

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.115.31:616-005.1-08:616.017.1

А.В.Патеюк, Б.И.Кузник, Е.М.Кустовская

### ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДОВ LYS-GLU-ASP-GLY И GLY-GLU-ASP-ALA НА ИММУНИТЕТ, СВЕРТЫВАНИЕ КРОВИ И ФИБРИНОЛИЗ В ОПЫТАХ IN VITRO

Читинская государственная медицинская академия (ректор – заслуженный врач РФ, д.м.н., профессор А.В.Говорин)

**Резюме.** Установлено, что синтезированные на основании изучения аминокислотного состава цитомединов передней (ПДГ - Lys-Glu-Asp-Gly) и задней (ЗДГ - Gly-Glu-Asp-Ala) долей гипофиза тетрапептиды, усиливают экспрессию рецепторов на Т-общих, Т-активных и В-лимфоцитах, замедляют свёртываемость крови и стимулируют фибринолиз. Показано, что Lys-Glu-Asp-Gly действует преимущественно на Т-, а Gly-Glu-Asp-Ala - на В-лимфоциты. Наиболее интенсивно обнаруженные эффекты проявляются при совместном действии пептидов.

Нашими исследованиями, проведенными на протяжении многих лет, установлено, что комплексы полипептидов, полученных из различных органов и тканей: тималин, бурсилин, эпителин, кортексин и другие - способны стимулировать реакции клеточного и гуморального иммунитета, а также оказывать влияние на свёртываемость крови и фибринолиз (6, 7, 8, 9, 11, 15). В дальнейшем было показано, что аналогичное действие, хотя и выраженное значительно слабее, присуще пептидам, полученным путём целенаправленного синтеза на основании изучения аминокислотного состава цитомединов (16), выделенных из вилочковой железы, эпифиза и печени (10, 16, 17).

Между тем за последние годы в отечественной и зарубежной литературе появилось немало сведений, говорящих о том, что пептиды способны оказывать влияние на адгезию и агрегацию тромбоцитов, процесс свёртывания крови, самосборку фибрина и фибринолиз. В частности, установлено, что тетрапептид тафцин, обладающий антиполимеризационным действием по отношению к фибрин-мономеру, одновременно связывает гепарин (13). Другой пептид - 1-тимозин способен нейтрализовать тромбин и тем самым препятствовать свёртыванию крови (14, 19).

Сильный ингибитор тромбина, представляющий собой низкомолекулярный пептид (ММ 3,5 кДа), был выделен из слюнных желёз мухи цеце (18).

Установлено, что малые пептидные молекулы, включающие аминокислотную последовательность Arg-Gly-Asp, и циклические пептиды с последовательностью Lys-Gly-Arg способны тормозить агрегацию тромбоцитов (13, 20).

Нами на основании исследования аминокислотного состава цитомединов передней и задней долей гипофиза синтетическим путём получены два тетрапептида. Один из них условно назван тетрапептидом передней (ТПДГ - Lys-Glu-Asp-Gly), а второй - задней доли гипофиза (ТЗДГ - Gly-Glu-Asp-Ala). Учитывая данные литературы (1, 13, 14, 19) и сведения, полученные нами ранее (8, 9), мы решили выяснить, как действуют синтезированные тетрапептиды на состояние иммунитета и процесс свёртывания крови в опытах in vitro.

**МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** В экспериментах использована кровь 10 здоровых людей и 10 больных с ожоговой болезнью, у которых зарегистрировано наличие клеточного иммунодефицита и внутрисосудистое свёртывание крови. О степени воздействия на иммунитет мы судили по экспрессии рецепторов на Т и В-лимфоцитах. С этой целью лимфоциты людей инкубировались с ТПДГ или ТЗДГ в дозе 0,01 мг на протяжении двух часов, а затем методом розеткообразования определяли количество Т-общих, Т-активных и В-лимфоцитов (3, 5). В контроле полипептиды заменяли таким же количеством трисбуфера, на котором разводили изучаемые препараты.

При исследовании свёртываемости крови к 0,1 мл плазмы добавляли 0,01 мг тетрапептида, растворённого в 0,1 мл трисбуфера. При этом изучалось, как изменяется время рекальцификации плазмы, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое и тромбиновое время, скорость лизиса эуглобулинов, хагеманзависимый фибринолиз и лизис сгустка, стимулированный стрептокиназой. Все перечисленные методики являются общепринятыми и вошли в современные руководства по изучению системы гемостаза (2, 4).

Полученные результаты обработаны методом вариационной статистики и вычислен показатель достоверности (Р).

