

© Коллектив авторов, 2018
УДК 612.115.3:612.115.064

Оберган Т.Ю., Ляпина М.Г., Успенская М.С., Ляпина Л.А.

Особенности влияния гепариноида из пиона совместно с аргинином на растворение венозных тромбов у крыс

ФГБОУВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119234, г. Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1, строение 12

Цель исследования. Изучить влияние сочетанного применения гепариноида из пиона молочноцветкового, обладающего антикоагулянтным и фибринолитическим действием, и аргинина, улучшающего реологические свойства крови, на процессы фибрино- и тромбообразования, вызванные введением тромбoplastина. **Методика.** Эксперименты выполнены на крысах-самцах Вистар ($n = 36$) массой 200—220 г. Процессы фибринообразования с последующим тромбообразованием вызывали внутривенным введением 0,4 мл 1% бычьего тромбoplastина (модель тромбообразования — МТ). Для изучения эффективности сочетанного подкожного применения препаратов определяли антикоагулянтную и фибриндеполимеризационную активность каждого препарата в отдельности. За 30 мин до введения смеси гепариноида с аргинином (в соотношении 1:4 по весу) внутривенно вводили тромбoplastин. Контролем служили животные, которым вводили физиологический раствор в том же объеме и в аналогичных условиях опыта. **Результаты.** Установлено в условиях *in vitro*, что препарат, включающий гепариноид из корней пиона молочноцветкового и аргинин при весовом соотношении 1:4, обладал антикоагулянтной и собственной фибриндеполимеризационной активностью. При подкожном введении этого препарата в минимальных дозах (0,05 мг на 200 г массы тела) в крови крыс повышались антикоагулянтная, суммарная, неферментативная и ферментативная фибринолитическая активность и снижалась до нормальных значений концентрация фибриногена. На модели крыс с тромбообразованием, вызываемым введением тканевого тромбoplastина, показан антитромботический и тромболитический эффекты исследуемого препарата. Впервые показано, что применение этого препарата через 30 мин после начала тромбообразования у крыс препятствовало развитию процессов тромбообразования или даже способствовало растворению свежих образующихся фибриновых сгустков. **Заключение.** Сочетанное применение гепариноида из пиона с аргинином в минимально действующих дозах усиливает деполимеризацию фибрина и препятствует процессам тромбообразования. Исследование может служить экспериментальным обоснованием применения препаратов при тромботических осложнениях с целью благоприятного воздействия на растворение свежих только что образующихся тромбов.

Ключевые слова: гепариноид из пиона; аргинин; деполимеризация фибрина; антитромботические препараты.

Для цитирования: Оберган Т.Ю., Ляпина М.Г., Успенская М.С., Ляпина Л.А. Особенности влияния гепариноида из пиона совместно с аргинином на растворение венозных тромбов у крыс. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2018; 62(1): 36—40. DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.36-40

Для корреспонденции: Ляпина Людмила Анисимовна, доктор биол. наук, гл. науч. сотр., каф. физиологии человека и животных, лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова, биологический факультет, МГУ им. М.В. Ломоносова, e-mail: lyapinal@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 10.05.2017

Obergan T.Yu., Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Lyapina L.A.

Features of the effect of peony heparinoid combined with arginine on dissolution of venous thrombi in rats

M.V. Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1, Bldg 12, Moscow 119234, Russian Federation

The aim was to study the efficacy of a combination of a heparinoid from *Paeonia lactiflora* roots, which exerts anticoagulant and fibrinolytic effects, and arginine, which improves blood rheologic properties, in fibrin and thrombus formation induced by administration of thromboplastin. **Methods.** Experiments were performed on male Wistar rats ($n = 36$) weighing 200—220 g. Processes of fibrin formation with subsequent thrombosis were induced by administration of 1% bovine thromboplastin (0.4 ml, i.v.) (thrombosis model, МТ). To study the effect of the combined subcutaneous treatment, minimum fibrin depolymerizing and anticoagulant activity of each drug was evaluated individually. Thromboplastin was injected 30 minutes prior to administration of the heparinoid and arginine mixture (weight ratio 1:4). Animals receiving saline in the

