

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ИССЛЕДОВАНИЕ ДЕЙСТВИЯ RGD-СОДЕРЖАЩИХ ПЕПТИДОВ НА АГРЕГАЦИОННУЮ СПОСОБНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ

Т. М. Васильева¹, В. А. Макаров¹, Г. Н. Петрухина¹, Т. Л. Воюшина²,
М. П. Юсупова², С. А. Новгородова², Е. К. Котлова²

Исследованы антиагрегационные свойства новых оригинальных синтетических пептидов ARGDS-NH₂ и RGD-dFK, а также пептида VPNLRGDLQVLA, являющегося фрагментом поверхностного белка вируса ящура. В процессе работы проводилось создание экологически чистого биотехнологического процесса синтеза пептидов с использованием протеолитических ферментов на различных его стадиях. Показано, что ARGDS-NH₂, RGD-dFK и VPNLRGDLQVLA ингибируют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*. Наиболее значительным антиагрегационным свойством обладают пептиды ARGDS-NH₂ и RGD-dFK. ARGDS-NH₂ и RGD-dFK снижают тромбоцитарную активность эффективнее, чем пентоксифиллин в эквивалентных концентрациях.

Ключевые слова: синтетические пептиды, агрегация тромбоцитов, GPIIb/IIIa-рецепторы

ВВЕДЕНИЕ

Фибриноген занимает исключительное место в процессе свертывания крови, так как является единственным субстратом, из которого под действием тромбина возникает волокнистая сеть фибрина, предупреждающего потерю крови. Кроме того, фибриноген принимает участие в патогенезе кардио-васкулярных заболеваний. Известно, что при повышенной концентрации фибриногена в плазме крови увеличивается риск возникновения гипертензии, ишемической болезни сердца и инфаркта миокарда [15]. Подобный эффект фибриногена может опосредоваться его влиянием на вязкость крови и отложением фибрина на атеросклеротических бляшках [15]. Связывание фибриногена с гликопротеиновыми рецепторами GPIIb/IIIa ($\alpha_{IIb}\beta_3$) тромбоцитов является конечным этапом действия всех агонистов тромбоцитов [4, 11]. Помимо фибриногена лигандами для GPIIb/IIIa-рецепторов служат фактор Виллебранда, винтронектин и фибронектин, которые необходимы для адгезии тромбоцитов к компонентам субэндотелия [9]. Взаимодействие GPIIb/IIIa с фактором Виллебранда является главным механизмом агрегации тромбоцитов при высоких скоростях сдвига.

Взаимодействие GPIIb/IIIa-рецептора активированных тромбоцитов с лигандами происходит благодаря

его способности связываться с последовательностью Arg-Gly-Asp (RGD), содержащейся в фибриногене, винтронектине, фибронектине и факторе Виллебранда [13].

Уникальная роль рецепторов GPIIb/IIIa делает соединения, способные воздействовать на активность GPIIb/IIIa, перспективной группой препаратов для коррекции функции тромбоцитов. По строению все ингибиторы рецепторов GPIIb/IIIa, используемые в терапии сердечно-сосудистых заболеваний, могут быть разделены на три группы: моноклональные антитела, циклические пептиды и малые молекулы.

Эффективность различных антагонистов GPIIb/IIIa-рецептора показана во многих исследованиях *in vivo* [8, 10, 12], причем ингибиторы фибриногеновых рецепторов оказывали более выраженное антиагрегационное действие, чем ацетилсалициловая кислота [18]. При применении различных препаратов существенно снижалась частота возникновения инфарктов миокарда и необходимость повторной реваскуляризации через 30 дней после коронарной ангиопластики [6–8]. Так, в исследовании EPIC установлено, что введение блокатора GPIIb/IIIa-рецепторов пациентам, подвергшимся ангиопластике, на 35 % сокращает риск сердечно-сосудистых осложнений и на 58 % уменьшает число смертельных исходов [6, 7]. Кроме того, снижалась необходимость повторной реваскуляризации в течение 6 мес [11].

Тем не менее, применение в клинической практике многих антагонистов GPIIb/IIIa-рецепторов, особенно моноклональных антител, затруднено. Одним из недостатков моноклональных антител является удлинение времени кровотечения [5]. Установлено также, что мо-

¹ Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза (зав. — проф. В. А. Макаров) Гематологического научного центра РАМН, Москва, 125167, Нов. Зыковский пр., 4а; e-mail: platelet@internets.ru

² Лаборатория химии белка им. В. М. Степанова (зав. — Г. Г. Честухина) ФГУП ГосНИИгенетика, Москва, 117545, 1-й Дорожный пр., 1.

