

ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.115.3:612.115.064

ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩИЕ ЭФФЕКТЫ
КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ ПРОЛИНА С ГЕПАРИНОМ

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

(кафедра физиологии человека и животных, e-mail: lyapinal@mail.ru)

В настоящей работе установлено образование комплексного соединения пролина с гепарином. Разработан способ получения комплекса в условиях *in vitro* при молярном соотношении пролина и гепарина 3:1. Этот комплекс обладал антикоагулянтной, антитромбоцитарной и фибриндеполимеризационной активностью в условиях *in vitro*. Через 10 мин после внутривенного введения комплекса пролин—гепарин в крови животных отмечался повышенный фон антитромбоцитарной, фибриндеполимеризационной, антикоагулянтной и антифибринстабилизирующей активности в отличие от его составных частей — пролина и гепарина.

Ключевые слова: комплекс пролин—гепарин, антикоагулянтная активность, фибриндеполимеризационные свойства, агрегация тромбоцитов.

Заменяемая аминокислота L-пролин (Pro) входит в состав всех природных белков, в том числе фибриллярных. Особенно богаты L-пролином коллаген, проламины (семена злаков), эластин, инсулин, адренкортикотропный гормон, глипролины (продукты гидролиза коллагена или эластина) и другие регуляторные пептиды. Пролин — единственная аминокислота, не образующая α -спирали и имеющая значение для третичной структуры белка. Метаболизм пролина тесно связан с глутаминовой кислотой [1]. При окислении пролина в организме животных образуются 3- и 4-гидроксипролины. Гидроксипролин, представленный в коллагене весьма большим числом остатков, стабилизирует его тройную спираль по отношению к действию протеаз [2]. Пролин улучшает состояние кожи вследствие увеличения продукции коллагена, участвует в восстановлении хрящевых поверхностей суставов, укрепляет связки и сердечную мышцу [3]. Имеются немногочисленные данные литературы о том, что пролин способен взаимодействовать с гепарином — природным антикоагулянтом [4], который предотвращает его мутации [5].

Гепарин снижает повышенный уровень холестерина, нормализует уровень сахара в крови и увеличивает скорость заживления ран в организме [4, 6, 7]. Он проявляет антикоагулянтную активность вследствие блокады свертывающей активности тромбина и других свертывающих белков [8, 9].

Экспериментальные данные, подтвержденные затем в клинических условиях, свидетельствуют об усилении противосвертывающих и антидиабетогенных свойств комплексных соединений гепарина с некоторыми низкомолекулярными веществами — аминокислотами, пептидами [10—12].

В связи с этим целью настоящей работы явилось создание противосвертывающего комплексного препарата пролина с гепарином и изучение его влияния на полимеризацию фибрина, антикоагулянтную и антитромбоцитарную активность в кровотоке животных.

Объекты и методы

В экспериментах использовали высокомолекулярный гепарин фирмы “Serva” (США), препарат аминокислоты пролина производства России.

Разработанным нами методом получали комплекс пролина с гепарином (КПГ) при молярном соотношении составных частей 3:1.

Методом перекрестного электрофореза было доказано существование взаимодействия между аминокислотными группами пролина и кислотными группами гепарина. В условиях *in vitro* проводили определение суммарной и неферментативной фибринолитической (фибриндеполимеризационной) активности [13] КПГ в пределах концентраций от 10^{-6} до 10^{-2} М, а также определяли антикоагулянтную активность и агрегацию тромбоцитов при добавлении к плазме крови здоровых животных комплекса пролин—гепарин.

Эксперименты *in vivo* были проведены на 20 лабораторных крысах-самцах в возрасте 5—6 мес с массой тела 190—210 г. Животные были разделены на 4 группы. Крысам первой группы вводили КПГ в дозе 1 мг/кг массы тела, крысам второй группы — пролин в дозе, эквивалентной его содержанию в комплексе (0,035 мг/кг), третьей группы — гепарин в дозе, эквивалентной его содержанию в комплексе (0,965 мг/кг), четвертой группе крыс вводили тот же объем, т.е. по 0,3 мл 0,85%-го раствора NaCl (рас-

