

Экспериментальная и профилактическая медицина

УДК 577.171.55

## **Изменение активности коагуляционного фактора XIII под действием гипоталамических нейроспецифических соединений**

**З.Х. Паронян, Л.С. Григорян, А.А. Степанян,  
Л.Н. Аракелян, Р.М. Срапионян**

*Институт биохимии им. Г.Х. Бунятыана НАН РА  
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5 /1*

*Ключевые слова:* пролином богатые пептиды, белок-гормональный комплекс, фибринстабилизирующий фактор, гемостаз

Гипоталамические пролином богатые пептиды (ПБП) ПБП-1 и GX-NH<sub>2</sub> регуляторные пептиды, которые обладают полифункциональными свойствами, включая иммуномодулирующие, антиоксидантные, противоопухолевые, нейропротекторные и антибактериальные свойства. Наличие в структуре ПБП большого количества аминокислотных остатков пролина дает им возможность легко вступать во взаимодействие с различными белковыми молекулами, в том числе участвующими в ключевых биохимических каскадах реакций. Они влияют на различные процессы гемостаза, на тромбино- и фибринообразования, фибринолитическую активность крови [7].

Установлено, что ПБП-1 в зависимости от дозы ускоряет гемокоагуляцию и подавляет фибринолитическую активность плазмы крови крыс, продлевая время фибринолиза от 20 до 65% [2,10]. В противоположность GX-NH<sub>2</sub> ускоряет тромболитическую активность крови, сокращая время фибринолиза на 23-45%. Максимального эффекта пептид достигает при воздействии низкими дозами (1мкг/100г) [3]. Отдельного внимания заслуживает нейроспецифический кардиоактивный белок-гормональный комплекс гипоталамуса – белок-носитель нейрогормона С (БНС), который имеет активное регуляторное действие на функциональное состояние системы свертывания крови, в частности на его некоторые биохимические показатели [5]. Выявлено эффективное участие БНС в регуляции метаболизма одного из ключевых ферментов гемокоагуляции – маркера общего коагуляционного пути ФХа с его ингибитором, антитромбином III (АТIII). Доказано участие БНС в этом процессе на уровне, свя-

зывают обе системы (внутренний и внешний механизмы), объединяющиеся на стадии образования X/Ха, и наличия нового альтернативного пути метаболизма ФХа [8].

Исходя из вышеизложенного и учитывая влияние этих гипоталамических нейроспецифических соединений на свертываемость крови, мы решили изучить их влияние на активность последнего фермента коагуляционного каскада плазмы крови, фибринстабилизирующего фактора XIII (ФХIII).

### Материал и методы

Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах-самцах Альбино массой 180 – 200г. Всего было использовано 88 животных, которые были распределены на 4 группы: особи группы 1 получали внутривенные инъекции физиологического раствора (0,85% NaCl) – контроль. Животные групп 2, 3 и 4 получали ПБП-1, GX-NH<sub>2</sub>, БНС соответственно, которые вводились в яремную вену в концентрациях 1, 2.5 и 5мкг / 100г массы тела.

Кровь для исследования брали из той же вены с антикоагулянтом 3,8 % цитратом натрия в соотношении 9:1. Для определения воздействия ПБП-1, GX-NH<sub>2</sub> и БНС на активность фибринстабилизирующего фактора плазмы крови крыс был использован метод В.П. Балуда и др. [1], принцип которого основан на определении времени растворения сгустка фибрина в растворе кислой мочевины после добавления к реагирующей смеси монодоксиусной кислоты, которая блокирует активность ФХIII. Время растворения сгустка зависит от активности фермента исследуемой плазмы, которую устанавливают по формуле  $A\Phi = A \cdot 100 : B$ , где А – время лизиса исследуемой плазмы, В – время лизиса контрольной плазмы.

В опытах использовали синтетические препараты ПБП-1 и GX-NH<sub>2</sub>, полученные в лаборатории природных соединений химического факультета Санкт-Петербургского государственного университета, и электрофоретически гомогенный гипоталамический белок-гормональный комплекс БНС, выделенный по методу Р.М. Срапионян [4].

Для определения статистической достоверности различий между контролем и опытными выборками использовали непараметрический критерий Манн – Уитни U. Уровень значимости  $p \leq 0,05$  считали достоверным по сравнению с контролем.

