

ЛЕЙЦИНСОДЕРЖАЩИЕ ПЕПТИДЫ
КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АНТИТРОМБОТИЧЕСКИЕ ВЕЩЕСТВА

© 2019 г. Л. А. Ляпина^{1, *}, Т. А. Шубина¹, Н. Ф. Мясоедов², М. Е. Григорьева¹,
Т. Ю. Оберган¹, Л. А. Андреева², Э. Я. Рогозинская¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Биологический факультет,
Москва, Россия

²Институт молекулярной генетики РАН, Москва, Россия

*E-mail: lyapinal@mail.ru

Поступила в редакцию 23.10.2018 г.

После доработки 11.02.2019 г.

Принята к публикации 11.02.2019 г.

В настоящей работе впервые изучены гемостазиологические свойства лейцин-содержащих регуляторных олигопептидов Н-Pro-Leu-Pro-ОН (PLP) и Н-Pro-Leu-Pro-Ala-ОН (PLPA) при их пероральном ежедневном введении через каждые 24 ч в течение 7 сут здоровым животным (крысам). Для исследований использованы стандартные коагулологические методы. Показано, что через 20 ч после последнего (седьмого) введения крысам исследуемых пептидов в плазме крови повышались антикоагулянтная активность на 10.3–30.6% по данным активированного частичного тромбопластинового времени, все виды фибринолитического процесса – суммарная фибринолитическая активность плазмы на 16–24%, неферментативный фибринолиз – на 9–11%, ферментативный фибринолиз – на 28–49%, активность плазмينا – на 28.5–29%. Но при этом не изменялся такой показатель, как время лизиса эуглобулинового сгустка фибрина (в отсутствие ингибиторов фибринолиза). Активность тканевого активатора плазминогена или не изменялась (PLP), или же снижалась под действием PLPA. Концентрация фибриногена при этом или уменьшалась на 18% (PLP), или соответствовала нормальным значениям (PLPA); активность фактора XIIIa снижалась на 17% (PLP) и 10% (PLPA). Оба пептида подавляли процесс агрегации тромбоцитов на 31–33.5% (при использовании в качестве индуктора АДФ). Наибольший противосвертывающий эффект установлен у олигопептида с дополнительным включением с С-конца молекулы аланина. Поскольку оба пептида при пероральном введении животным в той или иной степени проявляли в организме здоровых крыс комплекс антитромбоцитарных, антикоагулянтных, фибриндеполимеризационных, фибринолитических активностей и умеренно снижали уровни факторов свертывания – фибриногена или активность фактора XIIIa, то их можно считать перспективными антитромботическими веществами.

Ключевые слова: лейцин-содержащие олигопептиды, фибринолиз, агрегация тромбоцитов, антикоагулянтная активность, фактор XIIIa, фибриноген

DOI: 10.1134/S0869813919040022

Система гемостаза выполняет ряд жизненно важных функций, поддерживая кровь в жидком состоянии и препятствуя процессам тромбино- и тромбообразования. При нарушениях в этой системе могут развиваться или геморрагии или предрасположенность к тромбозам [1, 2]. Установлены механизмы пептидэргической

регуляции системы гемостаза как в норме, так и при некоторых патологических состояниях [3]. Пептиды в организме выполняют сигнальную функцию: они передают информацию от клетки к клетке и корректируют их работу. К настоящему времени выяснено, что регуляторные пептиды глипролинового ряда, включающие в свою структуру лейцин с С- или N-концов – Pro-Gly-Pro-Leu или Leu-Pro-Gly-Pro при интраназальном и внутривенном применении животным способствуют проявлению в крови антикоагулянтных, фибриндеполимеризационных и антитромбоцитарных эффектов. Выявлено также, что эти пептиды оказывают дополнительно гиполипидемическую и гипогликемическую активность [3, 4]. Это, вероятно, обусловлено наличием лейцина в составе пептидов, поскольку известно, что лейцин участвует в метаболизме жиров и углеводов, способствуя ускорению утилизации жиров в митохондриях и снижению уровня глюкозы крови [5]. Эта аминокислота входит в состав всех природных белков. Она способствует синтезу белков в мышцах и печени и служит источником энергии на клеточном уровне, предотвращая перепроизводство серотонина и связанное с ним наступление усталости [6].

