

Е. Ю. Савчик<sup>1</sup>, Т. Б. Калинина<sup>1</sup>, И. Д. Гурвиц<sup>1</sup>, М. А. Торлопов<sup>2</sup>, Н. Н. Дрозд<sup>1</sup>,  
В. А. Макаров<sup>1</sup>, А. В. Кучин<sup>2</sup>

## ВЛИЯНИЕ СУЛЬФАТА ЦЕЛЛЮЛОЗЫ НА ИНДУКЦИЮ ГИДРОЛИЗА ХРОМОГЕННОГО СУБСТРАТА НА ПЛАЗМИН И АНТИКОАГУЛЯНТНУЮ АКТИВНОСТЬ В ПЛАЗМЕ КРОЛИКОВ

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение “Гематологический научный центр” Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Москва, Россия;

<sup>2</sup> Институт химии Коми научного центра УрО РАН, Сыктывкар, Россия

При внутривенном введении сульфата целлюлозы (молекулярная масса 10 – 30 кДа, степень сульфатирования 1,8, антитромбиновая активность 130 ± 12 ЕД/мг, анти-фактор Ха активность 45 ± 3,3 ЕД/мг) время свертывания плазмы кроликов в тестах АЧТВ, Реа-Клот-Гепарин, а также антитромбиновая, анти-фактор Ха активности плазмы, период полувыведения и время действия возрастают с увеличением дозы с 0,3 до 10 мг/кг. Сульфат целлюлозы самостоятельно не влияет на агрегацию тромбоцитов человека, так же, как и не потенцирует агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную аденозиндифосфорной кислотой, и фибринолитическую активность эуглобулиновой фракции плазмы человека *in vitro*, но способствует увеличению фибринолитической активности плазмы кроликов при внутривенном введении.

**Ключевые слова:** сульфат целлюлозы, антитромбиновая (alla) активность плазмы, анти-фактор Ха (аХа) активность плазмы, фибринолитическая активность.

Во многих странах мира интенсивно проводятся исследования по разработке новых антикоагулянтов (АК) прямого действия (активаторов плазменного ингибитора сериновых протеаз свертывающей системы крови — антитромбина) среди производных полисахаридов бактериального, растительного или животного происхождения [1]. Такие АК, наряду с антиагрегантами, фибринолитиками и АК непрямого действия — основные препараты для предотвращения и лечения тромбоэмболических нарушений у человека и млекопитающих [2]. К ним относят препараты для парентерального введения — нефракционированные гепарины (НФГ), которые вытесняются низкомолекулярными гепаринами (НМГ) и синтетическим пентасакхаридом арикстра. При внутривенном или подкожном введении высокий антикоагулянтный потенциал некоторых НМГ сочетается с выбросом из клеток эндотелия сосудов активатора плазминогена, что способствует увеличению фибринолитической активности плазмы человека или экспериментальных животных [3]. Однако у всех используемых в настоящее время в клинической практике антикоагулянтов прямого действия есть побочные эффекты [4]. А у самого современного — арикстры, несмотря на высокую избирательность антикоагулянтного действия (опосредованно ингибирует активность фактора Ха), нет специфического антидота [5]. Это может осложнять проведение терапии в некоторых случаях и приводить к кровотечениям. Для нейтрализации АК эффекта гепаринов применяют сульфат протамина [6]. Для некоторых новых ингибиторов тромбина авторы специально разрабатывали специфический антидот [7].

Цель работы — исследование антикоагулянтной активности и активности плазмина плазмы челове-

ка/кроликов (*in vitro* или *ex vivo*) при введении сульфата целлюлозы (СЦ), выделенной из растений рода *Gossypium* (хлопок).

### Экспериментальная химическая часть

Использовали хлопковую микрокристаллическую целлюлозу (МКЦ) производства АО “Полиэкс” (г. Бийск), хлорсульфоновую кислоту (ClSO<sub>3</sub>H, Мерс), этанол х.ч., NaOH ч.д.а.. Пиридин осушали с ВаО и перегоняли.

ИК-спектры образцов записывали на спектрометре “Prestige-21”, в таблетках КВг в области 700 – 4000 см<sup>-1</sup>. Спектры ЯМР снимали на спектрометре “Bruker DRX-300” (300 МГц) в D<sub>2</sub>O. Элементный анализ образцов (определение серы) в образцах СЦ осуществляли на приборе EA-1110 фирмы “CE instruments” после сжигания образца в токе кислорода с хроматографической регистрацией продуктов. Степень замещения в препаратах СЦ-Na (C<sub>3</sub>S) находили по уравнению:

$$C_3 = \frac{162\omega_s}{3200 - \omega_s \cdot 102},$$

где  $\omega_s$  — содержание серы (масс. %).

Молекулярную массу (ММ) образцов СЦ определяли с помощью ВЭЖХ. Для анализа использовали хроматографическую систему “Shimadzu” (Япония): насос LC-20AD, термостат СТО-10AS, рефрактометр RID-10A, колонка Shodex OHpac SB804 HG (8 мм × 30 см). Элюирование проводили 0,15 М NaCl при 40 °С со скоростью потока 0,3 см<sup>3</sup>/мин. Для калибровки колонки использовали образцы сульфатированных пуллуланов с ММ в диапазоне (1,3 – 800) · 10<sup>3</sup>.

