

Н.В. Заїчко *,
Т.М. Платонова **,
Т.М. Чернишенко **,
Т.В. Гриненко **,
О.І. Юсова **

ВПЛИВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗУ ЩУРІВ

*НДІ реабілітації інвалідів Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова**
(директор – д.мед.н., проф. В.І. Шевчук)
*Інститут біохімії ім. О. В. Палладіна НАН України***
м. Київ

Ключові слова: *гідроген сульфід, пропаргілгліцин, гемостаз*
Key words: *hydrogen sulfide, proparhilhlitsyn, hemostasis*

Резюме. *Исследовано влияние 7-дневного введения донора гидроген сульфида $Na_2S \cdot 9H_2O$ (14 мкмоль/кг) и ингибитора цистатионин-гамма-лиазы DL-пропаргилглицина (50 мг/кг) на систему гемостаза крыс. Установлено, что повышение уровня гидроген сульфида в плазме крови замедляет активацию протромбина, снижает активность фактора X и ингибиторов фибринолиза. В то же время, снижение уровня гидроген сульфида приводит к усилению гемокоагуляции и увеличивает АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов.*

Summary. *Influence of 7-day administration of hydrogen sulfide donor $Na_2S \cdot 9H_2O$ (14 micromol/kg) and inhibitor of cystathionine- γ -lyase DL-propargylglycine (50 mg/kg) on hemostasis in rats was investigated. It was established that increasing of hydrogen sulfide blood level decelerated prothrombin activation, decreased activity of factor X and fibrinolysis inhibitors. At the same time, lowering of hydrogen sulfide resulted in enhancement of hemocoagulation and ADP-induced platelet aggregation.*

Гідроген сульфід (H_2S) є біологічно активним метаболітом сірковмісних амінокислот – цистеїну, гомоцистеїну та метіоніну, який бере участь в регуляції судинного тонуусу, нейромодуляції, запаленні тощо [7]. Встановлено, що H_2S досить активно утворюється в міокарді та судинах за участі піридоксальфосфатзалежного ферменту цистатионін- γ -ліази (КФ 4.4.1.1) [7]. Тому зниження ендогенної продукції H_2S сьогодні розглядають як можливий чинник захворювань серцево-судинної системи, зокрема артеріальної гіпертензії та ішемічної хвороби серця. Цілком очевидно, що H_2S , як і інші вазодилататори (оксид азоту, аденозин), може виявитись причетним до регуляції функціонального стану тромбоцитів та процесів тромбогенезу. Однак вплив H_2S на систему гемостазу залишається повністю не з'ясованим. У попередніх дослідженнях нами було показано, що в умовах *in vitro* H_2S проявляє антиагрегантну дію [3], а зниження його вмісту в сироватці крові у щурів із гіпергомоцистеїнемією асоціюється з посиленням активаційних процесів у тромбоцитах. Метою цієї роботи було визначити вплив H_2S на різні ланки (коагулянтну, антикоагулянтну, фібринолітичну, тромбоцитарну) системи гемостазу щурів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Досліди проведені на 30 білих нелінійних щурах-самцях масою 250-270 г. Під час експе-

рименту всі тварини отримували напівсинтетичний крохмально-казеїновий раціон, який забезпечував надходження в їх організм оптимальних кількостей всіх макро- і мікронутрієнтів [2]. На цей раціон тварин переводили за 10 днів до початку експерименту для адаптації, режим харчування та водний режим були *ad libitum*. Тварини були розділені на три групи: група №1 – контроль (n=10), щурам групи №2 (n=10) вводили донор H_2S – $Na_2S \cdot 9H_2O$ (у водному розчині існує як гідросульфід-аніон HS^-) в дозі 14 мкмоль/кг 1 раз на добу інтраперитонеально 7 днів, щурам групи №3 (n=10) вводили D,L-пропаргілгліцин (інгібітор цистатионін- γ -ліази) в дозі 50 мг/кг 1 раз на добу інтраперитонеально 7 днів. Щурам контрольної групи інтраперитонеально вводили відповідну кількість 0,15 М розчину NaCl. Дози та шляхи введення вказаних речовин обрані згідно з даними літератури і не викликали загибелі тварин [6]. Забір крові для досліджень проводили з серця тварин у поліетиленові пробірки: з 3,8% розчином цитрату натрію (у співвідношенні 9:1) для дослідження показників гемостазу; без антикоагулянтів - для біохімічних досліджень. Перед забором крові щурів анестезували кетаміном (100 мг/кг маси тіла інтраперитонеально). З експерименту тварин виводили шляхом дислокації шийних хребців. Досліди проведено згідно з правилами гуманного