Установлено, что конформационные изменения остатков L-лейцина в олигомерах, содержащих глицин-L-лейцин, влияют на их активность в зависимости от того, находится ли остаток L-лейцина в N- или С-концевом положении [7]. На это указывают и другие исследователи [8, 9], которые показали, что последовательность аминокислот в пептидах на основе лейцина влияет, в частности, и на стабильность клеточной стенки, повышая ее устойчивость к присутствию органических растворителей и к высоким концентрациям солей.

Большинство проведенных исследований, посвященных поиску средств фармакологической коррекции гемостаза путем применения лейцин-содержащих пептидов, направлено на изучение их действия через реализацию или ограничения тромбоногенеза, или на дезагрегацию тромбоцитов. В то же время немаловажное значение имеет ограничение процессов фибринообразования. Так, было установлено, что регулирующим воздействием может подвергаться взаимодействие сформированного тромбина с фибриногеном и, что особенно важно, ферментативный процесс самосборки фибрина, т.е. этап, не имеющий альтернативного пути, с помощью воздействия на который можно предотвратить образование тромба на конечной стадии этого процесса [10]. Таким действием обладают короткоцепочечные пептиды, в частности, пептиды глипролинового ряда [3].

Цель настоящей работы заключалась в изучении действия новых пептидов, содержащих аминокислоту лейцин внутри своих молекул (Pro-Leu-Pro и Pro-Leu-Pro-Ala), при их пероральном применении на функциональное состояние свертывающей и противосвертывающей систем гемостаза и выявлении их антитромботических эффектов.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы лейцин-содержащие пептиды – Pro-Leu-Pro (PLP) и Pro-Leu-Pro-Ala (PLPA), синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН.

Дизайн исследования заключался в изучении влияния новых препаратов на кровь животных для дальнейшего возможного их использования в качестве лекарственных средств в соответствии с ГОСТ 33044-2014, предусматривающим определение специфической фармакологической активности препаратов *in vivo* первоначально на здоровых животных. Поэтому в качестве подопытных животных использовались здоровые лабораторные белые крысы-самцы линии Вистар массой тела 250–280 г, которые содержались в стандартных условиях вивария. Все эксперименты на животных проводились в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейским научным фондом, Базельской декларацией, Европейской конвенцией и директивами по охране позвоночных животных, исполь-

зуемых в эксперименте 86/609/ЕЕС, а также Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. Всего в экспериментах было использовано 24 животных. Животные были разделены на 3 группы (по 8 особей в каждой группе): первой группе (контроль) вводили 0.85%-ный раствор NaCl (физиологический раствор), второй группе (опыт 1) – PLP и третьей группе (опыт 2) – PLPA. Введение каждого пептида осуществляли пероральным способом в ежедневной дозе 100 мкг/кг в течение 7 сут через каждые 24 ч. Контрольные животные получали в те же сроки и в том же объеме (0.2 мл/200 г массы тела) физиологический раствор. Взятие крови осуществляли через яремную вену (*v. jugularis*) с использованием в качестве консерванта 3.8%-ного раствора цитрата натрия в соотношении 9 : 1 через 20 ч после последнего введения препаратов, поскольку ранее нами было установлено, что под действием глипролинов антикоагулянтно-фибринолитические свойства крови сохраняются на протяжении 18–24 ч [3]. Кровь центрифугировали в двух режимах: при 1000 об./мин в течение 5 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы и при 2000 об./мин в течение 12 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы. В богатой тромбоцитами плазме определяли агрегацию тромбоцитов с использованием в качестве агреганта АДФ в концентрации 10^{-6} М. Измерения проводили на агрегометре марки “Биола” (Россия). В бедной тромбоцитами плазме проводили измерения следующих биохимических показателей плазменного гемостаза: антикоагулянтную активность по тестам активированного частичного тромбопластинного времени (АЧТВ) и тромбинового времени (ТВ) на анализаторе свертывания крови марки “Астра 2-01” (Россия); фибринолиз по тестам: суммарной фибринолитической активности (СФА), неферментативного фибринолиза (НФ) или фибриндеполимеризационной активности, параметрам ферментативного фибринолиза – по времени лизиса эуглобулинового сгустка (ВЛЭС), активности тканевого активатора пламиногена (ТАП) и активности пламина на фибриновых пластинах. Одновременно проводили измерение в плазме крови концентрации фибриногена с использованием набора реагентов Фибриноген-тест ООО “Технологии-стандарт” (Россия) и активности фактора XIIIa с использованием набора реагентов Фактор XIII-тест фирмы “Ренам” [11].

