

УДК 612.115.3:612.115.064

**ДОЗАЗАВИСИМОСТЬ ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩИХ ЭФФЕКТОВ
КОМПЛЕКСА АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ГЕПАРИНОМ****Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Калугина М.Д.***Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,**e-mail: lyapinal@mail.ru*

Исследован комплексный препарат аспарагиновой кислоты с нефракционированным высокомолекулярным гепарином, полученный при эквимольных соотношениях компонентов, входящих в состав комплекса. Показано, что при внутривенном введении лабораторным животным (крысам) комплексного соединения аспарагиновой кислоты с гепарином в дозах 1 и 0,1 мг/кг массы тела через 10 мин в крови крыс достоверно повышались антикоагулянтные, фибриндеполимеризационные и фибринолитические активности, а также активность тканевого активатора плазминогена, причем более значительно при большей дозе. Из составных частей комплексов только гепарин при внутривенном введении животным доз, эквивалентных их содержанию в комплексных препаратах, проявлял в организме значительную антикоагулянтную активность. Таким образом, установлена дозозависимость противосвертывающих эффектов комплекса при его введении в кровотоки.

Ключевые слова: антикоагулянтная активность, кровь, комплекс аспарагиновая кислота – гепарин, фибринолиз

**THE DOSE-DEPENDENCE OF THE ANTICLOTTING EFFECTS OF THE ASPARTIC
ACID WITH HEPARIN COMPLEX COMPOUND****Lyapina L.A., Obergan T.Yu., Kalugina M.D.***Lomonosov Moscow State University, Moscow, e-mail: lyapinal@mail.ru*

Researched complex compound of aspartic acid with unfractionated (high molecular weight) heparin obtained with equimolar ratios of components. It is shown that when administered intravenously to laboratory animals (rats) complex compounds of aspartic acid with heparin at doses of 1 and 0,1 mg/kg of body weight after 10 min in the blood of rats was significantly increased anticoagulant, fibrindepolymerizing, fibrinolytic activities, and activity of tissue plasminogen activator more significantly at a higher dose. Of the components of the complexes only heparin when administered intravenously to animals doses equivalent to their content in the complex preparations showed significant the anticoagulant effects in blood plasma. Thus, was established the dose-dependence of the anticlotting effects of the complex when it was introduced into the bloodstream.

Keywords: anticoagulant activity, blood, complex of aspartic acid – heparin, fibrinolysis

Как известно, аспарагиновая (аминоянтарная) кислота присутствует в организме всех позвоночных и беспозвоночных и играет важную роль в процессе формирования других аминокислот, в том числе аргинина, метионина, лизина; обеспечивает транспорт минералов, необходимых для функционирования ДНК и РНК. Она является нейромедиатором, положительно влияет на процессы памяти, стимулирует обучение, увеличивает уровень циклической АМФ в нервных клетках [1, 2]. Эта аминокислота принимает участие в регуляции эндокринной системы [3, 4], выведении токсинов из организма, в обезвреживании аммиака, улучшает метаболизм углеводов [1]. Производные аспарагиновой кислоты благоприятно действуют на сердечную мышцу [5].

С другой стороны, природный гликозаминогликан гепарин также позитивно влияет на сердечную мышцу, снижает повышенный уровень холестерина, нормализует концентрацию глюкозы в крови. Высокомолекулярный гепарин действует в кровотоке как антикоагулянт благодаря своей способности

ингибировать ферментативную активность свертывающих белков крови [6], в том числе основного фермента свертывания – тромбина [7]. В физиологических условиях гепарин вследствие своих структурных особенностей в свободном виде практически не встречается, так как взаимодействует с лигандами (аминокислотами, пептидами, белками и различными биологически активными веществами) плазмы крови с образованием комплексных соединений. В комплексообразовании принимают участие карбоксильные и сульфатные группы гепарина и аминогруппы второго компонента. Экспериментально было показано, что введение животным комплексных соединений высокомолекулярного гепарина с аминокислотами (аргинином, глутаминовой кислотой, глицином, лизином) и регуляторными пептидами глипролинового ряда, содержащими эти аминокислоты, вызывало повышение антитромбоцитарных, антикоагулянтных, антифибринолитических свойств плазмы крови [8]. При этом комплексы гепарина с аргинином и глицином обладали

