

## БИОСПЕЦИФИЧНЫЙ ЭЛЕКТРОФОРЕЗ КОМПЛЕКСОВ МЕЖДУ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫМИ ГЕПАРИНАМИ И ХИТОЗАНАМИ

*С.А. Толстенков\**, *Н.Н. Дрозд\**, *В.А. Макаров\**, *Г.Е. Банникова\*\**

\*Гематологический научный центр РАМН, Москва, E-mail: nndrozdz@mail.ru

\*\*Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

## BIOSPECIFIC ELEKTROPHORESIS OF COMPLEXES BETWEEN LOW MOLECULAR WEIGHT HEPARINS AND CHITOSANS

*S.A. Tolstenkov\**, *N.N. Drozd\**, *V.A. Makarov\**, *G.E. Bannikova\*\**

\*Haematological Research Center RAMS, Moscow, E-mail: nndrozdz@mail.ru

\*\*Center "Bioengineering" RAS, Moscow

### ABSTRACT

It was evaluated possibility of using a chitosan how an antidote for neutralizing of an antithrombin activity of a low molecular weight heparins. It is possible to use the chitosan with a molecular weight not less than 6 kD and a degree of deacetylation more than 90 % for neutralizing of the antothrombin activity of the low molecular weight heparins.

Экстракорпоральное кровообращение (ЭКК) при операциях на открытом сердце, программный гемодиализ при заместительной почечной терапии обычно проводятся с нефракционированным гепарином (НФГ). При этом достигается предотвращение тромбообразования в результате минимизации активации свертывающей системы крови [1,2]. Антикоагулянтная активность (АК) НФГ осуществляется посредством активации плазменного ингибитора сериновых протеиназ свертывающей системы крови – антитромбина (АТ), что приводит к увеличению скорости инактивации тромбина (IIa) и фактора Ха [3]. В конце ЭКК действие гепарина нейтрализуют сульфатом протамина (1 мг сульфата протамина на 100 ЕД НФГ) [4]. При этом быстро и полностью снижаются анти-фактор Ха (аХа) и анти-фактор IIa (аIIa) активности, а также укорачивается время свертывания плазмы в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) [5]. При высоком риске кровотечения (множественная травма, ранний послеоперационный период, желудочно-кишечное кровотечение) используют регионарную гепаринизацию, при которой в артериальную линию крови до диализатора вводят гепарин, а в венозную линию крови после диализатора – сульфат протамина (СП). Связываясь с гепарином, СП предотвращает формирование комплексов между гепарином и АТ, или прерывает этот процесс. Имея значительный положительный заряд благодаря наличию аргинина, СП формирует комплексы с полианионными молекулами гепарина. Механизм нейтрализации НФГ протамином в большей мере зависит от степени сульфатирования, чем с молекулярной массы антикоагулянта [6]. В последние годы при проведении экстракорпоральных методов лечения используют низкомолекулярные гепарины (НМГ), которые в отличие от обычного НФ обладают более выраженным антитромботическим эффектом; вызывают меньшее число геморрагических осложнений; не нарушают метаболизм липидов; не повышают адгезию тромбоцитов. Дополнительным аргументом в пользу применения НМГ при гемодиализе является их большая продолжительность действия (до 24 ч) [7]. У препаратов НМГ снижен заряд молекул и поэтому СП не может полностью нейтрализовать их АК активность [8]. Кроме этого, введение СП может сопровождаться отдельными побочными эффектами: увеличением давления в легочной артерии и уменьшением систолического и диастолического кровяного давления, потреблением кислорода миокардом, частотой сердечных сокращений и системного сосудистого сопротивления; бронхоспазмом и шоком [9,10]. Эти эффекты появляются в результате

активации комплемента, высвобождения гистамина, продукции тромбксана и оксида азота и формирования антител. Для снижения токсичности СП, а так же для повышения его способности нейтрализовать АК активность НМГ разработали низкомолекулярные протамины (НМП). При ферментативном гидролизе СП термолизинном получают образцы с молекулярной массой 1880 Да [11]. К новому семейству антидотов для гепаринов относятся низкомолекулярные пептиды, конкурирующие с АТ за связь с гепарином [12–16]. Наиболее эффективный, имеющий название НерAgrest™, в меньшей степени в сравнении с гепарином обладает побочными эффектами.

Целью работы является оценка возможности использования хитозана в качестве антидота для нейтрализации антитромбиновой активности НМГ.

