

## ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

### ВЛИЯНИЕ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНОГО ГЕПАРИНА, ПОЛУЧЕННОГО С ПОМОЩЬЮ ХИТИНОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА, НА АНТИКОАГУЛЯНТНУЮ АКТИВНОСТЬ ПЛАЗМЫ КРОЛИКОВ И КРЫС

Н. Н. Дрозд<sup>1</sup>, А. С. Толстенков<sup>1</sup>, В. А. Макаров<sup>1</sup>, Н. Т. Мифтахова<sup>1</sup>,  
Г. Е. Банникова<sup>2</sup>, П. П. Суханова<sup>3</sup>, В. П. Варламов<sup>2</sup>, Г. Е. Вихорева<sup>3</sup>

Исследовали антикоагулянтную активность низкомолекулярного гепарина со средней молекулярной массой 4,7 кД (НМГ-4,7). Образец НМГ-4,7 получали с помощью гидролиза хитинолитическим комплексом из *Streptomyces kurssanovii* нефракционированного гепарина из мукозы кишечника свиней. Специфическая ингибиторная активность НМГ-4,7 по отношению к тромбину (фактор IIa) и фактору свертывания крови Ха составила  $72 \pm 9$  ЕД/мг (aIIa активность) и  $200 \pm 33$  ЕД/мг (aХа активность) соответственно. Внутривенное или подкожное введение НМГ-4,7 кроликам вызывало дозозависимое изменение aIIa и aХа активности плазмы. На 5-й минуте после внутривенного введения 0,3 мг/кг или 3 мг/кг отношение активности aХа/aIIa в плазме составило 2,7 и 3,8 соответственно. При подкожном введении кроликам наблюдали медленную элиминацию антикоагулянта — до 24 ч. НМГ-4,7 (внутривенно) дозозависимо ингибировал образование тромба при экспериментальном моделировании венозного тромбоза у крыс. Полное ингибирование образования тромба наблюдали при введении НМГ-4,7 в дозе 3 мг/кг. Таким образом, показана возможность получения с помощью хитиназ низкомолекулярного гепарина с необходимой антитромботической активностью.

**Ключевые слова:** низкомолекулярный гепарин, анти-Ха активность, анти-IIa активность, антитромботическая активность

### ВВЕДЕНИЕ

Разработка фармакологических средств для профилактики и лечения артериальных и венозных тромбозов является одной из важных проблем медицины [11].

Высоко сульфатированный комплекс отрицательно заряженных полисахаридов, выделяемых из тканей млекопитающих, нефракционированный гепарин (НФГ), является антикоагулянтным и антитромботическим средством, используемым более 60 лет. Активируя плазменный ингибитор сериновых протеиназ свертывающей системы крови антитромбин (АТ), гепарин связывается с АТ специфической пентасахаридной последовательностью (H<sub>5</sub>) [12]. Известны два механизма ингибирования активированным антитромбином фактора Ха и тромбина (фактор IIa). В ускорении ингибирования тромбина преобладающим является “шаблонный” механизм. В качестве “шаблона”, соединяющего

ингибитор и фермент, выступает гепарин. В то же время активированный АТ непосредственно ингибирует фактор Ха [5].

Однако гетерогенный НФГ со средним распределением молекулярных масс 13 – 15 кД способен неспецифически связываться с макрофагами, эндотелиальными клетками, плазменными белками, следовательно, имеет сложную фармакокинетику и относительно непредсказуемый антикоагулянтный эффект. НФГ действует быстро и требует частых повторных введений [8].

В клинических испытаниях оцениваются современные антикоагулянты: ингибиторы пути “тканевой фактор/ фактор VIIa”; ингибиторы фактора Ха, прямые и непрямые; активированный протеин С и растворимый тромбомодулин; прямые ингибиторы тромбина [6]. Низкомолекулярные гепарины (НМГ) принадлежат к числу непрямых ингибиторов фактора Ха. Коммерческие НМГ имеют среднюю молекулярную массу (ММ) 3,5 – 6 кДа, отношение специфических активностей aХа/aIIa составляет 1,5 – 4 [9] и используются при многих тромботических заболеваниях и осложнениях [10]. НМГ имеют более стабильные фармакокинетические параметры, чем НФГ, которые обеспечивают некоторые преимущества, такие как самостоятельное подкожное введение пациентом один или два раза в

<sup>1</sup> Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза (руководитель — проф. В. А. Макаров) Гематологического научного центра РАМН, Москва, 125167, Новый Зыковский проезд, 4а.

