

УДК 612.115.3:612.115.064

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АНТИКОАГУЛЯНТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ГЕПАРИНА С АМИНОКИСЛОТАМИ – АЛАНИНОМ, ВАЛИНОМ И ГЛИЦИНОМ

Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Григорьева М.Е., Майстренко Е.С., Калугина М.Д.

Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: lyapinal@mail.ru

Установлено образование комплексных соединений отдельных алифатических аминокислот – аланина, валина и глицина с высокомолекулярным гепарином. Методом перекрестного электрофореза доказано существование образования комплексов перечисленных аминокислот с гепарином. Разработан способ получения соединений гепарина с аминокислотами при эквимольных соотношениях компонентов. Полученные нами комплексы высокомолекулярного гепарина обладали антикоагулянтной активностью и способностью снижать полимеризацию фибрина в условиях *in vitro*. При добавлении к плазме крови крыс *in situ* каждого из комплексов гепарин-аланин, гепарин-валин и гепарин-глицин в разных концентрациях установлено повышение антикоагулянтных свойств, фибринолитической активности неферментативной природы в крови животных. Делается вывод о перспективности изучения комплексов гепарина с аминокислотами в качестве препаратов, предупреждающих процессы образования тромбов в организме.

Ключевые слова: соединения аланин-гепарин, валин-гепарин, глицин-гепарин, антикоагулянтная активность, фибриндеполимеризационные свойства, фибринолиз

COMPARATIVE STUDY OF ANTICOAGULANT HEPARIN COMPOUNDS WITH AMINO ACIDS – ALANINE, VALINE AND GLYCINE

Lyapina L.A., Obergan T.Y., Grigorieva M.E., Maistrenko E.S., Kalugina M.D.

Biological Faculty of Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: lyapinal@mail.ru

It was found the formation of complex compounds separate aliphatic amino acids – alanine, valine and glycine with high-molecular-weight heparin. Using a cross-electrophoresis method it has been proved the existence of complex formation these amino acids with heparin. It was developed the method for obtaining compounds of heparin with amino acids at an equimolar ratio. Created complexes of high-molecular – weight heparin with amino acids possess anticoagulant activity and the ability to reduce the fibrin polymerization *in vitro*. When added to rats blood plasma *in situ* of each of the complexes heparin-alanine, heparin-valine and heparin-glycine in different concentrations was found the increase of anticoagulant properties, fibrinolytic activity nonenzymatic nature in the blood of animals. The conclusion about the perspective study of heparin complexes with amino acids as drugs that prevent the formation of blood clots in the body is done.

Keywords: alanine compound is heparin, the valine-heparin, glycine-heparin, anticoagulant activity, fibrinolytic properties, fibrinolysis

Моноаминомонокарбоновые аминокислоты – аланин, валин, глицин по структурным особенностям относятся к алифатическим [7]. Эти аминокислоты являются важными источниками энергии для головного мозга, центральной нервной системы и участвуют в поддержании тонуса мышц. Аланин, кроме того, регулирует уровень сахара в крови, участвует в синтезе антител, стимулируя иммунитет. При поступлении в организм в достаточной концентрации аланин повышает количество карнозина, который нормализует кислотно-щелочное равновесие в тканях мышц, усиливает антиоксидантные защитные функции организма, расширяет кровеносные сосуды, освобождая в эндотелии NO [9], купирует сосудистый пароксизм. Показано, что энергия связывания рецептором бета-аланина превышает энергию связывания глицина, что соответствует пролонгированному по срав-

нению с глицином воздействию препаратов бета-аланина на глициновые рецепторы и более длительной способности оказывать нормализующее действие на терморегуляцию и вазомоторику [6]. Значительное количество аминокислот, в том числе глицина, содержится в клетках сердечной мышцы и способствует нормальной работоспособности сердца и снижению уровня триглицеридов, а также повышает шансы на выживание после инфаркта миокарда [5]. Такая незаменимая аминокислота, как валин, вызывает расширение кровеносных сосудов, облегчая симптоматику стенокардии, является одним из главных компонентов роста и синтеза тканей тела. Он необходим для метаболизма мышц в качестве источника энергии и восстановления поврежденных тканей. Валин улучшает работу печени, снижает уровень сахара и повышенное содержание холестерина в крови [7].