Полученные данные были подвергнуты статистической обработке по непараметрическому критерию Манна–Уитни (STATISTICA 8.0).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами установлено, что оба лейцин-содержащих пептида достоверно подавляли агрегацию тромбоцитов на 31.0–31.5%, повышали антикоагулянтную активность плазмы крови по тесту АЧТВ, причем более значительно пептид с включением аланина на С-конце – PLPA (на 30.6%), снижали активность фактора XIIIa плазмы крови (на 10–17%), не повышая при этом или незначительно уменьшая концентрацию фибриногена. ТВ в данных условиях эксперимента практически не менялось (табл. 1).

Таким образом, направленность действия обоих пептидов при их пероральном применении выявлена в сторону возрастания противосвертывающих свойств крови.

При изучении фибринолитического звена противосвертывающей системы в ответ на многократное пероральное введение исследуемых пептидов было установлено следующее: оба пептида повышали СФА на 16–24%, НФ – на 9–11%, ФФ – на 28–49%. Эти пептиды практически не изменяли ВЛЭС. Они также или не влияли на активность ТАП (PLP), или же снижали эту активность на 57% (PLPA), что объясняется фактическим увеличением уровня активного пламина в кровотоке в ответ на введенные пептиды (на 29%) (табл. 2).

Таблица 1. Показатели гемостаза после 7-кратного введения пептидов здоровым крысам

Условия опыта	Агрегация тромбоцитов, индекс (%)	АЧТВ, с (%)	ТВ, с (%)	Концентрация фибриногена, г/л (%)	Активность FXIIIa, усл. ед. (%)
Контроль NaCl	1.94 ± 0.17 (100%)	30.1 ± 1.6 (100%)	20.1 ± 2.3 (100%)	3.2 ± 0.2 (100%)	62.5 ± 1.42 (100%)
PLP	1.35 ± 0.36 (68.5%)*	34.2 ± 1.35 (110.3%)*	17.3 ± 1.8 (86%)	2.7 ± 0.8 (84%)	51.8 ± 2.42 (83%)*
PLPA	1.36 ± 0.27 (69%)*	39.3 ± 0.96 (130.6%)*	21.2 ± 2.8 (106%)	3.3 ± 0.3 (103%)	56.3 ± 1.62 (90%)*

Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля. Обозначения: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ТВ – тромбиновое время; FXIIIa – фактор XIIIa.

Таблица 2. Показатели фибринолитического процесса в плазме крови после 7-кратного введения пептидов здоровым крысам

Условия опыта	СФА, мм ² (%)	НФ, мм ² (%)	ФФ, мм ² (%)	Активность плазмينا, мм ² (%)	Активность ТАП, мм ² (%)	ВЛЭС, мин (%)
Введение NaCl (контроль)	26.1 ± 2.0 (100%)	17.5 ± 1.1 (100%)	8.7 ± 0.5 (100%)	35.0 ± 4.9 (100%)	37.0 ± 3.5 (100%)	43.0 ± 1.4 (100%)
Введение пептида PLP	30.3 ± 1.1 (116%)*	19.1 ± 1.0 (109%)	11.2 ± 0.5 (128%)**	45.0 ± 5.2 (129%)*	34.0 ± 3.5 (92%)	50.0 ± 2.1 (116%)
Введение пептида PLPA	32.5 ± 1.0 (124%)**	19.5 ± 0.9 (111%)*	13.0 ± 1.7 (149%)**	45.0 ± 4.0 (129%)*	16.0 ± 2.3 (43%)*	45.0 ± 1.5 (104%)

Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля. Обозначения: ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$; СФА – суммарная фибринолитическая активность, НФ – неферментативный фибринолиз, ФФ – ферментативный фибринолиз, ТАП – тканевой активатор плазминогена, ВЛЭС – время лизиса эуглобулинового сгустка.

Обращает на себя внимание тот факт, что если лейцин-содержащий пептид PLPA снижал активность тканевого активатора плазминогена, то при этом он довольно значительно повышал активность фермента плазмينا в крови. Как было показано ранее, таким же действием, но при интраназальном многократном введении, обладали и другие пептиды глипролинового ряда, а также глипролины, содержащие в своей структуре лейцин (Pro-Gly-Pro-Leu и Leu-Pro-Gly-Pro) [4].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные эксперименты были направлены на выявление антитромботических свойств пептидов, включающих лейцин во внутреннюю структуру своих молекул. Обобщая полученные нами результаты и опираясь на данные литературы, можно считать, что различные по структуре лейцин-содержащие глипролины обладают уникальным действием на функциональное состояние противосвертывающей системы крови, одновременно проявляя антитромбоцитарную, антикоагулянтную и фибринолитическую активность ферментативной и неферментативной природы. Они участвуют в предотвращении самосборки фибрина, о чем свидетельствовало наличие фибриндеполимеризационной или неферментативной фибринолитической активности. Подобным действием обладали гепариноподобные компоненты [10], а также регуляторные пептиды глипролинового ряда при их интраназальном применении [3]. Ранее было показано, что аминокислота лейцин как препарат сравнения для лейцинсодержащих пептидов, при введении в организм крыс в дозе, эквива-

лентной его содержанию в пептидах, не оказывала значимых эффектов на свертывание крови [4].