творитель). Введение растворов препаратов и взятие крови через 10 мин производили через *v. jugularis*. Кровь брали в количестве 2 мл с использованием в качестве консерванта 3,8%-го раствора лимоннокислого натрия. Производили определение следующих параметров свертывающей и противосвертывающей систем плазмы крови: суммарную (СФА) и неферментативную (НФ) фибринолитическую активность [13], активность тканевого активатора плазминогена (ААП), антикоагулянтную активность по тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) [14] и активность фибринстабилизирующего фактора XIII [15]. Также в плазме, богатой тромбоцитами, определяли агрегацию тромбоцитов на агрегометре (Россия) с использованием в качестве индуктора агрегации раствора аденозиндифосфата в концентрации 2 мкМ [16]. Полученные результаты были обработаны статистически по методу Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Нами установлено, что в условиях *in vitro* комплекс КПП проявлял СФА за счет НФ (зоны лизиса составляли 20–36 мм²) в широком интервале концентраций от 10⁻⁵ до 10⁻² М, в то время как составные части — гепарин и пролин — в концентрациях, эквивалентных их содержанию в комплексе, не обнаруживали неферментативного фибринолитического действия (табл. 1). При этом комплекс КПП проявлял антикоагулянтную активность (по тесту АЧТВ) при его концентрации в плазменной среде от 10⁻⁵ до 10⁻² М, удлиняя время образования сгустка в 1,24–6,6 раз; составные части комплекса — гепарин и пролин — также проявляли антикоагулянтную активность, но в меньшей степени (гепарин удлинял АЧТВ в 1,11–4,75 раз, пролин — в 1,26 раз) и в меньшем диапазоне концентраций (пролин), чем комплекс. Агрегация тромбоцитов в присутствии комплекса в диапазоне концентраций 10⁻²–10⁻³ М снижалась в 1,21 раза по сравнению с контрольными пробами богатой тромбоцитами плазмы крови. Следовательно, в условиях *in vitro* комплекс отличался от состав-

Таблица 1

Показатели гемостаза при действии комплекса пролин—гепарин *in vitro*

Препараты	Концентрация, М	СФА, мм ²	НФ, мм ²	АЧТВ, сек	Агрегация тромбоцитов, %
Комплекс пролин—гепарин	10 ⁻²	36 ± 0,3**	36 ± 0,3**	175,9 ± 1,05**	82,7
	10 ⁻³	34 ± 0,05**	33 ± 0,3**	112,1 ± 1,24**	80,2
	10 ⁻⁴	30 ± 0,5**	30 ± 0,1**	69,3 ± 1,01**	85,0
	10 ⁻⁵	20 ± 0,1**	18 ± 0,2**	32,9 ± 2,82*	91,4
	10 ⁻⁶	9 ± 4,5	6 ± 5,0	28,0 ± 0,94	87,5
Пролин	10 ⁻²	0 ± 0	0 ± 0	33,6 ± 2,04**	96,0
	10 ⁻³	0 ± 0	0 ± 0	32,8 ± 1,01*	—
	10 ⁻⁴	0 ± 0	0 ± 0	26,1 ± 0,84	117,5
	10 ⁻⁵	0 ± 0	0 ± 0	26,4 ± 0,73	—
	10 ⁻⁶	0 ± 0	0 ± 0	26,9 ± 0,88	—
Гепарин	10 ⁻²	4,0 ± 2,3	4 ± 0,9	125,9 ± 2,01**	131,5
	10 ⁻³	0 ± 0	0 ± 0	54,1 ± 1,54**	—
	10 ⁻⁴	0 ± 0	0 ± 0	42,1 ± 1,03**	112,5
	10 ⁻⁵	0 ± 0	0 ± 0	26,9 ± 0,91	—
	10 ⁻⁶	0 ± 0	0 ± 0	29,3 ± 0,84*	—
0,85%-й NaCl	—	0 ± 0	0 ± 0	26,5 ± 0,89	100,0

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

ных частей значительным эффектом по АЧТВ и фибриндеполимеризационной или неферментативной фибринолитической активности.

При проведении экспериментов на животных было установлено, что через 10 мин после внутривенного введения КПП (1 группа) в плазме крови достоверно повышались СФА и НФ — в 1,21 и 1,36 раза соот-

Таблица 2

Суммарная фибринолитическая активность (СФА), неферментативный фибринолиз (НФ), активность плазмина (АП), активность активатора плазминогена (ААП) в плазме крови через 10 мин после внутривенного введения животным комплекса пролин—гепарин (КПП) в дозе 1 мг/кг и его составных частей в эквивалентных количествах (М ± m)