### Результаты и обсуждение

Плазменный фактор XIII (ФХIII) представляет собой тетрамерный белок, состоящий из четырех субъединиц: двух каталитических А (ФХIII-А) и двух ингибиторных В (ФХIII-В) [6]. В конечной фазе каскада коа-

гуляции с помощью тромбина и  $\text{Ca}^{2+}$  ФХШ превращается в активную трансглутаминазу (ФХШа), которая необходима для поддержания гемостаза, так как активный фермент стабилизирует фибрин путем сшивания его  $\alpha$ - и  $\gamma$ -цепей, укрепляет фибриновый сгусток ковалентными связями, защищая его от быстрого удаления фибринолитической системой. Врожденный недостаток ФХШ сопровождается тяжелым геморрагическим синдромом, вызывая опасный для жизни кровотокающий диатез, клинические последствия которого хорошо изучены. Недостаток активности XIII фактора нарушает процесс образования физиологического фибрина, что может привести к кровоточивости. Снижение активности фактора может наблюдаться также при заболеваниях печени (гепатиты, цирроз, рак с метастазами в печень), системных поражениях кровяного аппарата, под влиянием антикоагулянтов непрямого действия, при врожденных аномалиях и т. п., а также может являться следствием появления в крови ингибитора фермента. Активность ФХШ увеличивается у больных с тромбоэмболическими осложнениями, атеросклерозом, послеоперационных вмешательствах, при росте опухоли и метастаз, у рожениц. Все эти болезни распознаются только с помощью лабораторного исследования активности XIII фактора. Поскольку с нашей стороны уже подтверждено, что ряд нейроспецифических соединений гипоталамуса принимает активное участие в процессе гемостаза, то уместно изучить их участие в формировании и стабилизации фибриновых сгустков, что происходит благодаря активности ФХШ. Влияние исследуемых соединений на активность ФХШ приведено в таблице и рисунке.

Таблица

*Дозозависимое изменение активности ФХШ под действием гипоталамических нейроспецифических соединений ПБП-1, GX-NH<sub>2</sub>, БНС*

Доза	1мкг/100г	2.5 мкг/100г	5 мкг/100г
Название препарата	Активность ФХШ (%)		
ПБП-1	+ 16	- 58	—
GX-NH <sub>2</sub>	- 26	—	—
БНС	—	- 29	- 29

Как видно из таблицы, все протестированные нами соединения были испытаны в трех дозах (1, 2.5 и 5 мкг/100г), но не во всех случаях они оказывали влияние на активность фактора XIII, например, ПБП-1 при больших дозах (5мкг/100г) не оказывает эффекта, GX-NH<sub>2</sub> только в низких дозах (1мкг/100г) влияет на активность фермента, тогда как БНС действует только в больших дозах (2.5 и 5 мкг/100г). На рис. А, Б, В

показано, что исследуемые гипоталамические нейроспецифические соединения в зависимости от дозы оказывают различное влияние на активность фибринстабилизирующего фактора. Так, ПБП-1 (рис. А) в небольших дозах (1мкг/100г) увеличивает активность ФХШ на 16%, при увеличении количества пептида до 2.5 мкг, наоборот, подавляет активность фермента на 58%, а удвоение этого количества (5мкг) не имеет никакого влияния.