ставлення до експериментальних тварин, затвердженими комітетом з біоетики Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова.

Сироватку крові, а також багату та бідну тромбоцитами плазму крові отримували звичайними методами. Показники системи гемостазу визначали протягом трьох годин після забору крові. Плазму крові зі згустками чи ознаками гемолізу для досліджень не використовували. Агрегацію тромбоцитів досліджували у зразках багаті тромбоцитами плазми крові на фотооптичному агрегометрі AP2110 ("Солар", Білорусь), як індуктор агрегації брали АДФ (кінцева концентрація 5 мкМ). Для характеристики коагуляційного потенціалу визначали: активований частковий тромбопластиновий час (АЧТЧ), протромбіновий час (ПЧ), тромбіновий час (ТЧ), вміст фібриногену, амідолітичну активність X фактору (по відношенню до хромогенного субстрату S2765). Антикоагулянтну ланку системи гемостазу характеризували за активністю антитромбіну III та протеїну C, яку визначали амідолітичним методом. Для характеристики фібринолітичної системи визначали час лізису еуглобулінів. Додатково в пулах плазми щурів контрольної групи та щурів 2 групи (введення $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) визначали кількість плазміногену та активності тканинного активатора плазміногену (ТАП), його інгібітору (ПАІ-1) і α -2-антиплазміну.

Вміст плазміногену в плазмі крові визначали з використанням лізин-сефарози. На колонку, яка містила 5 мл гелю лізин-сефарози (сорбційна ємність - 0,6 мг білка/мл гелю), наносили 1 мл плазми крові щурів. Колонку промивали 0,1 М натрій-фосфатним буфером до поглинання елюату 0,001 при 280 нм, десорбцію плазміногену здійснювали 0,1 М 6-аміногексановою кислотою. Концентрацію проферменту розраховували за коефіцієнтом екстинції $E_{280\text{ нм}}^{1\%} = 17,0$ [8].

Активність ТАП та ПАІ-1 визначали за стандартною процедурою методів COASET t-PA та COATEST PAI (Chromogenix), відповідно, з використанням desAABB фібрину як стимулятора (0,12 мг/мл).

Активність α 2-антиплазміну плазми визначали за інгібуванням фібринолітичної активності плазміну. В реакційне середовище вносили: 0,02 М вероналовий буфер, що містить 0,13 М

NaCl та 0,001 М CaCl_2 , плазмін ($3,5 \cdot 10^{-8}$ М), плазму крові щурів (2,5 - 5,0 мкл). Процес полімеризації фібрину ініціювали додаванням розчину desAABB фібрину ($6,0 \cdot 10^{-7}$ М). Об'єм суміші - 1,0 мл. Реакцію проводили в термостатованій кюветі спектрофотометру (ЛОМО, Росія) за 37 °С. Оптичну щільність середовища протягом полімеризації та наступного гідролізу фібрину плазміном визначали при 350 нм. Вимірювали час напівлізису згустку $t_{1/2}$ (час від початку полімеризації фібрину до зменшення максимальної мутності середовища на 50%) і розраховували швидкість гідролізу фібрину плазміном як $1/t_{1/2}$. Швидкість гідролізу фібрину плазміном за відсутності плазми крові приймали за 100%.

Вміст H_2S у плазмі крові визначали за реакцією з *n*-фенілєндіаміном, як описано [1]. Вміст цистеїну визначали за реакцією з нінгідриновим реактивом у кислому середовищі [5]. Рівень білкових SH-груп у плазмі крові визначали за реакцією з реактивом Елмана.