Противосвертывающие эффекты исследованных нами пептидов можно объяснить несколькими путями. Они способны ингибировать активность тромбина и других свертывающих факторов, ликвидировать гиперкоагуляцию, что доказано в настоящей работе, а также основано на данных литературы, свидетельствующих об ингибировании тромбина под влиянием олигопептидов [12] и об экспрессии генов, кодирующих такие факторы, как антитромбин III, протеин С, тканевой активатор плазминогена, и супрессии генов, кодирующих тканевой фактор [2]. Указанные обстоятельства и приводят к сочетанному антикоагулянтному, антитромбоцитарному, фибриндеполимеризационному (неферментативному фибринолитическому), антифибринстабилизирующему их действию. Снижение агрегации тромбоцитов под влиянием исследованных пептидов может быть обусловлено их взаимодействием с гликопротеиновыми рецепторами тромбоцитов с последующим ингибированием их связи с фибриногеном. Так, известен пептид N-HIS-LEU-GLY-GLY-ALA-LYS-GLN-ALA-GLY-ASP-VAL, соответствующий участку γ -цепи фибриногена человека (последовательность аминокислот 400–411), который ингибирует связывание рецепторов тромбоцитов с фибриногеном и приводит к антитромбоцитарному эффекту [13]. Хотя исследуемые нами пептиды имеют сходство с фибриногеновым пептидом только наличием двух аминокислот, лейцина и аланина, установленный факт обнаружения антитромбоцитарных эффектов лейциновых пептидов, вероятно, обусловлен ингибированием связывания фибриногена с тромбоцитами, подобно действию вышеупомянутого фибриногенового пептида с последовательностью 400–411. О взаимодействии исследованных олигопептидов с фибриногеном свидетельствуют выявленное нами наличие у них фибриндеполимеризационной активности за счет ингибирования процессов полимеризации фибрина. Ранее было показано другими авторами [14], что пролинсодержащие пептиды взаимодействуют с периферическими D-доменами α -цепи фибриногена, содержащими последовательность аминокислот GLY-PRO-ARG (GPR), участвующими в ингибировании процесса полимеризации фибрина.

Известно также, что A- α цепь фибриногена содержит последовательность аминокислотных остатков ARG-GLY-ASP (RGD), которые являются участками ингибирования взаимодействия фибриногена с гликопротеиновыми рецепторами (ГП) [13], что в конечном итоге и приводит к подавлению агрегации тромбоцитов. Эта последовательность аминокислот – RGD играет важную роль во взаимодействии с ГП IIb/IIIa, она обнаружена и в других лигандах (например, из яда змей [15]). Установлено, что пептиды коллагена I и III типов [16] содержат ARG-GLY-ASP-SER-аминокислотную последовательность (RGDS) и прерывают заключительный этап связывания фибриногена с ГП IIb/IIIa активированных тромбоцитов. Установлено, что синтетические пептиды двух типов: RGD-содержащие (**Arg-Gly-Asp-Ser**) и AGD-содержащие (Tyr-Gly-Gln-Gln-His-His-Leu-Gly-Gly-Ala-Lys-Gln-**Ala-Gly-Asp-Val**) обладают таким же антитромбоцитарным действием, как и природные [5]. Кстати, последовательность аминокислот AGD имеется и в фибриногеновом пептиде 400–411. Указывается также, что синтетический пептид, содержащий последовательность аминокислот ARG-PRO-ASP (RPD), куда входит пролиновый остаток, имеющийся и в исследованных в настоящей статье пептидах, угнетает функцию ГП IIb/IIIa, вследствие чего подавляется агрегация тромбоцитов на 85%. [17]. RGD-последовательность аминокислот с дополнительным включением пролина была использована для конструирования мощных пептидов-миметиков изоформы 3 гирудина, обладающих наряду с антитромбоцитарной и антитромбиновой активностью. Пептиды, содержащие участки аминокислот RGDWP или RGDGP, обладали высокой антитромбиновой и антитромбоцитарной активностью, тогда как другие пептиды, не имеющие в своем составе пролина, проявляли только антитромбоцитарную актив-