<sup>2</sup> Лаборатория инженерии ферментов (руководитель — проф. В. П. Варламов) Центра “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312, проспект 60-летия Октября, дом 7, корп. 1.

<sup>3</sup> Кафедра технологии химических волокон (руководитель — проф. Л. С. Гальбрайт) Московского текстильного университета им. А. Н. Косыгина, Москва, 119991, Малая Калужская, 1.

день и отсутствие или снижение лабораторного мониторинга при профилактике [9]. Основное преимущество НМГ перед НФГ — меньшая полидисперсность молекул, способность в меньшей степени взаимодействовать с плазменными белками и клетками крови, что приводит к увеличению периода полуэлиминации, высокой биоприменимости, снижению риска тромбоцитопении или остеопороза.

Целью настоящей работы является исследование антикоагулянтной активности (АК) образца низкомолекулярного гепарина со средней ММ 4,7 кДа (НМГ-4,7) в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Определяли способность НМГ-4,7 ингибировать тромбин (фактор IIa) и фактор Ха, фармакодинамические параметры НМГ-4,7 при внутривенном и подкожном введении кроликам, антитромботическую активность НМГ-4,7 на модели венозного стаза у крыс.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Образец НМГ-4,7 получали с помощью контролируемого расщепления НФГ мукозы свиней (D0110001 Changzhou Quianhong Bio-Pharm Co. Ltd, КНР) смесью хитинолитического ферментного комплекса из *Streptomyces kurssanovii* [2]. Молекулярную массу гепаринов определяли вискозиметрически [13].

*Ингибирование фактора Ха (анти-Ха активность) и тромбина (анти-IIa активность)*

Определение аХа активности основано на способности антитромбина в присутствии гепарина ингибировать фактор Ха. Остаток фактора Ха гидролизует хромогенный субстрат (S-2222). Изменение оптической плотности за минуту ( $\Delta A/\text{мин}$ ) фиксировали при длине волны 405 нм на спектрофотометре. Количество появляющегося хромофора обратно пропорционально концентрации гепарина в пробе [11]. Концентрацию НМГ-4,7 рассчитывали, сравнивая с линейным участком калибровочной кривой по первому международному стандарту для НМГ (NIBSC). Результаты выражали в аХа ЕД/мг.

Подобным образом определяли аIIa активность, но с использованием хромогенного субстрата S-2238 и 5-го международного стандарта для НФГ (NIBSC). Результаты выражали в аIIa ЕД/мг [4].

Использовали следующие реактивы: тромбин человека, бычий фактор Ха и антитромбин человека (Dade Behring, Heparin Accucolor™ (CRS 106)), Berichrom Heparin (OWLD 11), хромогенные субстраты 2238 (Unichrom Unttest ATIII) and 2222 (Behring).

*Анти-фактор Ха и анти-фактор IIa активность плазмы животных*

Беспородным кроликам обоего пола (2,9 – 3,5 кг; Столбовая, Россия) внутривенно и подкожно вводили НМГ-4,7. Для каждой дозы использовали 10 кроликов. До и в различные интервалы после введения отбирали кровь из надреза на краевой вене уха. В пластиковую пробирку с 3,8 % раствором цитрата натрия добавляли

кровь в объемном соотношении 1/9. Пробы крови центрифугировали (1800 г, 20 мин) и полученную бедную тромбоцитами плазму хранили при  $-20^\circ\text{C}$ . Анти-фактор Ха и анти-фактор IIa активности плазмы определяли как было описано выше.

