# ОКСОПРОЛИНОВЫЕ КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СРЕДСТВА ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО И АНТИТРОМБОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

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

[1]Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. акад. Курчатова, 2
[2]Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, д.1/12; эл. почта: lyapinal@mail.ru

Одной из актуальных и важнейших задач современных биологических и медицинских исследований является поиск и исследование фармакологических средств, сочетающих гиполипидемический и антитромботический эффекты в организме. В настоящей работе у синтезированных методами классической пептидной химии в растворе регуляторных пептидов оксопролинового ряда (5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-Arg-Pro или Pyr-His-Pro-$NH_2$, Pyr-Trp-Pro и Pyr-Arg-Pro) установлены уникальные эффекты в организме при развитии гиперхолестеринемических состояний. Исследованные регуляторные пептиды при многократном интраназальном поступлении в организм животных с развившейся гиперхолестеринемией повышали противосвертывающий (антикоагулянтный, фибринолитический и антитромбоцитарный) потенциал крови с одновременным подавлением повышенной концентрации общего холестерина, холестерина липопротеинов низкой плотности и триглицеридов. Дополнительно к этому они способствовали нормализации уровня глюкозы крови. Спустя неделю после отмены применения пептидов выявленные у них гипохолестеринемические, нормогликемические и противосвертывающие эффекты сохранялись. Обсуждается вопрос о связи структуры пептидов оксопролинового ряда и их функциональных свойств. Делается вывод о перспективности дальнейших исследований оксопролиновых пептидов как препаратов, сочетающих антитромботическое действие с улучшением липидного обмена в организме.

**Ключевые слова:** оксопролиновые пептиды, гипохолестеринемическое действие, антитромботическая активность

**DOI:** 10.18097/PBMC20176306546

## ВВЕДЕНИЕ

Природные регуляторные пептиды применяются при разработке лекарственных препаратов и систем адресной доставки биологически активных соединений в клетки-мишени. Синтетические аналоги пептидов или пептидомиметики способны моделировать особенности строения активных центров пептидов и других биомолекул. Для многих коротких пептидов характерны Н-пептидные связи и кольцевые структуры. Такие структурные особенности, а также наличие пироглутаминовой кислоты в пептидах образуют действенную защиту против атаки протеаз, обладающих обычно субстратной специфичностью. Считается, что наиболее стабильны пептиды, содержащие пролин и пироглутаминовую кислоту. Описана стабильность в организме тиролибериноподобного пептида – трипептида из пироглутаминовой кислоты, глутаминовой кислоты и пролинамида. Этот пептид опосредует клинические проявления карциноидного синдрома [1]. Известно участие пептидов, в том числе и тиролиберинового ряда, в обмене веществ в организме.

В последние годы большое внимание уделяется пептидергической регуляции гомеостаза [2, 3], которая формирует компенсаторно-приспособительные реакции организма на нарушение гомеостатического баланса [4, 5]. Доказано участие коротких пептидов глипролинового ряда (Pro–Gly–Pro, Pro–Gly) в нормальном функционировании многих систем организма – свертывающей, противосвертывающей, сосудисто-эндотелиальной и др. [6, 7]. Некоторые пептиды относятся к антикоагулянтам, блокирующим активность фермента тромбина, другие – к антитромбоцитарным средствам [8], третьи – к антитромботическим [9].

Одним из тяжелых заболеваний сосудов являются атеросклеротические изменения, обусловленные нарушением липидного профиля, углеводного обмена и повышением свертываемости крови [10, 11]. Все эти нарушения имеют место при развитии “метаболического синдрома” [12]. Как известно, эндотелий сосудов при нормальном функционировании организма выделяет в кровоток ряд факторов противосвертывающей системы. Однако, повреждённый эндотелий прекращает продуцировать эндогенные вазодилататорные вещества; при этом в сосудистой зоне может возникнуть спазм. Чтобы восстановить метаболизм в органах и тканях в клинике применяют антилипемические средства в сочетании с антитромботическими [13, 14]. Показано, что лекарственная композиция, содержащая пироглутаминовую кислоту и пирролидон, обладая нейропротекторным эффектом, влияет на мозговое кровообращение у крыс в условиях глобальной преходящей ишемии мозга, а также при ишемическом поражении мозга и усиливает кровоснабжение и микроциркуляцию в коре головного мозга [1].

К настоящему времени синтезированы пептиды, содержащие N-амидино-пироглутаминовую кислоту, по методу, основанному на реакции внутримолекулярной циклизации на полимерном носителе. Показано, что такие соединения устойчивы в диапазоне pH от 2,0 до 7,4, в то время как

* - адресат для переписки

при pH 9,0 наблюдается быстрое раскрытие цикла с образованием производных гуанидино-глутаминовой кислоты [15]. Получены новые данные, касающиеся фармакодинамики H-Pyr-His-Pro-$NH_2$ и его взаимодействия с другими фармакологически активными пептидами. Эти результаты помогут оптимизировать способы его доставки в целевые ткани для достижения наиболее сильного и пролонгированного действия [16, 17].