## Влияние сульфата целлюлозы и НФГ на агрегационную способность тромбоцитов человека

Концентрация антикоагулянтов в плазме, мкг/мл	СЦ			НФГ		
	агрегация, %	скорость агрегации (tg $\alpha$ )	агрегация без АДФ, %	агрегация, %	скорость агрегации (tg $\alpha$ )	агрегация без АДФ, %
0	58,08 ± 4,40	6,02 ± 0,95	0	74,16 ± 2,58	9,28 ± 1,48	0
34,04	61,79 ± 7,82	5,03 ± 0,42	0	72,24 ± 4,09	8,89 ± 2,20	0,63
56,74	62,14 ± 6,89	6,79 ± 1,19	0	70,85 ± 6,51	5,20 ± 0,33	0
113,47	59,57 ± 6,71	6,58 ± 0,78	0	71,02 ± 6,82	8,39 ± 0,91	2,96
170,2	60,32 ± 5,40	5,30 ± 0,99	0	70,59 ± 4,90	5,70 ± 0,79	5,33
340,4	57,51 ± 7,10	5,74 ± 1,03	1,18	73,46 ± 4,77	6,05 ± 1,25	2,53

Среднюю степень полимеризации (СП<sub>ср</sub>) МКЦ определяли вискозиметрическим методом [8]. Приведённая вязкость ( $\eta_{\text{пр}}$ ) растворов определена с помощью вискозиметра Оствальда с диаметром капилляра 0,56 мм, при температуре 25 ± 0,2 °С. Характеристическая вязкость  $[\eta]$  рассчитана экстраполяцией  $\eta_{\text{пр}}$  при концентрации полимера  $C \rightarrow 0$ .

**Типовой синтез СЦ.** МКЦ (1,00 г; 6,17 ммоль), предварительно высушенную до постоянной массы при 103 °С, суспендировали в пиридине и оставляли на 12 ч при 60 °С. Далее полученную суспензию МКЦ охлаждали до 20 °С и прибавляли отдельно приготовленный раствор ClSO<sub>3</sub>H в пиридине (охлаждая и перемешивая пиридин, по каплям вносят трёхкратный 1,25 г, 18,51 ммоль избыток ClSO<sub>3</sub>H). Реакцию вели при 90 °С в течение 3 ч при перемешивании. Продукт отделяли на стеклянном фильтре, промывали этанолом (50 см<sup>3</sup>) и растворяли в 50 см<sup>3</sup> 4 % NaOH (рис. 1). Образовавшуюся натриевую соль СЦ (СЦ-Na) осаждали 100 см<sup>3</sup> этанола. Для окончательной очистки продукта использовали диализ через целлюлозные мембраны (Sigma-Aldrich) против дистиллированной воды. На последней стадии СЦ-Na осаждали этиловым спиртом и сушили в вакууме при 60 °С.

Выход снежно-белого порошкообразного продукта в виде натриевой соли (со степенью сульфатирования 1,7) составил 1,56 г. Продукт полностью растворим в воде, pH раствора нейтральный. ММ<sub>ср</sub> = 48 · 10<sup>3</sup>. ИК-спектр: 1240 см<sup>-1</sup>  $\nu_{\text{ас ср}}$  (S=O); 810 см<sup>-1</sup>  $\nu_{\text{в с}}$  (C–OS); 3400 см<sup>-1</sup>,  $\nu_{\text{ас}}$  (OH). ЯМР <sup>13</sup>C (D<sub>2</sub>O),  $\delta$ , м.д. (I, Гц): 100,8 (C<sub>1</sub>), 79,2 (C<sub>2</sub>-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>), 78,1, 75,1 и 73,3 (C<sub>3</sub>-C<sub>5</sub>), 66,7 (C<sub>6</sub>-OSO<sub>3</sub><sup>-</sup>).

Таблица 2

## Антифибринолитическая активность сульфата целлюлозы при лизисе фракции эглобулинов человека

Концентрация СЦ в плазме, мкг/мл	Время, мин	
	образования сгустка	лизиса сгустка
0	0,88 ± 0,07	7,87 ± 0,06
4,90	1,59 ± 0,01	10,68 ± 0,11
9,80	1,84 ± 0,04	14,86 ± 0,06
19,61	2,34 ± 0,06	21,33 ± 0,3

## Экспериментальная биологическая часть

Для определений применяли наборы отечественных (Ренам, Технология стандарт) и зарубежных (Sigma, Trinity Biotech, Roche) фирм, а также лиофильно высушенную плазму человека (НПО “Ренам”).

Специфические антикоагулянтные активности СЦ *in vitro* определяли по ингибированию расщепления тромбином или фактором Ха хромогенных субстратов (с высвобождением *n*-нитроанилида; развивающееся окрашивание фиксировали за 1 мин при  $\lambda = 405$  нм) при сравнении с Международным стандартом нефракционированного гепарина, основываясь на рекомендациях Европейской Фармакопейной статьи.

