

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ ПРЕПАРАТОВ АРГИНИНА С ГЕПАРИНОМ И РАСТИТЕЛЬНОМ ГЕПАРИНОИДОМ

Ляпина М.Г., Успенская М.С., Ляпина Л.А.

ФГОУ «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», Москва, e-mail: lyapinarita@gmail.com

Разработаны способы получения комплексных препаратов, включающих аргинин и гепарин животного происхождения (препарат 1), а также аргинин и гепариноид из корней пиона молочноцветкового (*Paeonialactiflora*) (препарат 2) при молярном соотношении компонентов 3 : 1. Проведены сравнительные исследования гемостазиологических свойств препаратов в условиях *in vitro* и *in vivo*. Оба препарата обнаруживали антикоагулянтные и фибриндеполимеризационные свойства, но в препарате 2 по сравнению с препаратом 1 наблюдалось превалирующее действие на ингибирование полимеризации фибрина. Расшифрован механизм фибриндеполимеризационного действия препаратов 1 и 2, который заключается в ингибировании конечного этапа процесса свертывания крови – образования фибринового сгустка. Препараты 1 и 2 в перспективе могут применяться как антитромботические средства, не вызывающие геморрагического действия на организм. Наиболее эффективным препаратом является комплексный препарат 2.

Ключевые слова: антикоагулянт, кровь, аргинин, гепарин, гепариноид из корней пиона, механизм действия.

COMPARATIVE STUDIES OF COMPLEX PREPARATIONS ARGININE WITH HEPARIN AND PLANT HEPARINOID

Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Lyapina L.A.

Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow, e-mail: lyapinarita@gmail.com

Methods have been developed for the preparation of complex drugs including arginine and heparin of animal origin (preparation 1), as well as arginine and heparinoid from the roots of *Paeonialactiflora* (preparation 2) with a molar ratio of components of 3: 1. Comparative studies of the haemostasiological properties of drugs under conditions *in vitro* and *in vivo*. Both drugs showed anticoagulant and fibrin-de-polymerization properties, but in preparation 2 compared to preparation 1, a predominant effect on the inhibition of fibrin polymerization was observed. The mechanism of fibrin depolymerization action of drugs 1 and 2 is deciphered, which consists in inhibiting the final stage of the clotting process - the formation of a fibrin clot. Preparations 1 and 2 in the future can be used as antithrombotic agents that do not cause hemorrhagic effects on the body. The most effective drug is a complex drug 2.

Keywords: anticoagulant, blood, arginin, heparin, heparinoid from paeonia roots, mechanism of action.

Ранее было установлено, что аминокислота аргинин улучшает реологические свойства крови, препятствует тромбообразованию [8,11] и оказывает положительные эффекты на метаболизм жиров и углеводов [1,6]. Ингибирующие свертывание крови эффекты аргинина обусловлены тем, что он является предшественником оксида азота (NO) [5], который вырабатывается эндотелиальными клетками сосудов. Оксид азота участвует в функционировании ряда систем организма, в том числе и гемостаза [9]. Один из природных антикоагулянтов системы гемостаза – гепарин животного происхождения, а также другие гликозаминогликаны блокируют свертывающую активность тромбина [4] и других протеиназ [13] при одновременном проявлении в организме противовоспалительного действия. Таким же действием обладает и гепариноид, полученный из корней пиона молочноцветкового [3].

Показано, что в гепариноиде из пиона содержится часть нефракционированного гепарина (НФГ) по антифакторной Па (анти-Па) активности и присутствует низкомолекулярный гепарин (НМГ) по антифакторной Ха (анти-ХА) активности. Соотношение этих активностей антиПа/антиХа в среднем было 1 : 2,03. Молекулярная масса гепариноида составляла 5,7 kDa [2]. Экспериментальные данные, подтвержденные затем в клинических условиях, свидетельствуют об активации противосвертывающей активности гепарином, гепариноидом и НМГ при ишемическом инсульте [10, 12].