У роботі використані D,L-пропаргілгліцин, L-цистеїн фірми Sigma (США), набори "Техплатин-тест", "АПТВ-ЕІ-тест", "Тромботест", "ХромоТех-Антитромбин", "АДФ" фірми Технологія-Стандарт (Росія) та "Реахром-Протеїн С" фірми НПО РЕНАМ (Росія), ТАП (Alteplasa) фірми Boehringer Ingelheim (Німеччина), S2251 (Val-Leu-Lys-pNa) фірми Chromogenix (Швеція), урокіназа фірми Medac (Німеччина), BrCN-сефароза фірми Amersham (Швеція). Статистичну обробку результатів проводили за допомогою статистичних програм "MS Excel XP". Вірогідність відмінностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що 7-денне введення розчину $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ викликало підвищення (на 24,0 та 22,7%) рівня H_2S та білкових SH-груп у плазмі крові і практично не впливало на рівень цистеїну (табл.). У той же час, введення пропаргілгліцину зумовило зниження вмісту H_2S , цистеїну та білкових SH-груп в плазмі крові на 37,6; 23,1 та 20,7%, відповідно. Індуковане введенням пропаргілгліцину падіння вмісту рівнів цистеїну та H_2S у плазмі крові пояснюється інгібуванням цистатіонін- γ -ліази, яка каталізує утворення зазначених речовин у серцево-судинній системі та інших тканинах (схема 1).

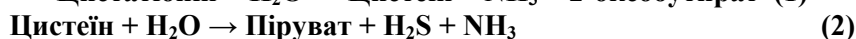


Схема 1. Реакції утворення цистеїну (1) та H_2S (2), що каталізуються цистатіонін- γ -ліазою

Звертає на себе увагу той факт, що коливання вмісту H_2S у плазмі крові, індуковані введенням $Na_2S \cdot 9H_2O$ та пропаргілгліцину, супроводжувались аналогічними за спрямованістю змінами рівня білкових SH-груп, причому між цими показниками існував

достовірний прямий кореляційний зв'язок ($r=0,79$). Виявлена закономірність підтверджує причетність H_2S до підтримки SH-груп у відновленому стані [7], що, як відомо, впливає на біологічну активність білків, у тому числі і білків системи гемостазу [4].

Вплив H_2S та D,L-пропаргілгліцину на вміст сірковмісних сполук у плазмі крові, показники системи гемостазу та агрегацію тромбоцитів у щурів ($M \pm m$)

Показник	Групи щурів		
	1	2	3
	контроль (n=10)	введення $Na_2S \cdot 9H_2O$ (n=10)	введення пропаргілгліцину (n=10)
Вміст сірковмісних сполук у плазмі крові			
H_2S , мкмоль/л	68,3 ± 3,56	84,7 ± 3,14*	42,6 ± 3,14 *
Цистеїн, мкмоль/л	167,6 ± 6,04	176,2 ± 5,57	128,9 ± 4,69*
Білкові SH-групи, ммоль/л	7,53 ± 0,26	9,24 ± 0,27*	5,97 ± 0,26*
Показники плазмених ланок системи гемостазу			
ПЧ, с	18,7 ± 0,52	24,6 ± 0,76*	15,9 ± 0,59*
АЧТВ, с	26,2 ± 0,59	31,3 ± 1,60*	22,1 ± 1,28*
ТЧ, с	10,3 ± 0,30	13,0 ± 0,39*	9,9 ± 0,38
Фібриноген, г/л	2,88 ± 0,15	2,98 ± 0,07	2,83 ± 0,12
Активність АТ III, %	100,4 ± 1,98	102,7 ± 1,44	95,6 ± 1,98
Активність протеїну С, %	99,2 ± 1,21	94,2 ± 2,80	95,2 ± 2,81
Активність фактору X, %	99,7 ± 1,46	79,5 ± 3,60*	-
Час лізису еуглобулінів, хв.	106,5 ± 2,99	112,1 ± 3,07	108,8 ± 2,67
Показники АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів			
Ступінь агрегації, %	31,3 ± 2,31	26,0 ± 1,14	40,7 ± 1,15*
Час агрегації, с	202,5 ± 18,8	206,6 ± 10,7	247,6 ± 4,24*
Швидкість, % за хв	26,5 ± 1,36	22,5 ± 1,70	32,4 ± 1,82*

