

Влияние нейроспецифического кардиоактивного белок-гормонального комплекса гипоталамуса на некоторые биохимические показатели системы свертывания крови

Р.М. Срапионян, З.Х. Паронян, Ж.Г. Абелян, Ф.М. Саакян, М.Ш. Мурадян, Л.С. Сехян

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

Ключевые слова: нейрогормон, кардиотропный, гемокоагуляция, гипоталамус, гемостаз, толерантность

Система свертывания крови – один из компонентов гемостаза, состоящая, в свою очередь, из свертывающей и противосвертывающей систем. Это сложный процесс является, по классической теории А.А. Шмидта, ферментативным и состоит из 4 основных фаз: образование протромбинового (тромбинактивирующего) комплекса, образование тромбина и фибрина, фибринолиз. Согласно каскадной теории, все факторы в плазме находятся в неактивном состоянии и сущность коагуляции заключается именно в активации каскада ферментов, приводящей к расщеплению фибриногена и превращению его в нерастворимый фибрин. Процессы свертывания запускаются двумя механизмами – внешним и внутренним, объединяющимися между собой на стадии образования активирования фактора X/Xa, являющегося ключевым ферментом каскадной системы механизма свертывания крови [8].

В сложном процессе свертывания крови участвует взаимодействие трех звеньев гемостаза: клеточных и плазменных факторов и компонентов сосудистой стенки. Регуляция этого процесса осуществляется как непосредственным влиянием на органы, синтезирующие факторы свертывания крови и компоненты фибринолитической системы, так и через эндокринную систему – гипоталамус, гипофиз и надпочечники [1].

На протяжении более двух десятков лет нами изучается широкий спектр функциональных возможностей новой семьи гипоталамических кардиотропных белок-гормональных комплексов (БГК),

условно названных по принципу связывания с соответствующими гормонами К, С и Г – белок-нейрогормон К, белок-нейрогормон С (БНС) и белок-нейрогормон Г соответственно [7, 12]. Установлена высокая активность физиологического действия исследуемых БГК на расширение коронарных сосудов, стабилизацию кровяного давления, повышение проницаемости капилляров, вазодилатацию, кардиоактивность и изменение активности симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы [7]. Одновременно полученные данные о разнонаправленном и дозозависимом влиянии БНС на процессы эндогенного синтеза NO в крови и мозге крыс явились предпосылкой к выяснению механизмов биогенных взаимопревращений, способствующих вазодилатации и улучшению кровообращения, особенно миокардиального кровотока под действием БНС [2].

Коррелирующим феноменом с вышеизложенным явилось выяснение участия кардиоактивных БГК в системе гемостаза, функциональное нарушение которого, как известно, является основой возникновения патологических процессов. Исследование действия БГК, в частности одного из них – БНС, на агрегационную способность тромбоцитов в плазме крови человека выдвинуло необходимую принципиальную задачу – изучение этого кардиотропного комплекса в регуляции метаболизма ключевого фермента гемокоагуляции – маркера общего коагуляционного пути Ха с его ингибитором, антитромбином III (АТ III). Было выявлено

эффективное участие БНС в этом процессе на уровне, связывающем обе системы (внутренний и внешний механизмы), объединяющиеся на стадии образования X/Ха, и наличие нового альтернативного пути метаболизма Ха [6].

В контексте вышеизложенного целью настоящего исследования явилось выяснение регуляторного действия БНС на функциональное состояние системы свертывания крови, в частности на его некоторые биохимические показатели.