ность. Установлено, что включенный в структуру остаток пролина облегчает воздействие RGD-участка и связывание пептида с ГП IIb/IIIa. Заслуживает внимания то обстоятельство, что присоединение пролинового остатка, который имеется и в наших исследованных пептидах, к участку RGD, присутствующему в фибриногене или в других антитромбоцитарных пептидах, повышало антитромбоцитарную активность в 1.5–2.5 раза [18], это может быть использовано для будущих конструкций бифункциональных антитромботических агентов [19]. Есть сообщения и о других антитромбоцитарных пептидах, например, выделенных из овса, ячменя и гречки, содержащих С-концевые аминокислоты с последовательностью Cys-Gly-His-Cys (CGHC) и оказывающие антитромбоцитарный эффект. Их антитромбоцитарное действие заключалось в уменьшении активации ГП IIb/IIIa [20, 21] подобно действию RGD-содержащих пептидов.

Итак, на основании имеющихся данных литературы, мы можем только предполагать, что антитромбоцитарные эффекты исследованных нами пролиновых пептидов, выражающиеся в подавлении АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов, обусловлены либо их взаимодействием с фибриногеном через аминокислотные последовательности ALA-GLY-ASP, GLY-PRO-ARG и ARG-GLY-ASP, либо ингибированием гликопротеиновых рецепторов тромбоцитов. Известно, что для подавления патологического тромбообразования используют одновременно как ингибиторы тромбина, так и ингибиторы агрегации тромбоцитов, которым принадлежит ключевая роль в формировании тромба. Природные RGD-содержащие пептиды [22, 23] обладали не только антитромбоцитарным эффектом, но и значительным антикоагулянтным действием. Подобным же действием обладали и исследованные нами новые лейциновые пептиды. Их антикоагулянтная активность, вероятно, связана с ингибированием факторов свертывания крови (Ха и факторов протромбинового комплекса), о чем свидетельствует установленное нами повышение активности АЧТВ. Интерпретация этого факта основана и на работах других авторов [1, 2]. Нами показано, что новые пептиды ингибируют процессы превращения фибриногена в фибрин в основном на стадии “самосборки” фибрина. Это доказано наличием у пептидов фибриндеполимеризационного (или неферментативного фибринолитического) действия. Дополнительно к этому можно говорить и о возможном объяснении антифибринстабилизирующего эффекта новых пептидов, который обусловлен, вероятно, ингибированием тромбина, участвующего в активации фактора XIII [13]. Мы также выявили, что повышение ферментативной фибринолитической активности может быть связано с появлением в кровотоке повышенного уровня фибринолитического фермента плазмина (или фибринолизина) при участии тканевого (эндотелиального) активатора пламиногена, выделяющегося в кровотоке.

Комплекс обнаруженных нами активностей указывает на общую закономерность активации в организме противосвертывающего потенциала крови под влиянием лейцин-содержащих пептидов. В наших исследованиях три- и тетрапептид включали лейцин внутри своей химической структуры, причем лейцин находился между двумя пролиновыми остатками, что обеспечивало стабильность пептидов и сохранение их положительных гемостазиологических свойств довольно продолжительное время. Период полувыведения регуляторных пептидов достаточно короткий (в пределах 1–2 ч) [24, 25], но особенность этого класса веществ заключается в их способности работать в очень малых концентрациях [26]. Относительно биодоступности пептидов, их всасывания и расщепления в желудочно-кишечном тракте крысы имеются лишь единичные данные. Интересны результаты, описанные в статье о распределении пептида глипролинового ряда ($[^3\text{H}]PGP$) в организме крыс, где обращается внимание, что вклад в протеолиз пептидов вносят пептидазы не только желудочно-кишечного тракта, но и плазмы крови. Максимальный уровень радиоактивности, характеризующий содержание пептида, наблюдался через 15–30 мин

после введения в желудке, печени, кишечнике и мозге и сохранялся на протяжении 5 ч наблюдения. Кроме того, обогащенные пролиновыми аминокислотными остатками пептиды более устойчивы к протеолитическому расщеплению в желудочно-кишечном тракте [24].

