

На правах рукописи

КОРТУСОВ ВАДИМ ЛЕОНИДОВИЧ

**ЭФФЕКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ
ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
(экспериментальное исследование)**

03.00.04 – биохимия

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

Тюмень - 2007

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Тюменская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию»

Научный руководитель: доктор биологических наук
Русакова О.А.

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Камилов Фэликс Хусаинович

доктор биологических наук,
профессор
Ральченко Ирина Викторовна

Ведущее учреждение: институт биохимии и генетики Уфимского
научного центра РАН

Защита состоится «___» ноября 2007 г в ___ ч на заседании диссертационного Совета ДМ 212.274.07 при ГОУ ВПО «Тюменский государственный университет» по адресу: г. Тюмень, ул. Пирогова, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале библиотеки Тюменского государственного университета

Автореферат разослан «___» октября 2007 г

**Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук профессор**

Чирятьев Е.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Система гемостаза выполняет в организме ряд важных функций – поддерживает кровь в жидком состоянии, препятствует тромбообразованию и блокаде микроциркуляции в органах, предотвращает кровоточивость /Баркаган З.С., 1988/.

Независимо от этиопатогенеза тромбоэмболических осложнений одним из средств их предупреждения и коррекции являются антикоагулянты, введением которых достигается угнетение синтеза прокоагулянтов, ограничение пострибосомального формирования прокоагулянтов (антивитамины К). Эти группы используются для создания медленно развивающейся гипокоагулемии. Но практическая медицина нуждается в быстром эффекте, обеспечиваемом антикоагулянтами прямого действия. Среди них чаще других применяется ГП, отличающийся сильным, но кратковременным эффектом /Кудряшов Б.А., 1992/. Хотя ГП является средством выбора, он отличается рядом недостатков. К важнейшим из них можно отнести способность вызывать агрегацию ТЦ /Bertele V. e.a., 1983/ и тромбоцитопению /Ansell J. e.a., 1986/. Отмечаются тромбоэмболические осложнения после отмены ГП, связанные с “эффектом бумеранга” /Nordon e.a., 1981/.

К числу применяемых антикоагулянтов прямого действия относятся гирудин и гирудиноиды, выделенные из тканей кровососущих животных обладающие антитромбиновым действием /Markwardt, 1985; Kaiser, Markwardt, 1988/. Практического применения они не нашли из-за сложной технологии получения и дороговизны /Баскова И.П., 1991/.

Исследования в области поиска естественных или создания новых средств направленного воздействия на гемостаз не прекращаются. В этом плане активно изучаются ингибиторы ТР, активаторы фибринолиза и фибринолитики /Андреев Г.В., 1981/, исследуются иммобилизованные ферменты и комплексные препараты /Мамедов Я.Д. и соавт., 1981/. Не остались в стороне и растения, как источники веществ, модифицирующих гемостаз, среди которых найдены как активаторы, так и ингибиторы свертывания крови /Рогов А.В., и соавт., 2003/. Большинство проведенных исследований посвящены поиску средств фармакологической коррекции гемостаза, влияние которых реализуется через ограничение тромбогенеза, или дезагрегацию ТЦ /Чирятьев Е.А., и соавт., 2001/.

В отношении ограничения агрегации ТЦ общая картина выглядит еще более удручающей, поскольку истинных эффекторов агрегации не существует, а применяемые антиагреганты изменяют другие параметры систем организма /Бышевский А.Ш. и соавт., 1996/. К ним относится аспирин, который необратимо ингибирует циклооксигеназу ТЦ, синтез тромбоксана A_2 и простациклина /Fuster, Jang, 1994/.

Более новыми антиагрегантами являются производные тиенопиридинов, которые ингибируют АДФ-индуцированную агрегацию ТЦ. Они эффективней аспирина /CAPRIE Steering Committee, 1996/, но вызывают тя-

желейшие побочные эффекты – нейропению, апластическую анемию, тромбоцитопению и др. /Yeh e.a., 1998/.

Исследуются пептидные ингибиторы, ограничивающие тромбинзависимое превращение ФГ, имеющие в своем составе аналоги N-концевого участка α -цепи ФГ с последовательностью GPR /Laudano, Doolittle, 1979/. Подобные пептиды выделены из тканей человека и животных /Бышевский А.Ш., Чирятов Е.А., 1990/. Но применение этой группы антикоагулянтов *in vivo* невозможно вследствие их быстрой элиминации из кровотока.

Исследования эффекторов агрегации ТЦ в настоящее время преимущественно сосредоточены на антагонистах GP IIb/IIIa-рецепторов ввиду стержневой роли GP IIb/IIIa как медиатора агрегации. Среди них можно отметить разработку искусственных антител /Coller, 1995; Charo e.a., 1987/, пептидных антиагрегантов, имитирующих RGD-последовательность α -цепи ФГ и действующих как конкурентные антагонисты /Lefkovits e.a., 1995/.

В лабораториях ТГМА из растений выделены гликопептиды, механизм действия которых отличен от гепарина, но имеющий сходство с пептидами - аналогами N-концевого участка α -цепи ФГ и пептидами, выделенными из плазмы крови человека и животных /Дементьева И.А., 1991; Русакова О.А., 1993/. По данным, О.А. Русаковой (1993) и А.Г. Губаева (1996) эти гликопептиды действуют достаточно продолжительно (до 24 ч после однократной инъекции), не вызывают гиперкоагулемии и не обладают токсическим действием. Однако их сырьевая база незначительна.

Пептидные эффекторы содержатся в водных растениях, обеспечивая до 80% органической фазы донных иловых грязей. Они не отличаются высоким содержанием антикоагулянтов, однако в процессе естественного концентрирования их содержание в сапропеле может достигать значительных величин /Яковлева н.в., 1998/, а сырьевая база неограничена.

Преыдушие исследования подтвердили наличие в экстрактах сапропеля веществ, эффект которых реализуется на заключительном этапе свертывания крови /Яковлева н.в., 1998/, но полученные данные не полны, исследования не затрагивали тромбоцитарный компонент свертывания крови, хотя известно что ФГ – ключевой субстрат заключительной фазы свертывания, участвует в процессах агрегации и адгезии ТЦ, взаимодействуя с рецепторами тромбоцитарных мембран /Панченко Е.П., 1997/.

Цель исследования – выделить из сапропеля фракции, обладающие антикоагулянтной активностью, установить их механизм действия на плазмокоагуляцию и тромбоцитарный гемостаз.

Задачи исследования. 1. Разработать способ получения фракции сапропеля, обладающей антикоагулянтной активностью. 2. Выделить и очистить эффекторы свертывания крови из сапропеля. 3. Изучить механизм действия на плазмокоагуляцию. 4. Изучить влияние эффекторов из сапропеля на агрегационную функцию тромбоцитов *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна. Впервые разработан способ выделения двух индивидуально-эффекторов свертывания крови. Установлено, что носители антикоагулянтных свойств - соединения пептидной природы. Расшифрован механизм ограничения процесса плазмокоагуляции: ингибирование реализуется на уровне коагуляционных превращений ФГ. Впервые установлено, что эффекторы из сапропеля угнетают АДФ- и адреналин-индуцированную агрегацию тромбоцитов *in vitro* и *in vivo*.

Практическая ценность. Впервые разработан способ получения антикоагулянтов из сапропеля – сырья с неограниченными запасами, позволяющий получать эффекторы свертывания в количествах, достаточных для их изучения в лабораторных условиях. Эффекторы ограничивают как плазменную, так и тромбоцитарную гемостаз, что обуславливает их ценность, как перспективных средств коррекции гемостаза.

Полученные данные могут быть использованы научными учреждениями, занимающимися проблемами свертывания крови и поиском новых средств воздействия на гемостаз.

Основные положения, выносимые на защиту

1. В сапропеле содержатся эффекторы свертывания крови, которые могут быть получены и индивидуальном виде. 2. Механизм ограничения плазмокоагуляции исследуемыми эффекторами отличен от механизма известных прямых антикоагулянтов и реализуется на заключительном этапе свертывания крови - коагуляционном превращении ФГ. 3. Эффекторы из сапропеля способны ингибировать агрегацию ТЦ в богатой ТЦ плазме при ее индуцировании растворами АДФ и адреналина. 4. При внутривенном введении лабораторным животным суммы эффекторов развивается стойкая гипокоагулемия за счет угнетения плазменного и тромбоцитарного компонентов гемостаза.

Апробация и публикации. Материалы работы опубликованы в журналах: «Медицинская наука и образование Урала», «Медицинская наука и образование Урала и Сибири», «Тромбоз, гемостаз и реология», доложены на научно-практической конференции Урал ФО «Актуальные вопросы лекарственного обеспечения населения УралФО в системе дополнительного лекарственного обеспечения.