Природный антикоагулянт крови гепарин, представляющий собой гликозаминогликан с кислыми сульфо- и карбоксильными группировками, нормализует уровень холестерина и сахара в крови и увеличивает скорость заживления ран в организме [1]. Он проявляет антикоагулянтную активность вследствие блокады свертывающей активности тромбина и других коагуляционных белков [10].

Экспериментальные данные, подтвержденные затем в клинических условиях, свидетельствуют об усилении противосвертывающих и антидиабетогенных свойств комплексных соединений гепарина с некоторыми аминокислотами и пептидами [3, 4].

Цель исследования заключалась в создании комплексных соединений алифатических аминокислот (аланин, глицин, валин) с гепарином и сравнительном изучении их влияния на полимеризацию фибрина и антикоагулянтную активность плазмы крови крыс в условиях *in vitro* и *in situ*.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использовали высокомолекулярный гепарин фирмы «Sevva» (США), препараты аминокислот – аланин, валин и глицин производства «Reanal» (Венгрия).

Разработанным нами методом получали комплексные соединения аланина с гепарином (АГ), глицина с гепарином (ГГ) и валина с гепарином (ВГ) при эквимолярном соотношении составных частей. Комплексообразование контролировали методом перекрестного электрофореза [4].

В условиях *in vitro* проводили определение собственной неферментативной фибринолитической (фибриндеполимеризационной) активности [3] комплексных соединений АГ, ГГ и ВГ в пределах концентраций от 10^{-6} до 10^{-1} М без добавления плазмы крови на пластинах нестабилизированного фибрина как в отсутствие, так и присутствии блокаторов ферментативного фибринолиза (Σ -аминокапроновой кислоты, антиплазмина, ингибитора трипсина и соевых бобов) [2]. Проведены эксперименты *in situ*, заключающиеся в том, что к нормальной плазме крови здоровых половозрелых крыс (вес 180–200 г, самцы) добавляли различные концентрации комплексных препаратов (от 10^{-6} до 10^{-1} М) и их составных частей (аланина, глицина, валина и гепарина) в количествах, эквивалентных их содержанию в комплексах. Добавление препаратов к плазме крови производили в следующей пропорции – к 0,2 мл плазмы приливали 0,05 мл препаратов, перемешивали и инкубировали при 37°C в течение 12–15 мин. После этого проводили определение антикоагулянтных (по тесту активированного частичного тромбопластинового времени – АЧТВ и тромбинового времени – ТВ) на анализаторе гемостаза Астра (Россия) и фибринолитических (по тесту фибриндеполимеризационной активности) свойств плазмы крови крыс [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Прежде всего, методом перекрестного электрофореза было доказано образование комплексных соединений гепарина с алани-

ном, глицином и валином при физиологическом pH (7,2–7,4). Об этом свидетельствовало исчезновение окраски на кислые группы гепарина в месте пересечения двух растворов – гепарина и аминокислоты, нанесенных перпендикулярно друг к другу, при их передвижении в электрическом поле. Обнаружено участие аминокислот каждой из аминокислот (окраска 0,05%-ным раствором нингидрина) во взаимодействии с кислыми карбоксильными или сульфатными группами гепарина (окраска 0/033%-ным раствором Азура А).