При препарировании яремных вен крысам самцам Вистар (250 – 350 г) внутрибрюшинно вводили этаминал-натрий (60 мг/кг). Для каждой дозы использовали 15 – 20 крыс. Физиологический раствор или раствор НМГ-4,7 вводили в правую яремную вену. Кровь отбирали в различные интервалы времени после введения.

*Модель венозного тромбоза у крыс*

Формирование тромба комбинацией стаза и гипервертывания крови индуцировали по методике [14]. Для анестезии крысам самцам Вистар (250 – 350 г) внутрибрюшинно вводили этаминал-натрий (60 мг/кг). С обеих сторон выделяли яремные вены. Для каждой дозы использовали 15 – 20 крыс. Физиологический раствор или НМГ-4,7 вводили в правую яремную вену. Через 15 мин в правую яремную вену вводили 0,75 мл/кг предварительно прогретой в стеклянной пробирке при  $37^\circ\text{C}$  сыворотки человека. Через 10 с перевязывали 0,7 см участок левой яремной вены, осуществляя таким образом стаз. Через 10 мин перевязанный участок вены вырезали и содержимое помещали в чашку Петри с физиологическим раствором. Сформировавшиеся тромбы оценивали в баллах от 0 до 4 по шкале Wessler. Взвешивали влажные тромбы на аналитических весах и определяли концентрацию белка в гомогенате тромба. Содержание белка в пробе определяли по калибровочной кривой фибриногена (Behring, Германия) в диапазоне концентраций 10 – 400 мкг/мл.

Результаты представлены как среднее арифметическое  $\pm$  стандартная ошибка средней арифметической. Статистический анализ данных проводили с использованием пакета программ Statgraphics Plus для Windows [3]. Сравнение данных по группам проводили с использованием *t*-теста Стьюдента.

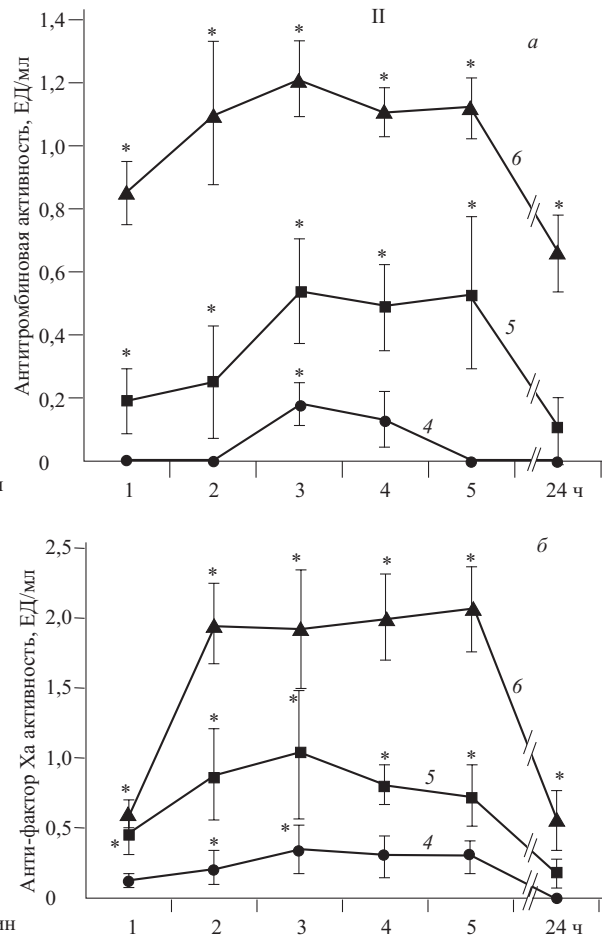
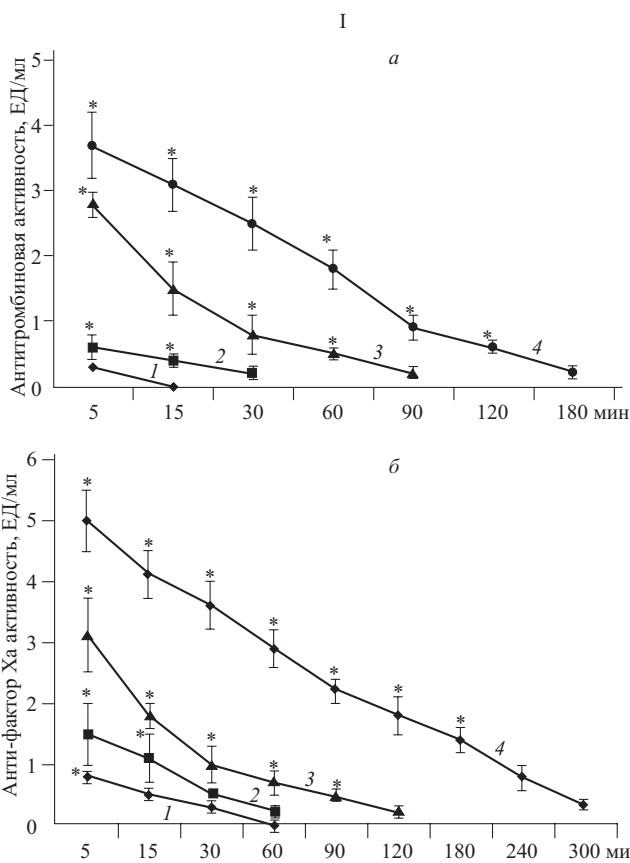
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

