

Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2005

Л. С. Николаева¹, В. В. Чирков¹, Н. А. Добрынина¹, Л. А. Ляпина²,
В. Е. Пасторова²

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ЭНДОГЕННЫХ ЛИГАНДОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО КОАГУЛОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗА

¹ Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, химический факультет, cyber@td.chem.msu.ru

² Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, lyapinal@mail.ru

Разработан новый метод компьютерного моделирования химических равновесий в мультикомпонентных биожидкостях организма на основе последовательного анализа банка данных равновесий исследуемого раствора, интегрированного с программой расчета равновесий AUTOEQUIL. Метод был применен для поиска низкомолекулярных эндогенных антикоагулянтов крови, механизм действия которых основан на снижении равновесной концентрации биологически активного иона Ca^{2+} за счет образования с ним устойчивых комплексов. Результат моделирования металл-ионных равновесий плазмы крови с банком данных свыше 800 единиц – адекватная модель, описывающая 64 равновесия в базе из 29 компонентов, анализ которых выявил четыре эндогенных лиганда плазмы, образующих устойчивые комплексы с Ca^{2+} : глутамат, цитрат, лактат, аденозин-3-фосфат (АТФ). Их антикоагулянтная активность подтверждена методами экспериментального коагулологического анализа с использованием плазмы крови лабораторных крыс по универсальным биологическим тестам: время рекальцификации плазмы (ВР) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ). Показано, что антикоагулянтная активность лактата – 500%, АТФ – 240%, глутамата – 176%, цитрата – 154% при сравнении с контрольной субстратной плазмой (100%).

Одним из наиболее применяемых в клинической практике и научных исследованиях антикоагулянтов плазмы крови является гепарин [1 – 6]. Он принадлежит к числу эндогенных антикоагулянтов крови, т.к. непосредственно входит в ее состав. Комплексы гепарина с кальцием усиливают антикоагулянтный эффект как *in vitro*, так и при их образовании в организме животных. Известна также антикоагулянтная активность лимонной кислоты, используемой для предотвращения свертываемости донорской крови (цитратная плазма) [7]. Однако состав плазмы крови включает несколько десятков низкомолекулярных лигандов (НМЛ), ионов биометаллов (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} и др.), а также несколько сотен комплексов, образуемых ими с эндогенными лигандами. Поэтому представляет интерес исследование антикоагулянтных свойств расширенного спектра НМЛ плазмы с учетом конкурентного комплексообразования НМЛ со всеми ионами биометаллов. Анализ литературных данных [8 – 17] не позволяет говорить о существовании единого мнения авторов о составе комплексных форм плазмы, что связано с трудоемкостью методов анализа больших информационных потоков по возможному мультикомпонентному ее составу и недостаточностью информации о множестве устойчивых комплексных форм в физиологическом интервале рН.

В настоящее время разработан целый ряд эффективных вычислительных программ расчета химических равновесий: LETAGROP [18], STEW [19], GAUSS [20], HALTAPALL [21], SCOGS [22], LEAST [23], MINQUAD [24], SQUAD [25], DALSFEK [26], SOLGASWATER [27], SUPERQUAD [28], HYPERQUAD [29, 30], ECCLES [12], AUTOEQUIL [33] и другие [34, 35]. Подробный сравнительный анализ некоторых из них дан в работах [31, 32].

Для систем известного молекулярного состава любая из перечисленных программ позволяет с различной степенью достоверности решать прямую и обратную (в некоторых случаях) задачи химических равновесий (расчет равновесных концентраций присутствующих форм и вычисление оценок констант комплексообразования по экспериментальным значениям измеряемого свойства соответственно). Однако большинство существующих программ не ориентировано на описание многокомпонентных равновесных химических систем неизвестного молекулярного состава, в которых возможно образование нескольких сотен комплексных форм. Одной из причин является жесткое ограничение на размерности массивов входной информации — компонентов раствора и констант комплексообразования.

Наиболее целесообразным решением этой проблемы является, на наш взгляд, разработка программного модуля, интегрирующего в единую структуру банк данных по комплексным формам бионеорганического раствора с программой расчета химических равновесий AUTOEQUIL и блоком анализа результатов расчета равновесий с выделением значимых комплексных форм по критериям, разработанным в [36] и адаптированным для решения мультикомпонентной “прямой” задачи равновесий с использованием доступного электронного банка по комплексным формам исследуемого раствора без жестких ограничений на размерность массива констант комплексообразования. Первая версия такой программы представляла собой диалоговую проблемно-ориентированную экспертную систему АВТОБИОХИМ [13], реализованную на языке Фортран и примененную к исследованию влияния антикоагулянта оксиэтилендифосфоновой кислоты (ОЭДФ) на снижение концентрации активного иона кальция Ca^{2+} в растворе, имитирующем состав плазмы крови по эндогенным лигандам и макроэлементам Ca^{2+} , Mg^{2+} на основе банка данных [14, 15].

