

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ГЕПАРИНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ С ПОМОЩЬЮ КОМПЛЕКСА ГИДРОЛАЗ

Н. Н. Дрозд¹, А. С. Толстенков¹, Г. Е. Банникова², Н. Т. Мифтахова¹,
Е. С. Лапикова¹, В. А. Макаров¹, В. П. Варламов²

Исследовали антикоагулянтную активность образцов низкомолекулярных гепаринов (НМГ) со средним распределением молекулярных масс 3,4 – 5,8 кДа. Образцы получали из нефракционированного гепарина с помощью иммобилизованного ферментного комплекса препарата протеаза С. *In vitro* образцы НМГ-ПС ингибировали активность факторов свертывания крови IIa (тромбина) и Ха. Полученные гепарины имели анти-Ха активность до 131 – 208 ЕД/мг и анти-IIa активность до 81 – 175 ЕД/мг. Все образцы НМГ образуют комплексы с сульфатом протамина в геле агарозы при электрофорезе. При внутривенном и подкожном введениях кроликам НМГ с молекулярной массой 5,4 кДа наблюдали возрастание антикоагулянтной активности плазмы с увеличением дозы.

Ключевые слова: нефракционированный и низкомолекулярные гепарины, ингибирование активности тромбина и фактора Ха, сульфат протамина

ВВЕДЕНИЕ

Нефракционированный гепарин (НФГ) представляет высоко сульфатированный комплекс анионных полисахаридов. Связываясь с плазменным ингибитором сериновых протеиназ свертывающей системы крови антитромбином (АТ; SERPINC1) посредством специфической пентасахаридной последовательности, гепарин индуцирует в серпине (serine protease inhibitor) конформационные изменения, которые приводят к активации ингибитора [16]. Ингибирование фактора Ха (ЕС 3.4.21.6) и фактора IIa (тромбин; ЕС 3.4.21.5) антитромбином, который активирован гепарином, происходит по разным механизмам. Гетерогенный НФГ со средним распределением молекулярных масс 13 – 15 кДа неспецифически связывается с макрофагами, тромбоцитами, эндотелиальными клетками и плазменными белками, следствием чего является сложная фармакокинетика и мало предсказуемый антикоагулянтный эффект [15]. НФГ в равной степени способен ингибировать тромбин (анти-IIa активность) и фактор Ха (анти-Ха активность), отношение активностей аХа/аIIa составляет 1. Наличие ряда побочных эффектов стимулировало разработку новых антикоагулянтных средств, лишенных недостатков НФГ. К числу существующих и разрабатываемых не прямых ингибито-

ров фактора Ха и тромбина принадлежат низкомолекулярные гепарины (НМГ) [8, 9].

В настоящее время известны препараты НМГ с патентованными названиями. В США это dalteparin, enoxaparin, tinzaparin. В Европе — certoparin, reviparin, nadroparin, rapnarparin. Среднее распределение молекулярных масс у перечисленных антикоагулянтов находится в диапазоне от 4 до 7 кДа и отношения активностей анти-фактор Ха/анти-фактор IIa (аХа/аIIa) составляют 1,5 – 3,5. НМГ получают из НФГ с помощью химического гидролиза (азотная кислота, пероксиды, щелочь), ферментативного гидролиза (гепариназа I, II, III) или с помощью гидролиза физическими методами (ультразвуковое или гамма-излучение) [11]. Гепариназы, используемые при деполимеризации НФГ, продуцируются *Flavobacterium heparinum* [17]. Гепариназа I (НерI; гепаринлиаза I; ЕС 4.2.2.7) расщепляет высоко сульфатированный участок НФГ по 2-О сульфатированным уроновым кислотам, в то время как гепариназа II (гепаринлиаза II; гепаритиназа II; без номера), имеет более широкую субстратную специфичность и расщепляет гликозидные связи, содержащие и 2-О сульфатированные, и несulfатированные уроновые кислоты. Гепариназа III (НерIII; гепаринтииназа I; ЕС 4.2.2.8), в противоположность гепариназе I, преимущественно расщепляет несulfатированные участки НФГ, а именно, гликозидные связи, содержащие несulfатированную уроновую кислоту.