Антитромбиновую активность (аПа) СЦ оценивали по ингибированию амидолитической активности тромбина [9]. Антитромбин (Roche или Sigma; 0,125 ЕД/мг), содержащийся в 100 мкл буфера 0,05 М трис-НСl, 0,0075 М Na<sub>2</sub> — ЭДТА, 0,175 М NaCl, 2 мг/мл альбумина бычьего (Sigma), pH 8,4, инкубировали 1 мин при 37 °С с СЦ в конечной концентрации 0,1 – 1000,0 мкг/мл. Затем добавляли 50 мкл (5 ЕД/мг) раствора бычьего тромбина (Roche или Sigma) в буфере. Через 1 мин добавляли 100 мкл раствора хромогенного субстрата S-2238 (Gly-Pro-Arg-p-Na, Roche или Sigma; 1,25 мМ) и определяли остаточную активность.

Анти-фактор Ха активности (аХа) определяли по ингибированию амидолитической активности активированного фактора десять [10]. К 100 мкл 0,05 М трис-НСl, 0,0075 М Na<sub>2</sub> — ЭДТА, 0,175 М NaCl, 2 мг/мл альбумина бычьего (Sigma), pH 8,4, содержащего 1 ЕД/мл антитромбина (Sigma или Trinity Biotech) добавляли СЦ в конечной концентрации 0,1 – 1000,0 мкг/мл. Через 2 мин инкубации при 37 °С добавляли 200 мкл раствора фактора Ха (8 ЕД/мл; Sigma или Trinity Biotech). Через 2 мин инкубации при 37 °С добавляли 200 мкл хромогенного субстрата S 2222 (N-benzoyl-Ile-Gly-Arg-pNa, Trinity Biotech; 1 мМ) и определяли остаточную активность.

Агрегацию тромбоцитов человека исследовали по методу Борна [11] в 0,450 мл цитратной бедной тромбоцитами плазме человека с использованием агрегометра Chrono-Log. В качестве индуктора агрегации брали аденозиндифосфорную кислоту (Boehringer Mannheim, Австрия, конечная концентрация 2 · 10<sup>-5</sup> М). На агрегатограмме определяли макси-

мальную амплитуду кривой агрегации (в %) и угол наклона кривой агрегации ( $\text{tg } \alpha$ ).

Влияние СЦ на формирование и лизис сгустка фракции эуглобулинов плазмы человека исследовали в тесте XII-а зависимый фибринолиз [12].

Для определений *ex vivo* использовали кроликов породы шиншилла, массой 3,5 – 4,5 кг ( $n = 64$ ). Все эксперименты с животными выполняли в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF), декларацией о гуманном отношении к животным с соблюдением “Правил для проведения работ с использованием экспериментальных животных”.

Для исследования фармакодинамических параметров антикоагулянт СЦ в физиологическом растворе вводили кроликам в краевую вену уха в дозах от 0,3 до 10 мг/кг. Кровь отбирали через 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 1440 мин после введения, собирая капли

из надреза в пластиковую пробирку с 0,11 М раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. В качестве препарата сравнения применяли НФГ (“Белмедпрепарат”  $a\text{IIa} = 160 \pm 15$  ЕД/мг,  $a\text{Xa} = 145 \pm 8$  ЕД/мг). Для получения бедной тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали при 1400g в течение 20 мин. Антикоагулянтную активность плазмы кроликов определяли в коагулологических тестах активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ; оценка влияния СЦ на свертывание крови при активации фактора XII) и с помощью набора РеаКлот-Гепарин НПО “Ренам” (оценка влияния на свертывание крови при добавлении фактора Ха) [13]. Для расчета антитромбиновой ( $a\text{IIa}$ ) и анти-фактор Ха ( $a\text{Xa}$ ) активностей плазмы использовали калибровочные кривые 5-го Международного стандарта НФГ. Активность пламина плазмы кроликов после введения СЦ определяли по гидролизу хромогенного субстрата [14]. Скорость гид-

Таблица 3

**Влияние внутривенного введения сульфата целлюлозы на время свертывания в тесте АЧТВ и антитромбиновую активность плазмы кроликов**