Цель настоящей работы заключалась в создании и сравнительном исследовании корригирующего действия трёх регуляторных пептидов, включающих пироглутаминовую кислоту – 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, 5-oxo-Pro-Trp-Pro, 5-oxo-Pro-Arg-Pro, на липидный обмен, состояние системы гемостаза, концентрацию глюкозы крови, изменение массы тела в условиях моделирования экспериментального метаболического синдрома у крыс.

## МЕТОДИКА

В работе применялись пептиды 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-Arg-Pro, синтезированные в Институте молекулярной генетики РАН (Москва).

Синтез пептидов осуществляли методами классической пептидной химии в растворе. Для синтеза использовали как производные L-аминокислот, так и аминокислоты со свободными функциональными группами. Упаривание растворов проводили на вакуумном испарителе при 40°С. Индивидуальность полученных соединений проверяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ) на пластинках с силикагелем фирмы “Silufol”, Чехия). Вещества обнаруживали в ультрафиолетовом свете (УФ-свете) с помощью нингидрина, реагентов Бартона, Паули и Рейнделя-Хоппе, *о*-толидина в среде хлора. Проверку гомогенности пептидов проводили с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Синтезированные пептиды были охарактеризованы при помощи масс-спектрометрии на приборе LCQ Advantage MAX (“Thermo Electron”, США). Все растворители, используемые при синтезе пептидов, соответствующим образом абсолютировали.

При синтезе пептидов применяли метод смешанных ангидридов, карбодиимидный метод с добавлением 1-гидроксибензотриазола (БТ) и метод активированных эфиров. Защитные группы с синтезированных пептидов удаляли (OBzl – бензиловый эфир и $NO_2$ группу с Arg гидрированием в токе сухого водорода с добавлением палладиевой черни), *трет*-бутилоксикарбонильную защиту (Boc) (50% TFA в $CH_2Cl_2$), замену метилового эфира (OMe) на амид ($NH_2$) проводили с использованием реакции амидирования в метаноле насыщенным аммиаком, затем незащищенный пептид переводили в форму ацетата ($CH_3COO^-$) с помощью катионнообменной смолы Амберлист А-21. Очистку синтезированных пептидов проводили перекристаллизацией из абсолютного метанола (MeOH) сухим диэтиловым эфиром.

В таблице 1 приведены физико-химические характеристики синтезированных пептидов.

Анализ синтезированных пептидов проводили на приборе Милихром-А02, на длинах волн 200 нм, 210 нм, 220 нм, 230 нм, 240 нм, рабочая длина волны – 210 нм, на колонке Prontosil 120 C18aq, 5 мкм, 2×75 мм, система А – 0,2 М $LiClO_4$+5 мМ $HClO_4$, В – метанол, линейный градиент от 0% В до 80% В за 16,5 мин, скорость 150 мкл/мин. Состав исследуемых соединений подтвержден масс-спектрометрическим анализом на масс-спектрометре ThermoElectron LCQ Advantage MAX (“Thermo Electron”). В работе использовали препараты с чистотой не менее 97%.

Эксперименты проведены на 63-х беспородных белых крысах-самцах с массой тела 400–450 г. Все эксперименты на животных были проведены в соответствии с требованиями Российского национального Комитета по биоэтике. В экспериментах использовали нормальных здоровых крыс (норма), которые содержались на стандартном гранулированном лабораторном корме “Лабораторкорм“ (Россия) и не получали никаких препаратов. Развитие метаболического синдрома (МС) вызывали жировой диетой, энергетическая ценность которой составляла 135% от стандартного рациона, и была обогащена насыщенными жирными кислотами и холестерином [18].

До проведения экспериментов крыс содержали в течение 6-ти недель на вышеуказанной диете. Далее (через 6 недель – 43 сут) была введена следующая схема проведения эксперимента: при продолжающемся содержании крыс на жировой диете с глюкозой животные были разделены на 4 группы – 3 опытные (опыт 1, 2. 3), получавшие интраназально каждый