В экспериментах *in situ*, после инкубации АГ, ГГ и ВГ с плазмой крови здоровых животных, выявлена антикоагулянтная активность комплексных препаратов (по тесту АЧТВ) при их концентрации в плазменной среде от 10^{-3} до 10^{-1} М, так как они удлиняли время образования сгустка в 1,5–4,0 раза по сравнению с контролем (образец с 0,85%-ным раствором NaCl). Дополнительно к этому ВГ в концентрации 10^{-4} М также проявлял антикоагулянтную активность, превышающую контрольный уровень в 2,2 раза. Из составных частей исследуемых комплексов только гепарин в концентрациях 10^{-1} и 10^{-2} М обнаруживал антикоагулянтную активность (АЧТВ удлинялось в 1,5–2,0 раза), в то время как аминокислоты не проявляли такого действия. По тесту тромбинового времени (ТВ) все комплексные соединения обладали способностью проявлять антикоагулянтное действие путем ингибирования активности тромбина в диапазоне концентраций от 10^{-4} до 10^{-1} М, удлиняя время образования фибринового сгустка в 1,3–2,6 раза. В этих условиях комплекс ВГ более значительно, чем АГ и ГГ, удлинял время образования фибринового сгустка (в 2,2–2,6 раза). Из составных частей комплексных соединений только гепарин проявлял ингибирующий эффект в отношении фермента тромбина, удлиняя ТВ в 1,5–1,9 раза при его концентрациях в системе 10^{-1} и 10^{-2} М, а у аминокислот антитромбинового действия не установлено. При изучении способности комплексов влиять на полимеризацию фибрина в присутствии плазмы крови здоровых животных было показано, что все они повышали фибриндеполимеризационную активность (разновидность фибринолиза) в пределах концентраций от 10^{-1} до 10^{-3} М в 2,1–4,5 раза по сравнению с контролем (0,85%-ный раствор NaCl), причем как в отсутствие, так и в присутствии блокаторов ферментативного фибринолиза. По степени выраженности фибриндеполимеризационного эффекта максимальным действием обладал препарат ВГ, а минимальным – ГГ (табл. 1).

Таблица 1

Антикоагулянтная (по тестам АЧТВ, ТВ) и фибриндеполимеризационная активности комплексных соединений гепарина с аланином, глицином, валином и их составных частей в эквивалентных концентрациях в плазменной среде в условиях *in situ* ($M \pm m$)

Концентрации (мг/мл)	Комплексные соединения			Аминокислоты			Гепарин	NaCl 0.85 %
	Аланин-гепарин	Глицин-гепарин	Валин-гепарин	Аланин	Глицин	Валин		
АЧТВ (с)								
10 ⁻¹	115,3 ± 3,5**	102,3 ± 3,1**	158,2 ± 4,5**	42,3 ± 1,5	41,0 ± 2,7	43,8 ± 2,4	79,5 ± 2,9**	38,3 ± 1,7
10 ⁻²	100,0 ± 3,0**	92,4 ± 5,2**	150,2 ± 6,5**	43,8 ± 3,4	41,8 ± 2,7	43,0 ± 1,0	66,9 ± 1,5*	43,8 ± 0,7
10 ⁻³	78,8 ± 0,6**	64,4 ± 4,5**	123,2 ± 4,5**	45 ± 0,8	40,5 ± 1,8	42,0 ± 1,2	45,2 ± 0,3	43,8 ± 1,2
10 ⁻⁴	49,2 ± 4,7	39,8 ± 2,0	87,1 ± 5,3**	39,9 ± 0,7	39,0 ± 1,0	39,5 ± 1,0	39,0 ± 1,1	39,5 ± 0,9
10 ⁻⁵	37,3 ± 0,2	33,0 ± 1,0	42,1 ± 6,3	37,7 ± 0,2	35,5 ± 1,8	33,9 ± 0,9	39,7 ± 2,4	33,3 ± 0,8
10 ⁻⁶	37,0 ± 0,3	33,3 ± 0,8	38,1 ± 4,3	37,1 ± 0,9	34,3 ± 1,0	34,1 ± 0,9	35,5 ± 4,2	35,3 ± 0,8
ТВ (с)								
10 ⁻¹	44,0 ± 0,9**	43,3 ± 2,3**	58,3 ± 5,5**	25,3 ± 0,7*	22,2 ± 0,9	25,0 ± 0,9	43,8 ± 4,5**	22 ± 0,9
10 ⁻²	41,2 ± 1,0**	38,1 ± 2,4**	56,4 ± 8,5**	24,5 ± 1,7	22,5 ± 1,5	25,5 ± 0,5	38,3 ± 0,3*	24,5 ± 1,2
10 ⁻³	40,0 ± 0,1**	39 ± 2,5**	50,0 ± 4,6**	23,0 ± 0,5	21,5 ± 0,5	24,1 ± 0,5	20,7 ± 0,4	20,7 ± 0,5
10 ⁻⁴	30,4 ± 0,4**	28 ± 4,5	31,2 ± 0,9**	27,1 ± 0,6	22,0 ± 0,3	23,7 ± 0,9	23,1 ± 0,9	22,2 ± 0,3
10 ⁻⁵	25,4 ± 1,5	22,4 ± 0,6	24 ± 3,7	20,2 ± 0,7	19,9 ± 0,5	21,8 ± 0,5	19,3 ± 0,4	19,8 ± 0,3
10 ⁻⁶	20,9 ± 1,8	19,5 ± 0,5	20,0 ± 0,5	24,1 ± 1,5	19,9 ± 1,0	20,8 ± 0,9	21,1 ± 0,7	19,8 ± 0,8
Фибриндеполимеризационная активность (мм ²)								
10 ⁻¹	70,1 ± 2,3**	68,0 ± 1,5**	76,7 ± 2,2**	20,0 ± 0,1	23,4 ± 1,1	22,0 ± 0,8	24,4 ± 0,1	24,2 ± 0,05
10 ⁻²	61,5 ± 0,4**	52,9 ± 1,5**	84,7 ± 1,4**	23,1 ± 0,7	20,0 ± 0,4	20,0 ± 0,6	20,5 ± 0,1	18,9 ± 0,1
10 ⁻³	51,5 ± 0,2**	41,0 ± 0,9**	82,0 ± 1,1**	23,0 ± 0,6	20,0 ± 0,4	20,0 ± 0,4	22,0 ± 0,2	19,0 ± 0,05
10 ⁻⁴	24,8 ± 1,7	26,4 ± 0,8*	22,0 ± 0,1	20,0 ± 0,5	20,0 ± 0,9	21,0 ± 0,9	25,1 ± 1,2	21,0 ± 0,4
10 ⁻⁵	20,0 ± 0,4	22,0 ± 0,0	21,0 ± 0,1	22,3 ± 0,4	21,0 ± 0,9	20,0 ± 0,8	23,0 ± 1,3	20,0 ± 0,7
10 ⁻⁶	22,0 ± 0,3	20,0 ± 0,6	20,0 ± 0,3	20,0 ± 0,50	20,0 ± 0,0	20,0 ± 0,90	24,1 ± 0,9	22,0 ± 0,8