*Специфическая антикоагулянтная активность НМГ-4,7*

Антикоагулянтная активность НФГ (ММ 7,4 кДа) составила  $223 \pm 19$  ЕД/мг (аIIa) и  $184 \pm 29$  ЕД/мг (аХа), отношение активностей аХа/аIIa – 0,83. НМГ, полученный с помощью гидролиза НФГ, имел ММ 4,7 кДа, аIIa активность  $72 \pm 9$  ЕД/мл, аХа активность  $200 \pm 33$  ЕД/мг, отношение активностей аХа/аIIa составило 2,8.

*Антикоагулянтная активность плазмы кроликов*

На рисунке, I изображено влияние внутривенного введения НМГ-4,7 в дозах 0,3; 0,5; 0,8 и 3 мг/кг на антикоагулянтную активность плазмы кроликов. Показано изменение антикоагулянтной активности плазмы в



Антикоагулянтная активность плазмы кроликов после внутривенного (I) и подкожного (II) введения НМГ-4,7.

НМГ-4,7 вводили в следующих дозах: 1 – 0,3 мг/кг; 2 – 0,5 мг/кг; 3 – 0,8 мг/кг; 4 – 3 мг/кг; 5 – 10 мг/кг; 6 – 30 мг/кг. Антитромбиновую активность (а; до введения гепарина составляла 0 ЕД/мл) и анти-Ха активность (б; до введения гепарина составляла 0 ЕД/мл) плазмы кроликов измеряли в различные интервалы времени после введения. \* —  $p < 0,05$ . По оси абсцисс — время после введения.

зависимости от дозы. Антитромбиновая активность плазмы повышалась с увеличением дозы (рисунок I, а) от  $0,3 \pm 0,1$  ЕД/мл (0,3 мг/кг;  $n = 10$ ) до  $3,7 \pm 0,5$  ЕД/мл (3 мг/кг;  $n = 10$ ) на 5-й минуте после введения. Анти-фактор Ха активность плазмы росла с увеличением дозы (рисунок, I, б) от  $0,8 \pm 0,1$  ЕД/мл (0,3 мг/кг;  $n = 10$ ) до  $5 \pm 0,5$  ЕД/мл (3 мг/кг;  $n = 10$ ) на 5-й минуте после введения. Наибольшая продолжительность эффекта (до 4 ч) наблюдали при дозе 3 мг/кг. Отношение активностей аХа/аПа наиболее выражено (до 2,5 раз) при дозе 0,5 мг/кг. Отношение активностей аХа/аПа снижалось до 1,2 – 1,7 раз при дозах 0,8 и 3 мг/кг, но антикоагулянтная активность плазмы при этом была высока.