При лечении НФГ или НМГ иногда наблюдают осложнения в виде кровотечений. Для того, чтобы избавиться от кровотечения, используют антагонист, например, сульфат протамина. Сульфат протамина — гетерогенный простой низкомолекулярный поликатион-

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

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

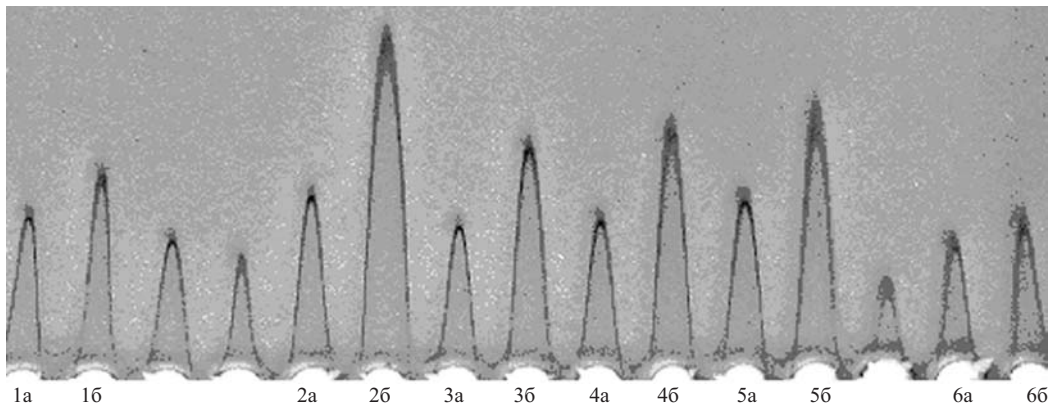


Рис. 1. Электрофорез комплексов НМГ-ПС/сульфат протамина в геле агарозы.

Количество добавлений в гель гепаринов: а — 0,0025 мг; б — 0,005 мг; 1 — НМГ-ПС, 4 кДа; 2 — НФГ, 13,8 кДа; 3 — НМГ-ПС, 4,7 кДа; 4 — НМГ-ПС, 5,4 кДа; 5 — НМГ-ПС, 5,8 кДа; 6 — НМГ-ПС, 3,4 кДа.

ный белок, в состав которого входят остатки аргинина, пролина, серина и валина [10]. Сульфат протамина связывает гепарин (комплекс поликатион-полианион) в стехиометрическом соотношении и не дает возмож-

ности активировать антитромбин. Появившийся комплекс не имеет антикоагулянтной активности. Полную нейтрализацию сульфатом протамина анти-IIa активности наблюдают для всех типов гепарина.

С целью разработки отечественного НМГ нами ранее изучен способ ферментативной деполимеризации НФГ с помощью хитинолитического комплекса из *Streptomyces kurssanovii* [1], а также с помощью иммобилизованных препаратов папаина, целловиридина, “протеазы С” и химотрипсина [2] исследована связь между структурой и антикоагулянтной активностью образцов НМГ [4, 5]. Настоящая работа посвящена исследованию *in vitro* специфической антикоагулянтной активности образцов низкомолекулярного гепарина (НМГ) со средним распределением молекулярных масс 3,4 – 5,8 кДа, полученных с помощью ферментативного гидролиза НФГ ферментным комплексом “протеаза С” и исследованию эффектов внутривенного и подкожного введения НМГ с молекулярной массой 5,4 кДа.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для получения образцов НМГ-ПС осуществляли гидролиз НФГ (ОАО “Белмедпрепараты”) с помощью иммобилизованного ферментного комплекса “протеаза С” [2]. Молекулярную массу (ММ) определяли по [1].