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля с NaCl. Обозначения: **p < 0,01; *p < 0,05.

В других экспериментах выявляли собственную фибринолитическую (фибриндеполимеризационную) активность. Установлено, что в условиях *in vitro* сами комплексные соединения АГ, ГГ и ВГ (в отсутствие плазмы крови) проявляли фибриндеполимеризационный эффект в широком пределе концентраций от 10⁻⁴ до 10⁻¹ М, в то время как и аминокислоты,

и гепарин таким действием не обладали. Показано, что на пленках нестабилизированного фибрина (в отсутствие фактора XIIIa) даже в присутствии в среде ингибиторов ферментативного фибринолиза, например, Σ-аминокапроновой кислоты, зоны лизиса выявлялись только после действия комплексов, но не после воздействия их составных частей (табл. 2).

Таблица 2

Собственная фибриндеполимеризационная активность комплексных соединений гепарина с аланином, глицином, валином и их составных частей в эквивалентных концентрациях в условиях *in vitro* ($M \pm m$)

Концентрации, мг/мл	Комплексные соединения			Аминокислоты			Гепарин	NaCl 0,85 %
	Аланин-гепарин	Глицин-гепарин	Валин-гепарин	Аланин	Глицин	Валин		
10 ⁻¹	44,0 ± 1,8**	44,7 ± 2,0**	49,7 ± 2,5**	0 ± 0	0 ± 0	4 ± 0	4 ± 0,1	0 ± 0
10 ⁻²	40,7 ± 0,4**	40,7 ± 0,4**	42,9 ± 0,5**	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
10 ⁻³	42,5 ± 1,7**	40,0 ± 2,1**	40,9 ± 0,9**	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
10 ⁻⁴	8,5 ± 1,7	0,5 ± 0,1	16,4 ± 0,4**	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
10 ⁻⁵	0 ± 0	0 ± 0	4,0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
10 ⁻⁶	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля с NaCl. Обозначения: **p < 0,01; *p < 0,05.