О широком спектре эффектов регуляторных пептидов известно уже давно. Именно представители этого класса участвуют во всех этапах любого физиологического процесса, обеспечивая взаимодействие всех систем организма. Один и тот же пептид может модулировать работу многих систем организма. О “функциональном континиуме регуляторных пептидов”, т.е. сложной системе взаимосвязи их эффектов в организме, писал И.П. Ашмарин. Вполне вероятно, что через 20 ч после введения пептидов наблюдаются итоговые эффекты сложной системы их континиума, выраженные в каскаде разнообразных физиологических реакций. Фрагменты пептидов, возникающие при их распаде в организме, могут обладать собственной физиологической активностью. Полученные нами данные вполне укладываются в эту концепцию, а множественность наблюдаемых эффектов подтверждается плейотропностью, полимодальностью и универсальностью их действия [26].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности изучения лейцин- и пролин-содержащих коротких регуляторных пептидов в качестве средств, предупреждающих тромбоопасные состояния организма. Впервые использованный неинвазивный пероральный способ введения этих пептидов приводил к появлению в кровотоке широкого спектра противосвертывающих эффектов, влияющих как на первичный гемостаз, так и на плазменный. Нами установлено фармакологическое угнетение агрегации тромбоцитов, которое, возможно, осуществляется подобно антагонистам мембранного рецептора ГП IIb/IIIa, действующим путем связывания с тромбоцитарным рецептором и препятствующим присоединению фибриногена к рецептору. Одновременно в крови отмечалось умеренное снижение активности фибринстабилизирующего фактора и отсутствие увеличения концентрации фибриногена, принимающих участие в заключительной стадии процесса свертывания крови. Нами показано, что сочетанное проявление у исследованных регуляторных пептидов антитромбоцитарных, фибриндеполимеризационных, антикоагулянтных, фибринолитических антифибринстабилизирующих эффектов обеспечивает их антитромботический фон в организме.

Учитывая сказанное, мы можем говорить о перспективности проведения дальнейших исследований коротких лейцин- и пролин-содержащих пептидов при патологиях, осложняющихся тромбофилиями или тромбозами.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследования выполнены при финансовой поддержке РФФИ (в рамках гранта на реализацию научного проекта № 18-4-00260).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баркаган З.С. О двух видах мониторинга антитромботических средств. Бюлл. сибирской мед. 2: 9–13. 2003. [Barkagan Z.S. About two types of monitoring of antithrombotic agents. Bull. Siberian med. 2: 9–13. 2003. (in Russ.)].
2. Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита. Экспресс издательство. 2010. [Kuznik B.I. Kletoshnie i molekularnie mehanizmi regulazii sistemi hemostasa v norme i patologii. [Cellular and molecular mechanisms of hemostatic system regulation in norm and pathology]. Chita. Express publishing. 2010].

3. Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A. Mechanisms for glyproline protection in hypercholesterolemia. *Pathophysiology*. 23(1): 27–33. 2016.
4. Shabalina A.A., Lyapina L.A., Rochev D.L., Kostyreva M.V., Tanashyan M.M., Suslina Z.A. *In vitro* lipid lowering and fibrinolytic effects of regulatory leucine containing glyprolines in human blood. *Biol. Bull.* 42(1): 74–77. 2015.
5. Huang Y., Zhou M., Sun H., Wang Y. Branched-chain amino acid metabolism in heart disease: An epiphenomenon or a real culprit? *Cardiovasc. Res.* 90(2): 220–223. 2011.
6. Wilkinson D.J., Bukhari S.S.I., Phillips B.E., Limb M.C., Cegielski J., Brook M.S., Rankin D., Mitchell W.K., Kobayashi H., Williams J.P., Lund J., Greenhaff P.L., Smith K., Atherton P.J. Effects of leucine-enriched essential amino acid and whey protein bolus dosing upon skeletal muscle protein synthesis at rest and after exercise in older women. *Clin Nutr.* 17: 340–347. 2017.
7. Okabayashi H.F., Kanbe H.H., O'Connor C.J. The role of an L-leucine residue on the conformations of glycyl-L-leucine oligomers and its N- or C-terminal dependence: infrared absorption and Raman scattering studies. *Eur. Biophys. J.* 1: 23–34. 2016.
8. Andreu C., Del Olmo M. Yeast arming by the Aga2p system: Effect of growth conditions in galactose on the efficiency of the display and influence of expressing leucine-containing peptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97(20): 9055–9069. 2013.
9. Ichimura N., Kasama T. Identification of valine- or leucine-containing glycopeptidolipids from *Mycobacterium avium*-intracellular complex. *Curr. Microbiol.* 64(6): 561–568. 2012.
10. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П., Карпова И.А., Русакова О.А., Самойлов М.А., Созонюк А.Д., Сулкарнаева Г.А., Тарасов Д.Б., Чирятыев Е.А., Шаповалов П.Я., Шаповалова Е.М. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения. *Мед. наука и образов. Урала*. 13(1): 163–170. 2012. [Byshesky A.Sh., Galyan S.L., Kalinin E.P., Karpova I.A., Rusakova O.A., Samoilo M.A., Cosonyk A.D., Sulkarnaeva G.A., Tarasov D.B., Chiratev E.A., Chapovalov P.Ya., Chapovalova E.M. [Inhibitors of self-Assembly of plant fibrin]. *Medical science and education of the Urals*. 13(1): 163–170. 2012. (In Russ.)].
11. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М. *Авансдес Солюшнз*. 2012. [Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A. *Teoreticheskie i prakticheskie voprosi izucheniya funkchionalnogo sostojania protivosvertivaushei sistemi krovi*. [Theoretical and practical issues of studying the functional state of the blood anticoagulation system]. Moscow. *Advanced Solutions*. 2012. (in Russ.)].
12. Hasan A., Wernock M., Nieman M., Srikanth S., Mahdi F., Krishnan R., Tulinsky A., Schmaier A. Mechanisms of Arg-Pro-Gly-Phe inhibition of thrombin. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285: 183–193. 2003.
13. Луговской Э.В., Макогоненко Е.М., Комисаренко С.В. Молекулярные механизмы образования и разрушения фибрина. Киев. *Наукова думка*. 2013. [Lugovskoi E.V., Makogonenko E.M., Komisarenko S.V. *Molekularnii mehanizmi obrasovanija i rasrusheniya fibrina* [Molecular mechanisms of formation and degradation of fibrin]. Kyiv. *Naukova dumka*. 2013].
14. Левитская Н.Г., Клейменов А.Н., Петросян М.Т., Розенфельд М.А., Каликевич В.Н., Ардомасова В.А. Влияние низкомолекулярных пептидов на процесс перехода фибриногена в фибрин. *Бюлл. эксп. биол. и мед.* 8: 190–192. 1987. [Levitskaya N.G., Kleymenov A.N., Petrosyan M.T., Rosenfeld M.A., Kalickevich W.N., Ardomasova W.A. The influence of low weight synthetic peptides on fibrin formation. *Bull. Exp. Biol. Med.* 8: 190–192. 1987. (in Russ.)].
15. Huang T.F., Holt J.C., Lukasiewicz H., Niewiarowski S. Trigramin. A low molecular weight peptide inhibiting fibrinogen interaction with platelet receptors expressed on glycoprotein IIb–IIIa. *J. Biol. Chem.* 262(33): 16157–16163. 1987.
16. Chiang T.M., Zhu J., Woo-Rasberry V. Peptides derived from platelet non-integrin collagen-receptors or types I and III collagen inhibit collagen-platelet interaction. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* 7(1): 71–75. 2007.
17. Topol E.J., Plov E.F. Clinical trials a platelet receptor inhibitors. *Thromb. Haemost.* 70(1): 94–98. 1993.
18. Kini R.M., Evans H.J. A novel approach to the design of potent bioactive peptides by incorporation of proline brackets antiplatelet effects of Arg-Gly-Asp peptides. *FEBS Letters.* 375: 15–17. 1995.
19. Yu Z., Huang Y., Wang Y., Dai C., Dong M., Liu Z., Yu S., Hu J., Dai Q. Construction and characterization of novel hirulog variants with antithrombin and antiplatelet activities. *Protein. Pept. Lett.* 21(1): 69–74. 2014.
20. Yu G., Wang F., Zhang B., Fan J. *In vitro* inhibition of platelet aggregation by peptides derived from oat (*Avena sativa* L.), highland barley (*Hordeum vulgare* Linn. var. nudum Hook. f.), and buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) proteins. *Food Chem.* 1: 577–586. 2016.
21. Sousa H.R., Gaspar R.S., Sena E.M., da Silva S.A., Fontelles J.L., Araujo T.L., Mastrogiovanni M., Fries D.M., Azevedo-Santos A.P., Laurindo F.R., Trostchansky A., Paes A. M. Novel antiplatelet role for a protein disulfide isomerase-targeted peptide: evidence of covalent binding to the C-terminal CGHC redox motif. *Thromb. Haemost.* 15(4): 774–784. 2017.
22. Aritz-Castro R., Beguin S., Tablante A. Purification and partial characterization of draculin, the anticoagulant factor present in the saliva of vampire bats (*Desmodus rotundus*). *Thromb. Haemost.* 73(1): 94–100. 1995.
23. Gaspar A.R., Joubert A.M., Crause J.C., Neitz A.W. Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savigniu*. *Exp. Appl. Acarol.* 20(8): 583–592. 1996.