Цель исследования – создание противосвертывающих комплексных препаратов аргинина с гепарином и гепариноидом из корней пиона молочнокветкового и сравнительное изучение их влияния на полимеризацию фибрина, антикоагулянтную и антитромбоцитарную активность крови крыс в условиях *in vitro* и *in vivo* при пероральном введении животным.

Материал и методы исследования

В работе использовали стандартный нефракционированный гепарин (НФГ) фирмы Serva (Германия); гепариноид, полученный из корней пиона молочнокветкового, выращенного в Ботаническом саду МГУ имени Ломоносова [3], содержащий НФГ и низкомолекулярный гепарин (НМГ); аргинин фирмы Reanal (Венгрия).

Разработаны способы получения комплексных препаратов аргинин – гепарин (препарат 1) и аргинин – гепариноид из пиона (препарат 2). Методом перекрестного электрофореза доказано при комплексообразовании существование взаимодействия между гуанидогруппами аргинина и кислыми группами гепарина или гепариноида. В условиях *in vitro* проводили определение суммарной и неферментативной фибринолитической (фибриндеполимеризационной) активности; антикоагулянтной активности и агрегации тромбоцитов при добавлении к плазме крови здоровых животных (0,1 мл) комплексных препаратов 1 и 2 в объеме 0,025 мл в пределах концентраций от 10^{-5} до 10^{-1} мг/мл.

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* использовали более 60 лабораторных белых крыс – самцов с массой тела 200–220 г. Все исследования на животных проведены в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург; 15.06.2006). В опытах *in vivo* животные были разделены на 5 групп: крысам первой опытной группы вводили комплексный препарат аргинина с гепарином (препарат 1) в дозе 0,1 мг/кг массы тела, животным второй опытной группы – комплексный препарат аргинина с гепариноидом из пиона (препарат 2) в дозе 0,1 мг/кг, крысам третьей контрольной группы – гепарин в дозе, эквивалентной его содержанию в комплексе 1, четвертой контрольной группы – гепариноид в дозе, эквивалентной его содержанию в комплексе 2, пятой контрольной группы – аргинин в дозе, эквивалентной содержанию его в комплексах, животным шестой контрольной группы вводили тот же

объем, т.е. по 0,3 мл, 0,85 %-го раствора NaCl (растворитель). Введение растворов препаратов производили перорально. Взятие крови осуществляли через 2 ч после введения из *venajugularis* с использованием в качестве консерванта 3,8 %-ного лимоннокислого натрия в соотношении 9:1, которую затем центрифугировали в двух режимах – при 1000g в течение 5 мин (получали богатую тромбоцитами плазму для определения агрегации тромбоцитов) и затем при 2000g в течение 10–12 мин для получения бестромбоцитарной плазмы. Производили определение следующих параметров свертывающей и противосвертывающей систем плазмы крови: суммарную (СФА) и неферментативную (НФ) фибринолитическую активность, активность тканевого активатора плазминогена (ААП). На приборе анализатор свертывания крови АСКa-2-01 АСТРА (Россия) определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Агрегацию тромбоцитов (АТ) измеряли на агрегометре (Россия) с использованием в качестве агреганта раствора аденозиндифосфата (АДФ) в концентрации 2 мкМ [2].

Все данные были обработаны статистически по непараметрическому критерию Вилкоксона (программа STATISTICA 6).