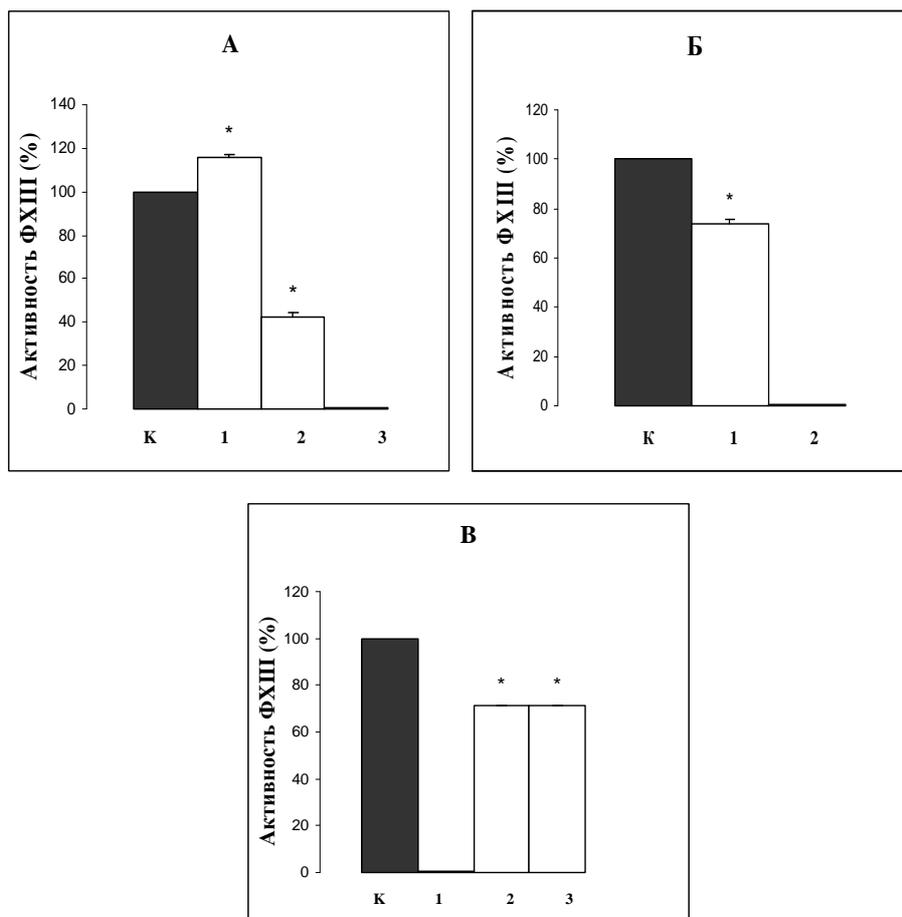


Рис. Дозозависимое изменение активности ФХШ до и после введения ПБП-1, GX-NH<sub>2</sub> и БНС. Контроль – черный столбик.  
 А – активность ФХШ, ПБП -1 в дозе: 1 – 1мкг, 2 – 2.5мкг, 3– 5мкг.  
 Б – активность ФХШ, GX-NH<sub>2</sub> в дозе: 1 – 1мкг, 2 – 2.5мкг.  
 В – активность ФХШ, БНС в дозе: 1 – 1мкг, 2 – 2.5мкг, 3 – 5мкг.  
 \* Достоверные различия между контролем и опытом ( $p \leq 0.05$ ).  
 Дозы приведены в расчете на 100г массы тела животного

На рис. Б показано дозозависимое влияние GX-NH<sub>2</sub> на активность ФХШ. Как видно из рисунка, GX-NH<sub>2</sub> подавляет активность фермента на 26% только в низкой дозе (1мкг/100г). Увеличение количества пептида не

дает эффекта, тогда как гипоталамический белок-гормональный комплекс БНС (рис. В) в малых количествах вообще не действует на активность фермента, а в дозах 2.5 и 5мкг/100г проявляет одинаковый эффект: в обоих случаях подавляет активность ФХШ на 29%.

Таким образом, на основании полученных результатов можно заключить, что изучаемые нами гипоталамические нейроспецифические соединения ( ПБП-1, GX-NH<sub>2</sub> и БНС ) в основном дозозависимо подавляют активность ФХШ, за исключением ПБП-1, который , как видно на рис. А, в зависимости от дозы имеет разнонаправленное действие на активность ФХШ .

Известно, что первоначально ФХШ был идентифицирован как белок (гликопротеин), участвующий в стабилизации фибринового сгустка, однако были определены дополнительные внеклеточные и внутриклеточные роли для ФХШ, которые влияют на разрешение тромба и восстановление тканей [9]. В последнее время ФХШ ассоциируется с атеротромботическими заболеваниями, особенно отмечается его участие в атерогенезе, заболевании коронарной артерии, атеротромботическом ишемическом инсульте и заболевании периферических артерии. Опубликованы работы, в которых доказывается связь между фактором XIII и тромбоэмболией и т.д. [6].

Учитывая многофункциональную роль ФХШ в организме, очень важно иметь дополнительные средства, регулирующие его действие, которые помогут вылечить вышеуказанные болезни. Исходя из того, что изучаемые нами нейроспецифические соединения гипоталамуса дозозависимо влияют на активность ФХШ, можно предположить, что они будут полезны в лечении заболеваний, вызванных участием данного фактора.

*Поступила 30.10.19*

**Արյան մակարդան XIII ֆակտորի ակտիվության  
փոփոխությունը հիպոթալամուսի նեյրոսպեցիֆիկ  
միացությունների ազդեցությամբ**

**Ջ.Խ. Պարոնյան, Լ.Ս. Գրիգորյան, Հ.Ա. Ստեփանյան, Լ.Ն. Առաքելյան,  
Ռ.Մ. Սրապիոնյան**

Ուսումնասիրվել է հիպոթալամուսի պրոլինով հարուստ պեպտիդներ ՊՀՊ - 1-ի, GX-NH<sub>2</sub>-ի և կարդիոակտիվ սպիտակուց – հորմոնային կոմպլեքս ՍՀԿՇ-ի ունեցած ազդեցությունն արյան մակարդան կասկադի վերջին ֆերմենտի՝ ֆիբրին ստաբիլիզացնող ֆակտոր XIII-ի (ՖXIII) ակտիվության վրա: Փորձարկվող միացություններն օգտագործվել են մի քանի չափաբաժիններով, պարզվել է, որ քանակից կախ-