Доза, мг/кг	I	Время после введения, мин										
		0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	1440
0	1	17,5 ± 1,2	16,6 ± 1,3	16,2 ± 1,9	17,3 ± 2	16,6 ± 0,7	16,6 ± 1,2	16,7 ± 0,9	17,2 ± 1	15,9 ± 0,9	16,7 ± 1,3	Но
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	Но
СЦ 0,3	1	17,8 ± 0,9	15,5 ± 1,2	16,6 ± 0,8	17,7 ± 0,5	18,1 ± 0,4	16,9 ± 0,3	18,5 ± 0,5	19,4 ± 1,7	19,4 ± 2,2	17,1 ± 1,5	Но
	2	0	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,01	0,01 ± 0,006	0,02 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 0,01	0,19 ± 0,17	Но
СЦ 0,5	1	14,5 ± 0,4	15,0 ± 1	16,0 ± 0,6	18,5 ± 1,7	17,5 ± 0,9	18,3 ± 1,5	18,1 ± 0,2	18,8 ± 0,9	20,7 ± 1,0	20,9 ± 1,1	Но
	2	0	0,01 ± 0,01	0,04 ± 0,04	0,05 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,02 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,26 ± 0,15*	0,14 ± 0,14	0,08 ± 0,08	Но
СЦ 1,0	1	19,3 ± 3,8	20 ± 2,6	21,6 ± 3,3	18,2 ± 1,1	19,5 ± 3,3	18,8 ± 2,4	19,5 ± 2,8	20,7 ± 2,8	19,8 ± 2,6	20,4 ± 2,8	Но
	2	0	0,15 ± 0,07*	0,1 ± 0,04*	0,07 ± 0,04	0,11 ± 0,05*	0,17 ± 0,04*	0,17 ± 0,05*	0,2 ± 0,05*	0,11 ± 0,04*	0,16 ± 0,05*	Но
СЦ 1,5	1	18,2 ± 1,2	23,3 ± 2,3	19,1 ± 2,3	18,5 ± 2,5	19,5 ± 2,1	21,3 ± 3,6	20,0 ± 3,5	22,1 ± 2,8	21,1 ± 2,6	20,7 ± 3,6	Но
	2	0	0,09 ± 0,08	0,1 ± 0,06	0,08 ± 0,07*	0,07 ± 0,03*	0,14 ± 0,07*	0,2 ± 0,15*	0,28 ± 0,12*	0,22 ± 0,12*	0,19 ± 0,12*	Но
СЦ 3,0	1	20,4 ± 1,9	25,7 ± 3,7	24,3 ± 2,7	23,2 ± 2,7	22,1 ± 2,9	22,4 ± 2,5	22,8 ± 2,2	23,6 ± 2,9	21,0 ± 1,5	21,5 ± 2,1	Но
	2	0	0,07 ± 0,07	0,13 ± 0,06*	0,32 ± 0,12*	0,25 ± 0,09*	0,3 ± 0,1*	0,25 ± 0,04*	0,3 ± 0,08*	0,47 ± 0,09*	0,5 ± 0,14*	Но
СЦ 5,0	1	21,4 ± 1,9	411,4 ± 71,7*	390,8 ± 83,7*	376,1 ± 48,2*	394,5 ± 32,1*	436,2 ± 84,6*	381,5 ± 50,2*	293,8 ± 41*	236,6 ± 13,1*	67,7 ± 6,6*	39,6 ± 5,4*
	2	0	2,61 ± 0,57*	2,73 ± 0,34*	2,76 ± 0,21*	2,85 ± 0,12*	2,98 ± 0,33*	2,78 ± 0,24*	2,02 ± 0,37*	1,31 ± 0,21*	0,41 ± 0,06*	0,02 ± 0,02*
СЦ 10,0	1	22,8 ± 0,9	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	> 300	26,1 ± 1,2	26,1 ± 1,7	25,7 ± 1,5	41,8 ± 4,9
	2	0	4,3 ± 1,2*	4,2 ± 0,8*	4,5 ± 0,7*	3,9 ± 1,1*	3,6 ± 1,2*	2,1 ± 0,6*	0,8 ± 0,3*	0,8 ± 0,5*	0,7 ± 0,4*	0,3 ± 0,06*
НФГ 5,0	1	21 ± 1,2	> 120	> 120	> 120	> 120	34,2 ± 4,8*	27 ± 1,8*	23,4 ± 1,2	21,2 ± 1,1	Но	Но
	2	0	3,82 ± 0,66*	2,54 ± 0,54*	1,66 ± 0,11*	0,85 ± 0,10*	0,25 ± 0,05*	0,21 ± 0,08*	0,05 ± 0,02	Но	Но	Но

I — тип измерения; 1 — время свертывания плазмы кроликов в тесте АЧТВ, с; 2 — антитромбиновая активность плазмы, ЕД/мл; \* ( $p < 0,05$ ) достоверность различий с показателями при 0 мин; НО — не определяли, в случае отсутствия различий предыдущих показаний с показателями через 0 мин после введения;  $n = (6 - 9)$ .

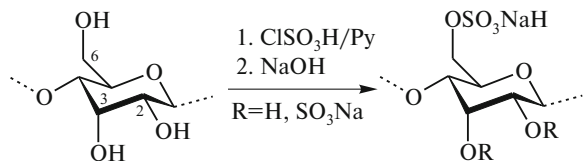


Рис. 1. Схема синтеза СЦ.

ролиза хромогенного субстрата на плазмин образцами плазмы кроликов, отобранной в различные интервалы времени после внутривенного введения (в/в) СЦ в дозах 0,5, 1,5 и 3 мг/кг, определяли спектрофотометрически при длине волны 405 нм. К 500 мкл разбавленной в 15 раз исследуемой бедной тромбоцитами плазме добавляли 500 мкл раствора стрептокиназы, далее смесь инкубировали в течение 5 мин при 37 °С, после чего добавляли 100 мкл хромогенного субстрата.