Результаты исследования и их обсуждение

Нами установлено, что в чистой системе (условия *in vitro*) комплексные препараты 1 и 2 проявляли СФА за счет НФ (или фибриндеполимеризационной активности – ФДПА) в широком интервале концентраций от 10^{-7} до 10^{-1} мг/мл, в то время как составные части – гепарин, растительный гепариноид и аргинин в концентрациях, эквивалентных их содержанию в комплексах, не обнаруживали фибринолитического действия или же оказывали слабый эффект (зоны лизиса составляли до 4 мм²). Следовательно, оба комплексных препарата препятствовали процессу полимеризации фибрина, причем препарат 2 – в большей степени. При этом в комплексных препаратах установлено наличие антикоагулянтной активности (по тесту АЧТВ) при их концентрации в плазменной среде от 10^{-5} до 10^{-1} мг/мл; из составных частей только гепарин и в большей степени гепариноид в эквивалентных дозах проявляли антикоагулянтную активность, но более слабую по сравнению с комплексными препаратами. АТ плазмы в присутствии комплексов в чистой системе в концентрации 10^{-2} – 10^{-3} мг/мл снижалась на 18 % (препарат 1) – 21 % (препарат 2) по сравнению с контрольными пробами после добавления физиологического раствора. Следовательно, в условиях *in vitro* комплексы отличаются от составных частей значительным эффектом по антикоагулянтной активности (тест АЧТВ) и фибриндеполимеризационной активности (ФДПА). Большую антикоагулянтную и ФДПА проявлял комплексный препарат 2 (с растительным гепариноидом) по сравнению с комплексным препаратом 1 (с гепарином животного происхождения). В табл. 1 представлены данные, полученные при действии

препаратов 1 и 2 при их концентрациях в системе 10^{-1} мг/мл в условиях *in vitro*.

Таблица 1

Влияние комплексных препаратов аргинин-гепарин (1) и аргинин-гепариноид из пиона (2) в концентрациях 10^{-1} мг/мл на антикоагулянтную активность плазмы и процессы фибринообразования в условиях *in vitro* ($M \pm m$)

Препараты	АЧТВ, с (в присутствии плазмы крови)	СФА, мм ²	ФДПА, мм ²
		в отсутствие плазмы крови	
Опытная группа 1 – комплекс аргинин-гепарин	69,0 ± 0,7**	47,0 ± 1,2**	46,8 ± 0,7**
Опытная группа 2 – комплекс аргинин- гепариноид	65,6 ± 0,7**	48,8 ± 1,8**	48,6 ± 0,7**
Контрольная группа 3 гепарин	40,9 ± 1,6*	3,5 ± 0,3*	3,4 ± 0,5**
Контрольная группа 4 гепариноид	40,0 ± 1,8*	4,4 ± 0,3*	4,4 ± 0,9**
Контрольная группа 5 аргинин	36,7 ± 1,7	0,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0
Контрольная группа 6 – физиологический раствор	36,2 ± 2,2	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,0

Примечание. Достоверность различий рассчитана относительно соответствующих проб контроля. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Обозначения: АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, собственная СФА – суммарная фибринолитическая активность, ФДПА – фибриндеполимеризационная активность.

Через 2 ч после перорального введения комплексных препаратов 1 и 2 в дозе 0,1 мг/кг выявлен повышенный фон антикоагулянтной активности по тесту АЧТВ, превышающий антикоагулянтную активность плазмы после введения физиологического раствора в 2,2 и 2,8 раза соответственно. При этом введение препаратов 1 и 2 приводило к увеличению СФА в 1,44 и в 1,9 раза соответственно, НФ – в 3,4 и в 4,6 раз соответственно, ААП – почти в 2,0 раза по сравнению с 6 контрольной группой, получавшей 0,85 %-ный раствор NaCl. Введение крысам эквивалентной по отношению к комплексу дозы аргинина (5 контрольная группа) не приводило к изменению СФА, НФ, ААП. Пероральное введение эквивалентной по отношению к комплексу дозы гепарина (3 контрольная группа) практически не изменяло исследуемых параметров гемостаза за исключением СФА плазмы, которая имела лишь тенденцию к увеличению по сравнению с контрольной группой 6 (введение физиологического раствора). Введение гепариноида из пиона оказывало более значительный эффект по АЧТВ, которое удлинялось 1,4 раза, СФА и НФ, которые увеличивались в 1,2 и в 2,7 раза соответственно по сравнению с 6 контрольной группой. Итак, гепариноид из пиона в