Из работ по компьютерному моделированию процессов комплексообразования в плазме крови [12, 37 – 41] отметим моделирование металл-ионных равновесий в растворе, имитирующем “естественную” плазму крови (без включения химических реагентов — экзогенных лигандов) [12]. Равновесные концентрации ионов металлов считались величинами, известными из других экспериментальных работ. Поэтому математическая модель равновесий строилась на основе законов действия масс и материального баланса только по эндогенным лигандам. При исследовании влияния химических реагентов на металл-ионные равновесия в плазме подлежат оценке именно равновесные (априори неизвестные) концентрации ионов и их изменения по отношению к концентрациям ионов в “естественной” плазме крови. Поэтому математическая модель равновесий [12] не может применяться

для оценки влияния биологически активных терапевтических лигандов, в том числе и антикоагулянтов. Модель должна строиться на основе законов действия масс и материального баланса по всем лигандам и ионам металлов при известных значениях их общих концентраций.

Целью настоящей работы является компьютерная разработка модели “естественной” плазмы крови, представление расширенного коагулологического анализа антикоагулянтных свойств лигандов плазмы *in vitro* и *in vivo* и проведение их сравнения с аналогичными характеристиками разработанной модели плазмы.

Методы исследования

В настоящем исследовании представлен модуль DEL, интегрирующий банк данных по компонентам и образуемым ими комплексным формам с программой расчета равновесий AUTOEQUIL. Он осуществляет также анализ информации, полученной этой программой. Предложенный алгоритм позволяет обходить ограничения на размерность массивов информации, возникающих при моделировании мультикомпонентных растворов, что является несомненным преимуществом перед аналогичными алгоритмами.

Алгоритм работы модуля DEL

Исходная информация по компонентам, входящим в состав исследуемых систем, представляется в виде таблиц с обозначениями компонентов, их общими концентрациями. Данные по комплексным формам, подлежащим идентификации, формируются на основе различных источников (электронные базы данных [13], статьи и т.д.) и представляются в виде таблицы с информацией о порядковом номере комплекса в банке данных, константе образования комплекса из компонентов, значении произведения растворимости комплекса.

Т а б л и ц а 1

Лиганды “естественной” плазмы крови

Лиганд L_n		Обозначение	Лиганд L_n		Обозначение	Лиганд L_n		Обозначение
название	n		название	n		название	n	
аденинат	2 –	ADE	глутаминат	3 –	GLN	орнитинат	3 –	ORN
аланат	2 –	ALA	глутамат	2 –	GLU	оксалат	2 –	OXL
аминобутират	2 –	AMB	глицинат	2 –	GLY	фенилаланат	2 –	PHE
аргинат	2 –	ARG	гистидинат	3 –	HIS	фосфат	3 –	PO ₄
аскорбат	2 –	ASC	гидроксипролинат	1 –	HPR	пролинат	1 –	PRO
аспарагинат	2 –	ASN	гипоксантинат	1 –	HPX	салицилат	2 –	SAL
аспаргат	2 –	ASP	гистамин	2 –	HST	серинат	2 –	SER
атф	2 –	ATP	имидазол	1 –	IM	сульфат	2 –	SO ₄
цитрат	3 –	CIT	лактат	1 –	LAC	сукцинат	2 –	CUC
карбонат	2 –	CO ₃	лейцинат	2 –	LEU	треонинат	2 –	THR
цистинат	3 –	CST	лизинат	3 –	LYS	триптофанат	2 –	TRP
цитруллинат	2 –	CTR	малат	2 –	MAL	тирозинат	2 –	TYR
цистеинат	3 –	CYS	метионат	2 –	MET	валинат	2 –	VAL

Математическая модель равновесий описывается системой уравнений, отражающих законы действия масс (1) и материального баланса по всем компонентам (2):

$$[K_j] = \beta(K_j) \prod_{i=1}^n [R_i]^{a_{ij}} \quad (1)$$

$$\sum_{i=1}^n a_{ij} [K_j] = c_i(R_i), \quad (2)$$

где R_i — i -ый компонент системы, $c_i(R_i)$ — его общая концентрация, $[R_i]$ — равновесная концентрация, a_{ij} — стехиометрический коэффициент, с которым компонент R_i входит в состав комплекса K_j , $[K_j]$ — равновесная концентрация комплекса K_j , $\beta(K_j)$ — константа его образования из компонентов.

Исследователь указывает, из каких компонентов будет строиться модель, а программный модуль DEL в соответствии с этим организует массив информации, содержащий только данные о комплексах, образующихся из них.

Идентификация значимых для модели комплексных форм основана на количественных критериях (априорном и апостериорном).

Комплекс K_j исключается из выборки подлежащих возможной идентификации форм, если выполняется условие (3) одновременно для всех компонентов, входящих в его состав (априорный критерий):

$$\alpha_{\max}(R_i) = \frac{a_{ij}[K_j]_{\max}}{c_i(R_i)} 100\% < \alpha_0, \quad (3)$$

где $\alpha_{\max}(R_i)$ — максимальное содержание компонента R_i в комплексе K_j , α_0 — пороговое значение критерия, задаваемое исследователем, $[K_j]_{\max}$ — максимальное возможное значение равновесной концентрации комплекса K_j в условиях задачи.