*Таблица 1.* Синтезированные пептиды и их физико-химические характеристики

| Пептид | Брутто-формула | Мол. вес | Чистота, % | Время удерж. мин | *Масс-спектрометрические характеристики (в положительных и отрицательных ионах) | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | $[M+H]^+$ $[M-H]^-$ | Фрагментация молекулярного пика |
| 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$ (H-Pyr-His-Pro-$NH_2$) | $C_{16}H_{22}N_6O_4$ | 362,12 | 97,1 | 4,68 | 363,1<br>361,1 | 249(100), 221(10), 115(4)<br>247(100), 242(66), 203(54) |
| 5-oxo-Pro-Arg-Pro (H-Pyr-Arg-Pro-OH) | $C_{16}H_{26}N_60_5$ | 382,20 | 98,6 | 6,21 | 383,2<br>381,2 | 268(100), 286(27), 240(10)<br>266(100), 136(20), 224(13) |
| 5-oxo-Pro-Trp-Pro (H-Pyr-Trp-Pro-OH) | $C_{21}H_{24}N_40_5$ | 412,17 | 97,8 | 11,46 | 413,2<br>411,2 | 298(100), 116(36), 395(20)<br>296(100), 282(62), 179(38) |

из исследуемых пептидов в дозе 50 мкг/кг 10-кратно и контрольные (контроль), получавшие в те же сроки и подобным образом вместо пептидов 0,85% NaCl. Через 20 ч после последнего 10-го введения пептидов или физиологического раствора (53 суток опыта) и через 7 суток (60 суток опыта) после отмены применения препаратов пептидов при продолжающемся содержании животных на жировом рационе с глюкозой у них натощак брали кровь.

Взятие крови осуществляли из *v. jugularis* в количестве 2 мл с использованием в качестве консерванта 3,8%-ного раствора цитрата натрия в соотношении кровь : консервант как 9 : 1. Образцы крови центрифугировали в двух режимах: при 1000 g в течение 5 мин для получения богатой тромбоцитами плазмы (для определения агрегации тромбоцитов) и при 3000 g в течение 10–12 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы (для определения других параметров).

Показатели жирового обмена в плазме крови исследовали энзиматическим колориметрическим методом с использованием набора реагентов фирмы "Ольвекс-Диагностикум" (Россия). При этом определяли концентрацию общего холестерина (ОХ), концентрацию холестерина липопротеинов высокой плотности (Хс-ЛПВП), концентрацию триглицеридов (ТГ). Суммарную концентрацию холестерина липопротеинов низкой плотности и очень низкой плотности определяли по формуле: Хс-(ЛПНП+ЛПОНП) = ОХ – (Хс-ЛПВП). Результат выражали в ммоль/л.

Концентрацию глюкозы в крови определяли на биохимическом анализаторе One Touch Horison (США), используя специальные тест-полоски для данного прибора.

В плазме крови производили определение следующих биохимических параметров гемостаза: суммарной (СФА), неферментативной (НФ) и ферментативной (ФФ) фибринолитической активности, активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), агрегации тромбоцитов (АТ) [19].

Взвешивание животных осуществляли до начала проведения эксперимента, то есть до начала содержания крыс на жировом рационе, затем до начала введения пептидов или физиологического раствора при развитии у крыс МС (на фоне жировой диеты с глюкозой), через 20 ч после 10-кратного введения пептидов и спустя 7 сут после отмены их применения.

Все данные были обработаны статистически по непараметрическому критерию Вилкоксона (программа STATISTICA 6).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание крыс в течение 43 суток на высококалорийной жировой диете (ВКД, контроль), обогащённой холестерином и глюкозой, привело к развитию нарушений липидного обмена. Так, содержание ОХ, Хс-(ЛПНП+ЛПОНП) и ТГ повысилось на 22%, 110% и 207% соответственно, а уровень Хс-ЛПВП снизился на 30% по сравнению с группой норма. По параметрам гемостаза в крови у животных контрольной группы отмечена гиперкоагуляция. Об этом свидетельствовало достоверное повышение свертываемости крови по данным АЧТВ на 43%, снижение фибринолиза (уменьшение СФА на 39%, НФ – на 27,3% и ФФ – на 33%) по сравнению с соответствующими нормальными значениями. Отмечено достоверное повышение уровня глюкозы крови на 3,35 ммоль/л и агрегации тромбоцитов на 123% в контроле по сравнению с нормой. Все эти данные указывали на развитие МС в организме контрольных животных, с которыми в дальнейшем и проводились эксперименты по изучению действия пептидов на жировой обмен и систему гемостаза. Такое состояние организма может быть связано с цитокином из семейства алярминов, вызывающим жировое перерождение стенки сосуда. Под его влиянием возрастает экспрессия тканевого фактора свёртывания, в результате чего в крови возникает повышенная свертываемость крови, ведущая к образованию тромбов [20].

