Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and theoretical articles•

Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 3(69), 2017

ՀԻՊՈԹԱԼԱՄՈՒՍԻ ՊՐՈԼԻՆՈՎ ՀԱՐՈՒՍՏ ՊԵՊՏԻԴ GX-NH$_2$-Ի ԱԶԴԵՑՈՒԹՅՈՒՆԸ ՊԼԱԶՄԱՅԻՆ ՀԵՄՈՍՏԱԶԻ ՎՐԱ ՀԻՊՈԿՈԱԳՈՒԼԱՑՄԱՆ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ

Զ.Խ. ՊԱՐՈՆՅԱՆ, Լ.Ս. ԳՐԻԳՈՐՅԱՆ, Ռ.Մ. ՍՐԱՊԻՈՆՅԱՆ

ՀՀ ԳԱԱ Հ.Ք. Բունիաթյանի անվ. կենսաքիմիայի ինստիտուտ
aregarpi4@gmail.com

Ուսումնասիրվել է հիպոթալամուսի պրոլինով հարուստ պեպտիդ (ՊՀՊ)՝ GX-NH$_2$ –ի ազդեցությունն արյան պլազմայի մակարդելիության մի շարք ցուցանիշների վրա հեպարինով առաջացրած հիպոկոագուլացման պայմաններում:

Հետազոտությունները կատարվել են ստուգիչ, հեպարինացված և հեպարինացված + GX-NH$_2$ կենդանիների խմբերում: Ստացված տվյալների համեմատական վերլուծություն կատարելիս պարզվել է, որ ստուգիչ փորձերի համեմատ հեպարինացված կենդանիների արյան մակարդման ընդհանուր ժամանակը երկարում է 38 %-ով, իսկ հեպարինացված և GX-NH$_2$ ներարկած կենդանիների մոտ՝ ընդամենը 10 %-ով, ռեկալցիֆիկացման ժամանակը առաջին դեպքում երկարում է 47, 5%-ով, իսկ երկրորդում՝ 29,4 %-ով: Պրոտրոմբինային ժամանակն հեպարինացված կենդանիների մոտ երկարանում է 100 %-ով, իսկ GX-NH$_2$-ի ներարկումից հետո՝ 45 %-ով: Ֆիբրինոգենի քանակը չի փոխվում հեպարինացված կենդանիների մոտ և 12 %-ով ավելանում է ՊՀՊ-ի ներարկումից հետո: Ստացված տվյալները վկայում են ՊՀՊ GX-NH$_2$-ի հակահեպարինային ակտիվության մասին և մեկ անգամ ևս հաստատում նրա մակարդիչ հատկությունը:

Պրոլինով հարուստ պեպտիդ – հիպոկոագուլացում – հակահեպարինային ակտիվություն

Изучалось действие гипоталамического пролином богатого пептида (ПБП) GX-NH$_2$ на некоторые показатели свертывания крови в условиях гипокоагуляции, полученное введением гепарина в дозе 0,5 Ед/мл. Опыты проводились на контрольных (0,85 %NaCl), гепаринизированных и гепаринизированных + GX-NH$_2$ (1мкг/100г) крысах. Выявлено, что по сравнению с контролем, время свертывания у гепаринизированных крыс удлиняется на 38 %, а после введения GX-NH$_2$ всего на 10 %. Время рекальцификации и протромбиновое время удлиняется на 47,5 % и 100 % соответственно, в то время как при введении ПБП на 29,4 % и 45 %. Концентрация фибриногена у гепаринизированных крыс не меняется, а после введения GX-NH$_2$ увеличивается на 12 %. Таким образом, полученные данные доказывают антигепариновую активность ПБП и еще раз подтверждают его ранее выявленные прокоагулянтные свойства.

Пролином богатый пептид – гипокоагуляция – антигепариновая активность

The effect of the hypothalamic proline-rich peptide (PRP) GX-NH$_2$ on several parameters of blood coagulation under conditions of hypocoagulation, obtained by the injection of heparin at a dose of 0.5U/ml was studied. Experiments were performed in control, heparinized and heparinized + GX-NH$_2$ rats. When comparing the obtained data, it became clear, that in comparison with the control, the clotting time in heparinized rats was increase by 38 % and after injection of GX-NH$_2$ only by 10 %. The duration of recalcification and protrombination was increased by 47,5 % and 100 % respectively, while at the injection of PRP by 29,4 % and 45 %. The concentration of fibrinogen in heparinized rats were not changed and after intravenous injection GX-NH$_2$ was increased by 12 %. Thus, the

obtained data prove the antiheparin activity PRP (GX-NH$_2$) and once again confirm its previously revealed procoagulant activity.