Условия опыта	СФА, мм ²	НФ, мм ²	АП + ААП, мм ²	АП, мм ²	ААП, мм ²
Группа 1 — введен КПП (1 мг/мл)	43,0 ± 1,1**	32,1 ± 1,0**	24,0 ± 0,5**	4,0 ± 0,6	20,0 ± 1,5**
Группа 2 — введен пролин (0,033 мг/кг)	34,0 ± 0,7	21,0 ± 0,7	12,4 ± 0,7	3,9 ± 1,1	11,8 ± 0,7
Группа 3 — введен гепарин (0,967 мг/кг)	38,0 ± 1,5	25,5 ± 1,1	23,1 ± 0,4**	3,8 ± 0,8	14,1 ± 1,2**
Группа 4 — (контроль) введен 0,85%-й NaCl	35,5 ± 1,1	23,6 ± 0,8	14,5 ± 0,4	3,2 ± 0,3	11,3 ± 0,8

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

Таблица 3

**Изменение антикоагулянтной активности
(по тесту активированного частичного тромбопластинового времени — АЧТВ),
агрегации тромбоцитов и фактора XIIIa в крови
через 10 мин после внутривенного введения животным
комплексного соединения аргинин—гепарин (КПГ) в дозе 1 мг/кг
и его составных частей в эквивалентных количествах ($M \pm m$)**

Условия опыта	АЧТВ, сек	Агрегация тромбоцитов, %	Фактор XIIIa, ед/мл
Группа 1 — введен КПГ (1 мг/кг)	28,3 $\pm$ 1,09**	71,3 $\pm$ 7,9**	67,0 $\pm$ 4,4**
Группа 2 — введен про- лин (0,035 мг/кг)	24,5 $\pm$ 0,31	100,0 $\pm$ 9,8	72,0 $\pm$ 5,1*
Группа 3 — введен гепа- рин (0,965 мг/кг)	26,5 $\pm$ 0,46*	121,5 $\pm$ 13,8	81,0 $\pm$ 2,8
Группа 4 (контроль) — введен 0,85%-й NaCl	22,2 $\pm$ 1,38	100,0 $\pm$ 7,4	88,0 $\pm$ 3,3

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

ветственно, суммарная активность активатора плазминогена и плазмина — в 1,66 раза, а также ААП в 1,77 раза по сравнению с контрольной группой, которая получала 0,85%-й раствор NaCl (табл. 2). Введение крысам эквивалентной по отношению к комплексу дозы пролина (2-я группа) не приводило к изменению СФА и НФ, однако отмечалось незначительное увеличение активности плазмина в 1,21 раза по сравнению с теми же показателями у контрольных крыс. Внутривенное введение эквивалентной по отношению к комплексу дозы гепарина (3-я группа) не изменяло исследуемых параметров гемостаза за исключением суммарной активности плазмина и ААП, которая увеличивалась в 1,59 раза, а также ААП плазмы, которая повышалась в 1,24 раза по сравнению с контрольной группой животных (табл. 2).

При этом после введения препаратов КПГ в дозе 1 мг/кг и гепарина в эквивалентной дозе в плазме крови крыс был выявлен повышенный фон анти-

коагулянтной активности по тесту АЧТВ, превышающий антикоагулянтную активность плазмы крови контрольных животных в 1,27 и 1,19 раз соответственно (табл. 3). Введение эквивалентной дозы пролина не приводило к достоверному изменению антикоагулянтной активности плазмы крови. Наряду с этим установлено уменьшение активности фибринстабилизирующего фактора XIIIa в плазме крови животных, которым вводили комплекс и пролин, в 1,31 и 1,22 раза соответственно по сравнению с контрольной группой крыс, откуда видно, что снижение данного показателя в 1-й группе (комплекс) происходило более эффективно.

В данных условиях эксперимента также обнаружено изменение показателей первичного гемостаза только после введения КПГ, на что указывало снижение агрегации тромбоцитов в 1-й группе животных в 1,4 раза по сравнению с контрольными значениями (табл. 3).

Таким образом, установлен значительный противосвертывающий эффект комплекса пролин—гепарин по сравнению с его составными частями: в плазме крови животных повышались суммарная фибринолитическая активность (в результате увеличения уровня неферментативного фибринолиза и возрастания активности тканевого активатора плазминогена), антикоагулянтная, антифибринолитическая активность крови и снижалась агрегация тромбоцитов.