Исследование гиполипидемического и нормохолестеринового действий пептидов 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-Arg-Pro при развитии МС у крыс через 20 ч после 10-кратного интраназального их применения на фоне ВКД (то есть на 53-и сут эксперимента) показало (табл. 2), что в крови опытных групп крыс по сравнению с контрольными снижались Хс-(ЛПНП+ЛПОНП) и ТГ. После введения 5-oxo-Pro-Arg-Pro отмечалось достоверное снижение со 100% (в контроле) до 62% уровня ОХ, до 44% – уровня Хс-(ЛПНП+ЛПОНП) и также до 44% – уровня ТГ, при применении 5-oxo-Pro-Trp-Pro достоверно, хотя и в меньшей степени, чем при применении 5-oxo-Pro-Arg-Pro, снижался уровень ТГ до 70% и Хс-(ЛПНП+ЛПОНП) – до 71%. При применении 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$ уровни ТГ и Хс-(ЛПНП+ЛПОНП) снижались до 79%. Следовательно, по характеру влияния пептидов на липидный профиль в период через 20 ч после последнего 10-го введения трёх пептидов наибольший эффект установлен при действии 5-oxo-Pro-Arg-Pro. Через 7 суток после отмены применения пептидов (то есть на 60 сутки эксперимента) вырисовывалась следующая картина: все три пептида достоверно и более значительно, чем в период через 20 ч после 10-го введения, снижали уровень ТГ со 100% в контроле до 32% (5-oxo-Pro-Arg-Pro), 33% (5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$) и до 58% (5-oxo-Pro-Trp-Pro). Дополнительно к этому через 7 суток после отмены 5-oxo-Pro-Arg-Pro и 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$ наблюдалось достоверное снижение уровней Хс-(ЛПНП+ЛПОНП) и ОХ. После использования 5-oxo-Pro-Trp-Pro отмечена только тенденцию к снижению ОХ и Хс-(ЛПНП+ЛПОНП) (табл. 2). Эти результаты подтверждают работы других исследователей по изучению других регуляторных пептидов при метаболических нарушениях в организме [11].

*Таблица 2.* Параметры общего холестерина, липидного профиля плазмы (Хс-(ЛПНП+ЛПОНП), Хс-ЛПВП, ТГ) в разные сроки эксперимента (через 20 ч после 10-ти кратного введения и через 7 суток после отмены введения пептидов) на фоне развития метаболического синдрома у крыс (M±m)

| Параметры липидного профиля | Контроль | Опыт 1 (5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$) | Опыт 2 (5-oxo-Pro-Trp-Pro) | Опыт 3 (5-oxo-Pro-Arg-Pro) |
|---|---|---|---|---|
| А. Через 20 ч после 10-го введения пептидов или NaCl | | | | |
| Общий холестерин, ммоль/л (%) | 1,909±0,162 (100%) | 1,851±0,060 (97%) | 1,527±0,071 (80%) | 1,191±0,131** (62%) |
| Хс-ЛПВП, ммоль/л (%) | 0,665±0,012 (100%) | 0,811±0,041* (122%) | 0,610±0,038 (92%) | 0,650±0,075 (98%) |
| Хс-(ЛПНП + ЛПОНП), ммоль/л (%) | 1,244±0,173 (100%) | 0,983±0,045 (79%) | 0,883±0,039* (71%) | 0,542±0,065** (44%) |
| ТГ, ммоль/л (%) | 1,987±0,115 (100%) | 1,570±0,055* (79%) | 1,396±0,162** (70%) | 0,877±0,075** (44%) |
| Б. Через 7 сут после отмены введения пептидов | | | | |
| Общий холестерин, ммоль/л (%) | 1,747±0,133 (100%) | 1,432±0,048* (82%) | 1,696±0,157 (97%) | 1,348±0,107* (77%) |
| Хс-ЛПВП, ммоль/л (%) | 0,758±0,023 (100%) | 0,857±0,069 (113%) | 0,810±0,053 (106%) | 0,752±0,018 (99%) |
| Хс-(ЛПНП + ЛПОНП), ммоль/л (%) | 0,989±0,098 (100%) | 0,722±0,050* (73%) | 0,886±0,093 (90%) | 0,595±0,070** (60%) |
| ТГ, ммоль/л (%) | 2,584±0,415 (100%) | 0,853±0,056** (33%) | 1,487±0,192** (58%) | 0,818±0,075** (32%) |

Примечание: Хс-ЛПВП - холестерин липопротеинов высокой плотности, Хс - (ЛПНП+ЛПОНП) - холестерин липопротеинов низкой плотности + липопротеинов очень низкой плотности; ТГ- триглицериды. Представлены средние значения (± ошибка средней; n=12). Значимость различий * - $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$ относительно контроля.