Объем и структура работы. Материалы исследования изложены на 154 страницах машинописного текста. В работе содержатся 37 рисунков, 1 схема и 12 таблиц. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (представленным 96 отечественными и 156 зарубежными авторами), главы (содержащей 4 подраздела), в которой изложены результаты собственных исследований, заключения и выводов.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований. Материалом для исследования послужил сапропель озера Б. Тараскуль, расположенного в Тюменской области.

ФМ получали из коммерческого ФГ по Е.А. Чирятьеву /1990/. Концентрацию ФМ определяли спектрофотометрически, принимая $E_{280}=15,67$ /Т.П. Угарова, В.А. Белицер, 1978/. Скорость самосборки ФБ определяли в системе, содержащей 0,5 мл 0,075 М боратного буфера с рН 7,6, 0,1 мл исследуемого препарата и 0,1 мл 1×10^{-6} М раствора ФМ (опыт). В контроле исследуемый препарат заменяли равным объемом растворителя.

Антикоагулянтную активность фракций экстракта оценивали *in vitro* по его влиянию на: 1) скорость взаимодействия ТР с ФГ; 2) скорость аутополимеризации ФМ по Е.А. Чирятьеву /1989/; 3) ВР и ТВ по В.П. Балуда и соавт. /1980/. Результаты выражали в значениях эффективности торможения (i) по формуле: $i = 1 - V_o/V_k$, где V_o и V_k - скорость реакции в опыте и контроле соответственно. Степень изменения активности антикоагулянта рассчитывали в процентах, принимая, что активность извлечения, полученного после ультрафильтрации, составляет 100%. Количественно содержание антикоагулянта во фракциях выражали в ЕА, принимая за 1 ЕА количество эффектора, вызывающего $i = 0,3$; 4) ВР определяли с помощью электрокоагулографа Н-334 согласно инструкции по использованию прибора; 5) скорость и степень адреналин- и АДФ-зависимой агрегации тромбоцитов в богатой ТЦ плазме, определяемой с помощью анализаторов агрегации ТЦ “Биохиммак” и “Биола 230LA”) самосборку ФМ, определяли нефелометрически с помощью анализатора агрегации ТЦ “Биола 230LA”. Оптическую плотность фракций экстракта, полученных после гель-фильтрации определяли с помощью СФ-46 (210-300 нм) и ФК-56 М (490 нм).

Эксперименты проводили на беспородных белых крысах, содержащихся в условиях вивария на лабораторном рационе. В опытах было использовано 110 крыс обоего пола, массой от 180 до 240 г. В пределах одной серии опытов масса животных не отклонялась от средней более, чем на 20 г. Средняя масса животных контрольной и подопытной групп существенно не отличалась. Исследования на животных проводили под эфирным наркозом. Растворы эффекторов вводили в яремную вену (контрольным животным – соответствующие объемы 0,85% раствора хлорида натрия), кровь отбирали из яремной вены противоположной стороны, стабилизируя 3,8% раствором цитрата натрия 1:9 /Балуда В.П. и соавт., 1980/.

В работе использованы препараты и реактивы: 1. Тромбин, фибриноген, фибринолизин (Каунас); 2. Гепарин (Spofa); 3. Набор аминокислот (Reanal); 4. Сефадекс G-50; 5. Наборы для определения агрегационной активности тромбоцитов (Reanal, Биола); 6. Патроптин (Behring), 7. Тромборель (Behring), 8. Стандартная плазма человека (Behring), 9. Фактордефицитная плазма (Behring), 10. Плазма крови доноров, стабилизированная 3,8% раствором натрия цитрата.

Результаты исследований подвергались математической обработке методом вариационной статистики для малых рядов наблюдений /В.С.

Бессмертный, 1967; И.Г. Венецкий, 1970/. Достоверность различий между средними величинами определялась с использованием критерия X_2 , критерия Стьюдента, различия принимали за достоверные при значениях вероятности (P) меньше 0,05 /Беленький М.Л., 1963 /.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение и очистка эффекторов из сапропеля. В качестве носителя ингибиторов использовали фракцию сапропеля, полученную настаиванием 50 г сапропеля со 150 мл дистиллированной воды при постоянном перемешивании в течении 1 ч. Смесь отстаивали 2 суток и декантировали надосадок. Экстракт упаривали в 10 раз на ротационном испарителе при температуре 48-50°C центрифугировали (3 000g, 30 мин). Для освобождения от неорганических солей супернатант диализовали против дистиллированной воды через гидратцеллюлозную мембрану Т-100 в соотношении 1:150 в течении суток. Недиализующуюся фракцию приводили к значению рН, равному 7,6, разбавляли буферным раствором в 0, 2, 4, 6 и 8 раз и определяли влияние разведений на время свертывания ФГ ТР. Для определения количества эффекторов стандартизовали реакцию взаимодействия ТР с ФГ, используя 0,1 мл раствора коммерческого ФГ (4 мг/мл) и 0,1 мл раствора ТР (активность 15 с) в 0,05 М Трис-НСI буферном растворе (рН 7,6) и 0,1 мл Трис-НСI буфера. Определяли время образования фибринового сгустка (контроль). В опыте вместо 0,1 мл Трис-НСI буфера вносили равный объем эффекторов. Количественную оценку выражали ЕА, что объясняется высокой удельной активностью эффекторов и невозможностью их точной дозировки путем взвешивания.

По результатам строили калибровочный график зависимости эффективности торможения от концентрации эффекторов, принимая за 100% концентрацию активность неразведенной фракции сапропеля (рис. 1).

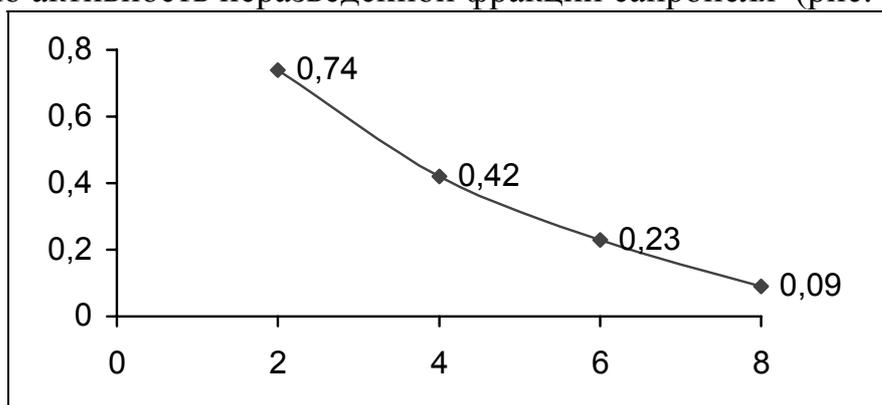


Рисунок 1. Зависимость эффективности торможения реакции тромбин-фибриноген от концентрации эффекторов. Абсцисса – разведение фракции экстракта сапропеля (раз); ордината - эффективность торможения (i).

Количество эффекторов, обусловившее эффективность торможения, равное 0,3, приняли за 1 ЕА и построили график, где содержание эффекторов в ЕА является функцией эффективности торможения.

Далее мы определили приемы очистки эффекторов. Действенным оказалось глубокое (-20°C) и длительное (24 ч) замораживание экстракта с последующим размораживанием при комнатной температуре. При этом выпадает обильный осадок, удаляемый центрифугированием при 3 000 г.

Определили основные параметры этой операции - температуру и время замораживания: экстракт подвергали замораживанию в холодильной камере в течение 6 ч при различных значениях температур. После размораживания центрифугировали, определяли количество ЕА в 1 мл и оптическую плотность при длине волны 465 нм (табл. 1).

Таблица 1

Количество эффекторов во фракциях сапропеля и их оптическая плотность до и после замораживания при различном значении температуры

Температура, $^{\circ}\text{C}$	Количество ЕА/мл	Оптическая плотность
+20	20,25±2,2	0,129 ± 0,006
-10	20,06±0,9	0,110 ± 0,007
-15	19,96±2,4	0,092 ± 0,002
-20	19,89±1,6	0,086 ± 0,004
-25	19,89±1,0	0,085 ± 0,002

Как следует из таблицы, различие в содержании эффекторов во фракциях до и после замораживания при различных температурах не значительно – максимально на 1,7%. Оптическая же плотность различается весьма заметно; после 6-ти часового замораживания она снизилась на 34%, что свидетельствует о существенной очистке носителя. Дальнейшего изменения оптической плотности фракции при замораживании ниже -20°C не происходит, следовательно этот параметр является оптимальным для достижения цели. Определили наиболее эффективное время замораживания: экстракт замораживали при -20°C в течение времени, указанного в таблице 2. После размораживания определяли те же показатели. Из данных, представленных в таблице 2 видно, что содержание эффекторов после размораживания и центрифугирования практически не изменяется в то время, как оптическая плотность через 24-30 часов от начала эксперимента

Таблица 2

Количество эффекторов во фракциях сапропеля и их оптическая плотность при замораживании при -20°C в течение различного времени

Время замораживания, ч	Количество ЕА/мл	Оптическая плотность
до замораживания	20,25±2,0	0,129 ± 0,007
1	20,02±2,2	0,103 ± 0,004
3	19,94±1,9	0,092 ± 0,006
6	19,89±0,8	0,086 ± 0,003
12	19,86±0,6	0,081 ± 0,004
18	19,83±1,5	0,074 ± 0,003
24	19,82±2,1	0,067 ± 0,005
30	19,82±2,0	0,067 ± 0,002

снижается почти на 50%. Следовательно, оптимальное время, в течение которого осуществляется замораживание, составляет 24 ч.