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.** Прежде всего мы решили выяснить как влияют синтезированные нами олигопептиды на экспрессию рецепторов лимфоци-

тов здоровых людей и больных с наличием вторичных иммунодефицитов. С этой целью проведены исследования на студентах-добровольцах и больных с ожогами. Полученные данные отображены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1  
Влияние ОПДГ и ОЗДГ на экспрессию рецепторов лимфоцитов периферической крови здоровых людей (M+m)

Изучаемые показатели	1 n=10	2 n=10	3 n=10	4 n=10
Т-активные лимфоциты P	25,1±2,1	29,5±2,2	27,1±1,7	31,7±2,3 <0,01
Т-общие лимфоциты	47,5±2,9	51,4±2,4	49,8±2,2	53,1±2,3
В-лимфоциты P	23,8±1,8	25,7±2,1	26,5±1,9	27,1±2,1 <0,01

Условные обозначения:

1. Лимфоциты, проинкубированные с физиологическим раствором;
  2. Лимфоциты, проинкубированные с ТПДГ;
  3. Лимфоциты, проинкубированные с ТЗДГ;
  4. Лимфоциты, проинкубированные одновременно с ТПДГ и ТЗДГ;
- P - достоверность между 1 и 2, 3.

Таблица 2  
Влияние ТПДГ и ТЗДГ на экспрессию рецепторов лимфоцитов периферической крови людей с ожогами (M+m)

Изучаемые показатели	1 n=10	2 n=10	3 n=10	4 n=10
Т-активные лимфоциты, % P	10,7±1,8	17,3±2,4	13,2±2,3	22,6±2,8 <0,001
Т-общие лимфоциты, % P	21,3±2,6	31,9±3,1	26,5±2,7	36,4±3,3 <0,001
В-лимфоциты, % P	19,2±2,1	23,4±2,5	25,7±2,2	29,8±2,3 <0,05

Условные обозначения те же, что и в табл. 1.

Как видно из представленных данных, используемые нами тетрапептиды не влияют на экспрессию рецепторов лимфоцитов здоровых людей. В то же время у больных с вторичными иммунодефицитами под воздействием ТПДГ значительно увеличивается количество общих и активных Т-лимфоцитов, хотя их число не доходит до нормы. Под влиянием ТЗДГ у больных с ожогами отмечается тенденция к увеличению общих Т-лимфоцитов и рост числа В-лимфоцитов. Наиболее интенсивное действие на экспрессию ре-

цепторов Т- и В-лимфоцитов проявляется при совместном внесении в культуру клеток ТПДГ и ТЗДГ. Следует заметить, что в последнем случае доза каждого из пептидов была уменьшена в 2 раза.

Не вызывает сомнения, что обнаруженные эффекты связаны с переходом 0-лимфоцитов в Т- и В-лимфоциты под воздействием изучаемых тетрапептидов.

В следующей серии наблюдения мы проследили, как влияют исследуемые тетрапептиды на основные показатели свёртывания крови и фибринолиза у здоровых людей и больных с ожогами.

Оказалось, что используемые тетрапептиды на плазме здоровых и больных людей удлиняют время рекальцификации, АЧТВ, протромбиновое и тромбиновое время, что, безусловно, объясняется способностью изучаемых пептидов связывать тромбин.

На плазме здоровых людей антикоагулянтное действие наиболее интенсивно проявляется под влиянием ТЗДГ. Вместе с тем, ТПДГ и ТЗДГ в

Таблица 3  
Влияние ТПДГ и ТЗДГ на некоторые показатели свертывания крови и фибринолиза здоровых людей (M+m)

Изучаемые показатели	1 n=10	2 n=10	3 n=10	4 n=10
Время рекальцификации плазмы, с P	68,2±3,6	81,2±2,6	113,5±2,8	128,5±2,3 <0,001
Протромбиновое время, с P	16,4±0,9	20,9±1,4	23,1±1,2	23,1±1,8 <0,01
АЧТВ, с P	41,9±1,8	60,4±2,6	101,9±3,9	112,6±4,4 <0,001
Тромбиновое время, с P	20,8±1,2	26,2±1,1	28,6±1,2	30,5±1,5 <0,01
Эуглобулиновый фибринолиз, мин P	337,5±10,0	212,5±10,0	207,5±7,5	187,5±10,0 <0,001
Фибринолиз, активированный урокиназой, мин	17,4±1,4	18,2±1,1	17,9±1,6	18,8±1,7
Хагеманзависимый фибринолиз, мин	18,7±1,2	18,9±1,1	19,3±1,4	19,7±1,3

Условные обозначения те же, что и в табл. 1.

Таблица 4

Влияние ТПДГ и ТЗДГ на некоторые показатели свертывания крови людей с ожогами (M+m)

Изучаемые показатели	1 n=10	2 n=10	3 n=10	4 n=10
Время рекальцификации плазмы, с P	54,7±5,2	72,3±4,8	74,5±5,6	86,4±5,3
Тромбиновое время, с P	10,6±2,1	14,7±2,9	15,1±2,4	16,8±3,6
Протромбиновое время, с P	12,6±2,4	20,6±3,5	23,4±4,2	24,9±4,4
АЧТВ, с P	33,5±4,3	48,8±5,1	50,2±4,7	54,6±5,6
Эуглобулиновый фибринолиз, мин P	420,0±18,7	165,8±16,4	174,8±15,6	172,4±17,5

Условные обозначения те же, что и в табл. 1.

