

УДК 577.171.55

Влияние гипоталамических нейромодуляторов и их модифицированных форм на гемостаз

**Р.М. Срапионян, З.Х. Паронян, Ф.М. Саакян, Г.С. Чаилян,
Л.С. Григорян**

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

Ключевые слова: гемокоагуляция, пролином богатый пептид, гемостаз

В последние годы усилился интерес к изучению регуляторных пептидов, обладающих полифункциональными свойствами, влияющих на различные процессы гемостаза – нервную, эндокринную, гемостатическую и другие системы организма. Исследование влияния биоактивных пептидов на систему гемостаза показало их защитное противосвертывающее действие (как опосредованное, так и прямое) на процессы тромбо- и фибринообразования, фибринолитическую активность крови и агрегацию тромбоцитов [1,10]. Отмечено, что антикоагулянтная активность пептидов зависит от наличия в них таких аминокислот, как пролин, аргинин, лизин; причем присутствие последовательности первых двух аминокислот служит одним из факторов, определяющих эту активность [3, 7].

К группе пролинсодержащих пептидов относятся открытые А.А. Галояном нейромодуляторы ПБП-1 (галармин), состоящий из 15 аминокислотных остатков и его аналог, десятичленник, где последний пролин амидирован. Эти пептиды синтезируются в форме общего белка-предшественника, нейрофизин-вазопрессин ассоциированного гликопротеина, и генетически детерминированно разделяются протеолизом во время аксонального транспорта [5].

Интерес к этим соединениям вызван тем, что пептиды этого класса обладают широким спектром биологической активности, включая иммуномодулирующие, антиоксидантные, противоопухолевые, нейропротекторные и антибактериальные свойства, являются регуляторами гуморального и клеточного иммунитета, миелопоэза, дифференциации тимоцитов.

Ранее нами было исследовано влияние ПБП-1 на систему гемостаза [9,11] и выявлено его дозозависимое ускорение гемокоагуляции с параллельной активацией системы противодействия свертыванию крови.

Задачей представленного исследования явились проведение анализа и сравнение влияния ПБП-1 и Gx-NH₂ на отдельные показатели системы

гемостаза и оценка зависимости этих эффектов от структурных изменений в молекуле предшествующего природного гормона.

Материал и методы

Эксперименты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180-200 г, которые были распределены на две группы: особи группы 1 получали внутривенные инъекции 0,85% раствора NaCl и служили контролем, животные группы 2 получали Gx-NH₂, введенного в яремную вену в концентрации от 1 до 10мкг/100г массы тела. Кровь для исследования брали из той же вены с антикоагулянтом 3,8% цитратом натрия в соотношении 9:1 через 30 и 60 мин после введения препарата. В плазме крови определяли следующие показатели состояния систем гемостаза: состояние свертывающей системы оценивали по времени свертывания крови и рекальцификации [6], показатели времени тромбообразования, определение активности факторов протромбинового комплекса [8]. В качестве характерных показателей состояния противосвертывающей системы (ПСС) оценивали изменение толерантности плазмы к гепарину, тромбинового времени, концентрации фибриногена [2].

В опытах использовали тромбин фирмы Sigma T6884-100UN 039K 7565, тромбопластин фирмы Delta-THR-stb. Синтетический препарат Gx-NH₂ получен в лаборатории природных соединений химического факультета Санкт-Петербургского Государственного университета. Для определения статистической достоверности различий между контрольными и опытными выборками использован непараметрический U-критерий Манна-Уитни. Уровень значимости $p < 0,01$ считали достоверным по сравнению с контролем.

Результаты и обсуждение

Жидкое состояние крови обеспечивается динамическим взаимодействием прокоагулянтных, антикоагулянтных и фибринолитических реакций. Результатом этих взаимодействий является ничто иное, как свертываемость цельной крови – показатель, позволяющий оценить состояние крови в целом.

Состояние свертывающей системы оценивали по уровню фибриногена, времени рекальцификации и показателям г (времени тромбопластино- и тромбообразования).