На рисунке, II показано влияние подкожного введения НМГ-4,7 в дозах 3, 10 и 30 мг/кг на антикоагулянтную активность плазмы кроликов. Антитромбиновая активность росла с увеличением дозы (рисунок, II, а). Максимум антитромбиновой активности плазмы ( $1,1 - 1,21$  ЕД/мл) с выходом на плато наблюдали через 2 – 3 ч после введения НМГ-4,7 в дозе 30 мг/кг.

Через 24 ч после введения аПа активность плазмы составила  $0,66 \pm 0,12$  ЕД/мл. Анти-фактор Ха активность плазмы возрастала с увеличением дозы (рисунок, II, б). Максимум аХа активности плазмы кроликов ( $1,9 - 2,1$  ЕД/мл) наблюдали через 2 ч после подкожного введения НМГ-4,7 в дозе 30 мг/кг. Через 24 ч аХа активность плазмы составила  $0,55 \pm 0,11$  ЕД/мл. Отношение активностей аХа/аПа плазмы в области плато составило 1,8.

#### Антитромботическая активность

Антитромботическую активность НМГ-4,7 исследовали на модели венозного стаза у 150 крыс самцов Вистар. Результаты представлены в таблице. Отмечали возрастание антитромботического эффекта с увеличением дозы НМГ-4,7 (0,3; 0,5; 0,8 и 3,0 мг/кг). Форма тромба в баллах, масса тромба и концентрация белка в гомогенате тромба достоверно отличались от показателей в контроле ( $p < 0,05$ ), начиная с дозы 0,5 мг/кг. Полное (100 %) ингибирование роста тромба наблюдали при дозе 3 мг/кг.

## Антитромботический эффект НМГ-4,7 на модели венозного стаза у крыс

Доза, мг/кг	Форма тромба, баллы	Масса влажного тромба, мг	[Белок], мкг/мл	aIIa <sup>#</sup> , ЕД/мл	aXa <sup>&amp;</sup> , ЕД/мл
Контроль	3,9 ± 0,1	9,8 ± 1,8	139 ± 8	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,02
0,3	3,4 ± 0,2	7,6 ± 1	131 ± 11	0,21 ± 0,02 *	0,21 ± 0,01 *
0,5	3,0 ± 0,6*	3,7 ± 0,6*	81 ± 12*	0,29 ± 0,04 *	0,36 ± 0,06 *
0,8	0,9 ± 0,4*	2,3 ± 0,3*	70 ± 16*	0,61 ± 0,12 *	0,80 ± 0,05 *
3	0 ± 0*	1,4 ± 0,3*	39 ± 7*	0,98 ± 0,16 *	1,20 ± 0,07 *

**Примечание.** Контроль — крысам вводили эквивалентный объем физиологического раствора вместо раствора НМГ-4,7; [белок] — концентрация белка в гомогенате тромба; <sup>#</sup> — антитромбиновая (aIIa) активность плазмы крыс через 15 мин после внутривенного введения НМГ-4,7; <sup>&</sup> — aXa активность плазмы крыс через 15 мин после внутривенного введения НМГ-4,7; \* —  $p < 0,05$  относительно контроля;  $n = 20$ .

Отмечали тесную положительную корреляцию между формой тромба в баллах и массой тромба ( $r = 0,89$ ;  $p < 0,05$ ), между формой тромба и концентрацией белка в гомогенате тромба ( $r = 0,92$ ;  $p < 0,05$ ). Тесную отрицательную связь наблюдали между формой тромба в баллах и антикоагулянтной активностью плазмы крыс ( $r_{aIIa} = 0,92$ ;  $r_{aXa} = 0,99$ ;  $p < 0,05$ ). Терапевтически значимые величины aXa активностей плазмы крыс (0,36 ЕД/мл и более) наблюдали при дозах 0,5; 0,8 и 3,0 мг/кг.