Для оценки удельной антитромбиновой (аIIa) активности [12] исследуемых гепаринов 250 мкл анти-тромбина (“Behring”, Германия, 1 ЕД/мл 0,05 М трис-НСl буфера с 0,0075 М Na_2 -ЭДТА и 0,175 М NaCl, pH 7,4) преинкубировали в темпе 3 мин при 37° С с образцами НМГ разной концентрации. Затем добавляли 100 мкл раствора бычьего тромбина фирмы “Behring” (2 НИН ЕД/мл трис-ЭДТА буфера). Через 30 с добавляли 200 мкл раствора хромогенного субстрата для тромбина — S-2238 фирмы “Behring” (2 ММ трис-ЭДТА буфера). По изменению оптической плотности раствора за минуту при длине волны 405 нм судили об активности исследуемого образца. Для калиб-

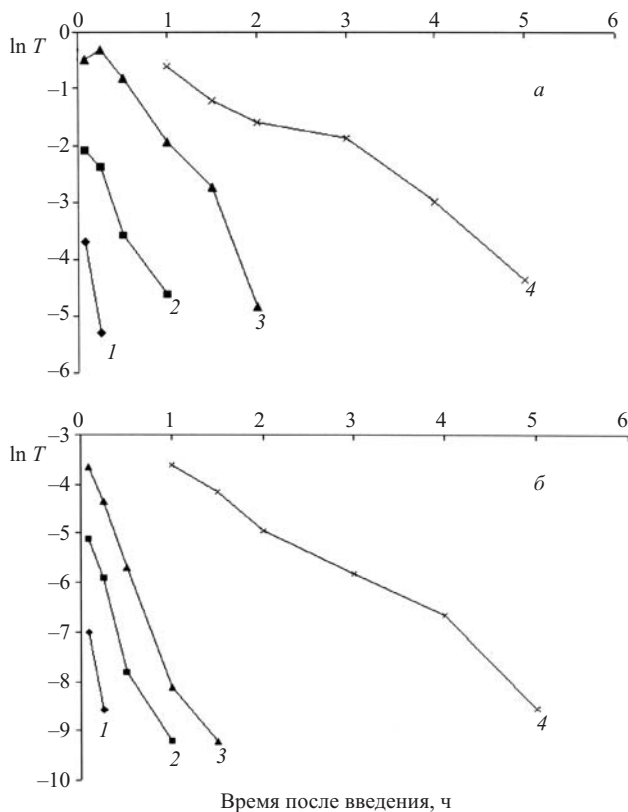


Рис. 2. Полулогарифмический график выведения НМГ с молекулярной массой 5,4 кДа в тесте времени свертывания крови (а) и активированного частичного тромбопластинового времени (б) после внутривенного введения кроликам.

Дозы: 1 – 0,3 мг/кг; 2 – 0,5 мг/кг; 3 – 0,8 мг/кг; 4 – 3 мг/кг.
 $T = T_i - T_b$, где T_i — время свертывания крови или плазмы в разные интервалы времени после введения; $T_b = 1,6 \pm 0,3$ мин ($0,027 \pm 0,005$ ч) — время свертывания крови до введения для а или $T_b = 15,3 \pm 1,7$ с ($0,006 \pm 0,00047$ ч) — время свертывания плазмы до введения для б; $n = 10$.