same amount and under similar experimental conditions served as controls. **Results.** Co-administration of heparinoid and arginine at minimum doses (0.05 mg) stimulated fibrin depolymerization and anticoagulant effects of each drug and did not increase the risk of bleeding. **Conclusion.** The combined use of peony heparinoid with arginine at minimum active doses increased fibrin depolymerization and prevented thrombosis. The study can serve as an experimental justification for using these drugs in thrombotic complications to favorably influence dissolution of fresh, recently formed blood clots.

Keywords: peony heparinoid; arginine; fibrin depolymerization; antithrombotic drugs.

For citation: Obergan T.Yu., Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Lyapina L.A. Features of the effect of heparinoid from the pion together with arginine on the dissolution of venous thrombi in rats. *Patologicheskaya Fiziologiya i Experimental'naya terapiya (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2018; 62(1): 36–40. (in Russian). DOI: 10.25557/0031-2991.2018.01.36-40

For correspondence: Ludmila A. Lyapina, Doctor of Biological Sciences, Chief Researcher, Head of Laboratory of protective systems of blood name prof. B.A. Kudrjashov, Federal Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Leninsky gory, 1, str. 12, Moscow, 119234, Russian Federation, e-mail: lyapinal@mail.ru

Information about authors:

Obergan T.Yu., <http://www.orcid.org/0000-0002-3760-3943>

Lyapina M.G., <http://www.orcid.org/0000-0001-6039-5161>

Uspenskaya M.S., <http://www.orcid.org/0000-0002-5368-4026>

Lyapina L.A., <http://www.orcid.org/0000-0002-8983-652X>

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Received 10.05.2017

Введение

Процессы тромбообразования сопутствуют многим заболеваниям, в том числе сердечно-сосудистым, сахарному диабету, метаболическому синдрому и др. Современные патофизиологические представления о возникновении в организме предпосылок для процессов образования фибрина с последующим переходом в тромбозы [1] диктуют необходимость поиска нетоксичных противотромботических препаратов, сочетающих ряд свойств — антикоагулянтных, фибринолитических и антитромбоцитарных [2]. Такими свойствами обладают растительные компоненты гликозаминогликановой природы [3, 4]. С другой стороны, известно также, что аминокислота аргинин оказывает влияние на улучшение противосвертывающего потенциала крови и сосудистого тонуса организма вследствие выхода из сосудистого эндотелия противотромботических веществ [5, 6]. В настоящее время известна способность веществ животного и растительного происхождения проявлять антикоагулянтную активность [7—12]. Кроме того, в некоторых растениях [13] выявлены компоненты, снижающие концентрацию фибриногена крови, усиливающие ее фибринолиз, активность антитромбина III, а также снижающие агрегацию тромбоцитов.

Изучена функциональная активность гепариноида из пиона молочнокветкового, которая играет важную роль в восстановлении противосвертывающего потенциала крови при развитии гиперкоагуляции [14].

Цель исследования — изучение сочетанного применения гепариноида из корней пиона молочнокветкового, обладающего антикоагулянтным и фибринолитическим действием, и аргинина, улучшающего реологические свойства крови, на процессы фибринообразования, вызванные введением тканевого тромбопластина.

Методика

В исследованиях применялся полученный нами гепариноподобный препарат (гепариноид) из корней молочнокветкового пиона (ГП) [14]. Уровень гепарина в препарате гепариноида определен амидолитическим методом.