этих условиях проявлял также антикоагулянтную активность, но в более слабой степени, чем комплексный препарат 2. Гепарин в эквивалентной дозе при пероральном приеме обнаруживал незначительные антикоагулянтные свойства в плазме крови крыс. После введения эквивалентной дозы аргинина не было отмечено резкого изменения антикоагулянтной активности плазмы крови. Агрегация тромбоцитов под действием перорального введения всех исследуемых препаратов практически не менялась, за исключением препарата 2, который имел тенденцию к снижению агрегации тромбоцитов (табл. 2).

Таблица 2

Суммарная фибринолитическая активность (СФА), неферментативный фибринолиз (НФ), активность тканевого активатора пламиногена (ААП), агрегация тромбоцитов, антикоагулянтная активность (по тесту АЧТВ) в плазме крови крыс через 2 ч после перорального введения комплексных препаратов аргинина с гепарином или гепариноидом в дозе 0,1 мг/кг и их составных частей в эквивалентных количествах ($M \pm m$)

Вводимые препараты	АЧТВ, с	Агрегация тромбоцитов, %	СФА, мм ²	НФ, мм ²	ААП, мм ²
Опытная группа 1 – препарат 1	73,0 ± 1,3**	105,0 ± 6,9	56,9 ± 1,2**	36,1 ± 1,2**	20,1 ± 1,6**
Опытная группа 2 – препарат 2	91,1 ± 0,9**	90,0 ± 3,3*	64,5 ± 1,1**	46,5 ± 1,0**	19,9 ± 2,0**
Контрольная группа 3 – гепарин	38,0 ± 2,5*	115,5 ± 1,1	39,7 ± 3,4*	19,6 ± 4,8	13,1 ± 1,2
Контрольная группа 4 – гепариноид	45,9 ± 1,5**	94,3 ± 1,4*	45,0 ± 0,7**	29,3 ± 0,9*	14,3 ± 1,0 *
Контрольная группа 5 – аргинин	34,0 ± 1,0	101,4 ± 0,9	36,2 ± 0,7**	10,8 ± 0,5*	13,5 ± 1,5
Контрольная группа 6 – 0.85 % NaCl	32,1 ± 1,1	100,1 ± 2,4	32,6 ± 1,3	10,5 ± 1,8	10,3 ± 1,4

Примечание. Достоверность различий рассчитана относительно соответствующих проб контроля. ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$. Обозначения: АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, СФА – суммарная фибринолитическая активность, НФ – неферментативная фибринолитическая активность, ААП – активность тканевого активатора пламиногена.

Следовательно, при сравнении противосвертывающих активностей после

перорального введения комплексов аргинин-гепарин и аргинин-гепариноид из пиона установлены значительные эффекты каждого из комплексных препаратов по сравнению с составными частями в отношении СФА в плазме крови, ее НФ, активности тканевого активатора пламиногена плазмы крови, АЧТВ. Препарат 2, включающий аргинин с гепариноидом из пиона, оказывал более значительный эффект по проявлению в кровотоке антикоагулянтной, суммарной и неферментативной фибринолитической активностей. Это, возможно, обусловлено тем, что гепарин при пероральном применении неактивен, но оказывает противосвертывающий эффект лишь в комплексе с аминокислотами, белками, пептидами [3,7]. В гепариноиде из пиона присутствует помимо НМГ и НФГ и пептид [3], поэтому и гепариноид из пиона, и комплекс с ним проявляют значительные антикоагулянтно-фибринолитические эффекты и имеют тенденцию к снижению агрегации тромбоцитов.