собственной фибринолитической активностью неферментативной природы, поскольку в условиях *in vitro* без добавления плазмы крови они растворяли нестабилизированные сгустки фибрина как в присутствии, так и в отсутствие ингибиторов ферментативного фибринолиза. Кроме того, при патологических состояниях организма, таких как сахарный диабет и стойкая гипергликемия, интраназальное многократное введение комплексных соединений гепарина с пептидом Arg-Pro-Gly-Pro приводило к восстановлению нарушенной функции системы гемостаза, а также к нормализации уровня глюкозы в крови животных [9]. Была разработана термодинамическая модель идентификации комплекса гепарина с аспарагиновой кислотой в водной среде в области pH плазмы по компьютерной программе AUTOEQUIL, установившая, что оптимальным соотношением компонентов является эквимолярная исходная концентрация мономерного звена гепарина и аспарагиновой кислоты [10]. До настоящего времени недостаточно изучена роль комплекса гепарина с аспарагиновой кислотой в организме.

В связи с этим **цель** настоящей работы заключалась в получении комплексного соединения аспарагиновой кислоты с гепарином и исследовании его антикоагулянтно-фибринолитического действия в организме в зависимости от применяемых доз.

Материалы и методы исследования

Для получения комплексного соединения гепарина с аспарагиновой кислотой применяли высокомолекулярный гепарин фирмы «Serva» (Германия) и аспарагиновую кислоту фирмы Реахим (Россия).

Комплекс аспарагиновой кислоты с гепарином (АГ) получали при эквимолярном соотношении составных частей [10]. Экспериментальное исследование проведено на 49 лабораторных белых крысах-самцах линии Wistar массой тела 180–200 г. Исследования на животных выполнены с соблюдением принципов, изложенных в «Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 15.06.2006).

Животные были разделены на 7 групп (по 7 крыс в каждой группе).

В 1-й группе подопытным животным вводили комплексный препарат аспарагиновой кислоты с гепарином в дозе 1 мг/кг массы тела; во 2-й группе – этот же комплексный препарат, но в дозе 0,1 мг/кг; в 3-й группе – гепарин в дозе 0,987 мг/кг, эквивалентной его содержанию в комплексе группы 1; в 4-й группе – гепарин в дозе 0,0987 мг/кг, эквивалентной его содержанию в комплексе группы 2; в 5-й группе – аспарагиновую кислоту в дозе 0,013 мг/кг, эквивалентной его содержанию в комплексе группы 1; в 6-й группе – аспарагиновую кислоту в дозе 0,0013 мг/кг, эквивалентной его содержанию в комплексе группы 2; в 7-й группе (контроль) вводили тот же объем, т.е. по 0,5 мл, 0,85%-го раствора NaCl (растворитель). Внутривенное введение препаратов в разных дозах

и забор крови осуществляли через яремную вену (*vena jugularis*). Кровь на анализ брали через 10 мин после введения комплекса и его составных частей с консервантом (3,8%-ный цитрат натрия в соотношении 9:1. Анализировали плазму, бедную тромбоцитами, для чего кровь центрифугировали при 2000 g в течение 10–12 мин. Определяли антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) на полуавтоматическом анализаторе свертывания крови АСКa-2-01 АСТРА (Россия) с использованием набора реагентов «АЧТВ-тест» («Технология-Стандарт», Россия) в соответствии с инструкцией к набору; суммарную (СФА) и неферментативную (НФ) фибринолитическую активность, соответствующую фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) – на пленках нестабилизированного фибрина, а также активность тканевого активатора плазминогена (ААП) – на пленках стабилизированного фибрина [11].

Все данные были обработаны статистически по непараметрическому критерию Вилкоксона (программа STATISTICA 6.0).

Результаты исследования и их обсуждение

Как показали проведенные исследования, у животных, которым производили инъекции комплексного соединения аспарагиновой кислоты – гепарин, увеличивался противосвертывающий потенциал плазмы крови. Так, через 10 мин после внутривенного введения крысам комплексного препарата в дозах 1 мг/кг и 0,1 мг/кг массы тела в обоих случаях в плазме крови выявлен повышенный фон антикоагулянтной активности: время образования сгустка по тесту АЧТВ составило $71,0 \pm 1,1$ с (доза 1 мг/кг) и $51,1 \pm 0,8$ с (доза 0,1 мг/кг), что достоверно превышало этот показатель в контрольной группе ($29,5 \pm 1,0$ с) в 2,4 и 1,7 раза соответственно (рис. 1). При этом введение составных частей – гепарина и аспарагиновой кислоты в дозах, эквивалентных их содержанию в комплексном препарате, приводило к достоверному удлинению АЧТВ только в случае применения гепарина: время свертывания в группах 3 и 4 составило $38,0 \pm 1,5$ с и $35,9 \pm 1,5$ с, что превышало, хотя и в меньшей степени, чем после применения комплекса, значения АЧТВ в контрольной группе в 1,3 и 1,21 раза соответственно. Введение аспарагиновой кислоты не вызывало изменения антикоагулянтной активности крови: АЧТВ в группе 5 составило $30,0 \pm 1,0$ с, в группе 6 – $30,1 \pm 1,1$ с и в обоих случаях различия по сравнению с контролем были недостоверны.