Показатели состояния свертывающей системы, определяемые через 30 мин после введения препарата Gx-NH₂, свидетельствовали о выраженном ускорении свертывания крови, зависящем от концентрации введенной дозы. Низкие дозы (1мкг/100г массы животного) выявляют

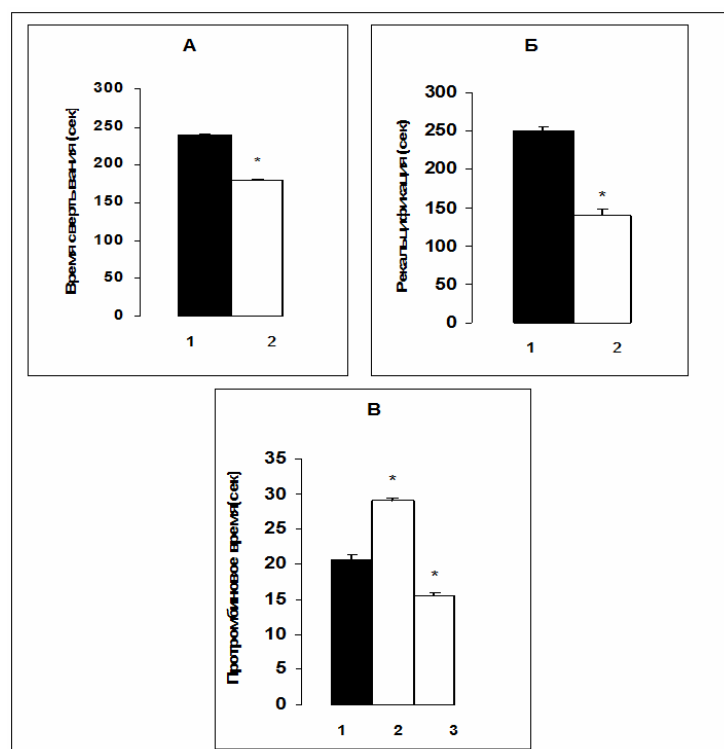


Рис.1. Изменение показателей гемокоагуляции до и после введения Gx-NH₂. Контроль – черный столбик. А – время свертывания, сек, Gx-NH₂ в дозе 1 мкг; Б – время рекальцификации, сек, Gx-NH₂ в дозе 1 мкг; В – протромбиновое время, сек, Gx-NH₂ в дозе 1мкг (2), 2,5 мкг (3).

* Достоверные различия между контролем и опытом ($p < 0.01$). Дозы приведены в расчете на 100 г массы тела животного

прокоагулянтный эффект и уменьшают спонтанную коагуляцию на 25% (рис.1, А). Кривая доза-эффект возрастает постепенно до определенного предела. Так, нарастание дозы до 5мкг время свертывания укорачивает до 60 сек после чего ускорение свертывания не наблюдается, что, очевидно, объясняется развитием запредельного торможения и соответствует понятию о существовании в организме предела ускорения. Следует отметить наличие параллелизма между временем свертывания крови и изменением времени рекальцификации, которое через 30 мин после введения аналогичной дозы Gx-NH₂ (1мкг/100г) укорачивалось на 44,5% (рис.1,Б).

В отличие, протромбиновое время под действием Gx-NH₂ изменяется разнонаправлено в зависимости от введенной дозы; так концентрация 1мкг/100г массы животного увеличивает протромбиновое время на 47%, увеличение дозы до 2,5 мкг уменьшает этот показатель до 25% (рис.1, В).