ված՝ նրանք հիմնականում ճնշում են ՖXIII-ի ակտիվությունը, բացառությամբ ՊՀՊ -1-ի, որը ցածր քանակի դեպքում (1մկգ) բարձրացնում է ֆերմենտի ակտիվությունը 16% -ով, իսկ 2.5 մկգ/100գ չափաբաժնով, ընդհակառակը, նկատելիորեն ճնշում է այն ( 58%): GX-NH<sub>2</sub> -ը ՖXIII-ի վրա ազդում է միայն 1մկգ/100գ չափաբաժնի դեպքում (26%), իսկ կարդիոակտիվ սպիտակուց - հորմոնային կոմպլեքսը՝ միայն բարձր քանակներով (2.5 և 5մկգ), ընդ որում երկու դեպքում էլ ճնշում է ֆերմենտի ակտիվությունը հավասարաչափ՝ 29%-ով: Արյան մեջ ՖXIII-ի բարձր կամ ցածր ակտիվությամբ պայմանավորված բոլոր հիվանդությունները հայտնաբերվում են վերջինիս ակտիվության լաբորատոր ուսումնասիրությամբ: Հաշվի առնելով մեր կողմից փորձարկվող նեյրոսպեցիֆիկ միացությունների ունեցած ազդեցությունը ՖXIII-ի ակտիվության վրա՝ ենթադրում ենք, որ, ի թիվս արդեն ընդունված բուժամիջոցների, կարող ենք առաջարկել նրանց կիրառությունը որպես ֆերմենտի ակտիվության կարգավորիչներ:

### **Changes in Coagulation Factor XIII Activity under the Influence of Hypothalamic Neurospecific Compounds**

**Z.Kh. Paronyan , L.S. Grigoryan, H.A. Stepanyan,  
L.N. Araqelyan, R.M. Srapionyan**

Hypothalamic proline-rich peptides PRP-1 and GX-NH<sub>2</sub> and the cardioactive protein-hormone complex BNC have been studied to evaluate the effect of the last enzyme on blood coagulation cascade, fibrin-stabilizing factor XIII. The tested compounds were used in several doses, depending on the amount they found to be mainly suppressing factor XIII activity, with the exception of PRP-1, which increases the enzyme activity by 16% in the low concentration (1 μg / 100 g) and 2.5 μg/100g, on the contrary, significantly suppresses its activity by 58%. GX-NH<sub>2</sub> affects factor XIII only at a dose of 1 μg / 100 g (26%), and a cardioactive protein-hormone complex only at high doses (2.5 and 5 μg / 100g), in both cases suppressing enzyme activity equally, by 29%. All diseases caused by high or low activity of factor XIII in the blood are found by laboratory. Taking into account the neurospecific compounds tested by us on factor XIII activity, we suggest that among the measures already taken, we can offer their application as regulators of enzyme activity.

## Литература

1. Балуда В.П., Балуда М.В., Деянов И.И., Тлепищев И.К. Физиология системы гемостаза. М., 1995.
2. Паронян З.Х., Григорян Л.С., Степанян А.А., Срапионян Р.М. Влияние пролином богатого пептида ПБП-1 на фибринолитическую активность плазмы крови крыс. ДНАН РА, 2018, т.118, 2, с.155 -159.
3. Паронян З.Х., Григорян Л.С., Степанян А.А., Срапионян Р.М. Влияние пролином богатого пептида GX-NH<sub>2</sub> на фибринолитическую активность плазмы крови крыс. Биол. журн.Армении, 2019 , LXXI, 2, с.48 - 51.
4. Срапионян Р.М. Нейроспецифические белок-гормональные комплексы. Успехи физиологических наук, 1996, т.27, 1, с. 21 – 31.
5. Срапионян Р.М., Паронян З.Х., Абелян Ж.Г., Саакян Ф.М., Мурадян М.Ш., Сехян Л.С. Влияние нейроспецифического кардиоактивного белок-гормонального комплекса гипоталамуса на некоторые биохимические показатели системы свертывания крови. Мед.наука Армении НАН РА, 2007, XLVII, 4, с.39 - 44.
6. *Bereczky Z, Muszbek L.* Faktor XIII and venous thromboembolizm, *Thromb Haemost.*, 2011, 37 (3), p.305 – 14.
7. *Galoyan A.A.* Brain Neurosecretory Citokins. New York: Academic Plenum Publishers, 2004.
8. *Goggin M.H., Srapionyan R.M., Galoyan A.A., Brecher A.S.* A potential role for atrial polypeptide and neurohormone C in the blood cascade. I. of *Invertigat Medicine (Suppl)*, 2002, 50 (5), p.234.
9. *Richardson V.K., Cordell P., Standeven KF., Carter RM.* Substractes of Factor XIII roles in thrombosis and wound healing. *Clinical science* 2013, 124 (3) , p.123 – 37.
10. *Srapionyan R.M., Paronyan Z.Kh , Saakyan F.M., Galoyan A.A.* Involvmnt of a Proline-Rich Peptide in the Regulation of the Hemostasis Sistem. *Neurochemical Journal*, 2014, V 1.8, № 1, p.44 - 46.