При изучении влияния исследуемых препаратов на фибринолитическую активность плазмы крови было установлено, что введение комплекса в дозе 0,1 мг/кг усиливало СФА в 1,2 раза ($39,5 \pm 0,5$ мм² против $32,6 \pm 1,0$ мм² в контроле), НФ в 2,5 раза

($26,5 \pm 0,8 \text{ мм}^2$ против $10,5 \pm 1,8 \text{ мм}^2$ в контроле) и ААП в 1,9 раза ($19,9 \pm 2,0$ против $10,3 \pm 1,4 \text{ мм}^2$ в контроле) (рис. 2). Увеличение дозы комплексного соединения до 1 мг/кг приводило к еще большему повышению фибринолитической активности плазмы крови: СФА составила $57,7 \pm 1,0 \text{ мм}^2$, НФ – $34,1 \pm 1,1 \text{ мм}^2$, ААП – $20,1 \pm 1,6 \text{ мм}^2$, т.е. наблюдалось возрастание исследуемых показателей соответственно в 1,8, 3,2 и 2 раза по

сравнению с контролем. Применение эквивалентных по отношению к комплексам доз гепарина вызывало достоверное изменение только ААП в 1,5 (группа 3) и 1,4 раза (группа 4) относительно контрольных значений, что составило соответственно $15,1 \pm 1,1 \text{ мм}^2$ и $14,3 \pm 1,0 \text{ мм}^2$. Введение крысам эквивалентных доз аспарагиновой кислоты (группы 5 и 6) не приводило к достоверному изменению СФА, НФ и ААП.

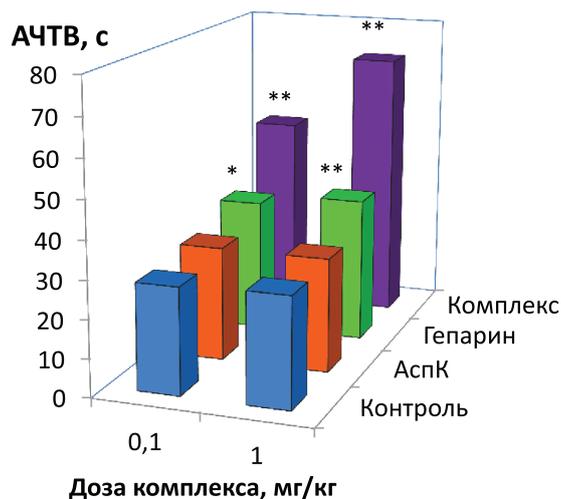


Рис. 1. Антикоагулянтная активность (по тесту АЧТВ) в плазме крови крыс через 10 мин после внутривенного введения комплексных препаратов аспарагиновой кислоты с гепарином в дозах 0,1 мг/кг и 1 мг/кг и их составных частей в эквивалентных дозах. Комплекс – введение комплексного соединения «аспарагиновая кислота – гепарин», Гепарин – введение гепарина, АспК – введение аспарагиновой кислоты, Контроль – введение 0,85% раствора NaCl.

Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,1$

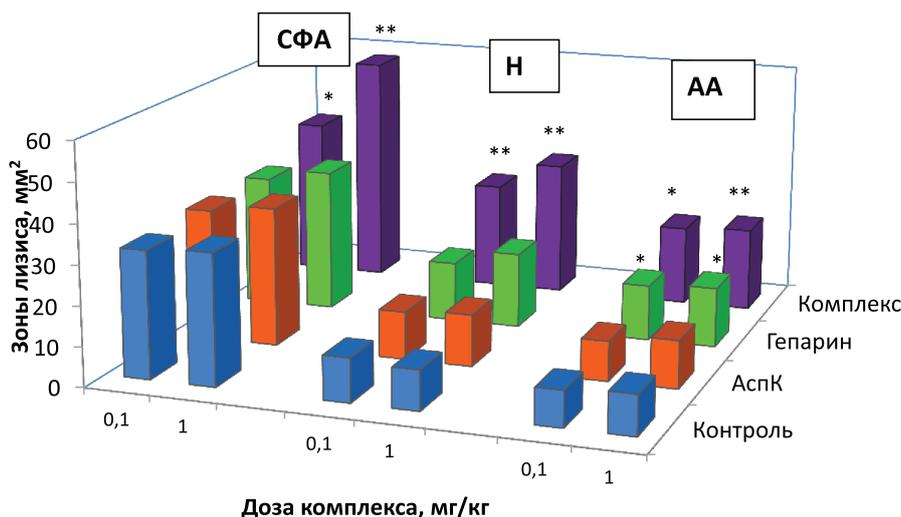


Рис. 2. Фибринолитическая активность плазмы крови крыс через 10 мин после внутривенного введения комплексных препаратов аспарагиновой кислоты с гепарином в дозах 1 мг/кг и 0,1 мг/кг и их составных частей в эквивалентных дозах. СФА – суммарная фибринолитическая активность, НФ – неферментативный фибринолиз, ААП – активность тканевого активатора плазминогена; Комплекс – введение комплексного соединения «аспарагиновая кислота – гепарин», Гепарин – введение гепарина, АспК – введение аспарагиновой кислоты, Контроль – введение 0,85% раствора NaCl. Примечание. * – $p < 0,01$; ** – $p < 0,1$

Итак, нами показано, что комплексное соединение аспарагиновая кислота – гепарин при его однократном внутривенном введении животным в двух разных дозах 1 и 0,1 мг/кг массы тела крыс способствовало усилению антикоагулянтно-фибринолитического потенциала плазмы крови животных пропорционально дозе вводимых препаратов. Комплексный препарат в дозе 1 мг/кг оказывал более значительный антикоагулянтный, суммарный и неферментативный фибринолитический эффект в кровотоке, чем при дозе 0,1 мг/кг. Введение комплекса в двух разных дозах (0,1 мг/кг и 1 мг/кг) способствовало экспрессии из эндотелия в кровоток тканевого активатора плазминогена практически в равной степени, что приводило к активации ферментативного фибринолиза. При этом введение комплекса увеличивало фибриндеполимеризационные или неферментативные фибринолитические эффекты в плазме крови, поскольку ранее у данного комплекса обнаружена собственная фибринолитическая активность в условиях *in vitro* [10]. На основании полученных в настоящей работе данных можно говорить о возможных механизмах фибринолитического действия исследуемого комплекса, заключающихся в том, что в ответ на появление комплекса в кровотоке из эндотелия сосудов экспрессируется повышенный уровень активатора плазминогена, который способствует возникновению дополнительных количеств фибринолитического фермента плазмина, повышая тем самым ферментативный фибринолиз. Таким образом, реализация действия комплекса осуществлялась путем усиления суммарного фибринолиза как за счет возрастания ферментативного, так и неферментативного процесса. Также установлены значительные эффекты комплексного соединения гепарина по сравнению с его составными частями – аспарагиновой кислотой и гепарином в отношении повышения антикоагулянтной активности по данным АЧТВ. Это, возможно, обусловлено тем, что, во-первых, большая доза комплекса влияет в более выраженной степени на увеличение времени образования сгустка в плазме крови, во-вторых, нами доказан ингибирующий эффект комплекса на факторы внутреннего пути свертывания и на активность тромбина, что согласуется с результатами, полученными при исследовании других комплексных соединений гепарина [8]. Как было показано в предыдущих работах [8, 9], гепарин в малых дозах не оказывает заметного влияния на систему гемостаза, в то время как в комплексах с аминокислотами, белками и пептидами

проявляется не только антикоагулянтный, но и широкий спектр других противосвертывающих эффектов. Так, в плазменном гемостазе исследуемый комплекс замедляет процессы фибринообразования через торможение полимеризации фибрина, оказывает антифибринстабилизирующее действие, усиливает активность активаторов плазминогена, тем самым повышая фибринолитический фон крови, в сосудисто-тромбоцитарном – снижает агрегацию тромбоцитов вследствие взаимодействия с их рецепторами. Следует отметить, что в условиях наших экспериментов составная часть комплекса – аспарагиновая кислота в двух разных дозах не оказывала влияния на параметры системы гемостаза, тогда как эффекты гепарина имели место, но были значительно слабее, чем в случае применения комплекса.