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что из всех исследуемых комплексных препаратов наибольшие антикоагулянтный, антитромбиновый и фибриндеполимеризационный эффекты обнаружены у комплекса ВГ. Возможно, это обусловлено с одной стороны структурными особенностями комплексов, а с другой – действием самих аминокислот. Так, количество CH_3 -групп в молекулах аминокислот, вступающих в реакцию комплексообразования, разное: в глицине этих групп нет, в аланине – одна, а в валине – две.

Ранее было обнаружено усиление антикоагулянтной активности плазмы крови за счет действия таких комплексов, как аргинин-гепарин [3], глутаминовая кислота-гепарин [8], однако у исследованных нами комплексов этот же факт установлен впервые. Дополнительно впервые представлены результаты наличия у указанных комплексных соединений собственной фибриндеполимеризационной активности.

Следовательно, в условиях *in situ* соединения АГ и ВГ отличались от ГГ более значительным антикоагулянтным и фибриндеполимеризационным фибринолитическим эффектом. Кроме того, препараты комплексов гепарина с исследуемыми аминокислотами обладали собственной фибриндеполимеризационной активностью в условиях *in vitro*, причем в большей степени это наблюдалось при действии комплекса ВГ, имеющего две метильные группировки.

Заключение

В настоящей работе продемонстрировано, что гликозаминогликан гепарин, обладающий избытком кислых сульфогидроксильных групп, взаимодействует с алифатическими аминокислотами с образованием комплексных соединений. Эти комплексы образуются при участии кислых групп гепарина и аминогрупп аминокислот. Установлен значительный антикоагулянтно-фибринолитический эффект комплексных соединений аланин-гепарин,

валин-гепарин и глицин-гепарин по сравнению с их составными частями: при добавлении к нормальной плазме крови животных этих соединений обнаруживалась фибриндеполимеризационная активность, которая сохранялась даже при дополнительном добавлении к плазме крови ингибиторов ферментативного фибринолиза, а также антикоагулянтная активность, выявляемая по тестам АЧТВ и тромбинового времени. В перспективе комплексные соединения гепарина могут быть применены при нарушениях свертываемости крови, сопровождающимися процессами тромбообразования.

Список литературы

1. Кондашевская М.В. Морфофункциональные и психофизиологические эффекты высокомолекулярного гепарина (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – М., 2006. – 47 с.
2. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. – М.: Адвансед Солюшнз, 2012. – 160 с.
3. Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е. Противосвертывающие эффекты комплексного соединения аргинина с высокомолекулярным гепарином // Биол. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – Т.147. – № 3. – С. 300–303.
4. Оберган Т.Ю. Глипролины и их комплексные соединения с гепарином как физиологические модуляторы функции противосвертывающей системы организма: дис. ... канд. биол. наук. – М., 2004. – 225 с.
5. Рассел Д., Кон Р. Глицин. – М.: VSD, 2012. – 62 с.
6. Торшин И.Ю., Громова О.А., Лиманова О.А. «Быстрый эффект» клималанина (бета-аланина) при приливах: сравнительное исследование взаимодействий бета-аланина, таурина и глицина с глициновыми рецепторами // Гинекология. – 2012. – Т.14. – № 2. – С. 5–8
7. Хазова О.А. Аминокислоты. – М.: Предтеча, 2010. – 64 с.
8. Ульянов А.М., Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Смолина Т.Ю. Антидиабетогенные и противосвертывающие свойства соединений гепарина с глутаминовой кислотой // Изв. РАН. Сер. Биол. – 2004. – № 3. – С. 340–344.
9. Hill C.A., Harris R.C., Kim H.J., Harris B.D., Sale C., Boobis L.H., Kim C.K., Wise J.A. Influence of beta-alanine supplementation on skeletal muscle carnosine concentrations and high intensity cycling capacity // Amino Acids. – 2007. – Vol. 32. – № 2. – P. 225–233.
10. Stief T.W. Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine // Clin. Appl. Thromb. Hemost. – 2007. – Vol. 13. – № 2. – С. 146–153.