Опыты проведены на 75 белых крысах-самцах Wistar массой 200—220 г. Все эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург 15.06.2006). Животные содержались в стандартных условиях вивария на обычном лабораторном рационе при свободном доступе к воде и пище. Поставлено 2 серии экспериментов. В первой серии определяли *in vitro* процессы фибринообразования и влияние на них смеси гепариноида из пиона совместно с аргинином в соотношении 1:4 по весу. Для характеристики параметров плазмы крови готовили нестабилизированные фактором XIIIa фибриновые

пластины, на которые наносили отдельно по 0,05 мл гепариноида в концентрации 0,05 мкг (по гепарину), аргинина в концентрации 0,2 мкг и их смеси, содержащей 0,05 мкг гепарина и 0,2 мкг аргинина. Контролем служили образцы, содержащие физиологический раствор. После 2 ч инкубации проб при 37°C в течение 2 ч производили измерение фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) препаратов по зонам лизиса на нестабилизированном фибрине. Во второй серии в экспериментах использовано 65 крыс. В условиях *in vivo* изучали образование фибрина в процессе тромбообразования, которое вызывали введением тромбопластина (модель тромбообразования — МТ). Эффективность сочетанного применения препаратов оценивали по антикоагулянтной и фибриндеполимеризационной активности каждого препарата. Тромбообразование вызывали внутривенным введением каждой крысе по 0,4 мл 1%-ного бычьего тромбопластина. Через 30 мин после этого животным опытной группы (группа 4) подкожно вводили смесь гепариноида с аргинином, содержащую по 10 мкг гепарина и 40 мкг аргинина в 0,2 мл физиологического раствора NaCl. Контролем служили животные (группа 1), которые получали вместо смеси физиологический раствор в том же объеме и тем же способом. Животным группы 2 вводили гепариноид, содержащий в 0,2 мл 10 мкг гепарина, группы 3 — аргинин, содержащий 40 мкг в 0,2 мл. Животным группы 5 (Норма) не делали никаких инъекций. Кровь брали из *vena jugularis* через 60 мин после введения крысам смеси или ее составных частей. В качестве консерванта использовали 3,8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Кровь центрифугировали при 3000g в течение 10—12 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы.

В плазме крови определяли следующие биохимические параметры гемостаза: всю суммарную фибринолитическую активность (СФА), неферментативную (НФ) и ферментативную (ФФ) фибринолитическую активность на нестабилизированных фибриновых пластинах и антикоагулянтную активность по

тесту активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ). Кроме того, проводили измерение концентрации фибриногена [15].

Все данные обработаны статистически с применением непараметрического критерия Вилкоксона (программа Statistica 6).

Результаты и обсуждение

В первой серии экспериментов (табл. 1) в условиях *in vitro* установлена высокая ФДПА смеси гепариноида с аргинином, которая проявлялась в максимальной степени по сравнению с ее составными частями. Кроме того, ФДПА смеси практически обуславливала всю СФА. Антикоагулянтная активность в присутствии плазмы крови здоровых крыс была наивысшей в смеси гепариноида с аргинином.

Во второй серии экспериментов (табл. 2) у животных группы 1 (контроль) через 60 мин после инъекции физиологического раствора на фоне введения тромбопластина наблюдалось развитие состояния повышенной свертываемости крови по сравнению с Нормой (группа 5): снижались антикоагулянтная активность (по тесту АЧТВ) на 56% и фибринолитическая активность, а именно, СФА — на 107%, НФ — на 303%, ФФ — на 40%, повышалась концентрации фибриногена плазмы на 27%. В группах 2 (введение гепариноида) и 3 (введение аргинина) на фоне введения тромбопластина выявлено повышение АЧТВ на 30% и 8,5%, СФА — на 41% и 12%, НФ — на 92% и 23%, ФФ — на 24% и 9% соответственно по сравнению с контролем (группа 1). У опытной группы 4 отмечалось полное восстановление свертываемости крови: АЧТВ резко увеличилось на 40%, СФА, НФ и ФФ — на 107%, 342% и 26% соответственно по сравнению с соответствующими образцами плазмы контрольной группы 1.