ноклональные антагонисты фибриногеновых рецепторов могут провоцировать образование в организме человека собственных антител к компонентам тромбоцитарной мембраны, и, таким образом, вызывать развитие тромбоцитопении. Другая сложность, возникающая при использовании моноклональных антител, — их быстрая протеолитическая деградация в организме [16].

Циклические пептиды более стабильны, чем моноклональные антитела вследствие меньшей подверженности ферментативному гидролизу [1]. Кроме того, пептиды обладают незначительными побочными эффектами, поскольку легко метаболизируются и превращаются в нетоксичные неактивные производные. В мире идет работа по созданию новых препаратов, принадлежащих к данной группе. Следует отметить, что в настоящее время Россия не располагает собственными промышленно производимыми ингибиторами рецепторов GPIIb/IIIa. Таким образом, представляется важной разработка отечественных антагонистов GPIIb/IIIa-рецепторов.

Известно, что природа соседних с последовательностью адгезии аминокислотных остатков оказывает влияние на сродство пептида к тому или иному интегрину. Показано, что для ингибирования тромбообразования наиболее подходящими являются 5 – 7-членные пептиды, содержащие последовательность Arg-Gly-Asp-Phe или Arg-Gly-Asp-Ser. Эти и подобные пептиды синтезируют, в основном, твердофазным способом, который протекает с использованием дорогостоящих и токсичных реагентов, необходимых для блокирования и деблокирования функциональных групп; к тому же он не обеспечивает оптическую чистоту продукта.

Ферментативный метод синтеза пептидов, в состав которых входят трифункциональные аминокислоты, такие как Arg и Asp, представляет принципиально новый биотехнологический способ получения этих соединений, обладающий значительными преимуществами.

Использование ферментов в качестве катализаторов синтеза пептидов позволяет избежать рацемизации продуктов в ходе реакции. Кроме того, при включении в состав пептида аминокислот с боковыми функциональными группами нет необходимости вводить их защиту и применять токсичные реагенты, что уменьша-

ет количество стадий синтеза и делает этот способ в большей степени соответствующим современным экологическим требованиям.

Цель работы — изучение влияния новых оригинальных синтетических пептидов, полученных ферментативным методом, на агрегационную активность тромбоцитов человека *in vitro*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной работе изучались антиагрегационные свойства двух синтетических пептидов ARGDS-NH₂ и RGD-dFK, а также пептида VPNLRGDLQVLA, являющегося фрагментом структуры поверхностного белка вируса ящура.

Все исследованные соединения были предоставлены сотрудниками лаборатории химии белка им. В. М. Степанова (зав. — Г. Г. Честухина) ФГУП ГосНИИ-генетика. Использование ферментативного метода на ключевых этапах синтеза наряду с традиционными химическими способами позволило получить целевые пептиды высокой чистоты и с хорошим выходом. Конечные пептиды и все промежуточные соединения выделяли экстракцией *n*-бутанолом или этилацетатом, флаш-хроматографией, переосаждением из органических растворителей и полупрепаративной ВЭЖХ.

Эксперименты по изучению антиагрегационной активности синтезированных пептидов были выполнены с использованием венозной крови здоровых доноров ($n = 50$), которую получали путем пункции кубитальной вены и стабилизировали 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали в течение 10 мин при 1000 об/мин, после чего верхний слой плазмы переносили в другую пробирку, а остаток повторно центрифугировали в течение 20 мин при 3000 об/мин для получения плазмы, бедной тромбоцитами.

Агрегацию тромбоцитов исследовали на агрегометре фирмы “Viola” (Россия) по методу G. G. V. Vorn [3]. С этой целью в кювету прибора помещали 300 мкл богатой тромбоцитами плазмы, используя в качестве оптического контроля такой же объем плазмы, не содержащей тромбоцитов. Исходная оптическая плотность богатой тромбоцитами плазмы (A_0) принималась за 100 %. О степени агрегации (A_{max}) судили по максима-

Таблица 1. Влияние синтетического пептида ARGDS-NH₂ и RGD-dFK на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*, индуцированную АДФ (A_{max} , %)

АДФ, $1 \cdot 10^{-5}$ М (контроль)	Концентрация, мМ							
	10	5	2,5	1	0,1	0,01	$1 \cdot 10^{-3}$	$1 \cdot 10^{-4}$
ARGDS-NH₂								
50,5 ± 1,7	2,5 ± 0,3*	20,6 ± 3,0*	24,6 ± 2,7*	32,5 ± 1,7*	38,4 ± 1,5*	36,9 ± 1,9*	35,5 ± 0,8*	39,9 ± 0,9*
RGD-dFK								
55,7 ± 2,2	0,9 ± 0,5*	10,2 ± 2,3*	31,9 ± 3,7*	37,9 ± 2,4*	41,9 ± 1,8*	43,1 ± 2,5*	45,5 ± 1,1*	50,1 ± 1,6

* различия достоверны по отношению к контролю ($p < 0,05$).