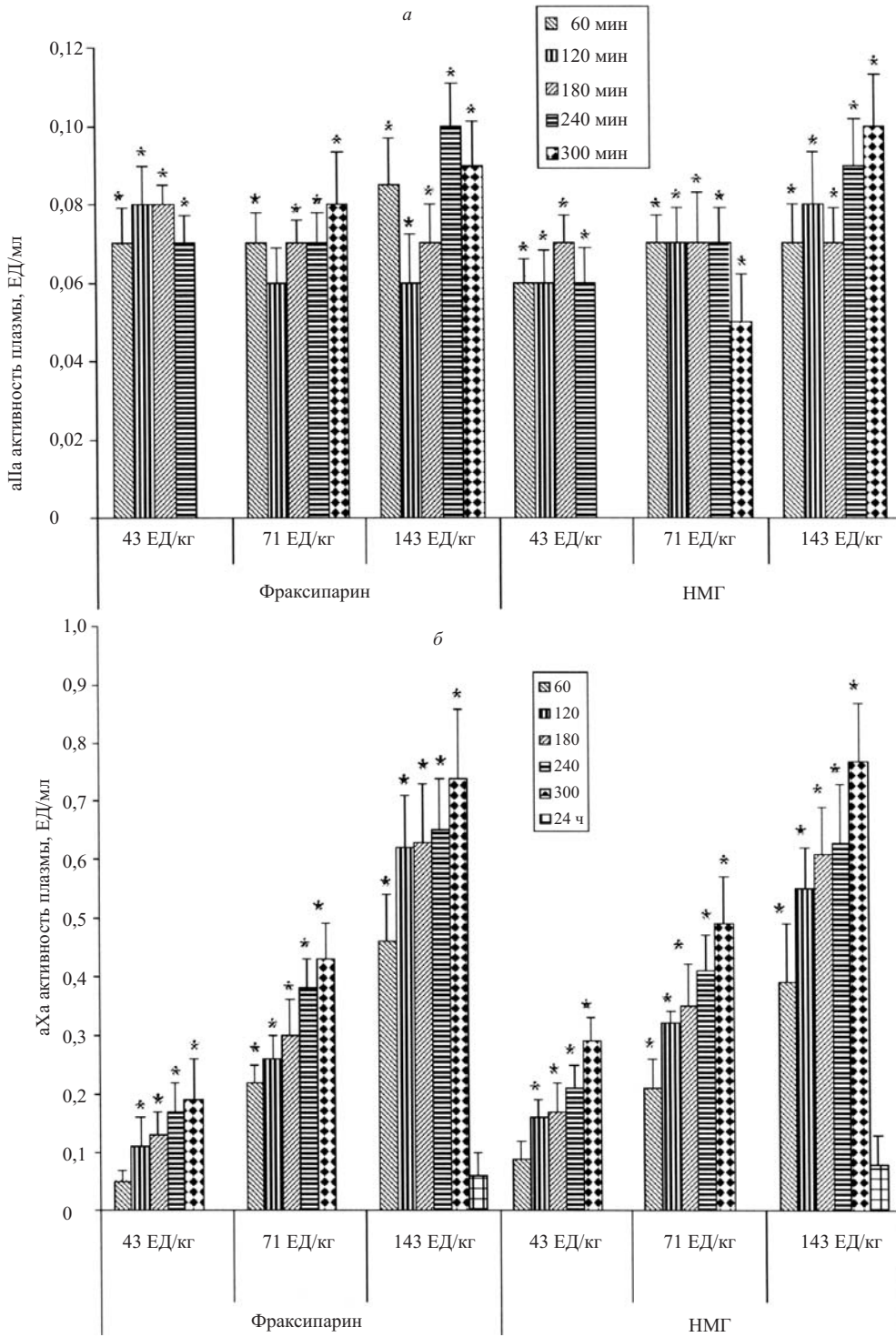


Рис. 3. Изменение аIIa (а) и аXa (б) активностей плазмы кроликов в результате подкожного введения НМГ с молекулярной массой 5,4 кДа или фраксипарина (n = 10).