Следующим приемом выделения носителей мы избрали гель-фильтрацию на сефадекс. Применение гелей G-50, G-150 или G-200 привело к разделению пиков антикоагулянтной активности и оптической плотности. Это указывало на то, что носитель антикоагулянтной активности находится в виде достаточно прочного комплекса с другим соединением. Анализ данных литературы /Комиссаров И.Д. и соавт., 1971/ показал, что в этом плане наиболее подходящей кандидатурой являются ГК, в значительном количестве содержащиеся в сапропеле. Для доказательства провели эксперимент, в котором через колонку, заполненную гелем сефадекс G-150, фильтровали изолированные ГК и высокоочищенную фракцию сапропеля: хроматографические профили при гель-фильтрации ГК (по данным спектрофотометрии) и фракции сапропеля совпадают между собой.

Следовательно, фракция сапропеля содержит два основных компонента - ГК и носители, ингибирующие плазмокоагуляцию. Одновременно получены сведения, что ГК не обладают антикоагулянтной активностью (растворы ГК не изменяют ни ВР, ни реакцию взаимодействия ТР с ФГ).

Далее мы прибегли к высаливанию сульфатом аммония. В концентрированной фракции сапропеля создавали насыщение сульфата аммония от 30 до 75%. Операцию проводили при различных значениях рН раствора фракции экстракта (от 2,6 до 9,4). При этом определяли минимальную степень насыщения, при которой появлялся осадок.

Наименьшая степень насыщения фракции экстракта (40%), при которой ГК начинают выпадать в осадок, соответствует рН 7,25. В связи с этим, получаемый концентрат фракции сапропеля приводили к рН 7,25, создавали 50% насыщение сульфатом аммония и образующийся осадок ГК отделяли центрифугированием. Надосадок концентрировали выпариванием на бане, создавая 100% насыщение сульфата аммония. Выпадающий осадок удаляли центрифугированием. Получаемый раствор содержал значительное количество солей, поэтому следующим этапом явилась разработка способа отделения солей от антикоагулянтов.

Поскольку эффекторы хорошо растворимы в этиловом спирте, а используемая для высаливания соль в спирте не растворима, мы прибегли к способу замены растворителя. Для этого к раствору, содержащему эффекторы и сульфат аммония, прибавляли равное количество 96% этанола, экспонировали при температуре -4°C в течение 30 мин и удаляли выпавший осадок солей центрифугированием. Водно-спиртовую смесь упаривали и повторяли операцию. Полученный раствор выпаривали на водяной бане и сухой остаток растворяли в 96% этаноле. Смесь выдерживали на холоду (-4°C , 30 мин), выпавшую в осадок соль удаляли. Этанол отгоняли, а сухой остаток, содержащий эффекторы, растворяли в 0,14 М растворе хлорида натрия и определяли их содержание и присутствие сульфатов пробой с ба-

рия хлоридом. Содержание эффекторов составило на 56% меньше, чем на предыдущем этапе выделения, но примесь ГК отсутствовала полностью.

Затем мы подвергли очищенный экстракт гель-фильтрации на колонке с Сефадексом G-50 (10×300 мм, элюент - 0,07 М раствор натрия хлорида, объем фракций - 2 мл, внешний объем колонки - 15 мл, скорость потока - 1 мл/мин) (рис. 2). Во фракциях элюата определили ингибиторную активность.

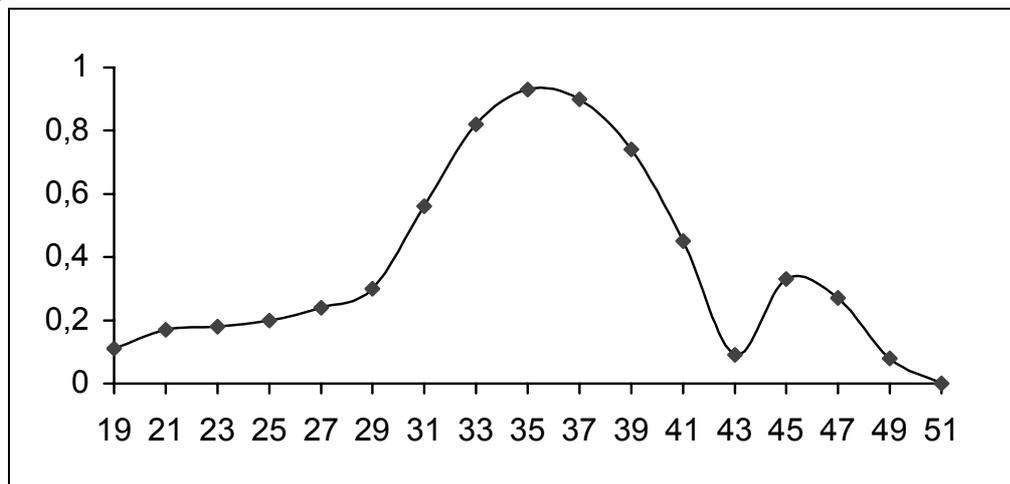


Рисунок 2. Хроматографический профиль антикоагулянтной активности при гель-фильтрации фракции сапропеля, освобожденной от гуминовых кислот, на сефадексе G-50. Абсцисса - №№ фракций; ордината - эффективность торможения.

Как следует из рисунка, носители элюируются в виде двух не накладывающихся друг на друга пиков, что свидетельствует о присутствии в полученной фракции минимум двух индивидуальных веществ, различающихся по молекулярной массе.

Таким образом, мы добились желаемого - получили растворы эффекторов, освобожденных от примесей, следовательно, пригодных для изучения тонких механизмов ограничения свертывания крови.

Механизм действия эффекторов из сапропеля на плазмокоагуляцию

Информация о влиянии антикоагулянтов на свертывание крови, была получена при анализе электрокоагулограмм. В качестве субстрата использовали пулированную донорскую плазму, а в качестве эффектора - фракцию сапропеля, содержащую 100 ЕА/мл (рис. 3).

Как видно на рис. 3, время, затраченное на формирование сгустка ($T_2 - T_1$), в присутствии ингибиторов составило 240 с, в отсутствие - 220 с, что больше на 8,3 %. Общая продолжительность свертывания (T_2) в опыте и контроле составила 840 и 300 с соответственно (различие - 64,3 %), а время от момента инициации свертывания до начала формирования фибринового сгустка (T_1) соотносится в опыте и контроле, как 6:1.

Для расшифровки механизма ограничения свертывающей активности крови мы выяснили, не обладают ли эффекторы гепариноподобным действием. Для этого изучили эффективность торможения скорости реакции