Противосвертывающие эффекты оксопролиновых пептидов в условиях развития МС исследованы по нескольким параметрам (табл. 3). Показано, что через 20 ч после 10-го введения пептидов крысам с развившимся МС параметры гемостаза изменялись в сторону гипокоагуляции. Так, при применении всех трёх пептидов (5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-Arg-Pro) повысились антикоагулянтная активность крови по тесту АЧТВ на 23%, 39% и 60% соответственно, СФА – на 25%, 34% и 55% соответственно, НФ – на 22%, 37% и 57% соответственно. ФФ достоверно повысился лишь при применении 5-oxo-Pro-Arg-Pro до 82%. Отмечалось подавление агрегации тромбоцитов до 44,8% (5-oxo-Pro-Trp-Pro) и до 47,5% (5-oxo-Pro-Arg-Pro) от контрольного уровня (табл. 3). Таким образом, при сравнении действия трёх пептидов на параметры гемостаза наивысший эффект обнаружен у 5-oxo-Pro-Arg-Pro. Возможно, это обусловлено присутствием в молекуле пептида остатка аргинина, который вызывает появление в кровотоке оксида азота, проявляющего антитромботическое действие [21]. Пептид 5-oxo-Pro-Trp-Pro в значительной степени влиял лишь на первичный гемостаз, снижая агрегацию тромбоцитов.

Через 7 суток после отмены применения трёх пептидов наибольший эффект на параметры гемостаза сохранялся у 5-oxo-Pro-Arg-Pro, поскольку наблюдалось достоверное повышение СФА, НФ, ФФ на 44%, 56% и 29% соответственно и подавление агрегации тромбоцитов до 47,2% от контрольных значений. При этом антикоагулянтная активность имела тенденцию к гипокоагуляции – АЧТВ повысилось на 56%. Два других пептида, 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, достоверно снижали НФ. Дополнительно к этому 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$ имел тенденцию к повышению СФА на 24% по сравнению с контролем (табл. 3). Следовательно, на фоне ВКД введение пептидов 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-Arg-Pro приводило к антикоагулянтно-фибринолитическому и антиагрегационному по отношению к тромбоцитам действию в крови, причём эти эффекты сохранялись и после отмены препаратов. Возможно, установленные эффекты изучаемых пептидов обусловлены ингибированием активности тромбина, что согласуется с данными других исследователей [22].

Одним из основных показателей, характеризующих развитие МС, является гипергликемия. Через 20 ч после 10-го введения уровень глюкозы крови в опытных пробах трёх пептидов снижался по сравнению с контрольным в среднем на 29-35%; через 7 суток после отмены препаратов пептидов эта тенденция сохранялась (табл. 3). Наибольшее уменьшение уровня глюкозы отмечалось после действия пептида 5-oxo-Pro-Arg-Pro. Следовательно, все исследованные нами пептиды 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-Arg-Pro проявляли гипогликемический эффект в организме животных даже на фоне такой патологии как МС. В работах других авторов получен подобный эффект при действии тетрапептида Панкраген-форте при нарушениях углеводного обмена [23] .

*Таблица 3.* Показатели системы гемостаза (АЧТВ, СФА, НФ, ФФ, АТ) через 20 ч после 10-ти кратного интраназального введения пептидов 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-Arg-Pro в дозе 50 мкг/кг массы тела крыс и через 7 суток после отмены лечения на фоне развития метаболического синдрома (M±m)

| Показатели крови | Контроль (0,85%-NaCl) | Опыт 1 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$ | Опыт 2 5-oxo-Pro-Trp-Pro | Опыт 3 5-oxo-Pro-Arg-Pro |
|---|---|---|---|---|
| Через 20ч после последнего введения пептидов | | | | |
| АЧТВ, сек (%) | 20,7±1,3 (100%) | 25,5±0,9* (123%) | 28,9±1,3** (139%) | 33,2±1,3 ** (160%) |
| СФА, мм$^2$ (%) | 24,0±0,9 (100%) | 30,2±3,1* (125%) | 32,3±1,5** (134%) | 37,3±1,7** (155%) |
| НФ, мм$^2$ (%) | 17,1±1,0 (100%) | 20,9±2,0 (122%) | 23,5±1,1** (137%) | 27,0±0,9** (157%) |
| ФФ, мм$^2$ (%) | 6,9±1,2 (100%) | 8,4±2,1 (121%) | 8,6±1,3 (124%) | 12,6±1,1** (182%) |
| АТ, индекс (%) | 2,9±0,3 (100%) | 2,0±0,4 (70%) | 1,3±0,1* (44,8%) | 1,4±0,1* (47,5%) |
| Уровень глюкозы крови, ммоль/л (%) | 6,9±0,6 (100%) | 4,95 ±0,6* (71%) | 5,0±0,6* (72,4%) | 4,5±0,9** (65%) |
| Через 7 сут после отмены применения пептидов | | | | |
| АЧТВ, сек (%) | 20,0±1,3 (100%) | 23,1±1,0 (115%) | 22,4±2,0 (112%) | 30,4±3,1* (150%) |
| СФА, мм$^2$ (%) | 24,5±0,9 (100%) | 30,5±1,7 (124%) | 27,3±1,7 (111%) | 35,5±1,7** (144%) |
| НФ, мм$^2$ (%) | 15,6 ±1,1 (100%) | 21,4±3,1 (136%) | 24,0±1,3** (152%) | 24,5±0,9** (156%) |
| ФФ, мм$^2$ (%) | 8,5±2,0 (100%) | 9,1±0,9 (107%) | 8,3±1,2 (97%) | 11,0±1,0** (129%) |
| АТ, индекс (%) | 3,2±0,7 (100%) | 2,0±0,3 (60%)* | 1,7±0,4 (58%) | 1,5±0,1 (47,2%)* |
| Уровень глюкозы крови, ммоль/л (%) | 7,9±0,6 (100%) | 4,9±0,6* (62,6 %) | 6,8±0,7* (83,5%) | 5,3±0,5** (67%) |