ровочной кривой использовали 5-й Международный стандарт нефракционированного гепарина (NIBSC). Для определения удельной аXa активности [12] исследуемого вещества 250 мкл антитромбина (“Behring”, 1 ЕД/мл 0,05 М трис-ЭДТА буфера с 0,0075 М Na₂-ЭДТА и 0,175 М NaCl, рН 8,4) с добавленным НМГ разной концентрации и с 250 мкл смеси фактора Ха (“Beh-

ring”, 8 ЕД/мл трис-ЭДТА буфера) с сульфатом декстрана (“Boehringer Mannheim”, Австрия, 0,02 мг/мл). После трехминутной инкубации при 37 °С определяли остаточную активность фактора Ха, добавляя 50 мкл хромогенного субстрата-S 2222 (“Behring”, 4 мМ дистиллированной воды). Активность определяли по изменению оптической плотности раствора при длине

волны 405 нм. Для калибровочной кривой использовали 1-й Международный стандарт низкомолекулярного гепарина (NIBSC).

Ракетный биоспецифичный электрофорез [3] растворов гепаринов проводили в слое 1 % агарозы в 0,1 М натрий фосфатном буфере (рН 6,8) толщиной 1 мм, содержащем сульфат протамина, на стеклянных пластинках. В геле вырезали лунки, заполняя их 5 мкл растворов антикоагулянтов (500 и 1000 мкг/мл). Электрофорез проводили при помощи комплекса Multiphor в течение 2 ч при градиенте потенциала 10 В/см. Окрашивали преципитаты 0,1 % раствором альцианового синего в 3 % уксусной кислоте. Избыток красителя смывали 3 % уксусной кислотой. Пластины с высушим гелем сканировали, переводили изображение в формат JPG и оценивали высоту и площадь пиков преципитации с помощью программы PhotoM 1,31.

Фармакодинамика. Образец НМГ-ПС с ММ 5,4 кДа (НМГ-ПС-4,5) вводили кроликам внутривенно в дозах 0,3; 0,5; 0,8 и 3 мг/кг и подкожно в дозах 43, 71 и 143 аХа ЕД/кг. Для сравнения в тех же дозах вводили фраксипарин (“Sanofi Whinthrop Industria”). Кровь для исследования отбирали из краевой вены уха до введения и через 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 и 300 мин после внутривенного введения и через 60, 120, 180, 240, 300 мин и 24 ч после подкожного введения. Кровь забирали из противоположной яремной вены в пластиковую пробирку с 0,11 М раствором $C_6H_5O_7Na$ в соотношении 9:1. Для получения бедной тромбоцитами плазмы пробирку центрифугировали при 1400 g 20 мин. Кровь и плазму анализировали в тестах времени свертывания крови и активированного частичного тромбопластинового времени [6]. Анти-IIa и анти-Ха [12] активность плазмы кроликов оценивали в разные интервалы времени после введения. Для расчета фармакокинетических параметров [7] данные представляли в виде полулогарифмических графиков выведения исследуемого вещества.

Оценка значимости различий двух средних арифметических рядов экспериментальных данных проводили по *t*-критерию Стьюдента. Для определения связи

между двумя признаками в рядах экспериментальных данных использовали корреляционный анализ [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходный образец гепарина с ММ 14 кДа обладал антитромбиновой активностью 159 ± 20 ЕД/мг, анти-Ха активность составила 172 ± 21 ЕД/мг. Гидролизованые образцы НМГ-ПС с ММ 4 – 5,4 кДа продемонстрировали уменьшение aIIa активности в сравнении с исходным НФГ (таблица). Отношение активностей аХа/aIIa возрастало до 1,4 – 2,1. Отмечали слабую положительную связь ($r = 0,26$; $p < 0,05$) между aIIa активностью и молекулярной массой.

При анализе подвижности в электрическом поле комплексов НМГ-ПС / сульфат протамина (рис. 1) отмечали рост размеров пиков преципитации с увеличением молекулярной массы образцов НМГ (таблица). Коэффициенты корреляции между высотой и площадью пиков преципитации, с одной стороны, и молекулярной массой, с другой, составили 0,9 – 0,92 ($p < 0,05$) при добавлении 2,5 мкг антикоагулянтов. С увеличением отношения активностей (аХа/aIIa) снижались размеры пиков преципитации ($r_{\text{аХа/aIIa}} - \text{высота} = -0,49$ и $-0,46$; $r_{\text{аХа/aIIa}} - \text{площадь} = -0,43$ и $-0,54$).