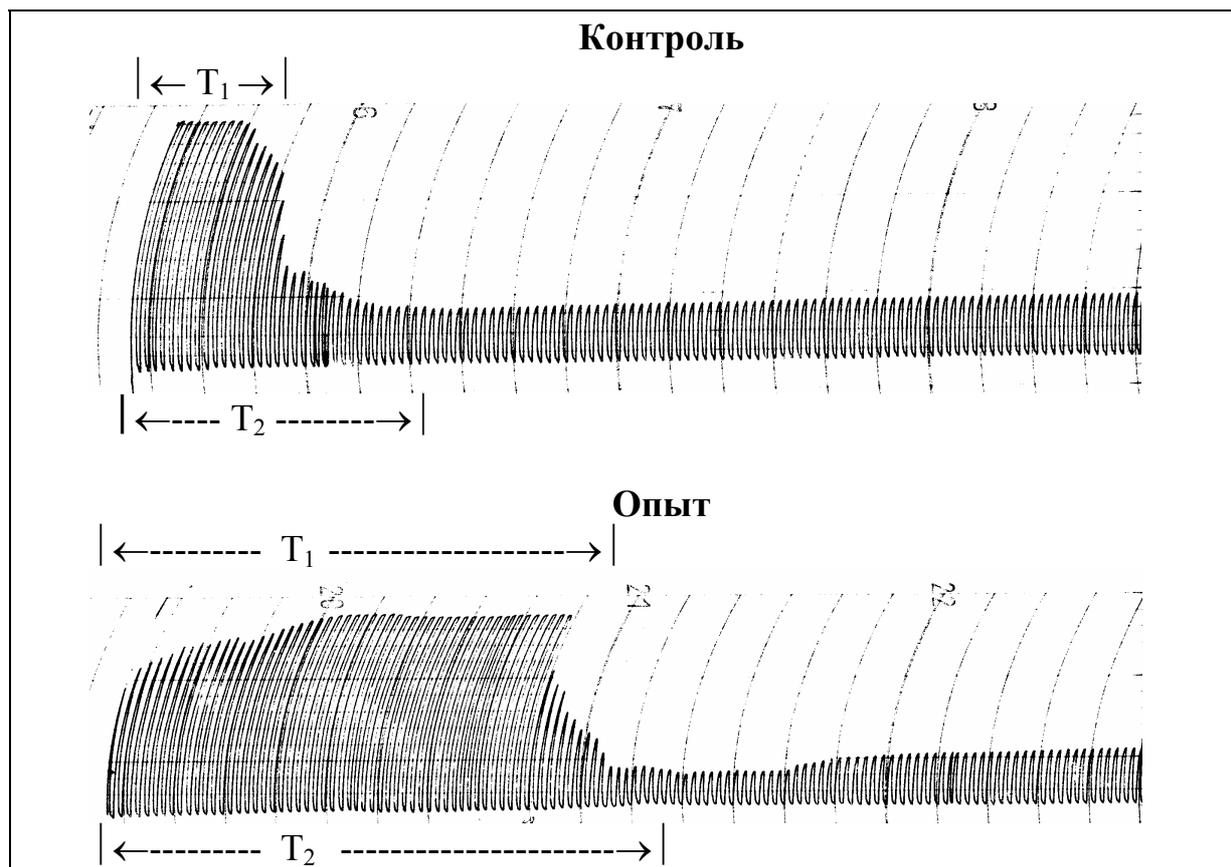


Рисунок 3. Электрокоагулограмма плазмы крови в отсутствие (контроль) и в присутствии (опыт) фракции сапропеля с антикоагулянтной активностью. Пояснения в тексте.

взаимодействия ТР (1,5 мг/мл) с ФГ (4 мг/мл) очищенным экстрактом (24 ЕА/мл), ГП (10 ЕА), сывороткой крови, разведенной в 10 раз, как источника антитромбина III, порознь, а также в сочетании ГП-сыворотка, экстракт-сыворотка, экстракт-ГП. В контроле в систему самосборки вносили адекватное количество физ. раствора. Эффективность совместного влияния рассчитывали по Уэбб Л., 1966, (табл. 3).

Расчет показал, что при совместном влиянии на реакцию ТР с ФГ гепарина и сыворотки обнаруживается выраженный синергизм - экспериментальная суммарная эффективность торможения выше теоретической на 32,8%. При влиянии на эту же реакцию экстракта и ГП обнаруживается снижение установленной эффективности торможения по отношению к рассчитанной теоретически - на 2,6%, что статистически недостоверно. При исследовании пары экстракт-антитромбин III, мы наблюдали статистически достоверное снижение эффективности торможения по сравнению с теоретически рассчитанной - на 14,8%. Следовательно, механизм ограничения скорости реакции ТР с ФГ гепарина и экстракта из сапропеля принципиально различается.

Приступая к расшифровке механизма ограничения плазмокоагуляции фракцией сапропеля, мы определили влияние различных ее концентраций на ВР, АВР, АЧТВ, ТВ и ВСФ, используя пулированную плазму (рис. 4).

Таблица 3

Сравнительная оценка влияния антикоагулянта из сапропеля и гепарина на реакцию взаимодействия тромбина с фибриногеном

Схема опыта (все компоненты смеси в соотношении 1:1)	Экспериментальная эффективность торможения в эксперименте	Эффективность торможения, рассчитанная теоретически
Тр + 2Фр + Инг + Фг	$0,82 \pm 0,002$	
Тр + 2Фр + Геп + Фг	$0,63 \pm 0,012$	
Тр + Фр + АтIII + Фг	$0,04 \pm 0,000$	
Тр + Геп + АтIII + Фг	$0,94 \pm 0,007$	$0,64 \pm 0,009$
Тр + Инг + Геп + Фг	$0,91 \pm 0,010$	$0,93 \pm 0,005$
Тр + Инг + АтIII + Фг	$0,72 \pm 0,006$	$0,83 \pm 0,007$

Как видно на рисунке, кривые, характеризующие влияние фракции сапропеля на ВР, АВР и АЧТВ практически совпадают между собой. Это указывает на то, что носитель реализует эффект не зависимо от того, протекает ли свертывание по внутреннему или по внешнему пути. Отсюда же следует, что, вероятнее всего экстракт оказывает влияние на этапах, следующих за образованием ТР. Об этом же свидетельствует то, что те же количества экстракта обладают существенно большим ингибирующим эффектом на ТВ, и, особенно, на время ВСФ.

Эти эксперименты демонстрируют то, что очищенная фракция сапропеля ограничивает плазмокоагуляцию. Однако невозможно определить, на какой из этапов свертывания плазмы оказывают влияние антикоагулянты. В связи с этим мы провели серию экспериментов, используя в качестве субстрата фактор-дефицитные плазмы. Выбор определяемых показателей обусловлен рекомендациями фирмы-изготовителя дефицитных плазм. В качестве субстрата использовали нормальную плазму той же фирмы. Исследовали влияние фракции экстракта на свертывание плазм, дефицитных по факторам II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII и кининам (рис. 5, 6).

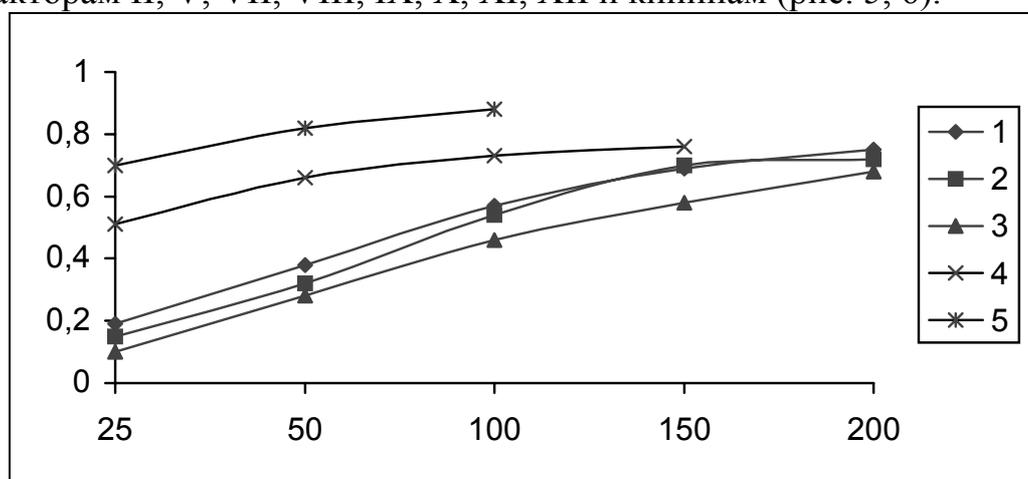


Рисунок 4. Зависимость эффективности торможения ВР (1), АВР (2), АЧТВ (3), ТВ (4) и ВСФ (5) от концентрации ингибитора. Абсцисса - концентрация ингибитора (ЕА), ордината - эффективность торможения (i).

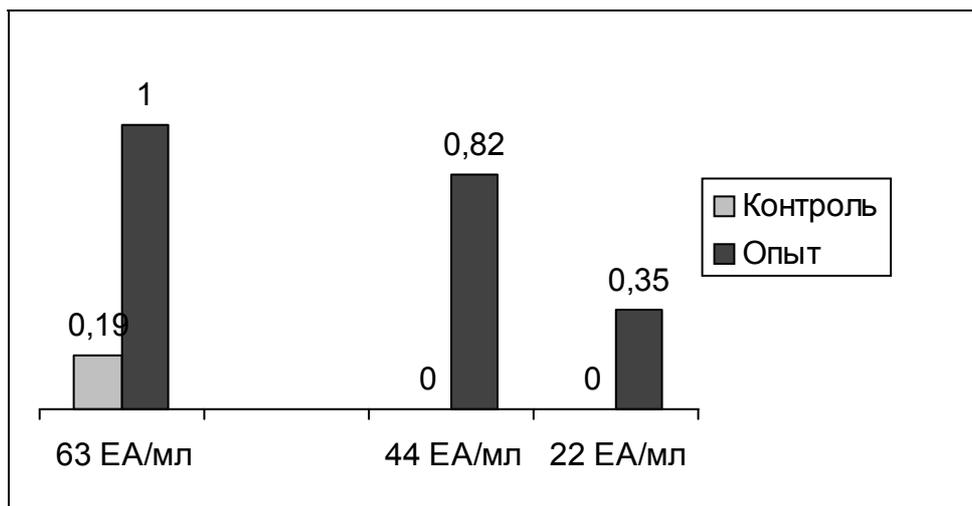


Рисунок 5. Эффективность торможения тромбопластинного времени плазмы, дефицитной по ф. II, фракцией антикоагулянта из сапропеля. Здесь и ниже - абсцисса - концентрация антикоагулянта (EA/мл); ордината - эффективность торможения (i).