Примітка: * - $p < 0,05$ - відносно групи контролю

Колівання рівня H_2S у крові відображались на функціональному стані системи зсідання крові. Зокрема, збільшення вмісту H_2S у плазмі крові при введенні $Na_2S \cdot 9H_2O$ асоціювалось зі зменшенням активності коагуляційних процесів: у щурів групи №2 час зсідання плазми крові в тестах ПЧ та АЧТВ подовжився на 31,6 та 19,5%, активність фактору X зменшилась на 20,3% порівняно з контролем, що свідчить про сповільнення активації протромбіну. В той же час індуковане пропаргілгліцином зниження вмісту H_2S у плазмі крові, навпаки, супроводжувалось посиленням процесів гемокоагуляції – час зсідання крові в тестах ПЧ та АЧТВ у щурів групи № 3 скоротився на 2-4 с (15-16%) порівняно з контролем. Введення $Na_2S \cdot 9H_2O$ викликало також подовження (на 26,2%) часу зсідання крові в тесті ТЧ, тоді як введення пропаргілгліцину практично не впливало на цей показник. Оскільки рівні фібриногену у щурів

контрольної та дослідних груп достовірно не відрізнялись між собою, збільшення ТЧ може свідчити про накопичення в плазмі крові сполук, здатних зменшувати активність тромбіну, при цьому не виключено, що таку дію має H_2S .

Зміни вмісту H_2S у плазмі крові (як при введенні $Na_2S \cdot 9H_2O$, так і при введенні пропаргілгліцину) не асоціювались з достовірними змінами активності білків антикоагулянтної ланки (антитромбіну III та протеїну С) і не викликали помітних змін часу лізису еуглобулінів. Більш детальний аналіз показників системи фібринолізу був проведений у пулах плазми крові щурів контрольної групи та щурів, яким вводили $Na_2S \cdot 9H_2O$. З'ясувалось, що зниження рівня H_2S не супроводжувалось достовірними змінами вмісту плазміногену та активності ТАП (рис.1) в плазмі крові, однак намічалась тенденція до зменшення активності інгібіторів плазміну – ПАІ-1 та $\alpha 2$ -антиплазміну (рис.2, 3).

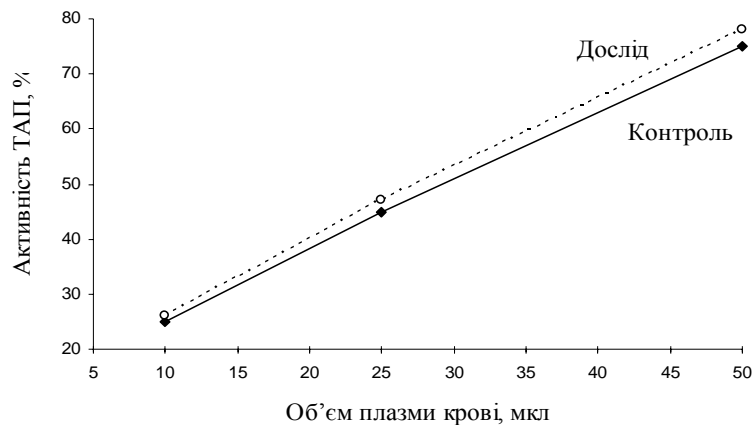


Рис.1. Активність ТАП у плазмі крові щурів контрольної групи та щурів, яким вводили $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (дослід)

Дослідження агрегації тромбоцитів показало, що зниження вмісту H_2S у плазмі крові супроводжувалось підвищенням чутливості цих клітин до дії стимуляторів. Так, ступінь, швидкість та час АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів у щурів, яким вводили пропаргілгліцин, були вищими (на 30,0; 22,3 та 44,0%), ніж у контролі.