одинаковой степени стимулируют тотальный эуглобулиновый фибринолиз и не оказывают влияния на лизис сгустка, активированный стрептокиназой и каолином.

Полученные факты заставляют предположить, что исследуемые полипептиды обладают свойствами активатора пламиногена и не способны заменить плазмин.

Таким образом, синтезированные нами пептиды могут одновременно стимулировать клеточный и гуморальный иммунитет, связывать тромбин и активировать фибринолиз. Мы надеемся, что со временем эти соединения найдут клиническое применение при заболеваниях, сопровождающихся вторичными иммунодефицитами и хронической формой ДВС-синдрома.

### ВЫВОДЫ

1. Синтезированные на основе изучения аминокислотного состава цитомединов передней и задней долей гипофиза тетрапептиды обладают способностью увеличивать экспрессию рецепторов на Т- и В-лимфоцитах, замедляют свертываемость крови и стимулируют фибринолиз.
2. Тетрапептид передней доли гипофиза в большей степени повышает содержание Т-общих и Т-активных, а задней - В-лимфоцитов.
3. Антикоагулянтное действие в большей степени присуще тетрапептиду задней доли гипо-

физа.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин И.П., Каменский А.А., Ляпина Л.А. и др. Глипролины как самостоятельные регуляторы и стабилизаторы других пептидов // Вопр. биол. мед. и фарм. химии. 2002. №1. С. 24-27.
2. Баркаган З.С., Момот А.П. Основы нарушений диагностики гемостаза. М. "Ньюдиамед АО". 1999. 220 с.
3. Иммунологические методы. Пер. с нем. / Под ред. Х. Фримеля. М. "Мир". 1979. 518 с.
4. Исследование системы крови в клинической практике. Редакторы Г.И.Козинец, В.А.Макаров. М. "Триада-Х". 1998. 480 с.
5. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. СПб. Изд-во "Гиппократ". 1998. 156 с.
6. Кузник Б.И., Васильев Н.В., Цыбиков Н.Н. Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма. М. "Медицина". 1989. 320 с.
7. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины и их роль в регуляции физиологических функций // Успехи совр. биологии. 1995. Т. 115, вып. 3. С. 353-367.
8. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований. СПб. "Наука". 1998. 310 с.
9. Кузник Б.И., Хавинсон В.Х., Витковский Ю.А. и др. Применение пептидных биорегуляторов в хирургии и онкологии. Чита. 2001. 352 с.
10. Малежик Л.П., Хасанова Н.В., Корешкова Г.Н. Влияние ливагена на иммунитет и гемостаз // Проблемы биорегулирующей терапии в эксперименте и клинике. Чита. 2002. С. 14-15.
11. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., Писарев О.А. Выделение из тимуса и изучение природы фактора, стимулирующего иммуногенез // Докл. АН СССР. 1977. №3. С. 491-494.
12. Пасторова В.Е., Ляпина Л.А., Смолина Т.Ю., Ашмарин И.П. Антикоагулянтные и фибринолитические эффекты простейших пролинсодержащих пептидов // Известия РАН, сер. Биол. 1998. № 3. С. 1-5.
13. Пасторова В.Е., Ляпина Л.А., Черкасова К.А., Ашмарин И.П. Пептиды как ингибиторы свертывающей активности тромбина и агрегации тромбоцитов // Успехи физиологических наук. 1999. Т. 30. № 2. С. 80-91.
14. Струкова С.М., Дугина Т.Н., Самаль А.Б. Иммунорегулятор 1-тимозин - ингибитор ферментативной активности -тромбина // Бюл. Экспер. биол. и мед. 1995. Т. 306, № 1. С. 229-232.
15. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г., Малинин В.В. и др. Средство, стимулирующее репаративные процессы, и способ его применения // Патент РФ № 2139085. 1999.
16. Хавинсон В.Х., Рыбакина Е.Г., Малинин В.В. и др.

---

Влияние коротких пептидов на реакцию бласттрансформации тимоцитов и процесс сигнальной трансдукции по сфингомиелиновому пути // Бюлл. экпер. биол. мед. 2002. №5. С. 574-577.

17. Чиркунов А.В. Влияние тималина, тимогена и виллона на некоторые показатели иммунитета и гемостаза. Автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Чита. 2000. 20 с.
18. Cappello M., Bergum P.W., Vlasuk G.P. et al. Isolation and characterization of the thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans* // Am. J. Trop. Med. Hig. 1996. V. 54, № 5. P. 475-480.
19. Goldstein A.L., Badamchian M. Biology of thymosin peptides // International journal on immunorehabilitation. 2001. V. 3, № 2. P. 65.
20. 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. 1995. V. 375. P. 15-17.