Результаты экспериментов свидетельствуют, что эффективность торможения скорости реакций свертывания достоверно различается только в случае использования в качестве субстратных плазм, дефицитных по фактору II и кининам и не зависит от активности других факторов.

Эксперименты свидетельствуют о преимущественном влиянии носителей ингибиторной активности на конечную фазу процесса плазмокоагуляции – TP-зависимом превращении ФГ; недостаток образующегося TP приводит к удлинению процесса свертывания ФГ и, следовательно, увеличению времени, в течение которого ингибитор может реализоваться.

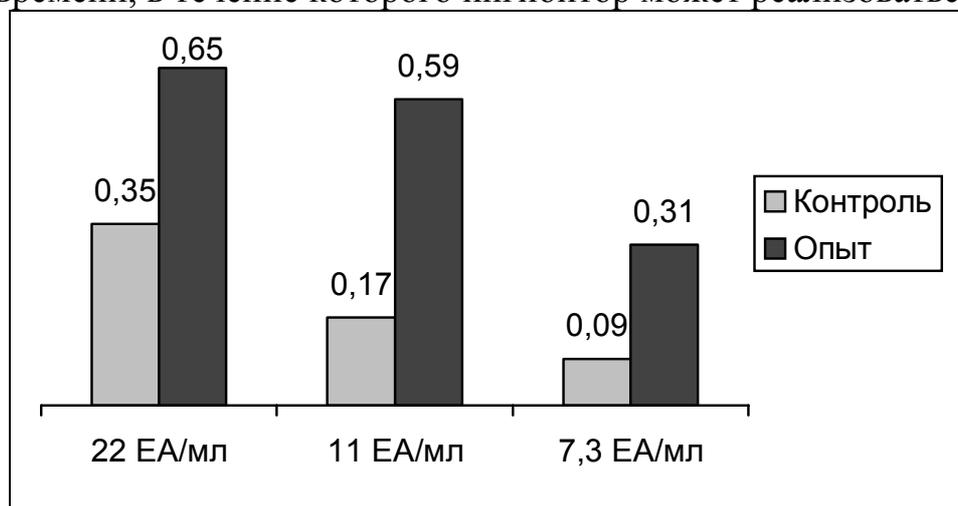


Рисунок 6. Эффективность торможения каолин-кефалинового времени плазмы, дефицитной по кининам, фракцией антикоагулянта из сапропеля.

Что касается существенного увеличения степени торможения при использовании в эксперименте плазмы, дефицитной по кининам, то в данной работе эти сведения мы восприняли на уровне констатации факта, без попытки детального исследования механизма происходящего.

Эти данные говорят о влиянии фракции экстракта на III фазу плазмокоагуляции. В то же время, невозможно отрицать полное отсутствие ингибиторного эффекта на этапы, предшествующие процессу ТР-зависимого превращения ФГ.

Для разрешения вопроса провели дифференциацию влияния ингибиторов плазмокоагуляции на этапы, предшествующие взаимодействию ТР с ФГ и этап коагуляционного превращения ФГ. Изучена зависимость эффективности торможения скорости взаимодействия ТР(1,5 мг/мл) и ФГ (4 мг/мл) от различных концентраций ингибитора в чистой системе (рис.7), а также аналогичная зависимость при полимеризации ФМ (рис.8).

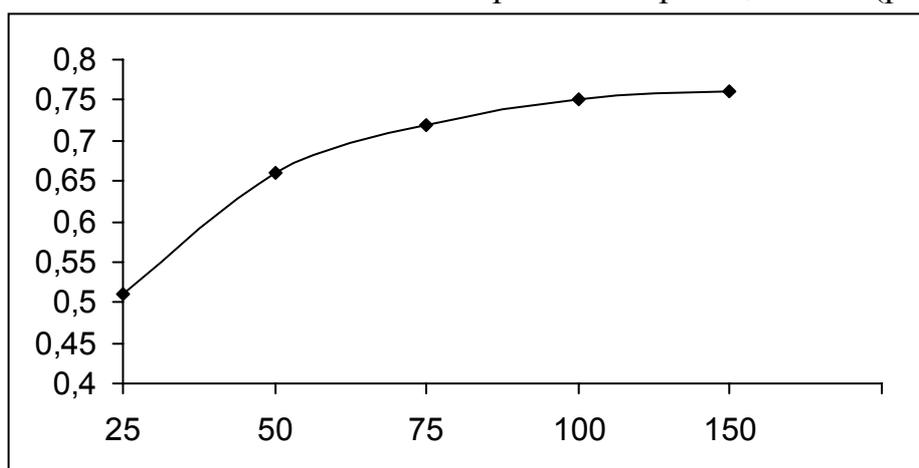


Рисунок 7. Зависимость эффективности торможения скорости взаимодействия ТР с ФГ(ордината) от концентрации ингибитора из сапротеля (абсцисса).

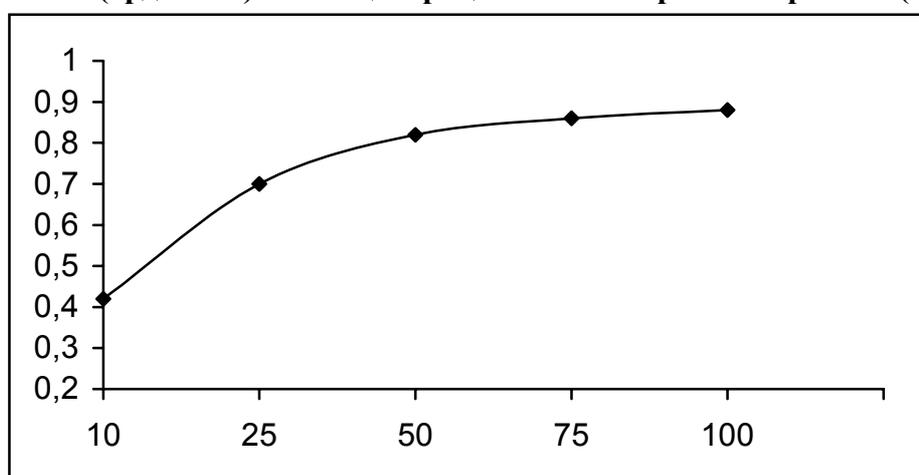


Рисунок 8. Зависимость эффективности торможения скорости полимеризации ФМ (ордината) от концентрации антикоагулянта (абсцисса).

Данные, представленные на рисунках, свидетельствуют о том, что факторы способны ограничивать скорость взаимодействия ТР с ФГ и самосборку ФМ *in vitro*. Зависимости эффективности торможения от их концентрации в обоих случаях описываются параболическими кривыми. Обращает на себя внимание более высокая чувствительность к ингибитору самосборки ФМ. Так, для достижения 50% торможения ($i = 0,5$) скорости

взаимодействия ТР с ФГ требуется больше ингибитора в 1,7 раза, чем для достижения такой же степени торможения процесса полимеризации ФМ.

В то же время, эффекторы способны ограничивать свертывание, предшествующее ТР-образованию. Это установлено в опыте с использованием в дефибринированной плазмы крови. Нативную пулированную плазму крыс освобождали от ФГ нагреванием на водяной бане при 53⁰С в течение двух минут. Полноту осаждения ФГ определяли путем добавления к дефибринированной плазме 0,55% раствора хлорида кальция; в течение шести часов образования сгустка не происходило, но внесение в систему ФГ(4 мг/мл) вызывало свертывание.