Полученные данные свидетельствуют, что исследованный комплекс проявляет в организме сочетанное антикоагулянтное, фибриндеполимеризационное и антитромбоцитарное действие, благодаря чему в перспективе он может служить хорошим антикоагулянтно-фибринолитическим и антитромбоцитарным препаратом в случае возникновения предтромботических состояний в организме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Биологический энциклопедический словарь / Под ред. М.С. Гилярова. М.: БСЭ, 1995. 864 с.
2. Cooper S.K., Pandhare J., Phang J.M. A hypothesized regulatory function for hydroxyproline metabolism in apoptosis // Proc. Amer. Assoc. Cancer Res. 2005. Vol. 46. Abstract 1260.
3. Wegmann S., Schöler J., Bippes C.A., Mandelkow E., Muller D.J. Competing interactions stabilize Pro- and anti-aggregant conformations of human tau // J. Biol. Chem. 2011. Vol. 286. P. 20512—20524.
4. Ito M. Cerebellar long-term depression: characterization, signal transduction, and functional roles // Physiol. Rev. 2001. Vol. 81. P. 1143—1195.
5. Boustta M., Leclercq L., Vert M. Affinity chromatography as a tool to analyze polyanion-polycation complexes: the case of Poly(L-lysine Citramide) — Poly(L-lysine) Sys-

tems // J. of Bioactive and Compatible Polymers. 2004. Vol. 19. P. 155—171.

6. Bougie D.W., Wilker P.R., Aster R.H. Patients with quinine-induced immune thrombocytopenia have both “drug-dependent” and “drug-specific” antibodies // Blood. 2006. Vol. 108. P. 922—927.

7. 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.

8. Stief T.W. Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine // Clin. Appl. Thromb. Hemost. 2007. Vol. 13. N 2. P. 146—153.

9. Кондашевская М.В. Морфофункциональные и психофизиологические эффекты высокомолекулярного гепа-

рина (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... докт. биол. наук. М., 2006. 47 с.

10. *Оберган Т.Ю.* Глипролины и их комплексные соединения с гепарином как физиологические модуляторы функции противосвертывающей системы организма: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2004. 25 с.

11. *Смолина Т.Ю., Пасторова В.Е., Ляпина Л.А.* Комплексообразование дипептида пролил-глицин с гепарином; исследование гемостатических свойств комплекса *in vitro* и при внутривенном введении // Тромбоз, гемостаз и реология. 2002. № 2. С. 38—41.

12. *Ляпина Л.А., Оберган Т.Ю., Пасторова В.Е.* Противосвертывающие эффекты комплексного соединения аргинина с высокомолекулярным гепарином // Бюл. эксперимент. биол. и мед. 2009. Т. 147. № 3. С. 300—303.

13. *Kudrjashov B.A., Lyapina L.A.* Non-enzymatic fibrinolysis and its role in the organism // Thrombosis and thrombolysis / Ed. E.I. Chazov, V.N. Smirnov. New York: Consultants Bureau, 1986. P. 33—65.

14. *Долгов В.В., Свиринов П.В.* Лабораторная диагностика нарушений гемостаза. М.; Тверь: Триада, 2005. 227 с.

15. *Баркаган З.С., Момот А.П.* Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2001. 285 с.

16. *Берковский А.Л., Васильев С.А., Жердева Л.В.* Пособие по изучению адгезивно-агрегационной активности тромбоцитов. М.: РАМН НПО "Ренам", 2003. 28 с.

Поступила в редакцию
23.04.12

ANTICOAGULANT EFFECTS OF COMPLEX CONNECTION PROLINE WITH HEPARIN

L.A. Lyapina, T.Yu. Obergan, M.E. Grigorieva, E.S. Maistrenko

In the present work the formation of proline—heparin complex is established. The way of reception of this complex in conditions *in vitro* is developed. The received complex at molar a parity proline and heparin 3 : 1 extended time of formation of fibrin clot, reduced platelet aggregation and showed lytic effect towards non-stabilized fibrin *in vitro* conditions. Through 10 minutes after intravenous introduction of the complex proline—heparin in blood of animals was marked the raised levels of fibrindepolymerizing, anticoagulating, antifibrin stabilizing and antiplatelet activity has been found out whereas its components — proline and heparin — those properties did not possess.

Key words: *proline—heparin complex, anticoagulating activity, fibrindepolymerizing properties, platelet aggregation.*

Сведения об авторах

Ляпина Людмила Анисимовна — докт. биол. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лабораторией защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-26-08, 8-499-744-49-85; e-mail: lyapinal@mail.ru

Оберган Тамара Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11.

Григорьева Марина Евгеньевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11.

Майстренко Евгения Семеновна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-14-11.