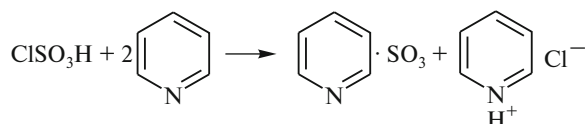


Рис. 2. Схема образования комплекса SO<sub>3</sub>-пиридин.

Результаты исследования представлены как средние арифметические значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего арифметического. Для определения связи между 2 признаками в рядах экспериментальных данных использовали корреляционный анализ. Различия считали достоверными при значении  $p < 0,05$ . Статистическую обработку данных проводили, используя параметрический *t*-критерий Стьюдента в программах Biostat, SSPS, StagraphicsPlus.

Таблица 4

Влияние внутривенного введения сульфата целлюлозы на время свертывания в тесте РеаКлот-гепарин и анти-фактор Ха активность плазмы кроликов

Доза, мг/кг	I	Время после введения, мин										
		0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	1440
0	1	13 ± 0,1	12,8 ± 1,1	14,7 ± 1,4	12,9 ± 1	13,3 ± 0,8	13,3 ± 1,5	14,2 ± 1,6	15,7 ± 2	13,9 ± 1,3	17,9 ± 0,9	Но
	2	0	0,021 ± 0,014	0,028 ± 0,018	0	0,023 ± 0,013	0	0,053 ± 0,023	0,021 ± 0,011	0,029 ± 0,021	0,052 ± 0,034	Но
СЦ 0,3	1	15,5 ± 1,1	18,6 ± 1,2	17,1 ± 1,2	17,8 ± 0,4	14,8 ± 1,4	14,3 ± 1,2	16 ± 1,6	15,6 ± 1,1	15 ± 1,3	17,3 ± 1,3	Но
	2	0	0,064 ± 0,037	0,045 ± 0,031	0,041 ± 0,032	0	0,053 ± 0,032	0,119 ± 0,05	0,139 ± 0,06	0,209 ± 0,03	0,08 ± 0,04	Но
СЦ 0,5	1	18,3 ± 0,4	17,9 ± 1,2	20,2 ± 1,8	20,1 ± 1,9	20,4 ± 2,0	21,1 ± 1,7	20,1 ± 1,6	21,9 ± 2,6	23,1 ± 2,3	22,2 ± 1,3	18,3 ± 0,4
	2	0	0,02 ± 0,01	0,08 ± 0,04	0,09 ± 0,04	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,04	0,13 ± 0,05	0,13 ± 0,02	Но
СЦ 1,0	1	13,8 ± 0,8	14,6 ± 0,6	15 ± 0,5	13,4 ± 0,7	12,6 ± 0,3	15,9 ± 2,6	16,5 ± 1,6	17,3 ± 1,2	19,6 ± 1,2	15,9 ± 3,4	Но
	2	0	0,062 ± 0,035	0,041 ± 0,036	0,058 ± 0,03	0,061 ± 0,025	0,066 ± 0,038	0,103 ± 0,034	0,058 ± 0,037	0,098 ± 0,031	0,125 ± 0,041	Но
СЦ 1,5	1	16,6 ± 1,1	18,8 ± 1,8	16,9 ± 0,7	16,9 ± 0,5	17,2 ± 0,6	17,0 ± 1,1	18,6 ± 0,6	16,8 ± 1,1	19,4 ± 0,4	21,0 ± 1,9	Но
	2	0	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,09	0,15 ± 0,00	0,17 ± 0,03	0,11 ± 0,04	0,09 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,14 ± 0,00	0,14 ± 0,03	Но
СЦ 3,0	1	14,5 ± 1,0	14,4 ± 1,6	20,2 ± 5,0	19,0 ± 1,8	21,8 ± 4,2	18,2 ± 1,9	16,8 ± 0,6	16,2 ± 1,2	18,1 ± 0,8	19,6 ± 2,6	Но
	2	0	0,087 ± 0,047	0,228 ± 0,118	0,092 ± 0,046	0,155 ± 0,078	0,113 ± 0,061	0,137 ± 0,072	0,313 ± 0,102	0,215 ± 0,126	0,475 ± 0,021	Но
СЦ 5,0	1	17,3 ± 1,2	241,2 ± 31,6*	252,8 ± 17,8*	236,6 ± 33,2*	284,4 ± 27,3*	217,1 ± 20,4*	211,5 ± 22,4*	188,4 ± 16,2*	165,6 ± 7,7*	25,9 ± 7	28,8 ± 5,8
	2	0	2,31 ± 0,39*	2,37 ± 0,37*	2,25 ± 0,48*	2,56 ± 0,37*	1,62 ± 0,49*	1,25 ± 0,34*	1,23 ± 0,26*	0,87 ± 0,1*	0,26 ± 0,09*	0,26 ± 0,08*
СЦ 10,0	1	18,1 ± 1	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	> 200	19,5 ± 1,1	30,1 ± 2,1
	2	0	5,7 ± 0,2*	5,4 ± 0,5*	5,4 ± 0,2*	5,6 ± 0,3*	5,3 ± 0,2*	4,2 ± 0,7*	3,5 ± 0,5*	2,4 ± 0,3*	1,6 ± 0,6*	0,3 ± 0,02*
НФГ 5,0	1	19,9 ± 2,6	116,1 ± 35,7*	82,3 ± 11,8*	52,4 ± 14,3*	45,7 ± 9,0*	30,8 ± 4,2*	16,4 ± 2,8	13,2 ± 0,8	11,6 ± 0,2	Но	Но
	2	0	1,55 ± 0,27*	1,17 ± 0,29*	0,88 ± 0,16*	0,53 ± 0,13*	0,39 ± 0,11*	0	0	0	Но	Но