Proline rich peptide – hipocoagulation – antithrombin activity

Արյան մակարդման գործընթացը այնպես է կարգավորվում, որ մակարդելիության գործոնների միայն մի փոքր մասն է ակտիվանում, որի շնորհիվ մակարդուկը չի տարածվում անոթի վնասված մասի շրջանակից: Այդպիսի կարգավորումը շատ կարևոր է, քանի որ մեկ միլիլիտր արյան մակարդելիության պոտենցիալը բավական է, որպեսզի 10-15 վրկ -ում օրգանիզմի ամբողջ ֆիբրինոգենը վերածվի ֆիբրինի: Արյան հեղուկ վիճակը պահպանվում է շնորհիվ նրա շարժման, որի հետևանքով նվազում է մակարդման բաղադրիչների կոնցենտրացիան, էնդոթելի կողմից մակարդման գործոնների կլանման և բնական հակամակարդիչների, որոնցից կարևորներն են. հակատրոմբին III -ը, պրոտեիններ C, S և մակարդելիության արտաքին մեխանիզմի արգելակիչները: Հակատրոմբին III, կապվելով սերինային պրոտեազներին պատկանող համարյա բոլոր ակտիվացած մակարդելիության գործոններին, առաջացնում է ոչ ակտիվ կոմպլեքսներ, որոնք էնդոթելի մակերեսին, շնորհիվ հեպարինի և հեպարինանման մոլեկուլների, կտրուկ ավելանում են: Հեպարինը պարարտ բջիջների գրանուլների առանցքային բաղադրիչ է, որը հայտնի է որպես արյան հակամակարդիչ ոչ ֆերմենտային համակարգի հիմնական հումորալ գործոն: Այն բարձրամոլեկուլյար մուկոպոլիսախարիդ է, որի ֆիզիոլոգիական հատկությունների որոշիչ գործոնը մեծ քանակությամբ բացասական լիցքավորված խմբերի առկայությունն է, որի շնորհիվ արտազատվելով ակտիվացած պարարտ բջիջներից անմիջապես կոմպլեքսներ է առաջացնում պրոտեազների հետ [7]: Նախկինում մեր կողմից ուսումնասիրվել է հիպոթալամուսի ՊՀՊ GX-NH$_2$–ի մասնակցությունը հեմոստազի բազմաստիճան ֆերմենտային համակարգում [4], հայտնաբերվել է նրա մակարդիչ ակտիվությունը, որը արտահայտվել է արյան ընդհանուր մակարդման, ռեկալցիֆիկացման, պրոտրոմբինային և տրոմբինային ժամանակների կրճատմամբ, ինչպես նաև ֆիբրինոգենի քանակի ավելացմամբ: Հայտնի է, որ արյան մակարդելիության արագացումը կարող է պայմանավորված լինել ոչ միայն այն խթանող ֆակտորների քանակի ավելացմամբ, այլ նաև նրանց արգելակող միացությունների քանակի նվազեցմամբ [5]: Ներկայացված աշխատանքի նպատակն է ցույց տալ ՊՀՊ GX-NH$_2$ -ի ազդեցությունը արյան մակարդման մի շարք օղակների վրա հեպարինով պայմանավորված հիպոկոագուլացման պայմաններում:

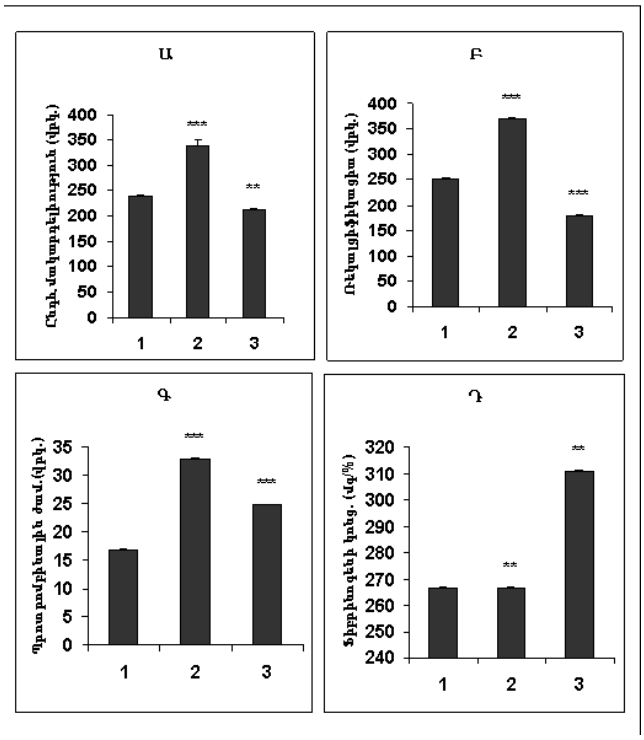
Նյութ և մեթոդ: Հետազոտությունները կատարվել են արու սպիտակ ոչ գծային առնետների վրա (180-200 գ): Կենդանիները բաժանվել են երեք խմբի. 1-ին խմբի առնետներին ներարկվել է ֆիզիոլոգիական լուծույթ (0,85 % NaCl), 2-րդ խմբին՝ հեպարին (0,5 Մ/մլ), 3-րդ խմբին նույն քանակությամբ հեպարին և ՊՀՊ GX-NH$_2$ (1 մկգ/100 գ): Մակարդելիությունը որոշելու համար արյունը վերցվել է լծային երակից, նմուշը ներարկելուց 60 րոպե հետո: Վերցրած արյունը Na-ի ցիտրատով հավասարակշռելուց հետո (9 : 1) 10 րոպե ցենտրիֆուգվել է 1500 պտ/րոպ արագությամբ, ստացված պլազմայում որոշվել է հեմոստազի մի քանի կենսաքիմիական ցուցանիշներ [2]. արյան մակարդման ժամանակը որոշվել է Lee-ի մեթոդով [6], ըստ որի գրանցվել է ֆիբրինային մակարդուկի առաջացման արագությունը երակային արյան մեջ 37ºC-ում: Ռեկալցիֆիկացման ժամանակը որոշվել է տրոմբոցիտներով հարուստ պլազմային օպտիմալ քանակությամբ $CaCl_2$ –ի ավելացմամբ, քանի որ հավասարակշռված արյան մեջ Ca-ի ազատ իոնները կապվում են կայունացնող նյութի հետ, զրկելով նրան մակարդվելու ունակությունից: Պրոտրոմբինային կոմպլեքսի ակտիվությունը որոշվել է օգտագործելով Delta –THR – stb ֆիրմայի լիոֆիլիզացված տրոմբոպլաստին, որը իրենից ներկայացնում է հյուսվածքային տրոմբոպլաստին և ֆոսֆոլիպիդներ պարունակող հյուսվածքների աղային էքստրակտ [8]: Ստացված տվյալների անալիզը կատարվել է համաձայն

$A = t_{ստ} / t_{ֆ} \times 100\%$ ֆորմուլայի: Ֆիբրինոգենի քանակությունը որոշվել է ըստ Ռուտբերգի, ստացված տվյալները արտահայտվել են մգ/% -ով [3]:

ՊՀՊ GX-NH$_2$-ը սինթեզվել է Սանկտ–Պետերբուրգի համալսարանի բնական միացությունների լաբորատորիայի կողմից:

Վիճակագրական հավաստիությունը որոշվել է One – wey Analysis of Variance (ANOVA) միջխմբային համեմատական վերլուծության ճանապարհով:

Արդյունքներ և քննարկում: Հեպարինով առաջացրած հիպոկոագուլացման պայմաններում մակարդիչ համակարգի վիճակը գնահատվել է ըստ արյան ընդհանուր մակարդելիության, ռեկալցիֆիկացման, պրոտրոմբինային ժամանակի և պլազմայում ֆիբրինոգենի քանակության մակարդակի (նկ.1):



Նկ.1. GX-NH_2 –ի ազդեցությունը մակարդելիության ցուցանիշների վրա հիպոկոագուլյացիայի պայմաններում. 1. Ստուգիչ. 0,85 % NaCl, 2. հեպարինացված 0,5 Մ/մլ հեպարին, 3.հեպարինացված + GX-NH_2, 1 մկգ/100 գ:
Ա – ընդհանուր մակարդելիության ժամանակ, վրկ, Բ – ռեկալցիֆիկացիայի ժամանակ, վրկ. Գ – պրոտրոմբինային ժամանակ, վրկ, Դ – ֆիբրինոգենի քանակություն, մգ/%
(**– $p<0,01$, *** – $p<0,001$):

Արյան ընդհանուր մակարդելիությունը որոշվել է հեպարինի ներերակային ներարկումից 60 րոպե հետո: Ըստ ստացված տվյալների՝ մակարդելիության ժամանակը երկարել է 38 % -ով, իսկ GX-NH_2 –ի ներարկումից հետո ընդամենը 10 %-ով, այսինքն ՊՀՊ-ը ունի բավականին բարձր հակահեպարինային ակտիվություն, քանի որ այն մակարդման ժամանակը մոտեցրել է ստուգիչ փորձի մակարդակին: Ուղղակի հեպարինացված և հեպարինացված ու GX-NH_2 ներարկած կենդանիների մոտ մակարդելիության ցուցանիշների տարբերությունը կազմում է 28 % (նկ.1, Ա):

