступила в редакцию 27.08.2020 г.
После доработки 15.01.2021 г.
Принята в печать 22.01.2021 г.

RESEARCH ARTICLE

Effects of KKRRPGP (Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro) and KRRKPGP (Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro) peptides on hemostasis parameters, lipid profile, blood glucose level, and body weight changes in rats with metabolyc syndrome and endothelial dysfunction

N.F. Myasoedov[1], L.A. Lyapina[2], T.Y. Obergan[2,*], M.E. Grigorjeva[2], T.A. Shubina[2], L.A. Andreeva[1]

[1]Institute of Molecular Genetics Russian Academy of Sciences, Kurchatov sq. 2, Moscow, 123182, Russia;
[2]Laboratory of Blood Protection Systems, Department of Human and Animal Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia
[*]e-mail: tobergan@mail.ru

Lysine-and arginine-containing peptides Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Gly-Pro and Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro were administered intranasal way (daily single dose of 100 mcg/kg for 7 days) to animals (laboratory rats) with experimental metabolic syndrome and endothelial dysfunction. Metabolic syndrome was modeled by a high-calorie diet throughout the experiment period, and endothelial dysfunction was modeled by intraperitoneal injection of L-NAME (daily single dose of 10 mg/kg for 5 days). It was found that these peptides had anti-clotting, hypoglycemic, and hypocholesterol effects and reduced body weight gain in experimental animals. Peptides treatments affected both primary (vascular-platelet) hemostasis, reducing platelet aggregation, and all links of plasma hemostasis, increasing anticoagulant, fibrindepolymerization and enzymatic fibrinolytic activity, as well as antifibrinstabilizing properties of plasma and reducing the concentration of fibrinogen in it. At the same time, the studied peptides reduced the content of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, and triglycerides, increasing the concentration of high-density lipoprotein cholesterol. These effects were observed 20 hrs after the last administration of peptides and persisted, although to a lesser extent, 7 days (168 hrs) after stopping treatment. In this regard, we can talk about the prolonged action of both glyproline peptides, which have lysine and arginine amino acid residues in their structure, and their ability to protect the body from the development of metabolic diseases and endothelial dysfunction. The maximum effects were provided by the Lys-Arg-Arg-Lys-Pro-Gly-Pro peptide, which may be due to its structural features.

Keywords: *metabolic syndrome, lysine- and arginine-containing peptides, endothelial dysfunction, body weight, glucose level, lipid profile, hemostasis system*

Funding: This study was performed under the state assignment of Institute of Molecular Genetics, National Research Centre “Kurchatov Institute”, project number AAAA-A16-16021660094-0.

Сведения об авторах

Мясоедов Николай Федорович – академик РАН, докт. хим. наук, зам. директора Института молекулярной генетики РАН. Тел. 8-499-196-00-02; e-mail: *nfm@img.ras.ru*

Ляпина Людмила Анисимовна –докт. биол. наук, гл. научн. сотр., проф., зав. лабораторией защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-26-08; e-mail: *lyapinal@mail.ru*; ORCID: http://orcid.org/0000-0002-8983-652X

Оберган Тамара Юрьевна – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-14-11; e-mail: *tobergan@mail.ru*; ORCID: http://orcid.org/0000-0002-3760-3943

Григорьева Марина Евгеньевна – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-26-08. e-mail*: mgrigorjeva@mail.ru*; ORCID: http://orcid.org/0000-0003-0469-3943

Шубина Татьяна Александровна – канд. биол. наук, ст. научн. сотр., лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел. 8-495-939-14-11. e-mail*: shubina-74@mail.ru*; ORCID: http://orcid.org/0000-0003-1092-8382

Андреева Людмила Александровна – рук. сектора Института молекулярной генетики РАН. Тел. 8-499-196-16-02; e-mail: *landr@img.ras.ru*