Материал и методы

Эксперименты проведены на нелинейных белых крысах-самцах Альбино (200-220г). Животные были распределены на две группы: контрольным крысам вводили внутримышечно физиологический раствор, опытные крысы получали в том же объеме водный раствор БНС. Острые эксперименты проводились на интактных и модельных животных с введением гепарина в дозе 25 ед/мл, вызывающего состояние гипокоагуляции. Кровь для коагулологических исследований брали из яремной вены после введения препарата через 30 и 60 мин. После стабилизации раствором цитрата Na (9 : 1), центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин и в плазме крови проводили определение биохимических показателей крови. В опытах *in vitro* изучали влияние различных концентраций БНС на гемокоагуляцию. Исследование системы гемостаза проводили с использованием следующих методик;

- *определение времени свертывания крови* проводили по методу Lee R. [9], который основан на определении скорости образования сгустка в венозной крови при температуре 37°;

- *исследование времени рекальцификации плазмы* проводили по методу Bogerhot H. [5]. В основе метода лежит добавление к плазме, содержащей тромбоциты, оптимального количества хлорида кальция. В стабилизированной крови свободные ионы кальция связываются стабилизатором и кровь лишается способности к свертыванию. При добавлении раствора CaCl_2 в кровь, вновь появляются свободные ионы кальция, что возвращает ей способность к коагуляции;

- *определение активности факторов протромбинового комплекса* проводили по методу Квика [10] с использованием лиофилизированного тромбoplastина фирмы Delta THR-stb. Результаты анализа представлены в секундах, отражающих протромбиновое время (t), и в единицах активности (A) протромбинового комплекса по формуле:

$$A = t_{\text{контр}} / t_{\text{опыт}} \times 100\%;$$

- *определение толерантности к гепарину* осуществляли по методу Sigg S. [11], принцип которого заключается в исследовании влияния определенных количеств гепарина на время рекальцификации цитратов плазмы;

- *электрофоретически гомогенные препараты БНС* получены по методу Срапионян Р.М. [3].

Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета программ Microsoft Excel 2000 и Stat Soft Statistikal. Достоверность разницы между контрольными и опытными группами оценивалась с помощью t- критерия Стьюдента. Различия считались достоверными при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Как известно, жидкое состояние крови обеспечивается динамическим взаимодействием прокоагулянтных, антикоагулянтных и фибринолитических реакций. Результатом этих взаимодействий является свертываемость цельной крови, позволяющая оценить состояние крови в целом.

Исследования изменения этого показателя под действием БНС были проведены на интактных белых крысах в условиях *in vivo* и *in vitro*. Результаты проведенных острых экспериментов (табл.1) продемонстрировали дозозависимое разнонаправленное влияние БНС на время свертывания. Если низкие дозы (25-50нг) БНС уменьшают, то высокие (100нг) дозы увеличивают время свертывания крови. Из вышесказанного можно сделать заключение о различных дозозависимых эффектах БНС – гиперкоагуляции и гипокоагуляции соответственно.

Таблица 1

Изменение времени свертывания крови крыс до и после введения БНС (сек)

Доза нг/г	До введения	Через 30 мин	Через 60 мин
25	221	170	180
50	225	180	160
100	223	250	250

Примечание. Приведены средние значения из 6 определений.

Аналогичная картина наблюдалась у животных при хронических экспериментах. В течение 8 дней исследовали действие ежедневного подкожного введения БНС в дозе 50 нг на животное. Пробы забраны на 4, 6 и 8-й дни. Результаты свидетельствовали о динамике увеличения времени свертываемости в первые 4 дня, составляя 230 сек, в то время как контрольные замеры составляли 185 сек, на 6-й и 8-й дни наблюдалось замедление свертывания крови – 145 сек. После прекращения введения отмечалась тенденция к восстановлению и приближалась к контрольным цифрам – 168 сек.

В серии исследований *in vitro* были изучены эффекты следующих концентраций БНС 1:5, 1:10, 1:20 на время свертывания крови. По полученным данным, наибольшая активность БНС отмечается в соотношении разведения в концентрации 1:10, если маточный его раствор был взят в количестве 10^{-8} М и составлял 10 μ в 0,1 мл. Увеличение времени свертывания составляло $200 \pm 1,8$ сек, в то время как у контрольных животных оно равнялось $250 \pm 3,1$ сек. При уменьшении разведения до 1:5 отмечалось некоторое уменьшение активности – до $230 \pm 1,0$ сек. Увеличение разведения 1:20 не изменяло времени свертывания. Уместно отметить, что степень выраженности влияния на ускорение свертывания крови зависит от введенной дозы. Однако кривая доза – эффект возрастает до определенного предела, после чего ускорения свертывания не наблюдается, что, по-видимому, можно объяснить наличием в организме предела ускорения. Примечательно, что действие БНС *in vitro* в концентрации, близкой к оптимально действующей в организме животного, имеет одинаковый характер, однако в количественном отношении его действие выражено сильнее в последнем случае.