Հայտնի է, որ արյան ընդհանուր մակարդելիության և ռեկալցիֆիկացման միջև գոյություն ունի զուգահեռություն, այս փորձերում ևս դա հաստատվում է. Հեպարինացված կենդանու արյան պլազմայի ռեկալցիֆիկացման ժամանակը երկարում է 47,5 %-ով, որը բացատրվում է պլազմայում ավելցուկային հեպարինի առկայությամբ, իսկ ՊՀՊ-ի ազդեցության տակ այն կրճատվում է մինչև 29 %-ի (նկ.1, Բ): Նույն օրինաչափությունը կրկնվում է նաև պրոտրոմբինային ժամանակի որոշման ժամանակ: Այս դեպքում ստուգիչ և հեպարինացված կենդանիների պլազմայի պրոտրոմբինային ժամանակի ցուցանիշների տարբերությունը հասնում է 100 %-ի. եթե ստուգիչ փորձերում այն 16 վրկ է, ապա հեպարինացված փորձերում (հեպարին ներարկելուց 60 րոպե հետո) այն 32 վրկ է, այսինքն

պրոտրոմբինային ժամանակը երկարում է երկու անգամ: Հեպարինացված և այնուհետև GX-NH$_2$ ներարկված տարբերակում՝ 30-60 րոպե հետո պրոտրոմբինային ժամանակը կրճատվում է 25 %-ով, հասնելով 24,8 վրկ (նկ.1,Գ): Պրոտրոմբինային ժամանակի երկարումը բացատրվում է պլազմայում նորմայից ավել հեպարինի պարունակությամբ, իսկ GX-NH$_2$ -ի ներարկումից հետո նրա կրճատումը տվյալ պեպտիդի մակարդիչ և հակահեպարինային ակտիվությամբ:

Ինչ վերաբերվում է ֆիբրինոգենի քանակության փոփոխությանը, ապա ստուգիչ և հեպարինացված փորձերում այն չի փոխվում. ֆիբրինոգենի քանակությունը երկու դեպքում էլ հավասար է՝ 266,4 մգ/%, իսկ հեպարինացված և ՊՀՊ ներարկած կենդանիների արյան պլազմայում այն 310,8 մգ/% է, որը կազմում է 12 %: Այս ցուցանիշի կարճաժամկետ և քիչ բարձրացումը կարելի է գնահատել որպես օրգանիզմի պաշտպանիչ ռեակցիա, որը հաստատվում է գրականության տվյալներով [1] :

Այսպիսով, մեր կողմից մեկ անգամ ևս հաստատվեց հիպոթալամուսի պրոլինով հարուստ պեպտիդ GX-NH$_2$ –ի մակարդիչ հատկությունը և ցույց տրվեց, որ հեպարինացված կենդանիների մոտ (հիպոկոագուլացման պայմաններում) այն ունի հակահեպարինային ակտիվություն:

ԳՐԱԿԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

1. *Луговский Э.В.* Молекулярные механизмы образования фибрина и фибринолиза. Киев, 2003.
2. *Петрушин Ю.В., Рогова С.Ш., Ковалевич Н.И.* Лабораторные методы исследования системы гемокоагуляции. М., 2009.
3. *Рутберг П.А.* Лабораторное дело. №5, с. 6, 1961.
4. *Срапионян Р.М., Паронян З.Х., Саакян Ф.М.,Чаилян Г.С., Григорян Л.С.* Влияние гипоталамических нейромодуляторов и их модифицированных форм на гемостаз. Мед. наука Армении, *LIV*, 3, с.15-20, 2014.
5. *Boot N., Bennet B.* A newlife – long hemorrahagic disorder due to excess plazminogen activation. Amer. J. Hematol., 4, p. 289-294, 1999.
6. *Lee R., White P.D.* Clinical study of the coagulation time of blood. Amer. J. Med., VCXLY, 4, p. 495-503, 1973.
7. *Rabenstein D.L.* Heparin and heparin sulfate: structure and function. Nat. Prod. Rep., 19 (3), p. 312-331, 2002.
8. *Riggeri Z.M.* J. Thromb. Haemost., 1,7, p. 1335-1342, 2003.

Ստացվել է 24.05.2017