Заключение

В работе представлены экспериментальные доказательства, что комплексное соединение аспарагиновая кислота – гепарин при его внутривенном введении животным проявляет широкий спектр противосвертывающих эффектов (антикоагулянтную, суммарную фибринолитическую, фибриндеполимеризационную или неферментативную фибринолитическую активности, а также активность тканевого активатора плазминогена), которые зависят от дозы вводимого препарата. При дозе комплекса 0,1 мг/кг установлены умеренные антикоагулянтная, суммарная и неферментативная фибринолитическая активность, в то время как активность тканевого активатора плазминогена сравнима с той же активностью при большей дозе (1 мг/кг). Комплексный препарат аспарагиновой кислоты с гепарином в дозе 1 мг/кг массы тела животных проявлял в организме максимальное ферментативное в отношении увеличения активности тканевого активатора плазминогена и неферментативное (или фибриндеполимеризационное) фибринолитическое действие, одновременно повышая антикоагулянтный потенциал плазмы крови. Из составных частей комплекса только гепарин усиливал антикоагулянтную активность и активность тканевого активатора плазминогена в кровотоке. Следовательно, можно заключить на основании полученных нами данных, что комплекс аспарагиновая кислота – гепарин относится к антикоагулянтно-фибринолитическому средству, которое возможно применять в случае возникновения в кровотоке тромботических осложнений с целью защиты организма от повышенного свертывания крови.

Список литературы

1. Хазова О.А. Аминокислоты / О.А. Хазова. – М.: Предтеча, 2010. – 64 с.
2. Man E.H., Fisher G.H., Payan I.L., Cadilla-Perezrios R., Garcia N.M., Chemburkar R., Arends G., Frey W.H. D-aspartate in human brain // *J. Neurochem.* – 1987. – Vol. 48, № 2. – P. 510–515.
3. Afraei S., D’Aniello A., Sedaghat R., Ekhtiari P., Azizi G., Tabrizian N., Magliozzi L., Aghazadeh Z., Mirshafiey A. Therapeutic effect of D-aspartate on a mouse model of multiple sclerosis // *J. Food Drug Anal.* – 2017. Vol. 25, № 3. – P. 699–708.
4. D’Aniello A., Di Fiore M.M., Fisher G.H., Milone A., Seleni A., D’Aniello S., Perna A.F., Ingrosso D. Occurrence of D-aspartic acid and N-methyl-D-aspartic acid in rat neuroendocrine tissues and their role in the modulation of luteinizing hormone and growth hormone release // *FASEB J.* – 2000. – Vol. 14, № 5. – P.699–714.
5. Whiteley W.N., Adams H.P., Bath P.M., Berge E., Sandsele P.M., Dnnis 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, № 6. – P. 539–545.
6. Кондашевская М.В. Гепарин – новая парадигма эффектов действия. – М.: Студия МДВ, 2011. – 276 с.
7. Stief T.W. Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* – 2007. – Vol. 13, № 2. – P. 146–153.
8. Ляпина Л.А. Регуляторная роль соединений гепарина с низкомолекулярными лигандами крови в плазменном и тромбоцитарном гемостазе / Л.А. Ляпина, Т.Ю. Оберган, В.Е. Пасторова // *Известия РАН. Сер. биологическая.* – 2011. – № 2. – С. 208–219.
9. Комплекс гепарина с пептидом Arg-Pro-Gly-Pro его антикоагулянтно-фибринолитические и гипогликемические эффекты / Л.А. Ляпина [и др.] // *Известия РАН. Сер.биологическая.* – 2012. – № 1. – С. 72–77.
10. Nikolaeva L.S., Lyapina L.A., Palyulin V.A., Obergan T. Yu, Semenov A.N., Karlov D.S., Bragin P.E. The Elaboration of High-Molecular-Weight Heparin Complex with Aspartic Acid and the Study of Its Activity // *Advances in medicine and biology.* – Inc United States.: Nova Science Publishers, 2014. – P. 123–152.
11. Ляпина Л.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови / Л.А. Ляпина Л.А., М.Е. Григорьева, Т.Ю. Оберган, Т.А. Шубина. – М.: ООО «Адвансед Солюшнз», 2012. – 160 с.