Внутривенное введение кроликам образца НМГ с молекулярной массой 5,4 кДа (НМГ-ПС-5,4) вызывало дозозависимое удлинение времени свертывания крови в тестах времени свертывания крови (рис. 2, а) и активированного частичного тромбопластинового времени (аЧТВ, рис. 2, б). В тесте аЧТВ с увеличением дозы (с 0,3 мг/кг до 3 мг/кг) возрастали период полуэлиминации ($T_{1/2}$) с 0,037 ч до 0,26 ч и T_{max} (рассчитанное) с 0,008 ч до 0,091 ч. Используя калибровочную кривую для стандарта гепарина, нашли увеличение площадей под кривыми выведения (AUC_{∞}) с 0,00082 мг·ч/мл до 0,1147 мг·ч/мл.

Влияние подкожного введения кроликам НМГ-ПС-5,4 на антикоагулянтную активность плазмы показано на рис. 3. Фраксипарин и НМГ-ПС-5,4 одинаково влияют на aIIa активность плазмы кроликов

Антикоагулянтная активность образцов НМГ-ПС и подвижность комплексов НМГ-ПС/сульфат протамина в электрическом поле (размеры пиков преципитации)

ММ, кДа	аХа, ЕД/мг	aIIa, ЕД/мг	аХа/aIIa	Размеры пиков преципитации			
				500 мкг/мл		1000 мкг/мл	
				высота, пкс	площадь, пкс	высота, пкс	площадь, пкс
13,8	172 ± 21	159 ± 20	1,1	90 ± 12	1280 ± 113	140 ± 10	2194 ± 218
5,8	134 ± 14	175 ± 10	0,8	48 ± 7	549 ± 26	89 ± 9	1199 ± 200
5,4	168 ± 19	$81 \pm 11^*$	2,1	65 ± 8	838 ± 34	103 ± 11	1616 ± 131
4,7	143 ± 19	$103 \pm 13^*$	1,4	63 ± 7	672 ± 29	107 ± 14	1802 ± 157
4,0	$131 \pm 16^*$	$123 \pm 12^*$	1,1	60 ± 8	730 ± 31	120 ± 9	1814 ± 184
3,4	$208 \pm 9^*$	169 ± 15	1,2	50 ± 5	436 ± 42	90 ± 7	1311 ± 111

Примечание. пкс — пиксель — единица измерения, определяющая объем данных, содержащихся в растровом изображении; * — $p < 0,05$, достоверность различий с показаниями для гепарина с ММ 13,8 кДа; $n = 5$.

(рис. 3, а). Так, через 5 ч после введения действие веществ (доза 43 аХа ЕД/кг) заканчивается. С увеличением дозы с 71 аХа ЕД/кг до 143 аХа ЕД/кг незначительно возрастает антитромбиновая активность плазмы с 0,06 аПа ЕД/мл до 0,1 аПа ЕД/мл. Более выраженное влияние гепаринов наблюдали на примере аХа активности плазмы (рис. 3, б). Так же, как и при введении фраксипарина при увеличении дозы НМГ-ПС-5,4 возрастала аХа активность плазмы кроликов. Введение в дозе 43 аХа ЕД/кг приводило к росту аХа активности плазмы до профилактических величин (в пределах 0,15 аХа ЕД/мл) через 4–5 ч. Терапевтически значимую аХа активность плазмы (0,3–0,75 ЕД/мл) отмечали через 4 ч после введения в дозе 71 аХа ЕД/кг и через 1 ч после введения в дозе 143 аХа ЕД/кг. Через 24 ч после введения в дозе 143 аХа ЕД/кг наблюдали аХа активность плазмы до $0,06 \pm 0,002$ ЕД/мл и $0,075 \pm 0,009$ ЕД/мл для фраксипарина и НМГ-ПС-5,4 соответственно.