Помірне підвищення рівня H_2S у плазмі крові, зумовлене введенням $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, не спричиняло достовірних змін агрегації тромбоцитів. Між ступенем агрегації тромбоцитів та рівнем H_2S у плазмі крові виявлявся обернений кореляційний зв'язок ($r=-0,33$), який посилювався при введенні пропаргілгліцину ($r=-0,51$).

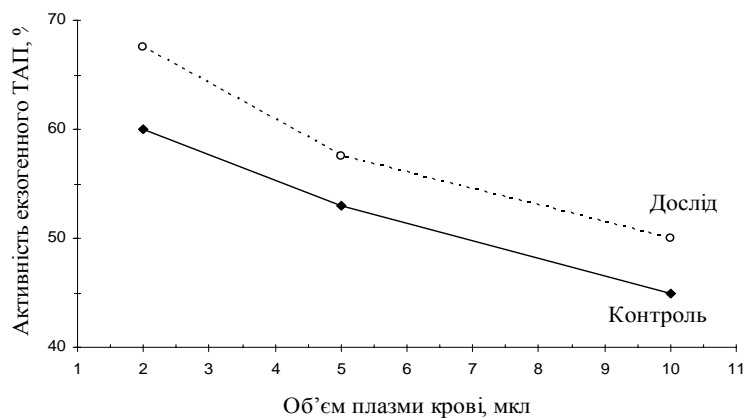


Рис.2. Зниження активності екзогенного ТАП під дією ПАІ-1 плазми крові щурів контрольної групи та щурів, яким вводили $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ (дослід)

Таким чином, нами вперше показано, що рівень H_2S у крові є одним із чинників, причетних до регуляції функціонального стану системи гемостазу. Підвищення вмісту H_2S у крові супроводжується сповільненням процесу гемокоагуляції (за рахунок зниження активності фактору X та пригнічення процесу активації протромбіну) і викликає тенденцію до зменшення активності інгібіторів фібринолізу - ПАІ-1 та α_2 -антиплазміну. На противагу цьому, зниження вмісту H_2S у плазмі крові сприяє посиленню процесів активації протромбіну та збільшує чут-

ливість тромбоцитів до АДФ, що може зумовити розвиток тромбофілії. Найбільшою мірою на падіння рівня H_2S у крові реагують тромбоцитарна ланка і плазмені фактори коагуляції, тоді як зростання рівня H_2S у крові в першу чергу відображається на плазменому гемостазі і, меншою мірою, на процесі фібринолізу. Ймовірні механізми впливу H_2S на процеси зсідання крові можуть опосередковуватись через зміну редокс-статусу білків системи гемостазу та тромбоцитів, внаслідок здатності цієї молекули втручатись у тілово-дисульфідний обмін. Як відомо,

цей шлях є важливим в регуляції активності багатьох білків, у тому числі і білків системи гемостазу [4]. Зокрема, продемонстровано, що редукція дисульфідних зв'язків у молекулі тромбіну зменшує його клотингову активність по відношенню до фібриногену [9], а інгібування активності одного з ключових ферментів тіолово-дисульфідного обміну протеїндисульфідізо-

мерази порушує залежний від тканинного фактору процес утворення фібрину [4]. Перспективами подальших досліджень є вивчення молекулярних механізмів впливу H_2S на систему гемостазу та розробка шляхів корекції гемокоагуляційних порушень шляхом модуляції синтезу H_2S .