Параллельно изменениям, наступающим во времени свертывания крови, наблюдалось изменение других показателей. А именно, изменение времени рекальцификации, которое через 30 мин после введения 50 нг БНС укорачивалось с $93,5 \pm 2,7$ сек до $63 \pm 1,7$ сек, составляя приблизительно 36,6% уменьшения. Через 60 мин время рекальцификации составляло уже $57 \pm 1,5$ сек, укорачиваясь на 39% по сравнению с контрольной пробой.

Можно отметить наличие параллелизма между временем свертывания и рекальцификации; если первый показатель через 30 мин уменьшается примерно на 30%, то второй за тот же промежуток укорачивается на 31,5%.

Исходя из совокупности полученных данных, можно сделать заключение о выраженной дозозависимой гиперкоагуляции, что, в свою очередь, диктовало целесообразность проведения экспериментов по изучению действия БНС в условиях экспериментальной гипокоагуляции, моделированной внутривенным введением гепарина в дозе 10 ед/100 г массы животного. Как показали полученные данные, у контрольных животных, которым был предварительно введен физиологический раствор, действие гепарина проявилось через 15 мин после введения, сопровождаясь выраженной гипокоагуляцией. При этом было выявлено замедление времени отмеченных биохимических показателей крови более чем в 2 раза по сравнению с контрольным уровнем, что, безусловно, является следствием угнетения активности факторов свертывания крови. Введение раствора БНС в дозе 100 нг/100 г массы животного на пониженном фоне свертывания привело к сокращению указанных показателей и приблизилось к исходным данным на 120-й минуте.

Исходя из полученных данных, можно утверждать о способности БНС уменьшать гипокоагуляционные сдвиги и восстанавливать процесс свертывания крови, а именно, сокращение действия гепарина и проявление антигепаринового действия. Однако уместно отметить, что описанные изменения протекают разнонаправленно; в зависимости от введенной дозы БНС степень их выраженности не однозначна, что, естественно, сопровождается чувствительными сдвигами в системе свертывания крови. Наиболее выраженные изменения отмечаются по уменьшению протромбинового

времени (примерно на 50%) и наименее – по повышению тромбопластической активности на 23%, что характеризуется, как известно, ускоренным и

интенсивным образованием кровяного тромбопластина (табл.2).

Таблица 2

Изменение показателей гемокоагуляции intactных крыс до и после введения БНС

Условия опыта	Время свертывания, сек	Время рекальцификации, сек	Тромбопластическая активность, %	Протромбиновое время, сек
Контроль Истощенный раствор, n = 8	217 ± 4,8***	93,5 ± 2,7**	96 ± 3,1**	21,5 ± 0,9*
БНС 25нг/100г (30 мин), n = 8	171 ± 6,6***	65 ± 2,3**	104 ± 4,1***	18,6 ± 0,8*
БНС 25нг/100г (60 мин), n = 8	178 ± 6,4***	63 ± 1,7*	121 ± 3,6***	13,5 ± 0,7*
БНС 50нг/100г (60 мин), n = 8	160 ± 6,2***	57 ± 1,5*	120 ± 3,6***	10,5 ± 0,7*

* $p \leq 0,5$, ** $p \geq 0,025$, *** $p \leq 0,01$

Установленные гиперкоагуляционные сдвиги некоторых вышеописанных показателей свертывания крови крыс послужили основанием для проведения специальной серии экспериментов по изучению влияния БНС на функциональное состояние противосвертывающей системы (ПСС). Имеющиеся в литературе данные позволяют предположить, что ускорение свертывания крови может быть обусловлено не только увеличением факторов, стимулирующих коагуляцию, но и уменьшением веществ, тормозящих ее [4].