Заключение

В настоящей работе показано, что при сравнении противосвертывающих эффектов комплексных препаратов 1 (аргинин-гепарин) и 2 (аргинин-гепариноид из пиона) и их составных частей – гепарина, гепариноида и аргинина в эквивалентных дозах в условиях *in vivo* наибольший противосвертывающий эффект обнаруживает комплексный препарат 2, что указывает на более длительное его сохранение в кровотоке. Полученные нами данные свидетельствуют в пользу применения именно комплексных препаратов, а не отдельных их частей, в случае возникновения предтромботических состояний в организме. Комплексные препараты проявляют в организме сочетанное антикоагулянтное, ферментативное фибринолитическое и фибриндеполимеризационное действие, благодаря чему они относятся к антикоагулянтно-фибринолитическим средствам. Препарат 2 в отличие от препарата 1, оказывает, хотя и незначительное, антитромбоцитарное действие, что может служить экспериментальным обоснованием совместного применения гепариноида из пиона и аргинина в низких дозах для эффективного предупреждения тромботических осложнений при развитии гиперкоагуляции в организме.

Список литературы

1. Баркаган З.С., Костюченко Г.И. Метаболически-воспалительная концепция атеротромбоза и новые подходы к терапии больных / З.С. Баркаган // Бюллетень СО РАМН. – 2006. – № 2 (120). – С. 132–138.
2. Ляпина Л.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы кров / Л.А. Ляпина, М.Е. Григорьева, Т.Ю. Оберган, Т.А. Шубина. – М.: АдванседСолюшнз, 2012. – 160 с.

3. Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С. О механизме антикоагулянтного действия экстракта из корней пиона молочноцветкового /Л.А. Ляпина [и др.] // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 11-6. – С.1091-1093.
4. Aster R.H. Heparin-induced immune thrombocytopenia – a clinical or laboratory diagnosis // *Thrombosis and haemostasis*, 2006, vol. 4, no. 4, pp. 757-758.
5. Brunini T.M.C., Mendes-Ribeiro A.C., Ellory J.C., Mann G.E. Platelet nitric oxide synthesis in uremia and malnutrition: A role for L-arginine supplementation in vascular protection // *Cardiovasc. Research*, 2007, vol. 73, no. 2, pp. 359-367.
6. Fujita S., Rasmussen B.B., Cadenas J.G., Grady J.J., Volpi E. Effect of insulin on human skeletal muscle protein synthesis is modulated by insulin-induced changes in muscle blood flow and amino acid availability // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2006, vol. 291, pp. E745-E754.
7. Imberty A., Lortat-Jacob H., Perrez S. Structural view of glucosaminoglycan-protein interactions // *Carbohydrate Res.*, 2007, vol. 342, pp.430-438.
8. Nakayama-Hamada M., Suzuki A., Furukawa H., Yamada R., Yamamoto K. Citrullinated fibrinogen inhibits thrombin-catalysed fibrin polymerization // *J. of Biochem.*, 2008, vol. 144, no. 3, pp. 393-398.
9. Napoli C., Stanley W.C., Ignarro L.J. Nutrition and cardiovascular disease: Putting a pathogenetic framework into focus // *Cardiovasc. Res.*, 2007, vol. 73, no. 2, pp. 253-256.
10. Sandercock P.A., Leong T.S. Low-molecular-weight heparins or heparinoids versus standard unfractionated heparin for acute ischaemic stroke // *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2017, Apr. 4: 4: CD00119.
11. Stief T.W. Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine // *Clin. and Appl. Thromb. and Hemost.*, 2007, vol.13, no. 2, pp. 146-153.
12. Whiteley W.N., Adams H.P., Bath P.M., Berge E., Sandse P.M., Dennis M., Murray G.D., Wong K.S., Sandercock P.A. Targeted use heparin, heparinoids, or low-molecular-weight heparin to improve outcome after acute ischaemic stroke: an individual patient data meta-analysis of randomised controlled trials // *Lancet Neurol.*, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 539-545.
13. Xiao C., Lian W., Zhou L., Gao N., Xu L., Chen J., Wu N., Peng W., Zhao J. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors // *Thromb. Res.*, 2016, vol. 146, pp. 59-68.