24. Васильковский Б.В., Золотарев Ю.А., Жуйкова С.Е. Изучение распределения [^3H] PGP в организме крыс. *Вопр. биол. мед. и фарм. химии*. 3: 41–45. 2003. [Vaskovskii B.V., Zolotarev Yu.A., Zhuykova S.E. To study the distribution of [^3H] PGP in rats. *Quest.Biol. Med. Pharm. Chemistry*. 3: 41–45. 2003. (in Russ.)].
25. Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Нагаев И.Ю. Исследование протеолиза аминокептидазами аналогов семакса с разными N-концевыми аминокислотами. *Биоорган. химия*. 37(4): 475–482. 2011. [Shevchenko K.V., Vyunova T.V., Nagaev I.Yu. Proteolysis of Semax analogues with different a terminal amino acids by aminopeptidases. *Bioorganic chemistry*. 37(4): 475–482. 2011. (in Russ.)].
26. Ашмарин И.П., Данилова Р.А., Рудько О.И. Исследование пролонгированного действия короткоживущих анксиогенных олигопептидов на крысах. *Биомедицина*. 6: 103–110. 2007. [Ashmarin I.P., Danilova R.A., Rudko O.I. A study of the prolonged action of short-lived anksioogenic oligopeptides in rats. *Biomedicine*. 6: 103–110. 2007. (in Russ.)].

Leucine-Containing Peptides as a Promising Antithrombotic Substances

L. A. Lyapina^{a, *}, T. A. Shubina^a, N. F. Myasoedov^b, M. E. Grigorjeva^a, T. Y. Obergan^a,
L. A. Andreeva^b, and E. J. Rogozinskaya^a

^aMoscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

^bInstitute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

*e-mail: lyapinal@mail.ru

Abstract—Here we study the gemostatic properties of leucine-containing regulatory oligopeptides H-Pro-Leu-Pro-OH (PLP) and H-Pro-Leu-Pro-Ala-OH (PLPA) administered orally every 24 hours for 7 days to healthy animals (rats). Standard coagulologic techniques were applied. We demonstrated that 20 hours after the 7th administration of the peptides the anticoagulant activity in the blood plasma was increased by 10.3–30.6% according to the activated partial thromboplastin time data, all types of the fibrinolytic process – total plasma fibrinolytic activity by 16–24%, non-enzymatic fibrinolysis – by 9–11%, enzymatic fibrinolysis – by 28–49%, and the plasmin activity – by 29%. In contrast, the lysis time of the euglobulin fibrin clot (in absence of fibrinolysis inhibitors) was not affected. The activity of tissue plasminogen activator was either unchanged (PLP) or decreased under the effect of PLPA. The fibrinogen concentration either decreased by 18% (PLP), or remained at normal values (PLPA); the activity of factor XIIIa decreased by 17% (PLP) and 10% (PLPA). Both peptides suppressed the platelet aggregation by 31–33.5% (when used as an ADP inductor). The most prominent anticoagulant effect was observed for the oligopeptide containing the additional alanine residue at the C-terminus. Since both peptides showed varying degrees of complex antiplatelet, anticoagulant, fibrinolytic activity, and moderate reduction of coagulation factor levels – fibrinogen and factor XIIIa – when administered orally to animals, they can be considered promising antithrombotic agents.

Keywords: leucine-containing oligopeptides, fibrinolysis, platelet aggregation, anticoagulant activity, factor XIIIa, fibrinogen

ЦИТИРОВАТЬ:

Ляпина Л.А., Шубина Т.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Андреева Л.А., Рогозинская Э.Я. Лейцинсодержащие пептиды как перспективные антитромботические вещества. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*. 105(4): 492–500.

10.1134/S0869813919040022

TO CITE THIS ARTICLE:

Lyapina L.A., Shubina T.A., Myasoedov N.F., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Andreeva L.A., Rogozinskaya E.J. Leucine-Containing Peptides as a Promising Antithrombotic Substances. *Russian Journal of Physiology*. 105(4): 492–500.

DOI: 10.1134/S0869813919040022