I — тип измерения; 1 — время свертывания плазмы кроликов в тесте РеаКлот-гепарин, с; 2 — анти-фактор Ха активность плазмы, ЕД/мл; \* ( $p < 0,05$ ) достоверность различий с показаниями при 0 мин; НО — не определяли, в случае отсутствия различий предыдущих показаний с показаниями через 0 мин после введения;  $n = (6 - 9)$ .

## Результаты и их обсуждение

Использование системы  $\text{ClSO}_3\text{H}$  — пиридин для сульфатирования целлюлозы позволяет получать СЦ с различной степенью замещения, вплоть до предельной [15]. Следует уточнить, что сульфатирующим агентом при использовании этой смеси является не хлорсульфоновая кислота, а комплекс серного ангидрида и пиридина (рис. 2), образующийся при контролируемом прибавлении хлорсульфоновой кислоты к третичному амину.

Полученный сульфатированный полисахарид, представляет собой линейный полимер, построенный из остатков  $\beta\text{-D-Glc}$ , гидроксильные группы которого этерифицированы остатками серной кислоты. По данным ЯМР спектроскопии этерификация легче происходит при С6 — атоме элементарного ангидроглюкозного звена. Доступность реакционных центров при С2, С3 и С6-атомах элементарного звена характеризуется рядом  $\text{С6} > \text{С2} > \text{С3}$ , по этой причине сульфатирование при С3-атоме происходит в большей степени только после исчерпывающей этерификации остальных реакционных центров. Таким образом, для представленных образцов СЦ сульфатные группы распределены в основном между С2 и С6-атомами элементарного звена. Степень замещения образцов СЦ колебалась от 0,8 до 2,5,  $\text{MM}_{\text{cp}}$   $30 \times 10^3$  до  $60 \times 10^3$ .

Исследования *in vitro*. Антитромбиновая активность исследованного соединения сравнима с таковой для НФГ и выше, чем у используемых НМГ [2]; однако эффективность ингибирования активности фактора Ха в 3 раза ниже, чем у НФГ и НМГ. Известно, что антикоагулянтная активность НФГ лучше нейтрализуется, хоть и не высоко специфичным сульфатом протамина, за счет большей, чем у НМГ, степени сульфатирования [16, 17]. Поэтому, вероятность эффективного действия сульфата протамина на антикоагулянтную активность СЦ велика.

В настоящей работе оценивали влияние СЦ на агрегацию тромбоцитов человека, вызванную АДФ (*in vitro*). Концентрации исследуемого соединения в плазме составляют 34,04 – 340,4 мкг/мл (что соответствует концентрации АК в плазме при внутривенном введении экспериментальным животным в дозах 1 – 10 мг/кг). СЦ не потенцирует агрегацию тромбоцитов человека, индуцированную АДФ, не влияет на скорость агрегации кровяных пластинок и не вызывает самостоятельно агрегации тромбоцитов (табл. 1). Од-

нако НФГ в концентрациях 113,5 – 340,4 мкг/мл самостоятельно вызывает агрегацию тромбоцитов. Следует отметить, что такие концентрации в плазме соответствуют весовым дозам 3 – 10 мг/кг, а в единицах активности против тромбина — от 300 до 1000 ЕД/кг, но это много больше, чем требуется для терапевтического эффекта при однократном внутривенном (в/в) введении [18].

С увеличением концентрации СЦ в плазме человека от 4,9 до 19,6 мкг/мл в тесте XIIa-зависимый фибринолиз возрастают как время образования, так и время лизиса сгустка (табл. 2).

Исследования *ex vivo*. С увеличением дозы СЦ от 0,3 до 10 мг/кг увеличивается время свертывания плазмы кроликов в тесте АЧТВ на 5-й минуте после введения с  $15,5 \pm 1,2$  с до  $411,4 \pm 71,7$  с и более (табл. 3). Через 300 мин после введения в дозах 0,3 – 3 мг/кг действие АК достоверно заканчивается. Период полувыведения до 255 мин и время действия  $> 300$  мин наблюдается при дозе 5 мг/кг. Необходимое увеличение времени свертывания плазмы кроликов в 2 – 2,5 раза (в сравнении с контролем) и увеличение антитромбиновой активности до терапевтических величин (0,35 – 0,7 ЕД/мл) наблюдается в диапазоне доз 3 – 5 мг/кг.