Таким образом, на МТ у крыс сочетанное применение гепариноида из пиона совместно с аргинином привело к усилению противосвертывающих эффектов

Таблица 1

Сочетанное влияние гепариноида из пиона и аргинина на процессы фибринообразования в условиях *in vitro* (M ± m)

Препараты	АЧТВ, с + плазма крыс	СФА, мм ²	ФДПА, мм ²		ФФ, мм ²
			Без плазмы крови		
Контроль — физ. р-р (n = 7)	36,2 ± 2,2	0,5 ± 0,1	0,3 ± 0,0		0,0 ± 0,0
Гепариноид (n = 7)	40,0 ± 1,8*	2,4 ± 0,3*	2,4 ± 2,0**		0,0 ± 0,0
Аргинин (n = 6)	36,7 ± 1,7	0,9 ± 0,1	0,0 ± 0,0		0,0 ± 0,0
Опыт — гепариноид + аргинин (n = 7)	45,6 ± 0,7**	48,8 ± 1,8**	48,6 ± 0,7**		0,2 ± 0,05

Примечание. АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время, собственная СФА — суммарная фибринолитическая активность, собственная ФДПА — фибриндеполимеризационная активность, ФФ — ферментативный фибринолиз; * — p<0,05; ** — p<0,01 — по сравнению с контролем 1

Таблица 2

Влияние сочетанного применения гепариноида из пиона и аргинина на процессы фибринообразования на фоне введенного тромбoplastина крысам (модель тромбообразования) в условиях *in vivo* ($M \pm m$)

Вводимые препараты на фоне тромбoplastина	АЧТВ, с	СФА, мм ²	НФ, мм ²	ФФ, мм ²	Ф, мг%
Группа 1 (контроль) — физиологический раствор (n = 8)	22,1 ± 1,3 (100%)	10,1 ± 2,4 (100%)	2,6 ± 0,1 (100%)	7,5 ± 1,8 (100%)	380 ± 12,4 (100%)
Группа 2 — гепариноид (n = 7)	28,9 ± 1,5* (130%)	14,3 ± 1,4* (141%)	5,0 ± 0,7** (192%)	9,3 ± 0,9* (124%)	310 ± 10,0 * (81%)
Группа 3 — аргинин (n = 7)	24,0 ± 1,0 (108,5%)	11,4 ± 0,9 (112%)	3,2 ± 0,7** (123%)	8,2 ± 0,5* (109%)	356 ± 11,5 (93%)
Группа 4 (опыт) — гепариноид + аргинин (n = 8)	31,1 ± 0,9** (140%)	21,0 ± 1,3** (207%)	11,5 ± 1,1** (442%)	9,5 ± 1,0* (126%)	288 ± 9,8** (75%)
Группа 5 (Норма) — без препаратов (n = 8)	32,5 ± 1,5** (146%)	21,0 ± 0,4** (207%)	10,5 ± 0,9** (403%)	10,5 ± 2,0* (140%)	280,0 ± 7,5** (73%)

Примечание. * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ — по сравнению с контролем (группа 1) Ф — концентрация фибриногена

в организме на фоне введенного тромбoplastина, вызывающего генерацию тромбина и резкую гиперкоагуляцию [1]. Следовательно, исследуемая смесь обладала защитным противотромботическим эффектом. Важно отметить, что отдельно гепариноид из пиона также оказывал противотромботические эффекты, но в значительно меньшей степени, чем смесь. Исследование может служить экспериментальным обоснованием совместного применения гепариноида из пиона и аргинина в низких дозах для предупреждения тромботических осложнений при развитии гиперкоагуляции в организме.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о том, что сочетанное применение гепариноида из корней пиона в дозе 50 мкг/кг массы тела крыс и аргинина в дозе 200 мкг/кг массы тела усиливают противосвертывающие свойства обоих препаратов и препятствуют развитию процессов фибрино- и тромбообразования в организме при их провокации. Использование исследуемых препаратов в низких дозах снижает риск возникновения побочных геморрагических эффектов. Комплексный препарат растительного гепариноида и аргинина может относиться к перспективным противотромботическим средствам, так как оказывает противосвертывающий эффект в условиях генерации тромбина в кровотоке.