Примечание: АЧТВ - активированное частичное тромбопластиновое время, СФА - суммарная фибринолитическая активность, НФ - неферментативный фибринолиз, ФФ - ферментативный фибринолиз; АТ - агрегация тромбоцитов. Представлены средние значения (± ошибка средней; n=12). Значимость различий * - $p<0,05$, ** - $p<0,01$ относительно контроля.

Учитывая, что развитие МС сопровождается увеличением массы тела [12], представляло интерес определить изменение этого параметра при применении исследуемых пептидов. На рисунке показана динамика изменения массы тела крыс при действии оксопролиновых пептидов. К концу эксперимента (60 сут) установлено, что опытные крысы при их постоянном содержании на ВКД с повышенной концентрацией глюкозы снизили массу тела при действии 5-oxo-Pro-Arg-Pro, 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$ или незначительно прибавили в весе при действии 5-oxo-Pro-Trp-Pro. При этом контрольные животные значительно увеличили массу тела. Эти данные указывают на способность исследованных оксопролиновых пептидов сохранять первоначальную массу тела животных, независимо от содержания их на преатерогенной жировой диете.

Таким образом, 5-oxo-Pro-Arg-Pro и в меньшей степени 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$ восстанавливали нормальные значения показателей ОХ, липидного профиля даже при одновременном употреблении в пищу продуктов, приводящих к повышению уровня холестерина крови. Это связано со структурными особенностями указанных пептидов, поскольку присутствие аргинина в структуре молекулы пептида, по-видимому, способствует появлению в кровотоке оксида азота, который, кроме антитромботического, обеспечивает гиполипидемический эффект, присутствие же триптофана поддерживает нормальный жировой обмен [24]. Также впервые установлены антикоагулянтно-фибринолитические и антитромбоцитарные эффекты этих пептидов в крови крыс, постоянно употребляющих жирную пищу с избытком насыщенных жирных кислот и глюкозы. Снижение агрегации тромбоцитов под действием пептидов, вероятно, обусловлено их взаимодействием с фибриногеном, который связывается с рецептором на тромбоцитах – гликопротеином IIb-IIIa [8]. По результатам наших исследований введение данных пептидов *in vivo* не приводило к возникновению гормонального ответа, опосредованного активацией TRH1 рецепторов. В то же время эти пептиды способны модулировать активность нейропептидов и вызывать сходные физиологические эффекты, усиливая противосвёртывающие эффекты [9].

Таким образом, наши эксперименты показали эффективность действия пептидов по нормализации уровня общего холестерина и липидного профиля в плазме крови и по их способности предотвращать накопление жировой массы (то есть прибавку в весе) с одновременным положительным влиянием на параметры гемостаза в сторону активации функционального состояния противосвертывающей системы крыс.