Модель равновесий по прошедшим априорную оценку комплексам рассчитывается программой AUTOEQUIL [17]. DEL фиксирует результаты ее работы для использования их в оценке значимости для модели комплекса K_j по апостериорному критерию.

Комплекс K_j считается значимым для модели по апостериорному критерию (4), если выполняется следующее условие хотя бы для одного компонента, входящего в его состав:

$$\alpha(R_i) = \frac{a_{ij}[K_j]}{c_i(R_i)} 100\% \geq \alpha_0, \quad (4)$$

где $\alpha(R_i)$ — содержание компонента R_i в комплексе K_j .

В противном случае комплекс K_j исключается.

Если вопрос о значимости решается положительно, то проверяются на значимость ранее включенные в модель комплексы. В результате в модели остаются молекулярные формы, значимые в смысле выбранного критерия хотя бы по одному компоненту. После этого осуществляется переход к следующему комплексу из базы данных. Эти процедуры продолжают до исчерпания всех выбранных для идентификации комплексных форм.

Адекватность модели оценивается по отклонению рассчитанных значений параметров, выбранных в качестве отклика (рН, рСа) от экспериментальных значений.

Конечная информация о комплексах, идентифицированных в результате построения модели, представляется в виде таблицы с данными об их составе, равновесных концентрациях и величинах содержания компонентов в комплексах.

Для исследования влияния идентифицированных лигандов на свертывание крови *in vitro* и *in vivo* использовали белых лабораторных крыс массой тела 200–250 г. Для опытов *in vitro* у животных брали шприцем кровь из *v. jugularis*, используя в качестве консерванта раствор щавелевокислого натрия (0,01 моль/л) в соотношении кровь — консервант = 9:1. Кровь центрифугировали при 3000 g оборотов для осаждения форменных элементов. Супернатант (плазма) был практически лишен тромбоцитов. В опытах *in vivo* животным вводили внутривенно в *v. jugularis* исследуемый лиганд в дозе 1 моль/л, и затем через определенные промежутки времени (через 1 и 10 мин) брали из вены с 3,8 % раствором лимоннокислого натрия с последующим центрифугированием в том же режиме.

В образцах крови как *in vitro*, так и *in vivo* определяли антикоагулянтную активность по тестам времени рекальцификации (ВР) и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Время рекальцификации определяли по общепринятому способу при добавлении раствора лиганда в объеме 0,1 мл к реакционной смеси (0,1 мл 0,85 % раствора + 0,1 мл субстратной плазмы). Регистрировали время образования сгустка. Статистическая обработка проведена методом Фишера-Стьюдента.

Таблица 2
Компоненты “естественной” плазмы крови

Обозначение	C_{total} , моль/л	Обозначение	C_{total} , моль/л	Обозначение	C_{total} , моль/л
H	3.00E-02	CIT	1.45E-04	LYS	1.78E-04
Ca	2.53E-03	LEY	1.24E-04	ARG	9.50E-05
Mg	1.14E-03	SER	1.22E-04	PHE	6.40E-05
Fe	1.78E-05	ATP	1.00E-04	ORN	5.80E-05
Zn	3.16E-05	HIS	8.50E-05	TYR	5.80E-05
Cu	1.00E-06	HPX	5.00E-05	ASN	5.50E-05
Mn	7.24E-07	SUC	4.20E-05	GLN	4.80E-05
CO ₃	2.60E-02	CST	4.00E-05	ASC	4.30E-05
LAC	2.30E-03	MAL	3.50E-05	MET	2.90E-05
PO ₄	1.10E-03	CYS	2.30E-05	CTR	2.70E-05
GLU	5.21E-04	OXL	1.20E-05	AMB	2.40E-05
ALA	3.70E-04	HPR	7.00E-06	TRP	1.00E-05
VAL	2.27E-04	SAL	5.00E-06	ASP	5.00E-06
SO ₄	2.11E-04	ADE	1.00E-06	HST	3.00E-08
GLY	2.00E-04	PRO	2.11E-04		
THR	1.50E-04	IM	2.10E-04		

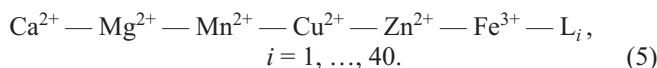
Распределение ионов биометаллов M^{n+} по комплексам ($\alpha(M^{n+}) \geq 1\%$) в “естественной” плазме крови