Для дифференциации влияния эффекторов на этапы свертывания, обеспечивающие ТР-генез и ТР-зависимое превращение ФГ, мы провели эксперимент, в котором к 0,1 мл дефибринированной плазмы прибавляли 0,1 мл раствора ФГ (4 мг/мл), 0,1 мл раствора антикоагулянта и 0,1 мл 0,55% кальций хлорид, оценивая при этом возможный суммарный эффект на свертывающий потенциал плазмы крови. В контроле раствор антикоагулянта заменяли равным объемом физ. раствора. В другом случае, для оценки влияния ингибитора на ТР-зависимое превращение ФГ, к 0,1 мл дефибринированной плазмы прибавляли 0,1 мл 0,55% раствора хлорида кальция и инкубировали в течение времени достаточном для образования ТР, после чего прибавляли по 0,1 мл растворов антикоагулянта и ФГ. В контроле антикоагулянт заменяли на физ. раствор (табл. 4).

Таблица 4

Эффективность торможения свертывания фибриногена при внесении антикоагулянта в тромбингенерирующую систему (дефибринированную нагреванием плазму) до и после образования тромбина

Концентрация антикоагулянта ЕА/мл	Антикоагулянт внесен	
	Одномоментно с инициацией тромбиногенеза	По завершении тромбиногенеза
22	0,24 ± 0,01	0,13 ± 0,02
44	0,40 ± 0,04	0,22 ± 0,01
63	0,54 ± 0,03	0,29 ± 0,02

Об ограничении скорости ТР-образования свидетельствует эксперимент в котором ингибитор вносили через равные интервалы времени от момента инициации плазмокоагуляции (рис. 9).

При внесении эффекторов в реакционную смесь одновременно с инициацией ТР-генеза, скорость образования ФБ в опыте меньше, чем скорость образования ФБ в контроле на 53%. При их внесении через 30, 60 и 80 с эта величина составила 46, 38 и 23%. Следовательно, чем в более поздние сроки от момента провокации свертывания внесен эффектор, тем ниже его ингибиторный эффект. Это также свидетельствует о том, что изучаемый экстракт способен ограничивать скорость образования ТР.

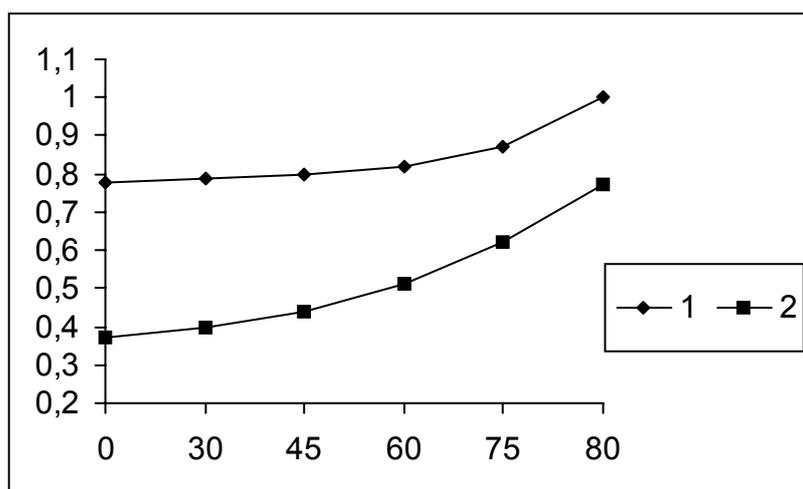


Рисунок 9. Зависимость скорости образования фибринового сгустка при внесении антикоагулянтов в разные сроки от момента инициации плазмокоагуляции. Абсцисса - время от начала плазмокоагуляции; ордината - скорость образования сгустка в контроле (1) и опыте (2).

Взаимодействие ТР с ФГ включает в себя два этапа: ферментативный, приводящий к образованию ФМ и самосборку мономеров. Влияние ингибитора на самосборку установлено. В то же время остается невыясненным вопрос о его влиянии на ферментативный этап этого процесса.

Для разрешения этого вопроса инкубировали при 37°C раствор ФГ (6 мг/мл) в 0,14 М растворе хлорида натрия, содержащим ТР (1,5 мг/мл) и мочевины (3,3 М), предотвращающую самосборку. Через равные интервалы времени отбирали аликвоты смеси, провоцировали самосборку ФБ боратным буфером (рН 7,6; 0,075 М) и фиксировали момент образования сгустка. В части опытов ингибитор (160 ЕА/мл) добавляли в реакционную смесь одновременно с ТР (оценивается суммарное влияние на ферментативную и неферментативную фазы превращений ФГ), в другой части ингибитор вносили в момент провокации самосборки - в этом случае он влияет только на полимеризацию ФМ (рис. 10).

Как следует из графиков ингибиторы тормозят обе стадии превращений ФГ: скорость суммарной реакции (рис. 10, кривая 2) находится ниже графика скорости реакции, протекающей при воздействии только на этап самосборки ФБ. Если допустить, что они оказывает влияние на какой-либо один из этапов превращений ФГ, обсуждаемые кривые совпадали бы.

На рисунке 10 видно, что скорость самосборки растет по мере увеличения времени инкубации ТР с ФГ как в контроле, так и в опытах. Если принять скорость самосборки без ингибитора (контроль) на каждом отрезке времени инкубации за 100%, то на 1 мин инкубации в случае, где ингибитор влияет на обе стадии процесса, скорость реакции составляет 38%. При взаимодействии ингибитора с уже образовавшимся ФМ, этот показатель равен 57%, что свидетельствует о торможении ингибиторами ферментативной стадии перехода ФГ в ФБ. Начиная со 2 минуты инкубации ход всех трех кривых параллелен друг другу и разница между скоростью реак-

ции в случае, когда ингибитор влияет на оба этапа коагуляционного превращения ФГ, и когда он влияет только на процесс полимеризации, составляет в среднем около 33%. Преимущественное влияние ингибиторы оказывает на полимеризацию ФМ. Так, если принять за 100% реализацию антикоагулянтного эффекта ингибитора опыт, в котором ограничиваются обе фазы превращения ФГ, то на долю торможения самосборки приходится около 67% от общего эффекта.

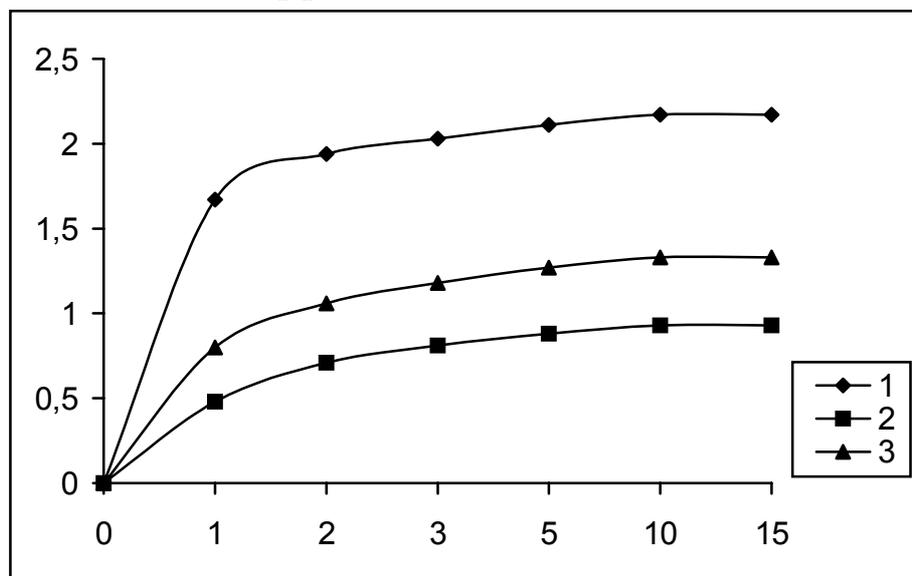


Рисунок 10. Зависимость скорости самосборки фибрина от продолжительности инкубации смеси фибриноген-тромбин. Абсцисса - продолжительность инкубации, мин.; ордината - скорость реакции. 1 - ингибитор отсутствует в реакционной смеси, 2 - ингибитор внесен в реакционную смесь одновременно с тромбином, 3 - ингибитор внесен одновременно с провокацией самосборки.

Самосборка ФМ включает в себя два этапа: формирование из мономеров протофибрилл и последующую АГ. В связи с этим интересно выяснить, как зависит эффект ингибитора от количества образующегося ФМ с одновременным формированием протофибрилл в субфизиологических условиях, и на какие этапы в процессе формирования протофибрилл он оказывает влияние.

Для решения этих вопросов осуществили взаимодействие ФГ (2 мг/мл) и ТР (1 мг/мл) в 0,14 М растворе хлорида натрия. Одновременно, а в последующем через равные интервалы времени от начала реакции, к смеси прибавляли по 18,5 ЕА раствора ингибитора. В контроле вносили адекватное количество физ. раствора. В этих условиях в результате взаимодействия ТР с ФГ продуцируется ФМ. В случае, когда ингибитор вносится в реакционную смесь одновременно с остальными компонентами реакции, он оказывает влияние на весь процесс формирования протофибрилл. В последующем ингибиторы взаимодействуют не только с образующимися мономерами, но и с полимерами различной степени зрелости (рис. 11).