льной величине падения оптической плотности по окончании агрегационного процесса по сравнению с A_0 . Исследуемое вещество добавляли в кювету агрегометра, инкубировали в течение 5 мин при 37° С, затем индуцировали процесс тромбоцитарной агрегации.

В качестве проагреганта в работе использовали АДФ (“Boehringer Mannheim”, Австрия) в конечной концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М.

Статистический анализ полученных данных проводили в соответствии с общепринятыми методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа состояла из двух этапов. В первой части изучали влияние пептидов ARGDS-NH₂, RGD-dFK и VPNLRGDLQVLA на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*. Во второй части работы была проведена сравнительная оценка антиагрегационной активности данных пептидов и пентоксифиллина. Данный препарат был выбран для сравнения, так как является одним из широко используемых лекарственных средств при лечении ишемических инсультов и других заболеваний, сопровождающихся повышенным риском тромбообразования [2, 14, 17].

В результате проведенных экспериментов показано, что пептид дозо-зависимо ингибировал агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную АДФ, во всем диапазоне исследованных концентраций: для ARGDS-NH₂ и RGD-dFK $1 \cdot 10^{-4}$ — 10 мМ, для VPNLRGDLQVLA 0,1 – 10 мМ. В максимальной исследованной концентрации ARGDS-NH₂ практически полностью блокировал тромбоцитарное взаимодействие. В более низких концентрациях (0,01 – 2,5 мМ) ARGDS-NH₂ снижал агрегацию в 1,5 – 2 раза по сравнению с контролем. При дальнейшем уменьшении концентрации ARGDS-NH₂ его антиагрегационный эффект становился менее выраженным. Тем не менее, даже в минимальных исследованных концентрациях данный пептид достоверно ингибировал активность тромбоцитов. При этом тромбоцитарная агрегация оставалась сниженной в 1,25 – 1,3 раза по сравнению с контрольной величиной (табл. 1).

Пептид RGD-dFK также оказывал антиагрегационное действие. Достоверное уменьшение тромбоцитарной агрегации наблюдалось при его применении в диапазоне концентраций 0,001 – 10 мМ. Инкубирование богатой тромбоцитами плазмы с максимальной исследованной концентрацией RGD-dFK приводило к полному ингибированию агрегационной активности. При снижении концентрации антиагрегационный эффект RGD-dFK сохранялся. При этом отмечено снижение агрегационной активности тромбоцитов в 1,3 – 1,7 раза по сравнению с контролем. В наименьшей концентрации RGD-dFK ($1 \cdot 10^{-3}$ мМ) также оказывал антиагрегационное влияние и достоверно инги-

Таблица 2. Влияние пентоксифиллина на агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*, индуцированную АДФ (A_{\max} , %)

АДФ $1 \cdot 10^{-5}$ М (контроль)	Концентрация пентоксифиллина, мМ		
	10	1	0,1
$53,6 \pm 1,9$	$40,7 \pm 1,8^*$	$43,1 \pm 1,8$	$49,1 \pm 4,4$

* $p < 0,05$.

бирова́л тромбоцитарное взаимодействие в 1,2 раза. (см. табл. 1).

Фрагмент поверхностного белка вируса ящура пептид VPNLRGDLQVLA проявил антиагрегационные свойства. Во всех исследованных концентрациях (1 – 10 мМ) данное соединение уменьшало АДФ-индуцированную агрегацию в среднем в 1,5 раза по сравнению с контрольным экспериментом.

Таким образом, три исследованных соединения проявили антиагрегационную активность. Следует отметить, что синтетические пептиды ARGDS-NH₂ и RGD-dFK в одинаковых концентрациях оказывали примерно равный по своей силе эффект.

Во второй части работы проведена сравнительная оценка антиагрегационного эффекта синтетических пептидов с влиянием пентоксифиллина.

Инкубирование богатой тромбоцитами плазмы с пентоксифиллином приводило к достоверному снижению АДФ-индуцированной агрегации только при применении препарата в концентрации 10 мМ. Тромбоцитарная агрегация при этом уменьшалась с $53,6 \pm 1,9$ % до $40,7 \pm 1,8$ %, т.е. в 1,3 раза. Пентоксифиллин в концентрациях 1 и 0,1 мМ не влиял на агрегационную способность тромбоцитов (табл. 2). В то же время, пептиды ARGDS-NH₂ и RGD-dFK обладали антиагрегационной активностью во всех исследованных концентрациях (0,1 – 10 мМ).