Известны разные способы получения НМГ с низким выходом путем фракционирования природного препарата или с высоким выходом контролируемой деполимеризацией [7]. Возможно получение НМГ путем частичной деполимеризации  $\alpha$ -гликозидных связей гепарина с помощью гепариназы. Используемый в этом процессе фермент продуцируется *Flavobacterium heparinum* [1]. Получение НМГ ферментативным путем минимально затрагивает структуру молекулы гепарина, на основе этого процесса получают препарат логипарин [7]. Мы исследовали возможность получения НМГ с помощью гидролиза ферментами, никогда для этой цели не применяемыми. Ранее мы получали низкомолекулярные сульфаты хитозана, используя ферментативный гидролиз высокомолекулярного сульфата хитозана иммобилизованным хитинолитическим комплексом из *Streptomyces kurssanovii* [12]. Культура *Streptomyces kurssanovii* содержит гидролазы: четыре хитиназы, хитозаназу, N-ацетилглюкозаминидазу и протеазу. Механизм действия этого ферментного комплекса не ясен. Сульфатированный хитозан не является специфическим субстратом для этих ферментов, однако, мы наблюдали значительное снижение вязкости растворов при изменении условий. Сульфатированный хитозан, как и НФГ демонстрирует ускорение инактивации тромбина, формируя эквимоллярные комплексы с антитромбином. Ферментный хитинолитический комплекс из *Streptomyces kurssanovii* использовали для деполимеризации нефракционированного гепарина из кишечника свиней. Получили образец НМГ со средним распределением молекулярной массы 4,7 кДа. Отношение активностей aXa/aIIa составило 2,8, что попадает в диапазон подобного отношения активностей

для известных препаратов НМГ (dalteparin — 4; enoxiparin — 3,9; Logiparin — 1,5; НФГ — 1 [6]). НМГ-4,7 продемонстрировал значительную антикоагулянтную активность и отношение активностей, необходимое для антитромботического средства.

При внутривенном введении кроликам НМГ-4,7 отношение антикоагулянтных активностей плазмы сохранялось. При подкожном введении в дозах 10 и 30 мг/кг отмечали рост aXa активности плазмы до 1 – 2 ЕД/мл с достижением максимального эффекта через 180 мин и продолжительностью действия более чем 24 ч (aXa активность плазмы составила  $0,55 \pm 0,20$  ЕД/мл). Для сравнения, aXa активность плазмы после подкожного введения фраксипарина в дозе 700 aXa ЕД/кг через 3 ч составляла 2 ЕД/мл, через 24 ч —  $1,04 \pm 0,09$  ЕД/мл. При внутривенном введении НМГ — 4,7 в дозах 0,8 и 3 мг/кг отмечали ингибирование роста тромба на 80 и 100 % при моделировании венозного стаза у крыс.

Значительность связей между формой тромба при моделировании венозного тромбоза и антикоагулянтными активностями плазмы позволяют в дальнейшем при анализе антитромботической активности образцов низкомолекулярных гепаринов прибегать к определению только aXa активности плазмы.

## ВЫВОДЫ

1. Определена специфическая антикоагулянтная активность образца низкомолекулярного гепарина с ММ 4,7 кДа (полученного с помощью ферментативной деполимеризации нефракционированного гепарина хитинолитическим комплексом из *Streptomyces kurssanovii*), выраженная в способности ингибировать тромбин (анти-IIa активность —  $72 \pm 9$  ЕД/мг) и фактор Ха (анти-Xa активность —  $200 \pm 33$  ЕД/мг).

2. При подкожном и внутривенном введениях образца низкомолекулярного гепарина с ММ 4,7 кДа кроликам отмечали увеличение антикоагулянтной активности плазмы кроликов с возрастанием дозы.

3. Образец НМГ-4,7 способен ингибировать рост тромба на модели венозного тромбоза у крыс. Антитромботический эффект в 100% наблюдали при дозе 3 мг/кг.