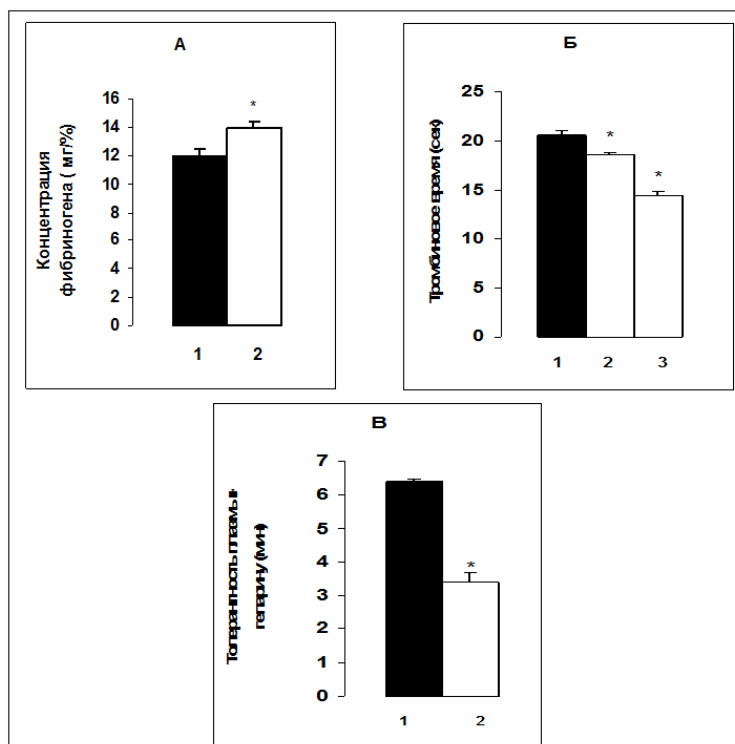


Рис.2. Влияние Gx-NH₂ на антикоагулянтную активность intactных крыс. Контроль – черный столбик. А – концентрация фибриногена, мг%, Gx-NH₂ в дозе 1 мкг; Б – тромбиновое время, сек, Gx-NH₂ в дозе 1 мкг (2), 2,5 мкг (3); В – толерантность плазмы к гепарину, мин, Gx-NH₂ в дозе 1 мкг.
* Достоверные различия между контролем и опытом ($p < 0.01$). Дозы приведены в расчете на 100 г массы тела животного

В целом, полученные данные свидетельствовали о дозозависимых гиперкоагуляционных сдвигах вышеописанных показателей свертывания крови и послужили основанием для проведения специальной серии экспериментов на предмет изучения влияния Gx-NH₂ на функциональное состояние противосвертывающей системы.

Как показали результаты исследования, введение Gx-NH₂ intactным крысам сопровождается угнетением функционального состояния ПСС, что выражается сдвигами показателей как антикоагуляционного, так и фибринолитического звена гемостаза. Так, понижение толерантности плазмы к гепарину при введении 1мкг Gx-NH₂ в интервале 30-60 мин составляет 44% (рис.2,В), несколько меньше, до 29%, тромбиновое время (рис.2,Б). В противоположность этому отмечается некоторое увеличение концентрации фибриногена на 12% (рис.2,А). Кратковременное увеличе-

ние этого показателя рассматривается как защитная реакция организма, что согласуется с литературными данными [4]. В свою очередь, сокращение тромбинового времени указывает на некоторое увеличение содержания тромбина и свидетельствует о способности $Gx-NH_2$ снижать активность ингибитора тромбина, что также ведет к ускорению гемокоагуляции.

Таким образом, $Gx-NH_2$ дозозависимо ускоряет гемокоагуляцию, но при этом параллельно имеет место активация системы противодействия свертыванию крови. Учитывая тесную связь между нарушением кровотока и состоянием активности структур мозга, предположения о специфической направленности воздействия $Gx-NH_2$ на сосудистую систему и его участия в предотвращении развития деструктивных процессов в крови и тканях можно считать оправданными.