Как явствует из полученных результатов исследования, введение БНС intactным крысам сопровождается угнетением функционального состояния ПСС, что выражается сдвигами некоторых изученных показателей антикоагулянтного звена гемостаза. Так, повышение толерантности плазмы к гепарину в интервале 30-60 мин составляет в среднем 59%, максимальные сдвиги (примерно в 3 раза) отмечены в толерантности крови

к гепарину. Полученный факт свидетельствует об инактивации гепарина и гепариноподобных веществ, что, по-видимому, ослабляет тормозящее влияние на процесс свертывания крови.

Ранее полученные нами данные [3] об ингибиторном действии БНС на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в плазме крови в условиях *in vitro* свидетельствовали о прямом его влиянии на функцию последних. Одновременно предварительное введение БНС в организм животного сокращало тромбиновое время, что объяснялось некоторым увеличением содержания тромбина, являющегося, как известно, одним из индукторов агрегации. Этот факт приводит к заключению о способности БНС снижать активность ингибитора тромбина, что также ведет к ускорению гемокоагуляции.

Учитывая тесную связь между нарушением кровотока и состоянием активности структур мозга, можно объяснить специфическую направ-

ленность воздействия кардиотропного БНС на сосудистую систему и его антиоксидантные функции, а также его участие в предотвращении развития деструктивных процессов в крови и тканях.

Известно, что при самых разнообразных экстремальных ситуациях система свертывания крови не выступает изолированно, и изменения в ней всегда проявляются в комплексе с другими вегетативными реакциями. В данной иерархии кардиоактивные белок-гормональные комплексы гипоталамуса, в частности БНС, занимают одно из ключевых мест. Для подтверждения можно сослаться на вышеизложенные результаты исследований, которые подтверждают эффективное

участие БНС в регуляции метаболизма маркера общего коагуляционного пути фактора X с его ингибитором АТ III на уровне, связывающем обе системы – внутренний и внешний механизмы, объединяющиеся на стадии образования X/Xa.

Вышеизложенный спектр исследований позволяет не только выяснить регуляторные функции БГК и открывает новые этапы в их теоретической трактовке, но и создает принципиально новые возможности в поисках путей направленной коррекции патогенетической терапии ряда сердечно-сосудистых заболеваний и центральных двигательных нарушений.

Поступила 13.08.07

Հիպոթալամուսի նեյրոսպեցիֆիկ կարդիոակտիվ սպիտակուց-հորմոնալ կոմպլեքսի ազդեցությունը արյան մակարդեղիության համակարգի որոշ րիոքիմիական ցուցանիշների վրա

Ռ.Մ. Սրապիոնյան, Զ.Խ. Պարոնյան, Ժ.Գ. Աբելյան, Ֆ.Մ. Սահակյան,
Մ.Շ. Մուրադյան, Լ.Ս. Սեփյան

Ուսումնասիրվել է սպիտակուց-հորմոնալ կոմպլեքսի (ՍՀԿ) մասնակցությունը արյան մակարդեղիության կասկադային մեխանիզմների FXa-ի և АТ III -ի փոխազդեցության մեջ: Ստացված տվյալները վկայում են, որ ՍՀԿ-ը չի խթանում FXa/AT III կոմպլեքսի ձևափոխարկումը: Այն ազդում է FXa և FXa/AT III կոմպլեքսների հիդրոլիտիկ կամ պրոտեոլիտիկ ակտիվության վրա:

Ուսումնասիրված են նաև ՍՀԿ-ի ազդեցությունը արյան մակարդման որոշ ցուցանիշների վրա (արյան մակարդման և պլազմայի ռեկալ-

ցիֆիկացիայի ժամանակ, արյան և պլազմայի տոլերանտությունը հեպարինի նկատմամբ):