Молекулярная форма	$\alpha(Ca^{2+})$	Молекулярная форма	$\alpha(Fe^{3+})$	Молекулярная форма	$\alpha(Zn^{2+})$
Ca^{2+}	37,0	Fe^{3+}	0,0	Zn^{2+}	6,1
$Ca_2(GLU)^{2+}$	41,2	$Fe(OH)(CYS)^{2-}$	64,6	$Zn(ALA)(HIS)^{3-}$	64,6
$CaH(PO_4)(CIT)^{3-}$	5,7	$FeH(PO_4)^+$	20,0	$Zn(CST)^-$	21,5
$CaH(CO_3)^+$	5,7	$Fe(SAL)^{2-}$	12,8		
$Ca(LAC)^+$	5,6	$Fe(MAL)_3^{3-}$	2,2		
$Ca(ATP)^-$	1,0				
	$\alpha(Mg^{2+})$		$\alpha(Cu^{2+})$		$\alpha(Mn^{2+})$
Mg^{2+}	67,3	Cu^{2+}	0,0	Mn^{2+}	32,5
$MgH(CO_3)^+$	9,5	$Cu(THR)(HIS)^{3-}$	49,8	$MnH(CO_3)^+$	36,9
$Mg(ATP)$	6,3	$Cu(GLY)(HIS)^{3-}$	35,1	$Mn(ATP)$	18,1
$MgH(PO_4)$	3,3	$Cu(ALA)(HIS)^{3-}$	4,6	$MnH(PO_4)$	7,7
$Mg(SO_4)$	3,3	$Cu(VAL)(HIS)^{3-}$	3,8	$Mn(OXL)$	1,6
$Mg(LAC)^-$	2,5	$Cu(LEU)(HIS)^{3-}$	3,5	$Mn(LAC)$	1,1
$Mg(HPX)^{3-}$	2,1	$Cu(HIS)_2^{6-}$	1,9		
$MgH(HIS)$	2,1	$Cu(GLY)(THR)^{2-}$	1,4		
$Mg(OXL)$	1,0				

Результаты и их обсуждение

Программа DEL была применена для оценки антикоагулянтной активности эндогенных лигандов плазмы крови на основе идентификации их устойчивых комплексов с ионами Ca^{2+} , снижающих равновесную концентрацию в растворе биологически активного иона Ca^{2+} , участвующего в каскаде процессов свертывания крови.

Исследовалась бионеорганическая система, имитирующая “естественную” плазму крови и включающая эндогенные лиганды L_i и 6 биометаллов (табл. 1 и 2):



Одновалентные ионы натрия и калия не включались в исследование, т.к. являются слабыми комплексообразователями. Ионы кобальта и молибдена не были включены в систему (5) из-за отсутствия информации об их содержании в плазме крови.

База данных по возможным комплексным формам ионов металлов с лигандами L_i была составлена на основе электронной версии базы данных ИЮПАК [13] по константам устойчивости при температуре $37 \pm 3^\circ C$ и ионной силе $0,15 \pm 0,05$ моль/л и работы [14] и включала около 800 комплексных форм. В резуль-

тате работы программы DEL был идентифицирован минимальный термодинамический базис из ионов протона, биометаллов и 22 эндогенных лигандов, в котором адекватной математической моделью были описаны реакции протонизации лигандов, а также 48 металл-ионных равновесий с образованием значимых комплексов ионов биометаллов с базисными лигандами (табл. 3).

Анализ данных табл. 3 показывает значимое присутствие в “естественной” плазме шести эндогенных антикоагулянтов: GLU, CIT, LAC, CO_3 , PO_4 , ATP.

В физиологическом интервале pH только GLU и CIT образуют комплексы только с ионами кальция Ca^{2+} и не участвуют в комплексообразовании с другими биометаллами, что позволяет только лиганды CLU и CIT определить как селективные по иону кальция.

Содержание ионов кальция Ca^{2+} в исследованных комплексах с этими биолигандами колеблется от 1% ($Ca(ATP)$) до максимального 41,2%, зарегистрированного для $Ca_2(GLU)$, что свидетельствует об их возможной значительной антикоагулянтной активности.

Введем количественные оценки, характеризующие влияние лиганда L на состояние ионов биометаллов, рассматривая исследуемые лиганды в концентрациях, превышающих их общие концентрации в “естественной” плазме крови (растворе-этalone) (табл. 1 и 2).

Предсказать полученные результаты или объяснить их на основе априорной информации об общих концентрациях биометаллов, лигандов и константах комплексообразования в мультикомпонентном растворе плазмы нельзя. Априори можно в пределах заданной точности ε идентифицировать незначимые комплексы из рассматриваемых в банке данных, используя оценку верхней границы значений логарифма равновесной концентрации комплекса K, заданного составом $K = H_n M_k L_m$ и константой его образования β_k :

$$C_k = \beta_k C_H^n C_M^k C_L^m \quad (6)$$

Таблица 4
Зависимость эффективной концентрации $c_{ef}(L, \delta_{max}(Ca^{2+}))$ и числа селективности $S(L)$ при максимальной эффективности $\delta_{max}(Ca^{2+})$ лиганда L