Поступила 10.04.14

Հիպոթալամուսի նեյրոմոդուլյատորների և նրանց մոդիֆիկացված ձևերի ազդեցությունը հեմոստազի վրա

**Ռ.Մ. Սրապիոնյան, Զ.Խ. Պարոնյան, Ֆ.Մ. Սահակյան, Գ.Ս. Չախյան,
Լ.Ս.Գրիգորյան**

Ուսումնասիրվել է հիպոթալամուսի պրոլինով հարուստ պեպտիդի ($Gx-NH_2$) ազդեցությունը արյան մակարդման որոշ ցուցանիշների վրա: Սուր փորձերում վերջինիս ազդեցությունը արտահայտվում է արյան մակարդման ժամանակի կրճատմամբ 30-60 րոպեների ընթացքում 25%-ով: Նույն ժամանակահատվածում $Gx-NH_2$ -ը նվազեցնում է ռեկալցիֆիկացման ժամանակը 44,5%-ով և պրոթրոմբինային ժամանակը 47%-ով: $Gx-NH_2$ -ի ազդեցությամբ արյան պլազմայի տոլերանտությունը հեպարինի նկատմամբ ընթանում է մեկ ուղղությամբ և ի հայտ է գալիս արտահայտված հակահեպարինային ակտիվություն. 25%-ով կրճատվում է արյան մակարդելիության ժամանակը: Թրոմբինային ժամանակը նվազում է 29%-ով, ֆիբրինոգենի կոնցենտրացիան, ընդհակառակը, ավելանում է 12%-ով:

Ստացված տվյալները վկայում են, որ $Gx-NH_2$ -ի ազդեցությամբ տեղի են ունենում հեմոստազի մակարդիչ օղակների ցուցանիշների փոփոխություններ:

The effect of hypothalamic neuromodulators on the regulation of the hemostasis system

**R.M. Srapionyan, Z.Kh. Paronyan, F.M. Sahakyan, G.S. Chailyan,
L.S. Grigoryan**

We studied the influence of hypothalamic proline-rich peptide on some factors of the hemostasis system of blood clotting, particularly on the separate parameters of hemostasis system. The data have shown that Gx-NH₂ results in decrease of some indices of hemocoagulation in intact animals: the spontaneous coagulation of the venous blood (25%), recalcification (44,5%), heparin tolerance of plazma (25%), fibrinogen concentration (12%) and thrombin time 29%.

Thus, the obtained data have demonstrated the normalizing effects of Gx-NH₂ on the anticoagulative system by direct correction of hemostasis disorders.

Литература

1. Ашмарин И.П., Каменский А.А., Ляпина Л.А. и др. ИЛ-1 и дисфункция систем гемостаза. *Вопр. биол. мед. и фармацевт. химии*, 2002, 1, с.24-27.
2. Бокарев И.Н. Патология гемокоагуляции. М., 1995, с.28-47.
3. Левицкая Н.Г., Клейменов А.Н., Позднякова Т.М. и др. Исследование спектра физиологической активности гептапептида семакс. *Нейрохимия*, 2008, т.25, 1-2, с.111-118.
4. Луговский Э.В. Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза. Киев, 2003.
5. Galoyan A.A. Primary structure and biological activity of haemoglobin-related hypothalamic peptides. In: *Biopolymers Peptide Science* (ed. V.T. Ivanov), John Willy and Sons, 1997, Vol.43, p.135-137.
6. Lee R., White P.D. Clinical study of the coagulation time of blood. *Amer. J. Med.*, 1973, VCXLY, 4, p.495-503.
7. Pratt K.R., Cote H.C.F., Chung D.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, Vol.94, p.7176 - 7181.
8. Riggeri Z.M. *J. Thromb. Haemost.*, 2003, Vol.1, 7, p.1335-1342.
9. Srapionian R.M. Neurosecretory hypothalamus is a source of organotropic neurohormones and immunomodulators. *Neurokhimya*, 2002, Vol.19, p.157-160.
10. Srapionian R.M., Paronian Z.Kh., Galoyan A.A. Role of cardiotropic protein-hormonal complexes in the regulation of hemostasis. *Neurochemical Journal*, 2008, Vol.25, 4, p.321-322.
11. Srapionyan R.M., Paronyan Z.Kh., Sahakyan F.M. et. al. Involvement of a proline-rich peptide in the regulation of the hemostasis system. *Neurochemical J.*, 2014, Vol.8, 1, p.44-46.