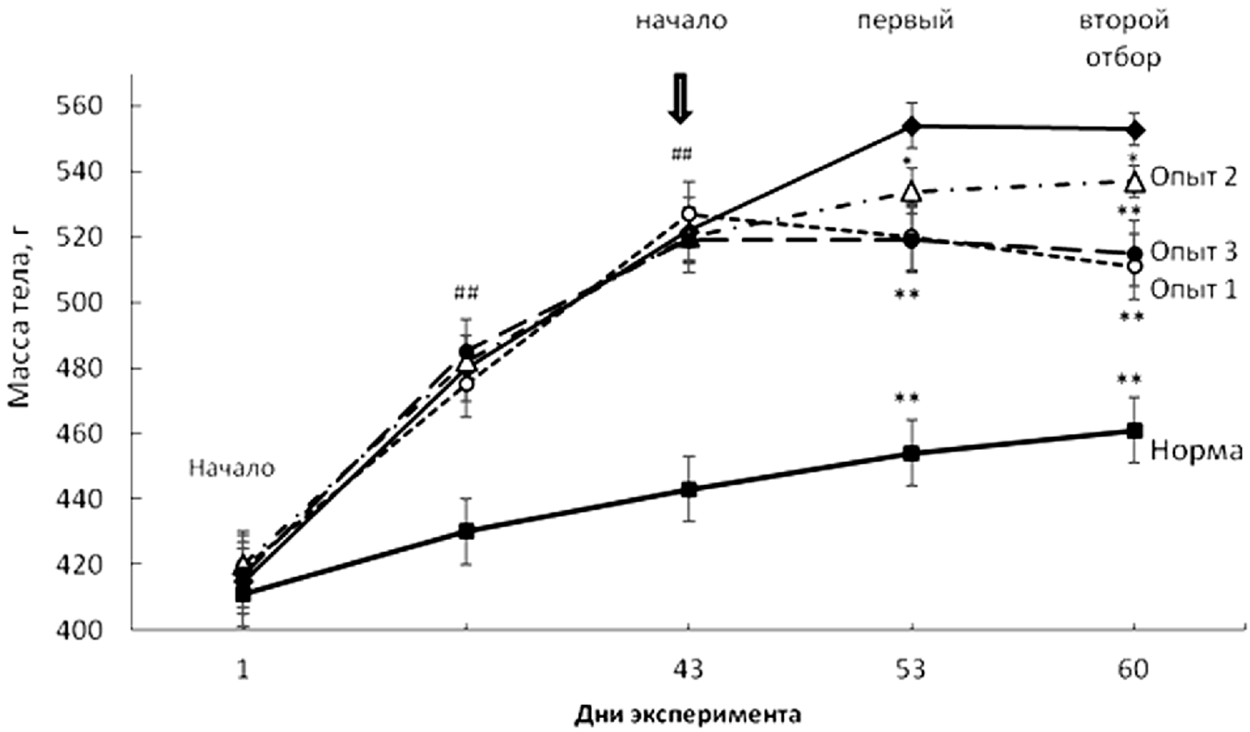


**Рисунок.** Динамика изменения массы тела крыс при действии оксопролиновых пептидов. Контроль - животные на ВКД. Опыт 1 - ВКД + 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$; Опыт 2 - ВКД + 5-oxo-Pro-Trp-Pro; Опыт 3 - ВКД + 5-oxo-Pro-Arg-Pro; норма - здоровые животные. Представлены средние значения (± ошибка средней; n=12). Значимость различий: ## -- p<0,01 относительно группы норма; * - p<0,05, ** - p<0,01 - относительно группы контроль.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Оксопролиновые пептиды 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, 5-oxo-Pro-Trp-Pro и 5-oxo-Pro-Arg-Pro, введённые многократно интраназально крысам с экспериментальным метаболическим синдромом, оказывали корригирующий эффект на уровень холестерина, концентрацию глюкозы крови и гемостатические показатели. Они предотвращали накопление жировой массы у крыс, причём этот эффект пептидов сохранялся длительное время даже после отмены их введения. Наибольший гиполипидемический, антикоагулянтный, антитромбоцитарный и фибринолитический эффект отмечен у пептида, содержащего в своей структуре остаток аргинина – 5-oxo-Pro-Arg-Pro. Другие два пептида активировали функцию противосвертывающей системы в меньшей степени. Возможно, сочетание в пептидах пролина, пироглутаминовой кислоты, антиатеросклеротического и антитромботического аргинина, а также "нормохолестеринового" триптофана способствовало усилению липолитической и гипокоагуляционной активности крови. Следовательно, исследованные нами пептиды могут в перспективе относиться к терапевтическим или лечебным средствам при развитии в организме метаболического синдрома. Целесообразность дальнейших исследований оксопролиновых пептидов как препаратов, сочетающих антитромботическое действие с улучшением жирового обмена веществ в организме, не вызывает сомнений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Луньшина Е.В., Ганьшина Т.С., Макарова Л.М., Погорелый В.Е., Мирзоян Р.С.* (2003) Экспер. клин. фармакол., **66**(1), 20-22.
2. *Kong X., Zhang D.Y., Wu H.B., Li F.X.* (2011) Biol. Pharm. Bull., **34**(5), 693-699.
3. *Vila L., Rebollo A., Adalsteisson G.S., Alegre T.M., Merlos M., Roglans N., Laguna J.C.* (2011) Toxicol. Appl. Pharmacol., **251**(1), 32-40.
4. *Хавинсон В.Х., Рыжак Г.А., Линькова Н.С., Ашапкин В.В., Дробинцева А.О., Башарина В.С., Ванюшин Б.Ф.* (2014) Молек. мед., **6**, 14-20.
5. *Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю.* (2003) Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы), Наука, СПб.
6. *Ашмарин И.П., Ляпина Л.А., Андреева Л.А., Ульянов А.М., Пасторова В.Е., Оберган Т.Ю., Алфеева Л.Ю., Мясоедов Н.Ф.* (2008) Тромбоз, гемостаз и реология, **34**(2), 38-43.
7. *Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А., Ляпина Л.А., Ульянов А.М., Шубина Т.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е., Григорьева М.Е.* (2011) Докл. РАН, сер. биол, **438**(2), 1-4.
8. *Ferrell J.E., Martin G.S.* (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 2234-2238
9. *Myasoedov N.F., Lyapina L.A., Grigorjeva M.E., Obergan T.Y., Shubina T.A., Andreeva L.A.* (2016) Pathophysiology, Elsevier BV, **23**(1), 27-33.
10. *Марцевич С.Ю.* (2005) Атеросклероз. Клиническая значимость и возможность предупреждения, "Сервиском", М.
11. *Xiao C., Hsieh J., Adeli K., Lewis G.F.* (2011) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., **301**, E429-E446.