Лиганд L	$c_{ef}(L, \delta_{max}(Ca^{2+}))$, моль/л	$\frac{c_{ef}(L, \delta_{max}(Ca^{2+}))}{c_{total}(L)}$, %	$\delta_{max}(Ca^{2+})$, %	$S(L)$
GLU	5.00E-04	96	50,0	0,93
CIT	7.00E-04	483	50,0	0,91
LAC	2.00E-02	870	50,0	0,85
ATP	2.70E-03	2700	50,0	2,08

$$\sup \{ \lg C_k \} \leq \lg \beta_k - n \cdot \text{pH} + k \cdot C_{M_k}^0 + m \cdot \lg C_{L_m}^0 \quad (7)$$

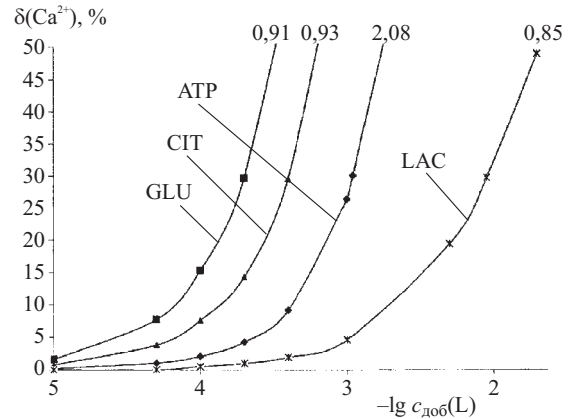
Если $\sup \{ \lg C_k \} < \varepsilon$, то комплекс K в пределах заданного порогового значения незначим.

Но этот априорный критерий (7) не работает для сравнения устойчивости значимых в смысле (7) комплексов ($\sup \{ \lg C_k \} > \varepsilon$) разных металлов даже с одним и тем же лигандом. Для такого сравнения нужны оценки равновесных концентраций комплексов (1), которые можно рассчитать только апостериори после решения "прямой" задачи равновесий относительно неизвестных равновесных концентраций компонентов с учетом конкурентного взаимодействия как всех исследуемых металлов за лиганд, так и всех лигандов за конкретный металл.

Анализ данных табл. 3. показывает, что устойчивые комплексы исследуемых металлов с лигандами CLU, CIT, LAC, CO₃, PO₄ не однотипны по составу: нормальные, протонированные, биядерные, бис- и трискомплексы, гидроксокомплексы, смешаннолигандные комплексы. Это объясняется прежде всего различием общих концентраций компонентов плазмы на несколько порядков, что приводит к процессам комплексообразования разных металлов с указанными лигандами в существенно отличающихся экспериментальных концентрационных областях компонентов при заданном водородном показателе раствора. Если при исследовании бинарных водных растворов исследуемых металлов $M^{(1)} - L - H_2O$ в одних и тех же экспериментальных условиях при образовании однотипных комплексов с лигандом L можно утверждать, что металл $M^{(1)}$ — более сильный комплексообразователь, чем металл $M^{(2)}$ ($C_{M^{(1)}L} > C_{M^{(2)}L}$), если $\beta_{K_1} > \beta_{K_2}$, то в растворе плазмы устойчивость комплекса зависит не только от константы комплексообразования, но и от области концентраций составляющих его компонентов. Если металл $M^{(*)}$ является слабым комплексообразователем в бинарном водном растворе, то это не означает, что в растворе плазмы не существует комплекс $K^{(*)} = H_n M_k^* L_m^*$, равновесная концентрация которого (6) превышает равновесные концентрации комплексов, образуемых более сильными комплексообразователями. Поэтому ион кальция Ca²⁺, являющийся слабым комплексообразователем в водном бинарном растворе, образует самый устойчивый комплекс в плазме Ca₂(GLU), поскольку его общая концентрация на 3–4 порядка превышает концентрации ионов других металлов.

Определим эффективность $\delta(M_k)$ лиганда L , характеризующую его влияние на изменение (по сравнению с системой-эталоном) содержания $\alpha(M_k)$ ионов свободного металла M_k как отношение такого изменения к первоначальному значению: $\delta(M_k) = 1 - \frac{\alpha(M_k)}{\alpha_{\text{ref}}(M_k)}$, где $\alpha_{\text{ref}}(M_k)$ — содержание иона металла в системе-эталононе.

Концентрацию лиганда L , которую необходимо добавить в раствор для достижения заданной эффектив-



Влияние дозы $c_{\text{доб}}(L)$ лиганда L на уменьшение $\delta(\text{Ca}^{2+})$ количества ионов кальция Ca^{2+} в плазме крови

ности $\delta(M_k)$, назовем эффективной концентрацией и обозначим $c_{\text{ef}}(L, \delta(M_k))$.

Число селективности $S(L)$, характеризующее влияние лиганда L (при значении эффективности $\delta(M_k)$, отличном от нуля) на изменение равновесных концентраций остальных биометаллов M_j ($j \neq k$), зададим формулой:

$$S(L) = \frac{\left(\sum_{j=1, j \neq k}^n \delta^2(M_j) \right)^{1/2}}{|\delta(M_k)|}$$

где n — количество ионов биометаллов M_j в системе.