Таким образом, из полученных данных следует, что пептиды ARGDS-NH₂ и RGD-dFK ингибируют тромбоцитарную активность эффективнее, чем использующийся в клинической практике пентоксифиллин. Данные соединения могут быть использованы в качестве основы для создания новых лекарственных препаратов, регулирующих тромбоцитарную агрегацию.

Работа поддержана грантом Минобрнауки Лот 2005-ЖС-12.2/003.

ВЫВОДЫ

1. Пептиды ARGDS-NH₂, RGD-dFK и VPNLRGDLQVLA ингибируют АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов человека *in vitro*.
2. Наиболее значительными антиагрегационными свойствами обладают синтетические пептиды ARGDS-NH₂ и RGD-dFK.
3. ARGDS-NH₂ и RGD-dFK ингибируют тромбоцитарную активность эффективнее, чем пентоксифиллин.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. П. Панченко, *Тер. архив*, **69**(9), 66 – 71(1997).
2. P. M. Bath and F. J. Bath-Hextall, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **3**, CD000162 (2004).
3. G. G. V. Born, *Nature* (London), **194**, 927 – 929 (1962).
4. A. U. Collier, B. S. Anderson, and H. F. Weisman, *Haemostasis*, **26**(Suppl. 4.), 285 – 293 (1996).
5. B. S. Collier, *Thromb. Haemost.*, **86**(1), 427 – 423 (2001).
6. EPIC Investigators, *N. Engl. J. Med.*, **330**(8), 956 – 961 (1994).
7. EPISTENT Investigators. *Lancet.*, **352**(5), 352 – 392 (1998).
8. J. J. Ferguson and D. Vaisman, *Expert. Opin. Investig. Drugs.*, **10**(11), 1965 – 1976 (2001).
9. B. Haimovich, P. Ji. E. Ginalis, et al., *Thrombos. Haemostas.*, **81**(4), 618 – 624 (1999).
10. K. Konstantopoulos and S. A. Mousa, *Curr. Opin. Investig. Drugs.*, **2**(8), 1086 – 1092(2001).
11. J. Lefkovits, E. F. Plow, and E. J. Topol, *New Eng. J. Med.*, **332**(23), 1553 – 1559(1995).
12. E. I. Lev, J. I. Osende, M. F. Richard, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **37**(3), 847 – 855 (2001).
13. S. Nair, K. Ghosh, B. Kulkarni, et al., *Platelets.*, **13**(4), 387 – 393(2002).
14. M. T. Santos, J. Valles, J. Aznar, et al., *Thromb. Res.*, **72**(3), 219 – 229 (1993).
15. D. J. Schneider, P. Q. Baumann, M. B. Holmes, et al., *Thromb. Haemost.*, **85**(2), 309 – 313(2001).
16. G. S. Sreeram, A. D. Sharma, and T. F. Slaughter, *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.*, **15**(2), 237 – 240 (2001).
17. J. Szefer, *Int. J. Artif. Organs.*, **18**(10), 633 – 648 (1995).
18. J. D. Talley, *J. Interv. Cardiol.*, **14**(2), 129 – 142 (2001).

Поступила 05.12.05

EFFECT OF SYNTHETIC RGD-CONTAINING PEPTIDES ON PLATELET AGGREGATION

T. M. Vasil'eva¹, V. A. Makarov¹, G. N. Petrukhina¹, T. L. Voyushna², M. P. Yusupova², S. A. Novgorodova², and E. K. Kotlova²

¹ Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Novo-Zykovskii pr. 4a, Moscow, 125167 Russia;

² Research Center for Genetics, 1 Dorozhnyi pr. 1, Moscow, 117545 Russia

The influence of new synthetic peptides ARGDS-NH₂ and RGD-dFK (synthesized by the fermentative method) and VPNLRGDLQVLA (a fragment of the foot-and-mouth virus's surface peptide) on the ADP-induced human platelet aggregation in vitro was studied. All peptides were found to inhibit the human platelet aggregation, but the synthetic peptides (ARGDS-NH₂ and RGD-dFK) showed the most pronounced effect. Significant decrease in the platelet aggregation was observed at their concentrations within 0.1 – 10 mM. ARGDS-NH₂ and RGD-dFK inhibited the platelet aggregation stronger than the reference drug pentoxifylline at equivalent concentrations.