References

1. Furie B., Furie B.K. Formation of the clot. *Thromb Res.* 2012; 130(1): S44-6.
2. De Asevedo T.C., Bezerra M.E., Santos M.G., Souza L.A., Marques C.T., Benevides H.M., Leute E.L. Heparinoids algal and their anticoagulant, hemorrhagic activities and platelet aggregation. *Biomed Pharmacother.* 2009; 63(7): 477-83.
3. Krichevsky L.A. A low molecular weight heparins in the modern system of control of blood clotting. *Anesthesi-*

ologiya and reanimatologiya. Meditsinskaya rehabilitatsiya. 2015; 16(117): 42-8. (in Russian)

4. Kristanov N.A., Safonova M.Yu., Bolotova V.S., Pavlova E.D., Sakanyan E.J. Prospects for the use of plant polysaccharides as therapeutic and prophylactic tools. *Vestnik VGU, seriya Biologiya, Khimiya, Farmatsiya.* 2005; 1: 212-21. (in Russian)

5. Mirmiran P., Bahadoran Z.G., Gaseu A., Asisi F. The Association of Dietary L-Arginine Intake and Serum Nitric Oxide Metabolites in Adults: A Population-Based Study. *Nutrients* 2016; 8 (5).

6. Trashkov A.P., Kovalenko A.L., Vasil'ev A.G., Valev V.V. L-arginine as dietary supplement for improving microvascular function. Pathophysiological and clinical aspects of using L-arginine in cardiology and and angiology. *Angiol Sosud Khir.* 2016; 22 (3): 9-15.

7. Arslan R., Bektas N., Bor Z., Sener E. *Pharm Biol.* 2015; 53(2): 275-9.

8. Collicec-Jouault S., Bavington C., Delbarre-Ladrat C. Heparin-like entities from marine organisms. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2012; 207: 423-49.

9. Sogut O., Erdogan M.O., Kose R., Boleken M.E., Kaya H., Gokdemir M.T., Ozgonul A., Iynen I., Albayrak L., Dokuzoglu M.A. Hemostatic efficacy of a traditional medicinal plant extract (Ankaferd Blood Stopper) in bleeding control. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2015; 21(4): 348-53.

10. Wu M., Xu L., Zhao L., Xiao C., Gao N., Luo L., Yang L., Li Z., Chen L., Zhao J. Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from sea cucumber. *Mar. Drugs.* 2015; 13 (4): 2063-84.

11. Xiao C., Lian W., Zhou L., Gao N., Xu L., Chen J., Wu M., Peng W., Zhao J. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors. *Thromb Res.* 2016; 146: 59-68.

12. Zhang S.B. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. *J. Food Chem.* 2016; 202: 1-8.

13. Nsimba M.M., Yamamoto C., Lami J.N., Hayakawa Y., Kaji T. Effect of a Congolese herbal medicine used in sickle cell anemia on the expression of plasminogen activators in human coronary aortic endothelial cells culture. *J. Ethnopharmacol.* 2013; 146(2): 594-9.

14. Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Maistrenko, E.S. On the mechanism of the anticoagulant action of the extract from the roots of *Paeonia lactiflora*. *Mezhdunarodniy Zhurnal*

Prikladnykh I Fundamentalnykh Issledovaniy. 2016; 11(6): 1091-3. (in Russian)

15. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the func-*

tional state of the anticoagulation system of blood [Teoreticheskoe i prakticheskoe issledovanie funkcionalnogo sostoyaniya protivoversytyvayushey sistemy krovi]. Moscow, Advanced Solutions; 2012. (in Russian)

Сведения об авторах:

Оберган Тамара Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных Биологического факультета МГУ, e-mail: tobergan@mail.ru;

Ляпина Маргарита Григорьевна, ведущий специалист лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных, e-mail: lyarinarita@gmail.com;

Успенская Марианна Сергеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. Ботанического сада МГУ, e-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru;

Ляпина Людмила Анисимовна, доктор биол. наук, проф., гл. науч. сотр., зав. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ, e-mail: lyarinal@mail.ru