Для оценки влияния конкретного лиганда на состояние ионов биометаллов был проведен ряд модельных экспериментов. Рассчитывались металл-ионные равновесия в растворе (5) с введением в него различных концентраций каждого из шести лигандов (L): GLU, CIT, LAC, CO₃, PO₄, ATP, потенциально обладающих антикоагулянтной активностью.

Введение в раствор плазмы дополнительной концентрационной дозы лиганда PO₄, равной $4 \cdot 10^{-4}$ моль/л (36,4 % от общей его концентрации в

Таблица 5
Влияние лигандов при концентрации 1 моль/л на время рекальцификации (ВР) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) плазмы крови крыс *in vitro*

Лиганд	Обозначения	ВР, %	АЧТВ, %
Лактат	LAC	> 500	> 500
АТФ (ампульный)	АТФ	170,0 ± 7,5	240,5 ± 3,0
Глутамат	GLU	114,0 ± 7,0	176,0 ± 0,2
Карбонат	CO ₃	98,0 ± 5,0	
Н-карбонат	HCO ₃	100,0 ± 1,5	104,0 ± 2,5
Фосфат	PO ₄	137,5 ± 9,0	144,5 ± 2,6
Цитрат	CIT	130,2 ± 4,5	154,0 ± 5,8
Имидазол	ИМ	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
Контроль — 0,85 % раствор NaCl	—	100,0 ± 1,0	100,0 ± 3,5

растворе-этalone) не снижает равновесную концентрацию ионов кальция, но приводит к критическому значению pH раствора (7,6). Аналогичная картина наблюдается и при введении в плазму 10^{-4} моль/л (0,8 % от общей концентрации) лиганда CO_3 . Таким образом, результаты моделирования показывают, что лиганды PO_4 и CO_3 при увеличении их концентрационных доз не могут достигнуть высоких значений эффективности.

Зависимость эффективности $\delta(\text{Ca}^{2+})$ от концентрации каждого из четырех лигандов CLU, CIT, LAC, ATP $\lg(c_{\text{доб}}(\text{L}))$ отображена на рисунке.

Область концентраций вводимых в “естественную” плазму крови лигандов ограничена факторами, связанными с ее стабильностью и функциональностью. Стабильность плазмы крови связана с величиной водородного показателя pH, не превышающем значение 7,6; а функциональность достигается при равновесной концентрации свободных ионов кальция, соответствующей критическому значению эффективности лиганда $\delta_{\text{max}}(\text{Ca}^{2+})$, равному 50 %, т.к. меньшие значения равновесной концентрации ионов кальция могут повлечь за собой гибель живого организма [7].

На рисунке также отмечены значения чисел селективности $S(\text{L})$ лигандов L при их максимальной эффективности.

Из анализа кривых, приведенных на рисунке, можно сделать определенные выводы относительно целесообразности использования различных концентрационных доз исследуемых биолигандов, рассматриваемых в качестве экзогенных, для снижения равновесной концентрации ионов кальция Ca^{2+} на заданную величину. Приведенный ряд модельных экспериментов показал, что добавление различных дополнительных доз лигандов CLU, CIT, LAC, ATP не приводит к значительным изменениям pH среды и к нарушениям стабильности системы, поэтому единственным ограничением величины дополнительной концентрационной дозы является критическое значение эффективности лиганда, совпадающее с максимально возможной эффективностью.

Величина максимальной эффективности глутамата GLU достигается при концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что составляет 96 % от его общей концентрации в “естественной” плазме крови, значение числа селективности на всей области добавляемых концентраций < 1 . Эти оценки позволяют сделать вывод о глутамате как высокоэффективном и селективном эндогенном антикоагулянте.

Величина максимальной эффективности цитрата CIT, образующего смешанно-лигандный комплекс $\text{CaH}(\text{CIT})\text{PO}_4$ достигается при концентрации $7 \cdot 10^{-4}$ моль/л, что составляет 483 % от общей концентрации этого лиганда в плазме крови, число селективности < 1 на всей области добавляемых концентраций. В точке наибольшей эффективности оно равно 0,9.

Лактат LAC участвует в процессах комплексообразования с ионами магния и марганца (табл. 3), что указывает на неселективность данного лиганда. В точке максимальной эффективности добавляемая концентрация равна $2 \cdot 10^{-2}$ моль/л или 870 % от общей концентрации, число селективности — 0,85.

Лиганд ATP в “естественной” плазме крови образует комплексы с ионами тех же металлов, что и LAC. При этом 75 % от его общей концентрации содержится в молекулярных формах $\text{Mg}(\text{ATP})$ и $\text{Mg}(\text{ATP})_2$, поэтому добавление дополнительной дозы ATP вызывает не только изменение равновесной концентрации ионов кальция Ca^{2+} , но и Mg^{2+} и Mn^{2+} . ATP является самым неселективным из исследуемых антикоагулянтов. Его минимальное число селективности равно 2,1, максимальная эффективность достигается при концентрации $2,7 \cdot 10^{-3}$ моль/л, что в 27 раз превышает его общую концентрацию в “естественной” плазме крови.