12. *Gorbachisky I., Akpinar H., Assimos D.G.* (2010) Rev. Urol., **12**(4), 157-180.
13. *Баркаган З.С., Костюченко Г.И.* (2006) Бюл. СО РАМН, №2, 132-138.
14. *Watson T., Arya A., Sulke N., Lip G.Y.H.* (2010) Chest., **137**, 869-868:
15. *Буров С.В., Москаленко Ю.Е., Панарин Е.Ф.* (2006) ЖОХ, **76**(4), 700-702.
16. *Шевченко К.В., Вьюнова Т.В., Радилов А.С., Андреева Л.А., Нагаев И.Ю., Шевченко В.П., Рембовский В.Р., Мясоедов Н.Ф.* (2015) Докл. РАН, **465**(6), 749-752.
17. *Вьюнова Т.В., Андреева Л.А., Шевченко К.В., Шевченко В.П., Мясоедов Н.Ф.* (2016) Нейрохимия, **33**(3), 230-237.
18. *Мясоедов Н.Ф., Шубина Т.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Андреева Л.А., Ляпина Л.А.* (2013) Вопр. питания, **82**(5), 41-45.
19. *Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А.* (2012) Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. “Адвансед Солюшнз”, М.
20. *Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Тарновская С.И., Линькова Н.С.* (2013) Вестн. гематол., **9**(2), 29-33.
21. *Vasilijević A., Buzadžić B., Korać A., Petrović V., Janković A., Korać B.* (2007) J. Physiol., **584**(3), 921-933.
22. *Hasan A.A., Wernock M., Nieman M., Srikanth S., Mahdi F., Krishnan R., Tulinsky A., Schmaier A.* (2003) Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., **285**(1), 183-193.
23. *Коркушко О.В., Чижова В.П., Шатило В.Б., Хавинсон В.Х.* (2013) Усп. геронтол., **26**(2) 297-308.
24. *Solomon J.K., Geison R.L.* (1978) J. Nutrition, **108**, 936-943.

Поступила: 27. 04. 2017.
Принята к печати: 06. 09. 2017.

## OXOPROLINIC SHORT PEPTIDES – POTENTIAL PHARMACOLOGICAL MEANS OF HYPOLIDEMIC AND ANTITROMBOTIC ACTIONS

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

[1]Institute of Molecular Genetics RAS, 2 Acad. Kurchatov sq., Moscow, 123182 Russia
[2]Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
1/12 Leninskie Gory, Moscow, 119234 Russia; e-mail: lyapinal@mail.ru

One of the most urgent and important tasks of modern biological and medical research is the search and research of pharmacological agents that combine lipid-lowering and antithrombotic effects in the organism. The unique effects of the regulatory peptides of the oxoproline series (5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, 5-oxo-Pro-Trp-Pro and 5-oxo-Pro-Arg-Pro or 5-oxo-Pro-His-Pro-$NH_2$, Pyr-Trp-Pro and Pyr-Arg-Pro) have been found in rats with hypercholesterolemia (metabolic syndrome). Multiple intranasal of these peptides to animals with developed hypercholesterolemia increased anticoagulant, fibrinolytic and antiplatelet potential of the blood and simultaneously lowered increased concentrations of total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol and triglycerides. In addition, they contributed to the normalization of blood glucose levels. A week after the last admistration of these peptides, the hypocholesterolemic, normoglycemic and anticoagulant effects persisted. The relationship between the structure of peptides of the oxoproline series and their functional properties is discussed. A conclusion is made about the prospects of further studies of oxoproline peptides as drugs that combine antithrombotic effects with the improvement of fat metabolism in the body.

**Key words:** oxoproline peptides, hypocholesterolemic action, antithrombotic activity