Սուր փորձերում ՍՀԿ-ի ազդեցությունը արտահայտվում է արյան մակարդեղիության ժամանակի կրճատմամբ. 30-60ր ընթացքում: Նույն ժամանակահատվածում ՍՀԿ-ը նվազեցնում է ռեկալցիֆիկացիայի ժամանակը 25%-ով: Հիպոկոագուլացված առնետների մոտ, որոնք ստացել էին 25E/100գ հեպարին, ՍՀԿ-ը արագացնում է արյան մակարդեղիությունը՝ ցուցաբերելով հակահեպարինային հատկություն:

The study of the effect of neurospecific cardioactive hypothalamic protein-hormonal complex on some biochemical indices of blood coagulation system

R.M. Srapionian, Z.Kh. Paronian, J.G. Abelian, F.M. Sahakian, M.Sh. Muradian, L.S. Sekhian

The data obtained have shown the effect of cardioactive protein-neurohormone C complex (PNC) upon the coagulation cascade at the Factor Xa (FXa) and FXa-AT III complex. It may suppress hydrolysis or proteolytic action of FXa on the FXa-AT III complexes, or autolytic activity of FXa at the level of FXa, via yet unknown mechanism. Besides, PNC affects some indices of the hemocoagulation of intact and experimental hemocoagulated animals; the spontane-

ous coagulation of the venous blood, recalcification, heparin tolerance of plasma and blood, the prothrombine complex activity.

The received data have demonstrated the normalizing effect of PNC on the blood coagulating process of the experimental hypocoagulated animals as well as its dose-depended action on the anticoagulative system, particularly on the above mentioned anticoagulating indices.

Литература

1. Андреев Т.В. Фибринолиз. Биохимия животных и человека. М., 1982, 6, с.84-94.
2. Мовсесян Н.О., Алчуджян Н.Х., Срапигян Р.М., Паронян З.Х., Абеян Ж.Г., Саакян Ф.М., Галоян А.А. Влияние нейроспецифических кардиоактивных белок-гормональных комплексов гипоталамуса на аргининзависимый синтез оксида азота в мозге и крови. Мед. наука Армении НАН РА, 2002, XLII, 1, с.3-8.
3. Срапигян Р.М. Нейроспецифические белок-гормональные комплексы. Успехи физиологических наук. 1996. т.27, 1, с.21-31.
4. Boot N.A., Bennet B. A new life-long hemorrhagic disorder due to excess plasminogen activation, Amer. J. Hematol., 1999, 4, p.289-294.
5. Bogerho H., Roka L. Gerinnungsphysiologische Untersuchungen bei hamorrhagischen Diathesen, Zeltschr. Vitamin-Hormon u. Fermentforsch., 1954, Bd. 6, 1, S.25-39.
6. Coggin M.H., Srapigian R.M., Galoyan A.A., Brecher A.S. A potential role for atrial polypeptide and neurohormone "C" in the blood cascade, J. of Investigat. Medicine (Suppl), 2002, 50, 5, p.234.
7. Galoyan A.A., Srapigian R.M. Protein-hormonal complexes in the hypothalamus as neurochemical systems of regulation, Neurochem. Res., 1983, 8, 12, p.1511-1535.
8. Jesty J. Dissociation of complexes and their derivatives formed during inhibition of bovine thrombin and activated Factor X by antithrombin III, J. Biol. Chem., 1979, 254, p.1044-1049.
9. Lee R., White P.D. Clinical study of the coagulation time of blood, Amer. J. Med., 1913, VCXLV, 4, p.495-503.
10. Quick A. On constitution of prothrombin, Am. J. Physiol., 1943, 2, 140, p.212-223.
11. Sigg B. Der Mikroheparintest, Klin. Wschr., 1952, 9/10, S.205-206.
12. Srapigian R.M. Neurosecretory hypothalamus is a source of organotropic neurohormones and immunomodulators, Neurokhimya, 2002, 19, 2, p.157-160.