Следовательно, при одинаковых максимально возможных эффективностях “естественные” антикоагулянты отличаются значением эффективной концентрации $c_{\text{ef}}(\text{L}, \delta(\text{Ca}^{2+}))$ (табл. 4). По этому параметру CLU имеет преимущество перед другими лигандами: он обладает минимальным из всех значений абсолютных концентраций рассматриваемых лигандов, а также наименьшей величиной отношения вводимой концентрации лиганда к исходному его содержанию в “естественной” плазме крови.

Для подтверждения и сравнения полученных данных при моделировании “естественной” плазмы крови последующие эксперименты проводились в биологической системе в условиях *in vitro* и *in vivo* с плазмой животных. Как видно из табл. 5, при добавлении к плазме крови здоровых животных различных лигандов в концентрации 1 моль/л при pH 7,2 – 7,4 установлено следующее: наибольшей антикоагулянтной активностью по тесту времени рекальцификации (BP) обладает лактат (BP > 500 %), затем АТФ (170 %), фосфат и цитрат (137 и 130 % соответственно). Карбонат и гидрокарбонат не имеют антикоагулянтных свойств. По увеличению теста АЧТВ лиганды располагаются от наивысшей активности до наименьшей следующим образом: лактат (500 %) > АТФ (240,56 %) > глутамат (176 %) > цитрат (154 %) > фосфат (144 %).

Следовательно, идентифицированные компьютерной моделью биолиганды CLU, CIT, LAC, ATP обладают антикоагулянтной активностью, подтвержденной данными, полученными на биологическом объекте (кровь животных). Расхождение данных при моделировании и исследовании в биологической системе для LAC и ATP можно объяснить неселективностью их влияния. Тем не менее, при исследовании антикоагулянтной активности ATP биологическими методами при его внутривенном введении крысам установлена его способность оказывать высокий антикоагулянтный эффект в кровотоке, начиная с первых минут после введения и на протяжении 10 мин наблюдения по

двум тестам ВР и АЧТВ (табл. 5), что согласуется с клиническими данными [7].

Таким образом, обобщая и анализируя полученные данные коагулологического исследования антикоагулянтной активности плазмы крови животных *in vitro*, можно говорить о том, что они подтверждают результаты моделирования “естественной” плазмы по антикоагулянтной активности из исследованных низкомолекулярных лигандов: глутамата, цитрата, лактата и аденозинтрифосфата. Расхождение результатов математического моделирования по эффективности фосфата, как слабого антикоагулянта, с результатами тестов ВЧ и АЧТВ, подтверждающих его значительную антикоагулянтную активность, можно объяснить двумя причинами: отсутствием в электронной базе данных по константам устойчивости [16] информации о комплексе фосфора с высоким содержанием в нем ионов кальция и потому не включенных в выборку исследуемых комплексов или объяснением антикоагулянтной активности фосфата механизмом, отличным от механизма снижения равновесной концентрации ионов кальция при введении фосфата в раствор плазмы.