Работа поддержана грантами фонда РФФИ: № 05-04-08100, № 05-03-32883, № 06-04-08140-офи.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Е. Банникова, П. П. Суханова, Г. А. Вихорева и др., *Прикл. биох. и микробиол.*, **38**(5), 413 – 415 (2002).
2. Г. Е. Банникова, П. П. Столбушкина, Н. Н. Дрозд и др., *Прикл. биох. и микробиол.*, **40**(4), 429 – 434 (2004).
3. В. Дюк, *Обработка данных на ПК*, Питер, Санкт-Петербург (1997).
4. A. S. Bhargava, J. Heinick, and P. Gunzel, *Arzneimittelforschung*, **30**(7), 1071 – 1074 (1980).
5. Y-J. Chuang, R. Swanson, S. M. Raja, and S. T. Olson, *J. Biol. Chem.*, **276**(18), 14961 – 14971 (2001).
6. J. Hirsh J, M. O'Donnell, and J. Weitz, *Blood*, **105**(2), 453 – 463 (2005).
7. R. Linhardt, F. Grant F, C. Cooney, et al., *J. Biol. Chem.*, **257**(13), 7310 – 7313 (1982).
8. N. Lubenow, R. Kempf, A. Eichner, et al., *Chest*, **122**(1), 37 – 42 (2002).
9. S. A. Rahima, F. Panju, M. Paib, et al., *Thromb. Res.*, **111**(4 – 5), 215 – 219 (2003).
10. Z. Shriver, R. Raman, G. Venkataraman, et al., *Proc Natl Acad Sci USA*, **97**(19), 10359 – 10364 (2000).
11. A. N. Teien, M. Lie M, and U. Abildgaard, *Thromb. Res.*, **8**(3), 413 – 416 (1976).
12. G. Vikhoreva, P. Stolbushkina, G. Bannikova, et al., *Carbohydr. Polym.*, **62**(4), 327 – 332 (2005).
13. W. Wang, S. Bo, S. Li, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **13**(5), 281 – 285 (1991).
14. S. Wessler, S. M. Reimer, and M. C. Sheps, *J. Appl. Physiol.*, № 14, 943 – 946 (1959).

Поступила 01.11.06

## EFFECT ON LOW-MOLECULAR-WEIGHT HEPARIN OBTAINED USING A CHITINOLYTIC COMPLEX ON THE ANTICOAGULANT ACTIVITY IN THE BLOOD PLASMA OF RABBITS AND RATS

N. N. Drozd<sup>1</sup>, A. S. Tolstenkov<sup>1</sup>, V. A. Makarov<sup>1</sup>, N. T. Miftakhova<sup>1</sup>, G. E. Bannikova<sup>2</sup>, P. P. Sukhanova<sup>3</sup>, V. P. Varlamov<sup>2</sup>, and G. E. Vikhoreva<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Novo-Zykovskii proezd 4a, Moscow, 125167 Russia;

<sup>2</sup> Bioengineering Research Center, Russian Academy of Sciences, pr. 60-Letiya Oktyabrya 7/1, Moscow, 117312 Russia;

<sup>3</sup> Moscow State Textile University, ul. Malaya Kaluzhskaya 1, Moscow, 119991 Russia

The anticoagulant activity of low-molecular-weight heparin with an average molecular weight of 4.7 kD (LMWH-4.7) has been studied. This derivative was prepared from unfractionated heparin with the help of chitinolytic enzyme complex from *Streptomyces karsanovii*. The antithrombin activity of LMWH-4.7 (aIIa activity) was  $72 \pm 9$  IU/mg and the activity with respect to the blood coagulation factor Xa (aXa activity) was  $200 \pm 33$  IU/mg, which corresponded to an aXa/aIIa ratio of 2.8 (necessary for effective antithrombotic drugs). The aIIa and aXa activity exhibited a dose-dependent variation upon intravenous and subcutaneous injections in rabbits, so that a high aIIa/aXa ratio was retained: 5 min after the intravenous injection of a minimum dose (0.3 mg/kg), this ratio was 2, 7, and for a greater dose (3.0 mg/kg) it reached 3.8. Subcutaneous injections were followed by slow elimination of the anticoagulant within 24 h. LMWH-4.7 upon intraperitoneal injections produced a dose-dependent inhibition of a model thrombosis in rats. Complete inhibition was observed for a dose of 3 mg/kg. Thus, it is possible to obtain active LMW heparin with the help of chitinases.