В контроле скорость реакции ТР с ФГ не изменяется. В опыте же этот параметр претерпевает существенные изменения и описывается параболой.

При использовании ингибиторов в случае их внесения в реакционную смесь одновременно с ТР и ФГ, скорость образования фибринового сгустка через 5, 10, 15, 20, 25, 30с после инициации реакции ниже контрольной на 52, 31, 26, 12, 5,1 и 0,0% соответственно.

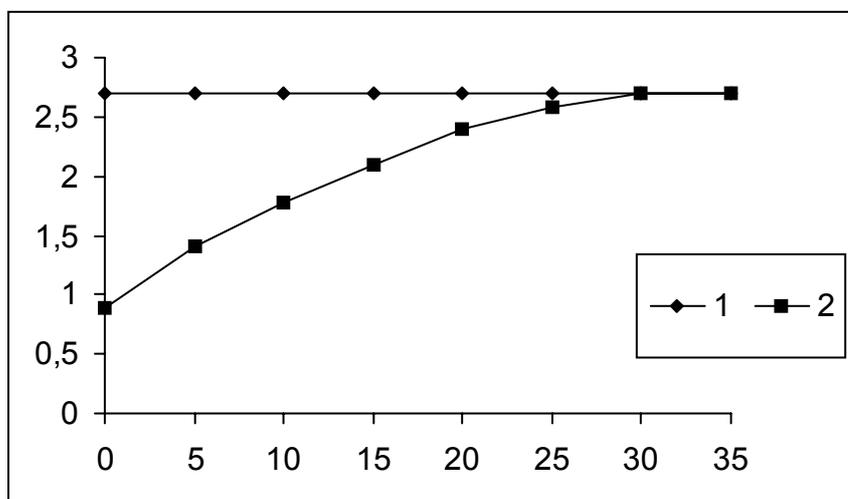


Рисунок 11. Зависимость скорости ($V, с^{-1} \times 100$) взаимодействия ТР с ФГ (ордината) при внесении ингибитора в реакционную смесь через равные интервалы времени (с) после инициации реакции (абсцисса). 1 - контроль, 2 - опыт.

Если принять за 100% время образования сгустка в отсутствие ингибиторов или внесении в момент АГ, то влияние на процесс формирования протофибрилл составляет 81% от контрольного, т.е. при достижении протофибриллами высокой степени зрелости они перестают влиять на дальнейший рост и АГ. Сделано заключение, что с учетом ограничения скорости взаимодействия ТР с ФГ наблюдается явная тенденция влияния ингибиторов на ранние стадии формирования протофибрилл, уменьшения в процессе роста волокон и отсутствия при прохождении около 2/3 пути от момента появления первых ФМ и до образования фибринового сгустка.

В следующей серии экспериментов определили, взаимодействует ли антикоагулянт с участниками реакции плазмокоагуляции. Для этого к раствору ингибитора добавляли раствор ФГ различной концентрации и раствор ТР (1,5 мг/мл). Смесь инкубировали 40 мин при 37°C, сгустки отделяли центрифугированием, а в супернатанте определяли остаточную активность.

Полученные данные показывают, что коагуляция ФГ сопровождается снижением количества ингибиторов в среде, при этом они в концентрации 2,9 ЕА/1 мг ФГ полностью вовлекается в сгусток.

Далее ингибиторы мы смешивали с ФБ, уменьшая концентрацию последнего на 3% (поправка на отщепляемые ФП). Смеси инкубировали 40 мин при 37°C, коагулировавший белок отделяли центрифугированием, а в супернатанте определяли количество ингибиторов.

Таким образом, антикоагулянт связывается как с ФГ, так и с ФБ, однако в последнем случае комплексообразование менее выражено. Взаимо-

действие ингибиторов с ФГ происходит минуя активные центры полимеризации, и следовательно, эффект не зависит от количества открытых активных центров.

Определили характер этого взаимодействия. В первой серии экспериментов изучали зависимость скорости самосборки ФБ от значения рН и ионной силы среды, в которой протекает процесс в отсутствие и в присутствии экстракта. Значения рН в системе создавали, используя для разбавления ФМ 0,075 М боратный буфер с различными значениями рН.

Скорость самосборки ФБ в контроле нарастает с повышением рН, достигая максимума при его значении, близком к рН 7,6, снижаясь в дальнейшем. С ингибитором нарастание рН ограничивает скорость самосборки во всем интервале изучаемых значений. Это свидетельствует, что ингибиторы ограничивают самосборку ФБ путем взаимодействия с субстратом - ФМ за счет электростатических связей /Луговской Э.В., 1982/. Результаты указывают и на то, что при изменении среды самосборки от 6,5 до 7,6 тормозящий эффект увеличивается, что свидетельствует об участии в образовании связей отрицательно заряженных функциональных групп.

Электростатическое взаимодействие между ФМ и ингибиторами подтверждено изучением влияния на этот процесс ионной силы: если оно происходит за их счет, то эффективность торможения самосборки ФМ должна изменяться и при изменении ионной силы /Белицер В.А., Варецкая Т.В., 1975/. Ионную силу изменяли, используя для провокации самосборки ФМ боратный буфер (0,075 М, рН 7,6) с различным содержанием хлорида натрия.

Эффективность торможения ВСФ экстрактом возрастает с повышением ионной силы, что свидетельствует о роли электростатических взаимодействий в реализации тормозящего эффекта экстракта.

Для выявления других возможных типов взаимодействий ингибиторов с субстратом, изучили скорость самосборки в присутствии мочевины, как соединения, конкурирующего за водородные связи. Мочевину в возрастающих количествах прибавляли к буферному раствору, использовавшемуся для провокации самосборки. Полученные результаты указывают на то, что во взаимодействии ингибитор - ФМ водородные связи существенной роли не играют.

Для выявления роли гидрофобных взаимодействий в эффекте ингибитора мы изучили изменения эффективности торможения в интервале температур от 2⁰С до 40⁰С.

Повышение температуры в среде самосборки до 25⁰С сопровождается ростом эффективности торможения, что свидетельствует о роли гидрофобных взаимодействий в обеспечении эффекта антикоагулянтами в зоне низких температур. Вместе с тем, мало существенные изменения в эффективности торможения при температуре выше 20⁰С, свидетельствуют об ограниченном их значении в условиях физиологической нормы.

Принимая во внимание вышеизложенное, можно утверждать, что комплексообразование ингибиторами с ФМ, происходит при непосредственном участии электростатических сил, и, в меньшей степени, за счет гидрофобных взаимодействий.

Влияние эфффекторов из сапропеля на агрегационную функцию тромбоцитов.

Наиболее изученными агонистами АГ ТЦ являются АДФ и адреналин, поэтому в работе в качестве индукторов мы использовали растворы АДФ (2,5 и 10 мкг/мл) или раствор Тоногена (адреналина). Исследование влияния очищенных ингибиторов, индивидуально полученных в процессе гелефильтрации (рис. 2), и названных эфффекторами I и II, на агрегационную функцию ТЦ. Эксперимент мы проводили на нормальной донорской плазме, богатой ТЦ (центрифугирование в течение 7 мин при 200 g). Регистрировали максимум АГ, время достижения максимума и характер (1- или 2-х волновая). В контроле в систему вносили адекватное количество 0,14 М раствора натрия хлорида. Цифровые значения полученных результатов приведены в таблице 5.

На рисунке 12 представлена контрольная агрегатограмма нормальной плазмы (индуктор - раствор АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл).

На рисунке просматривается как первая волна агрегации, характеризующая АГ ТЦ под влиянием экзогенного индуктора, так и вторая волна АГ, обусловленная высвобождением внутренних медиаторов АГ. Максимальная величина первой волны АГ (\max_1 , %) – 25,3% (во всех случаях максимальная величина АГ определяется по отношению исходной величины светопропускания богатой ТЦ плазмы (0%), к величине светопропускания бедной ТЦ плазмы (100%) в данный момент времени), время достижения максимальной величины первой волны АГ ($t_{\max 1}$, с) – 40 с; максимальная величина второй волны АГ (\max_2 , %) – 55,9%, время достижения максимальной величины второй волны АГ ($t_{\max 2}$, с) – 320 с; максимальная скорость АГ (V_{\max}) – 1,28 (тангенс угла наклона в наиболее крутом участке агрегатограммы); величина АГ через 240 с свидетельствующая о дезагрегации (\min , %) – 32,7%. Далее мы получили агрегатограммы той же плазмы в присутствии эфффекторов I и II (по 0,8 ЕА для каждого эфффектора) (рис. 13 и 14), индуктор – раствор АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл.