ЛИТЕРАТУРА

1. К. М. Лакин, *Лекарственная регуляция свертывания крови*, Знание, Москва (1971).
2. Б. А. Кудряшов, Л. А. Ляпина, *Вопр. мед. химии*, **28**(5), 112 – 115 (1982).
3. Л. А. Ляпина, В. Е. Пасторова, А. А. Каменский и др., *Вопр. мед. химии*, № 3, 33 – 36 (2000).
4. Л. А. Ляпина, Г. А. Зиадетдинова, *Известия АН, Сер. Биол. Науки*, № 1, 82 – 86 (2001).
5. Т. Ю. Смолина, В. Е. Пасторова, Л. А. Ляпина, *Тромбоз, гемостаз и реология*, № 2, 38 – 41 (2002).
6. Л. А. Ляпина, В. Е. Пасторова, Т. Ю. Смолина и др., *Вестник Московского университета, Сер. Биол.*, № 1, 3 – 7, (2003).
7. П. А. Манорик, Г. Н. Липкан, А. В. Пальчик, А. С. СССР, № 163 1970 (1989).
8. А. В. Семенов, *Биохимические компоненты и константы жидких сред и тканей человека (справочник)*, Медицина, Москва (1976).
9. Д. И. Семенов, И. П. Трегубенко, *Комплексоны в биологии и медицине*, УНЦ АН СССР, Свердловск (1984).
10. Д. Уильямс, *Металлы жизни*, Мир, Москва (1975).
11. R. J. P. Williams, *Cambridge Symposia*, № 30, 1 – 17 (1976).
12. P. M. May, P. W. Linder and D. R. Williams, *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, 6, 588 – 595 (1977).
13. Л. С. Николаева, И. Г. Сыщикова, Е. В. Исаева и др., *Ж. физ. химии*, **65**(2), 344 – 350 (1991).
14. A. E. Martell and R. M. Smith, *Critical Stability Constants*, V. 1 – 4, Plenum Press, New York (1974 – 1977).
15. К. Б. Яцимирский, Е. Е. Крисс, В. Л. Гвяздовская, *Константы устойчивости комплексов с биолгандами*, “Наукова Думка”, Киев (1979).
16. *Stability Constants Database. Academic Software*, Timble, Otley, Yorks, LS21 2PW, U. K. (1993).
17. И. В. Майорова, Н. В. Носова, Н. А. Добрынина и др., *Координац. химия*, **20**(3), 168 – 170 (1994).
18. L. G. Sillen, *Acta Chem. Scand.*, **16**(1), 159 – 172 (1962).
19. P. Gans, A. Vacca, *Talanta*, **21**(1), 45 – 57 (1974).
20. D. Perrin and J. G. J. Sayce, *Chem. Soc. (A)*, № 1, 82 – 89 (1967).
21. N. Ingrid, W. Kakolowick, L. G. Sillen, et al., *Talanta*, **14**(11), 1261 – 1286 (1967).
22. L. G. Sayce, *Talanta*, **15**(12), 1397 – 1419 (1968).
23. A. Sabatini and A. J. Vacca, *Chem. Soc. Dalton*, № 15, 1693 – 1698 (1972).
24. A. Sabatini, A. Vacca, and P. Gaus, *Talanta*, **21**(1), 53 – 77 (1974).
25. D. J. Legget, W. A. E. Mc. Bryde, *Anal. Chem.*, **47**(7), 1065 – 1070 (1975).
26. R. M. Alcock, F. R. Hartley, and D. E. Rogers, *J. Chem. Soc. Dalton*, № 2, 115 – 131 (1978).
27. G. Eriksson, *Anal. Chim. Acta*, **112**(4), 375 – 383 (1979).
28. P. Gans, A. Sabatini, A. Vacca, *J. Chem. Soc. Dalton*, № 6, 1195 – 1200 (1985).
29. P. Gans, *Coord. Chem. Rev.*, **184**(1), 311 – 317 (1999).
30. V. Salvado, *Polyhedron*, **18**(25), 3275 – 3280 (1999).
31. A. Garcia, J. M. Madarige, *Comp. and Chem.*, **24**(3), 193 – 201 (1984).
32. D. J. Legget, *Talanta*, **24**(9), 535 – 542 (1977).
33. А. М. Евсеев, Л. С. Николаева, *Математическое моделирование химических равновесий*, Изд. МГУ, Москва (1988).
34. <http://sinisha.chat.ru/articles/newalg/>
35. <http://www.natur.cuni.cz/~kyvala/>
36. Ю. А. Кирьянов, Л. С. Николаева, А. М. Евсеев, *Ж. неорганической химии*, **34**(7), 1635 – 1641 (1989).
37. G. E. Jackson, P. M. May and D. R. Williams, *J. Inorg. Nucl. Chem.*, **40**, 1227 – 1234 (1978).
38. J. P. Duffield, P. M. May and D. R. Williams, *J. Inorg. Biochem.*, **20**, 199 – 214 (1984).
39. G. E. Jackson and M. Singh, *Polyhedron*, **9**(4), 505 – 510 (1990).
40. L.-C. Konigsberger, E. Konigsberger, P. M. May, and G. T. Hefter, *J. Inorg. Biochem.*, **78**(3), 175 – 179 (2000).
41. G. E. Jackson, L. Mkhonta-Gama, A. Voyer and M. Kelly, *J. Inorg. Biochem.*, **79**(1–4), 147 – 151 (2000).

Поступила 25.11.03

THE INVESTIGATION OF ANTICOAGULATING ACTIVITY OF SEVERAL ENDOGENOUS LOW MOLECULAR WEIGHT LIGANDS OF BLOOD PLASMA BY THE COMPUTER SIMULATION METHOD AND BY UNIVERSAL BIOLOGICAL ASSAYS

Nikolaeva L. S., Chirkov V. V., Dobrinina N. A., Lapina L. A., Pastorova V. E.

Moscow State University, Russian

It has been developed the new computer simulation method of the chemical equilibria in multicomponent biological liquids of organism on the basis of the consecutive analysis of the databank equilibria, integrated with the program AUTOEQUIL. This method has been applied for the search for blood endogenous low molecular weight anticoagulants. The result of the metal-ion equilibria simulation in blood plasma with the databank including over 800 units is the adequate model describing the 64 equilibria on the basis of 29 components. Their analysis has revealed four endogenous ligands, forming stable complexes with Ca^{2+} : glutamate (glu), lactate (lac), citrate (cit) and adenosin-3-phosphate (ATP). Their anticoagulant properties have been confirmed by universal biological assays (m rats): plasma recalcification time (RT) and the activated partly thromboplastin time (APTT). It has been shown, that the anticoagulant activities of components were the following: lac – 500 %, ATP – 240 %, glu – 176 %, cit – 154 % in comparison with the substrate plasma 100 %.