Время свертывания плазмы экспериментальных животных в тесте РеаКлот-гепарин возрастает с увеличением дозы с 0,3 до 10 мг/кг (табл. 4). Через 5 мин после введения СЦ в наименьшей и одной из наибольших доз время свертывания составляет  $18,6 \pm 1,2$  с и  $241,2 \pm 31,6$  с соответственно. При введении в диапазоне доз 0,3 – 3 мг/кг не отмечается достоверного увеличения АК эффекта в 2 – 2,5 раза, в сравнении с контролем. Однако при введении в дозе 5 мг/кг на 5 – 240 мин после введения время свертывания плазмы увеличивалось в 10 – 14 раз.

Следует отметить, что антитромбиновая активность СЦ больше анти-фактор Ха активности в 3 раза, но при введении кроликам мы наблюдаем практически одинаковую антикоагулянтную активность плазмы ( $2,98 \pm 0,33$  –  $4,3 \pm 1,2$  аПа ЕД/мл и  $2,56 \pm 0,37$  –  $5,7 \pm 0,2$  аХа ЕД/мл при дозах 5 и 10 мг/кг) через 5 – 30 мин после введения. Это может свидетельствовать о том, что такое производное целлюлозы способствует увеличению активности, например, ингибитора пути тканевого фактора, за счет чего аХа активность возрастает. Подобный эффект некоторые авторы на-

Таблица 5

**Влияние внутривенного введения сульфата целлюлозы на оптическую плотность при гидролизе хромогенного субстрата на плазмин образцами плазмы кроликов**

Доза, мг/кг	Концентрация в плазме, мкг/мл	Время после введения, мин					
		0	5	10	15	30	60
0,5 СЦ	18	$0,0438 \pm 0,0021$	$0,0697 \pm 0,0031^*$	$0,0939 \pm 0,0027^*$	$0,0695 \pm 0,0029^*$	$0,0411 \pm 0,0055$	НО
1,5 СЦ	54	$0,0450 \pm 0,0042$	$0,1482 \pm 0,0084^*$	$0,1158 \pm 0,0096^*$	$0,1038 \pm 0,005^*$	$0,0468 \pm 0,0021$	НО
3,0 СЦ	108	$0,0411 \pm 0,0078$	$0,1392 \pm 0,0172^*$	$0,2352 \pm 0,0211^*$	$0,1098 \pm 0,0274^*$	$0,0762 \pm 0,0174^*$	$0,0516 \pm 0,0178$

\* достоверность различий ( $p < 0,05$ ) с показаниями при 0 мин; НО — не определяли, так как показания на 30 мин после введения с показаниями через 0 мин после введения не различаются;  $n = (6 - 8)$  — число животных на 1 дозу.

блюдали для ряда сульфатированных полисахаридов и особенно для НМГ [19–21].

Кроме этого, можно заметить, что пик антитромбиновой активности плазмы после введения СЦ в дозе 5 мг/кг продолжается 2 ч после введения, и максимальная величина аХа активности продолжается до 1 ч. И даже через 5 ч антитромбиновая активность достигает терапевтической величины. При в/в введении НФГ в дозе 5 мг/кг (для сравнения) по влиянию на время свертывания в тесте АЧТВ эффект заканчивался через 3 ч, а по РеаКлот — гепарин — через 2 ч (табл. 3 и 4), несмотря на то, что сила АК эффекта в первый час после введения в несколько раз больше, чем при введении СЦ. То есть, мы наблюдали для СЦ картину выведения АК, отличную от таковой для НФГ, что может свидетельствовать о некоторых различиях в механизме фармакологического действия этих соединений.

Похожий профиль выведения с длительностью эффекта до 12 ч после введения наблюдали при подкожном введении мышам СЦ (источник выделения не указан) в дозе 0,6 мг/кг [22].

При анализе амидолитической активности плазмы кроликов, полученной после введения полисахарида, по отношению к хромогенному субстрату на плазмин наблюдается достоверное увеличение скорости гидролиза с увеличением дозы (табл. 5). Через 5 мин после введения в дозах 0,5, 1,5 и 3 мг/кг (что соответствует 18, 54 и 108 мкг/мл концентрациям в плазме кролика) изменение оптической плотности за 1 мин составляет  $0,070 \pm 0,003$ ,  $0,148 \pm 0,008$  и  $0,139 \pm 0,017$  соответственно. Через 10 мин после введения в дозах 0,5, 1,5 и 3 мг/кг изменения оптической плотности за 1 мин достигают  $0,094 \pm 0,003$ ,  $0,116 \pm 0,009$ ,  $0,235 \pm 0,021$ .

Таким образом, при в/в введении исследованного СЦ кроликам фибринолитическая активность плазмы увеличивается в 2–2,5 раза. Известно, что введение сульфатированных полисахаридов разного происхождения экспериментальным животным, а также НФГ и НМГ человеку провоцируют снижение активности ингибитора активатора пламиногена первого типа, увеличение выброса из клеток эндотелия сосудов активатора пламиногена, вследствие чего активность пламина возрастает [23–25].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской академии наук (программа Президиума РАН

“Фундаментальные науки — медицине”, проект № 09-П-3 – 1024).