В последние двадцать лет НМГ с более узким молекулярно-массовым распределением (4–6 кДа) начали вытеснять НФГ как лекарственный препарат. Основное преимущество НМГ следует из их фармакокинетических свойств: в 2–4 раза большее время полувыведения из организма, заметно лучшая биодоступность при подкожном введении и более стабильная в зависимости от дозы реакция. Получение НМГ с помощью ферментативного гидролиза гепариназами предполагает минимальное воздействие на структуру молекулы гепарина. Так получают коммерческий препарат tinzaparin [8]. Каждый НМГ представляет в химическом отношении уникальное вещество с разными фармакологическими свойствами, так как молекулы НМГ характеризуются наличием разных специфических конечных групп. Описан гидролиз такого полисахарида как хитозан под действием различных гидролаз (гемицеллюлаза, лизоцим, папаин, липазы, глюканазы, протеазы и др. ферменты) [14]. Мы предположили, что гепарин тоже будет подвергаться неспецифическому действию гидролитических ферментов и исследовали возможность получения НМГ под влиянием ферментного комплекса “протеаза С”, ранее с этой целью не использовавшегося.

Препарат “протеаза С” представляет смесь экзопротеиназ. В состав препарата входят сериновая протеиназа I, сериновая протеиназа II, нейтральная протеиназа, арбоксипептидаза, аминопептидаза. Препарат активен в диапазоне рН от 5 до 10,5 при температуре 30–50° С и представляет медицинскую субстанцию на основе штамма *Acremonium chrysogenum*, предназначенную для изготовления на ее основе лекарственных средств. У исходного НФГ это отношение составляло 1,1. С уменьшением молекулярной массы падала и антитромбиновая активность полученных НМГ-ПС. Подобная закономерность отмечена в ряде работ, посвященных исследованию связи между структурой су-

льфатированных полисахаридов и антикоагулянтной активностью. С помощью биоспецифичного электрофореза в геле агарозы показана возможность создания комплексов между полученными образцами гепаринов (анионы) и классическим антагонистом для нейтрализации антикоагулянтной активности НФГ [10] — сульфатом протамина (катион).

Внутривенное или подкожное введение НМГ-ПС-5,4 приводит к росту антикоагулянтной активности плазмы кроликов в зависимости от дозы. Эффект подкожного введения НМГ-ПС-5,4 сравним с эффектом фраксипарина, введенного в сопоставимых дозах.

ВЫВОДЫ

1. Деполимеризация нефракционированного гепарина (ММ 13,8 кДа) с помощью ферментного комплекса “протеаза С” приводит к получению образцов гепаринов с молекулярной массой 3,4–5,8 кДа.
2. У трех из полученных низкомолекулярных гепаринов отношение активностей аХа/аПа возросло до 1,4–2,1. Для нефракционированного гепарина это отношение составляет 1.
3. Полученные низкомолекулярные гепарины способны создавать комплексы с сульфатом протамина.
4. Внутривенное и подкожное введение кроликам гепарина с молекулярной массой 5,4 кДа приводит к росту антикоагулянтной активности плазмы с увеличением дозы. Сравнение подкожного введения одинаковых доз используемого в клинической практике фраксипарина и полученного гепарина с молекулярной массой 5,4 кДа свидетельствует об одинаковом антикоагулянтном потенциале.