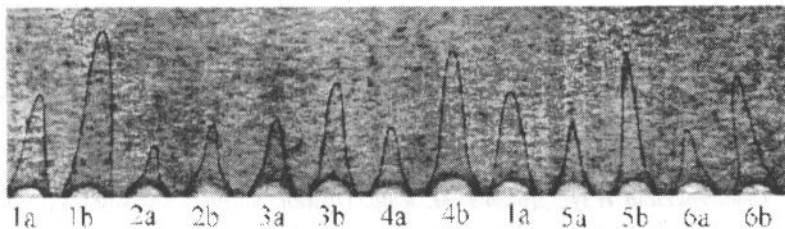
Образцы НМГ с молекулярной массой (ММ) от 3,4 до 6,1 кДа получали с помощью деполимеризации НФГ из легких крупного рогатого скота (партия D0110001 CHANGZHOU QUIANHONG BIO-PHARM CO. LTD, Китай) хитинолитическим ферментным комплексом [17] в лаборатории инженерии ферментов Центра “Биоинженерия” РАН. В работе использовали препарат коммерческого низкомолекулярного гепарина – Фраксипарин (Sanofi). Образцы хитозана с СД 61–85% и ММ 4–21 кДа получали в той же лаборатории. ММ определяли по [18], степень дезацетилирования (СД) – по [19]. Антикоагулянтную активность образцов НМГ оценивали по их способности ингибировать некоторые сериновые протеиназы свертывающей системы крови, определяя активность против тромбина (аIIa) и активированного фактора Ха по гидролизу хромогенных субстратов. При определении нейтрализации АК-эффекта также использовали гидролитическую активность протеиназ по отношению к хромогенным субстратам. На рисунке представлено сканированное изображение результата электрофореза образцов НМГ в агарозном геле, в который добавлен сульфат протамина (А) или хитозан (В). У зон преципитации окрашенных комплексов (“ракеток”) измеряли высоту в мм.

В результате исследования отмечено наличие пиков преципитации, а следовательно, и комплексов при проведении электрофореза НМГ как с хлоридом цетилпиридиния (используют для осаждения гликозаминогликанов при выделении из тканей), так и с классическим антидотом для гепаринов – сульфатом протамина, а так же и с хитозанами. Исключение составляет хитозан Х1 (ММ 4 кДа, СД 85%). При анализе электрофореза НМГ с Х1 в агарозе гель был ровно окрашен без наличия каких-либо “ракеток” или пятен. Антитромбиновая активность образцов НМГ достигала 69–260 ЕД/мг, активность против фактора Ха была 82–290 ЕД/мг. Показана умеренная положительная связь между ММ, аIIa и аХа образцов НМГ, с одной стороны, и высотой пиков преципитации с хитозанами, с другой.

Коэффициенты линейной корреляции составили 0,6–0,93; 0,55–0,92; 0,73–0,93, соответственно (таблица). Хитозаны с СД 85% и ММ 4, 6 и 21 кДа (Х2, Х3, Х4) демонстрируют тесную положительную связь между высотой пиков преципитации и аХа активностью НМГ ( $r = 0,85–0,91$ ). Хитозаны с ММ 21 кДа и СД 85, 70 и 61% (Х4, Х5 и Х6) так же демонстрируют тесную положительную связь между высотой пиков преципитации и аХа активностью НМГ ( $r = 0,82–0,93$ ). Какой-либо связи между ММ и СД хитозанов, с одной стороны, и высотой пиков преципитации, с другой нами не обнаружено (коэффициенты линейной корреляции составили 0,001–0,004). Для получения комплексов между НМГ и хитозанами следует использовать образцы последнего с ММ не ниже 6 кДа. Плохо окрашенные пики преципитации используемого в клинической практике НМГ – Фраксипарина, наблюдали только с некоторыми хитозанами и СП. Слабая окраска свидетельствует о малом количестве комплексов, что совпадает с литературными данными [12].

Для анализа нейтрализации антитромбиновой активности образцов НМГ использовали только хорошо растворяющиеся в физиологическом растворе хитозаны (Х6 и Х7). Образец Х7 (ММ 16 кДа, СД 91%) показал равную с СП способность восстанавливать скорость амидолитической реакции до 0,140–0,148 ΔА/мин. Следует заметить, что Х7 имеет большую СД, а Х6 (в меньшей степени продемонстрировавший способность нейтрализовать антитромбиновую активность НМГ) наименьшую СД – 61%.

А



В

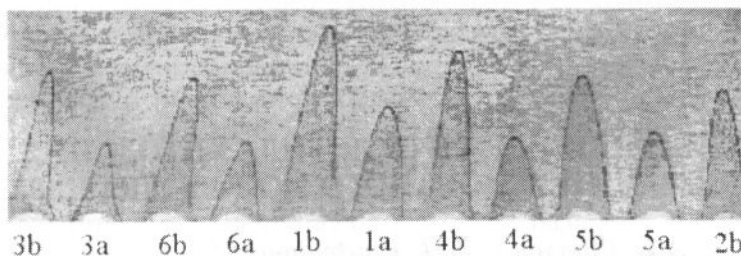


Рис. 1. Биоспецифичный электрофорез низкомолекулярных гепаринов в агарозном геле с сульфатом протамина (А) и хитозаном X7 (В).