## ЛИТЕРАТУРА

1. I. Groth, N. Grunewald, S. Alban, *Glycobiology*, **19**(4), 408–417 (2009).
2. M. P. Bonaca, P. G. Steg, L. J. Feldman, et al., *J. Am. Coll. Cardiol.*, **54**(11), 969–984 (2009).
3. S. V. Pham, P. C. Pham, P. M. Pham, et al., *Drug Des. Devel. Ther.*, **7**(4), 203–220 (2010).
4. N. Rosencher, L. Bellamy, L. Arnaout, *Arch. Cardiovasc. Dis.*, **102**(4), 327–333 (2009).
5. D. W. Harrington, *Hosp. Pract. (Minneapolis)*, **38**(4), 18–28 (2010).
6. M. Schroeder, J. Hogwood, E. Gray, et al., *Anal. Bioanal. Chem.*, **399**(2), 763–771 (2011).
7. J. van Ryn, J. Stangier, S. Haertter, *Thromb. Haemost.*, **103**(6), 116–127 (2010).
8. Л. С. Болотникова, С. Н. Данилов, Т. И. Самсонова, *Ж. приклад. химии*, **1**, 176–180 (1966).
9. Teien and M. Lie, *Thromb. Res.*, **10**(3), 399–410 (1977).
10. Teien, M. Lie, U. Abildgaard, *Thromb. Res.*, **8**(3), 413–416 (1976).
11. G. V. Born, *Nature*, **194**(4), 927–929 (1962).
12. Г. Ф. Еремин, А. П. Архипова, в кн.: *Система регуляции агрегатного состояния крови в норме и патологии*, Москва, Медицина (1982), сс. 129–132.
13. S. M. Bates, J. I. Weitz, *Circulation*, **112**(4), 53–60 (2005).
14. F. Markwardt, H. Klocking, *Haemostasis*, **6**(6), 370–374 (1977).
15. М. А. Торлопов, С. В. Фролова, В. А. Демин, *Химия в интересах устойчивого развития*, **4**, 491–496 (2007).
16. C. P. Dietrich, S. K. Shinjo, F. A. Moraes, *Semin. Thromb. Hemost.*, **25**(Suppl 3), 43–50 (1999).
17. J. Holst, B. Lindblad, D. Bergqvist, et al., *Blood Coagul. Fibrinolysis*, **5**(5), 795–803 (1994).
18. J. W. Eikelboom, J. Hirsh, *Thromb. Haemost.*, **96**(5), 547–552 (2006).
19. A. Demirkan, A. Mesut, S. Aykut, N. Kutlay, *Nephron.*, **91**(3), 162–163 (2002).
20. J. Holst, B. Lindblad, D. Bergqvist, et al., *Thromb. Res.*, **86**(4), 343–348 (1997).
21. Q. Ma, M. Tobu, C. Schultz, et al., *Thromb. Res.*, **119**(5), 653–661 (2007).
22. Z. M. Wang, L. Li, B. S. Zheng, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **41**(4), 376–382 (2007).
23. F. Markwardt, H. P. Klocking, *Haemostasis*, **6**(6), 370–374 (1977).
24. P. Andrade-Gordon, S. Strickland, *Biochemistry*, **25**(14), 4033–4040 (1986).
25. N. Shafiq, S. Malhotra, P. Pandhi, et al., *Pharmacology*, **78**(3), 136–143 (2006).

Поступила 09.03.11

## EFFECT OF CELLULOSE SULFATE ON THE INDUCTION OF HYDROLYSIS OF PLASMIN-SPECIFIC CHROMOGENIC SUBSTRATE AND ANTICOAGULANT ACTIVITY IN RABBIT BLOOD PLASMA

E. Yu. Savchik<sup>1</sup>, T. B. Kalinina<sup>1</sup>, I. D. Gurvits<sup>1</sup>, M. A. Torloпов<sup>2</sup>, N. N. Drozd<sup>1</sup>, V. A. Makarov<sup>1</sup>, and A. V. Kuchin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, 125167, Russia

<sup>2</sup> Institute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar, Komi Republic, Russia

Rabbit plasma coagulation time in the APTT and ReaClot-heparin tests, antithrombin and anti-factor Xa activities of plasma, and the effective half-life and operation time increase with the dose (0.3 to 10 mg/kg, i.v.) of injected cellulose sulfate (molecular mass, 10–30 kD; sulfation degree, 1.8; antithrombin activity,  $130 \pm 12$  IU/mg; anti-factor Xa activity,  $45 \pm 3.3$  IU/mg). Cellulose sulfate studied independently neither influences human platelet aggregation nor potentiates adenosinediphosphate-induced platelet aggregation and fibrinolytic activity of plasma euglobulin fraction *in vitro*, but it favors an increase in the fibrinolytic activity of plasma upon intravenous injection in rabbits.

**Key words:** Cellulose sulfate, fibrinolytic activity