Работа поддержана грантами РФФИ: 05-04-08100-офи-а, 05-03-32883-а, 06-04-08140-офи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Е. Банникова, П. П. Столбушкина, Н. Н. Дрозд и др., *Прикл. биох. микробиол.*, **40**(4), 429–434 (2004).
2. Г. Е. Банникова, В. П. Варламов, Н. Н. Дрозд и др., Патент РФ № 2295538 от 20 марта 2007 г., *Бюлл.*, № 8 (2007).
3. Н. Н. Дрозд, А. С. Толстенков, В. А. Макаров и др., *Бюлл. экпер. биол.*, **142**(11), 537–540 (2006).
4. Н. Н. Дрозд, А. С. Толстенков, В. А. Макаров и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**(2), 51–62 (2007).
5. П. П. Столбушкина, Г. Е. Банникова, Н. Н. Дрозд и др., *Хим.-фарм. ж.*, **38**(2), 71–74 (2004).
6. M. S. Bates and J. I. Weitz, *Circulation*, **112**(4), 53–60 (2005).
7. N. N. Drozd, A. I. Sher, V. A. Makarov, et al., *Thromb Res.*, **102**(5), 445–455 (2001).
8. J. Fareed, W. L. Leong, D. A. Hoppensteadt, et al., *Seminars in Thromb and Hemost.*, **30**(6), 703–713 (2004).
9. J. Hirsh, M. O'Donnell, and J. Weitz, *Blood*, **105**(2), 453–463 (2005).
10. E. M. Jacobsen, E. J. Trettenes, F. Wisloff, and U. Abildgaard, *Thromb J.*, **4**, 1–7 (2006).
11. Q. Ma, M. Tobu, C. Schultz, et al., *Thromb Res.*, **119**(5), 653–661 (2007).
12. B. H. Monien, B. L. Henry, A. Raghuraman, et al., *Bioorg Med Chem.*, **14**(23), 7988–7998 (2006).

13. H. J. Motulsky and A. Cristopoulos, *Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression*, GraphPad Software Inc, San Diego (2003).
14. R. A. A. Muzzarelli, M. G. Peter (eds.), *Chitin Handbook*, Atec, Grottammare, Italy (1997).
15. J. B. Segal, M. B. Streiff, L. V. Hofmann, et al., *Ann Intern Med.*, **146**(3), 211 – 222 (2007).
16. Z. Shriver, R. Raman, G. Venkataraman, et al., *PNAS*, **97**(19), 10359 – 10364 (2000).
17. Z. Shriver, M. Sundaram, G. Enkataraman, et al., *PNAS*, **97**(19), 10365 – 10370 (2000).

Поступила 19.06.07

ANTICOAGULANT ACTIVITY OF LOW-MOLECULAR-WEIGHT HEPARINS OBTAINED USING A HYDROLASE COMPLEX

N. N. Drozd¹, A. S. Tolstenkov¹, G. E. Bannikova², N. T. Miftakhova¹,
E. S. Lapikova¹, V. A. Makarov¹, and L. P. Varlamov²

¹ Laboratory of Hemostasis Pathology and Pharmacology, Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Novo-Zykovskii proezd 4a, Moscow, 125167 Russia

² Laboratory of Enzyme Engineering, Bioengineering Research Center, Russian Academy of Sciences, pr. 60-letiya Oktyabrya 7/1, Moscow, 117312 Russia

The anticoagulant activity of low-molecular weight heparins (LMWH-PC) with average distribution of molecular weights within 3.4 – 5.8 kD was investigated. The samples of LMWH-PC were obtained from unfractionated heparin using immobilized enzyme complex of protease C. The LMWH-PC derivatives inhibited the activity of blood coagulation factors IIa (thrombin) and Xa. The LMWH-PC derivatives had an anti-factor-Xa activity up to 131 – 208 IU/mg and anti-factor-IIa activity up to 81 – 175 IU/mg. All LMWH-PC derivatives form complexes with protamine sulfate during electrophoresis in agarose gel. The anticoagulant activity of rabbit plasma exhibits a dose-dependent increase upon the intravenous or subcutaneous injection of LMWH-PC with a molecular weight of 5.4 kD.