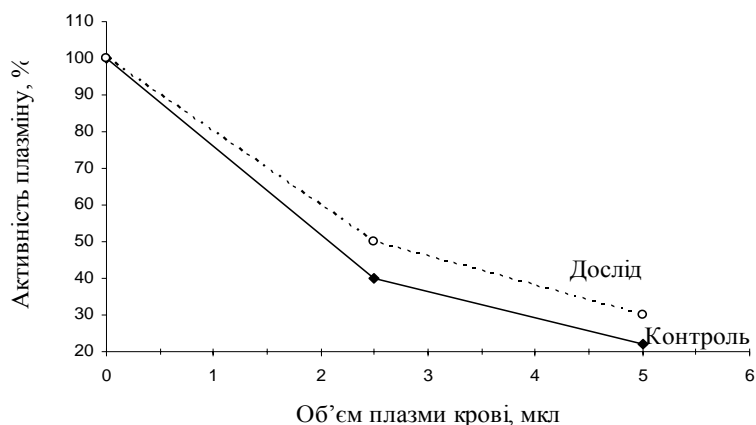


Рис.3. Інгібування фібринолітичної активності плазміну α_2 -антиплазміном плазми крові щурів контрольної групи та щурів, яким вводили $Na_2S \cdot 9H_2O$ (дослід)

ВИСНОВКИ

1. Введення $Na_2S \cdot 9H_2O$ (донору H_2S) щурам у дозі 14 мкмоль/кг протягом 7 днів викликає підвищення (20-25%) рівня H_2S та білкових SH-груп у плазмі крові і практично не впливає на рівень цистеїну. За цих умов введення пропаргілліцину в дозі 50 мг/кг, навпаки, викликає достовірне зниження (25-30%) вмісту H_2S , цистеїну та білкових SH-груп у крові.

2. Підвищення вмісту H_2S у плазмі крові призводить до подовження часу зсідання крові в тестах ПЧ і АЧТВ, зниження активності фактору X і викликає тенденцію до зменшення активності інгібіторів фібринолізу ПАІ-1 та α_2 -антиплазміну. Зниження рівня H_2S у плазмі крові асоціюється з посиленням процесів гемокоагуляції та збільшенням АДФ-індукованої агрегації тромбоцитів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Визначення вмісту гідроген сульфід у сироватці крові / Н. В. Заїчко, Н.О. Пентюк, Л. О. Пентюк [та ін.] // Вісник наукових досліджень. – 2009. – №1. – С.29-32.
2. Гіпергомоцистеїнемія: моделювання та вплив на стан судинної системи в експерименті / О.О. Пентюк, М. Б. Луцюк, К. П. Постовітенко [та ін.] // Досягнення біології та медицини.-2004.-№1(3).-С.35-38.
3. Заїчко Н.В. Вплив аніонів гідросульфіді, дитіоніту, сульфату, тіосульфату та сульфату на агрегацію тромбоцитів людини / Н. В. Заїчко, О.О. Пентюк // Укр.біохім. журнал. - 2009. – Т. 81, №1. - С.105-113.
4. Chen V.M. Allosteric disulfide bonds in thrombosis and thrombolysis / V. M. Chen, P. J. Hogg // J. Thromb. Haemost. - 2006. - Vol. 4.- P. 2533 - 2541.
5. Gaitonde M. K. A spectrophotometric method for direct determination of cysteine in the presence of other

- naturally occurring amino acid / M. K. Gaitonde // Biochem. J. - 1967. - Vol.104, N2. - P.627-633.
6. Hydrogen sulfide and its possible roles in myocardial ischemia in experimental rats / Y. Z. Zhu, Z. J. Wang, P. Ho [et al.] // J. Appl. Physiol. – 2007.- Vol. 102, N1.- P.261-268.
7. Lowicka E. Hydrogen sulfide (H_2S) – the third gas of interest for pharmacologists / E. Lowicka, J. Bel-towski // Pharmacological Reports.- 2007.- Vol.59.- P.4-24.
8. Robbins K. C. Plasminogen and plasmin / K.C. Robbins, L. Summari // Methods in Enzymology. - 1976. - Vol. 45. - P. 257- 273.
9. Serejskaya AA. Enzymic activity of thrombin with partially reduced disulfide bonds / A. A. Serejskaya, S. V. Zubak, T. W. Osadchuk, S. B. Serebryani // Thromb. Res. - 1983. - Vol. 32, N2.- P. 147-154.