НМГ и НФГ (а-1,25 мкг, б-2,5 мкг) добавляли в лунки 3-4 мм, вырезанные в 1% геле агарозы. Электрофорез проводили при градиенте 10 В/см в 0,02 М веронал-мединаловом буфере рН 8,6.

Через 2 ч пластины с гелем окрашивали 0,1% раствором альцианового синего.

Пластины с высохшим гелем сканировали и измеряли пики преципитации в формате jpg:

1 – НФГ 15 кД; 2 – 5,1 кД; 3 – 7,4 кД; 4 – 4,7 кД; 5 – 4,0 кД; 6 – 2,7 кД

Таким образом, для нейтрализации антитромбиновой активности НМГ можно использовать хитозаны с ММ не менее 6 кДа и СД более 90%.

Влияние поликатионов и соли алифатического аммониевого основания (ЦПХ) на электрофоретическую подвижность комплексов с низкомолекулярными гепаринами

№ НМГ	Высота пиков преципитации, мм								
	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	СП	ЦПХ
1		19,0±9,1		14		5,3±2,3	5±1,4	11	
2	6,06±0,60	7,8±0,7	9,3±0,2	5,31±1,6	4,0±1,4	5,8±1,1	2,7±0,1	7,33±0,72	5,6±0,62
3	11,67±0,4	21,3±6,7	21,7±5,6	12±0,02	12±0,2	11,5±2,7	6,8±0,1	21,5±0,28	7,6±0,4
4	9,44±1,35	16,7±5,6	21,0±4,5	10,7±0,71	8,27±0,78	9,8±2,2	5,8±1,0	21,5±5,0	7,1±1,11
5	10,62±0,95	21,7±11,7	21,3±10,9	12,83±0,17	12,02±0,2	12,0±2,1	8±1,2	32,3±1,08	11±1,63
6	9,23±0,48	21,2±11,7	22,3±6,7	9,31±2,68	8,76±1,75	12,0±4,1	8,7±0,9	17,3±6,2	11±1,82

\*ЦПХ – хлорид цетилпиридиния.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Despotis GJ, Gravlee G, Filos K, Levy J. Anesthesiology 1999; 91:1122- 51.
2. Moutona C, Calderonb J, Janvierb G, Vergnesa M-C. Thrombosis Research 111, N 4-5, (2003) 273-279.
3. Cannon CP. The pharmacology of anticoagulation. In: Roque Pifarref, editor. In anticoagulation, hemostasis, and blood preservation in cardiovascular surgery. Philadelphia: Hanley & Belfus; 1993.
4. Bevan DH. Br J Haematol 1999;104:208-19.
5. Lohne F, Klow NE, Stavnes S et al. Acta Radiol. 2004 Apr;45(2):171-5.
6. Young E, Cosmi B, Weitz J, Hirsh J. Thromb Haemost 1993;70:625. 30.
7. Шило В.Ю., Козлова Т.В., Денисов А.Ю. Фарматека, 2005, № 6 [101], 1-6.

8. *Crowther M, Berry LR, Monagle PT, Chan AKC.* Br J Haematol 2002; 116:178-86.
9. *Carr JA, Silverman N.* J Cardiovasc Surg. 1999;40(5):659-66.
10. *Pugsley MK, Kalra V, Froebel-Wilson S* Life Sci. 2002 Dec 6;72(3):293-305.
11. *L M Lee, L-C Chang, S Wroblewski, T W. Wakefield, V C. Yang.* AAPS PharmSci. 2001; 3 (3): article 19.  
DOI: 10.1208/ps030319.
12. *Shenoy S, Harris RB, Sobel M.* Curr Pharm Des. 1999 Dec;5(12):965-86.
13. *Schick BP, Gradowski JF, San Antonio JD, Martinez J.* Thromb Haemost. 2001 Mar;85(3):482-7.
14. *Onouea S, Nemotoa Y, Haradaa S et al.* Life Sciences 73 (2003) 2793-2806.
15. *Schick B.P., Maslow D., Moshinski A.,* San Antonio J.D. Blood, 2004, 103 (4), 1356-1363.
16. *Warkentin TE, Crowther MA.* Can J Anaesth. 2002;49(6): S11-25.
17. *Банникова Г.Е., Столбушкина П.П., Дрозд Н.Н. и др.* Прикл. биох. и микробиол. 2004; 40(4): 429-34.
18. *Wang W, Bo S, Li S, Qin W.* Int J Biol Macromol 1991;13(5), 281-5.
19. *Lim S, Hattori K, Hadson SM.* Advan Chitin Sci 2000; 454-459.