Как видно из иллюстраций, ингибиторы, соответствующие эфффекторам I и II практически не изменяют первую волну АГ: \max_1 – 26,2% (на 3,56% больше такового в контроле), $t_{\max 1}$ – 40 с (совпадает с контролем) для эфффектора I \max_1 – 27,4% (на 8,3% больше такового в контроле), $t_{\max 1}$ – 38 с (на 5% меньше контрольной величины), а для эфффектора II заметно угнетается вторая волна: \max_2 – 37% (на 33,81% меньше контрольного значения), $t_{\max 2}$ – 120 с (на 62,5% меньше контрольного значения) для эфффектора I и \max_2 – 44,1% (на 21,11% меньше контрольного значения), $t_{\max 2}$ – 200 с (на 37,5% меньше контрольного значения) для эфффектора II. Это сви-

детельствует о том, что при индуцировании АГ ТЦ раствором АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл нарушается процесс дегрануляции ТЦ и, как следствие, высвобождение внутренних медиаторов АГ. Максимальная скорость АГ в присутствии эффекторов составляет 1,04 (на 16,75% меньше контрольного значения) и 0,81 (на 36,72% меньше контрольного значения) для эффекторов I и II соответственно.

Кроме этого, эффектор I усиливает процесс дезагрегации: min – 19,2% что на 41,28% меньше контрольного значения (для эффектора II эта величина совпадает с контрольным значением).

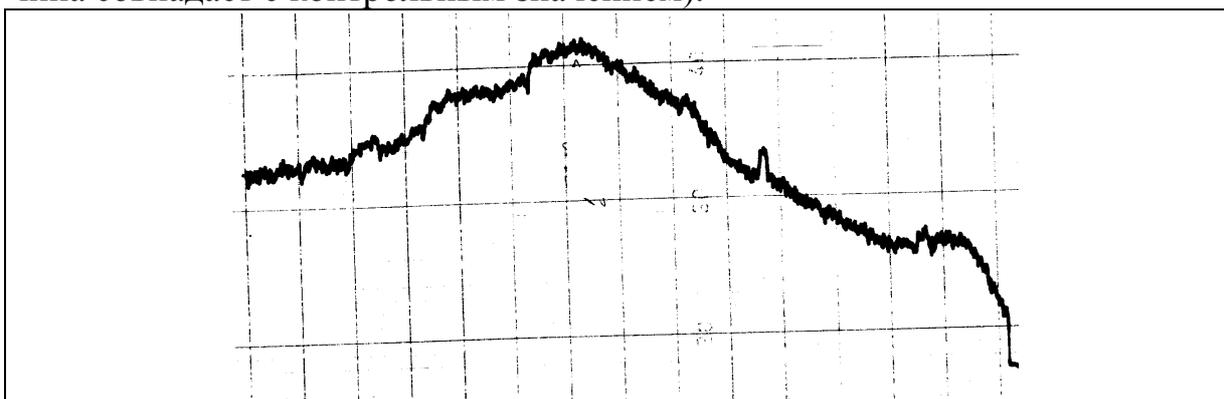


Рисунок 12. Агрегатограмма нормальной плазмы. Результаты анализа агрегатограмм (этой и последующих) представлены в таблице 8.

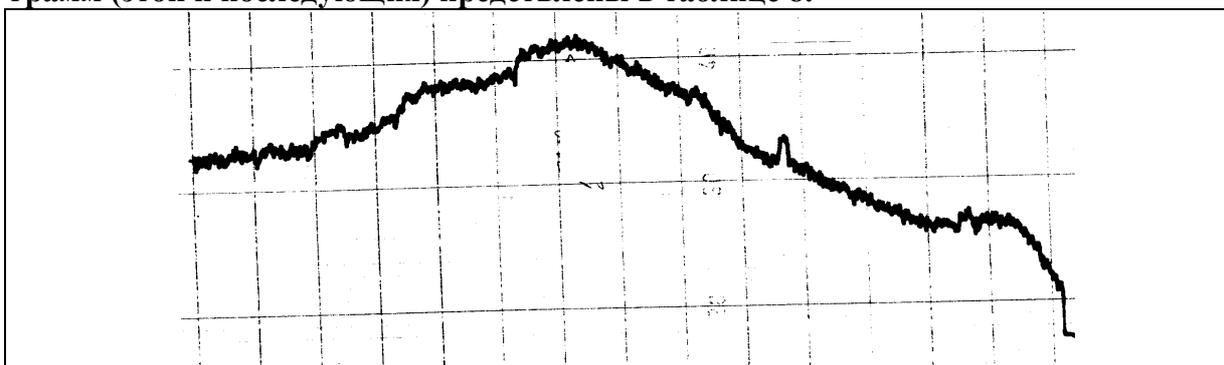


Рисунок 13. Агрегатограмма плазмы в присутствии эффектора I.

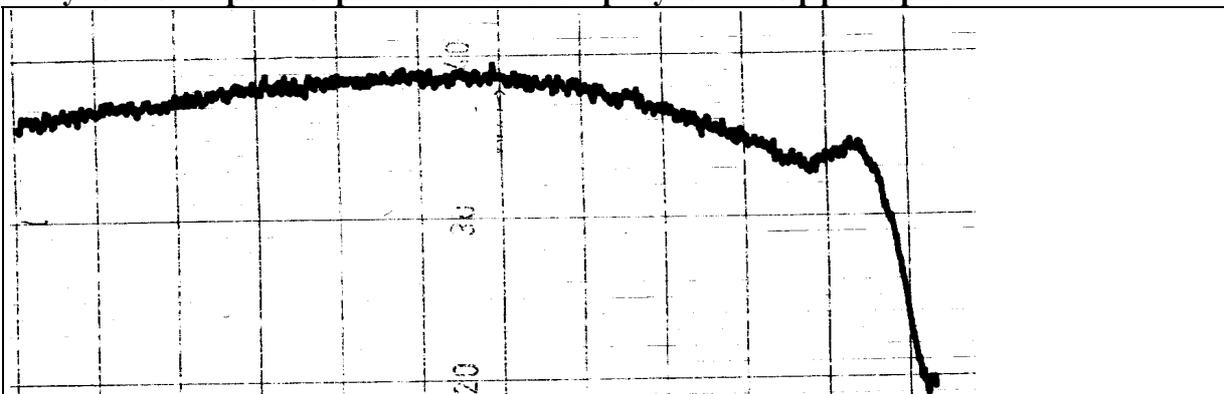


Рисунок 14. Агрегатограмма плазмы в присутствии фракции II.

Этот эксперимент мы повторили, используя в качестве индуктора более высокую концентрацию АДФ - 10 мкг/мл (рис. 15, 16 и 17), при тех же концентрациях эффекторов.

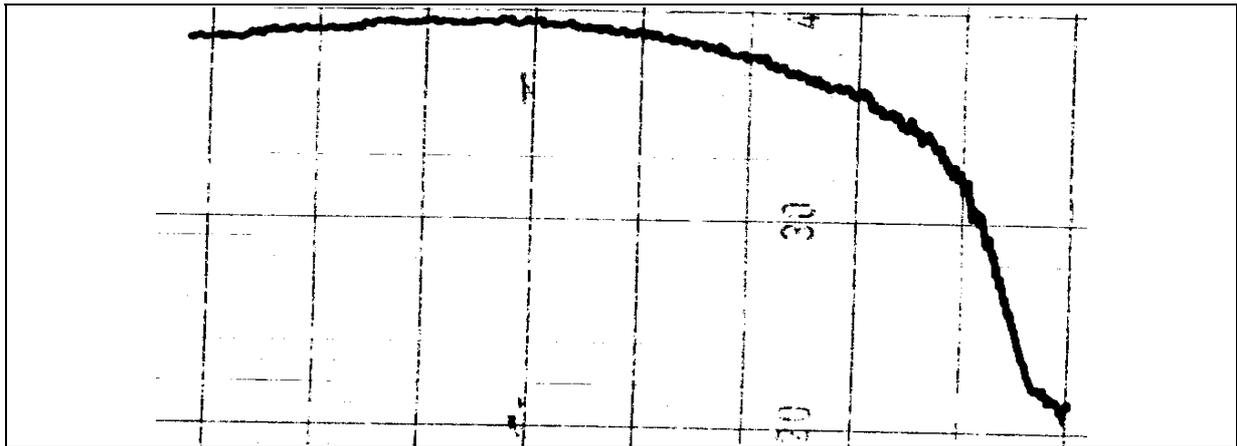


Рисунок 15. Агрегатограмма донорской плазмы

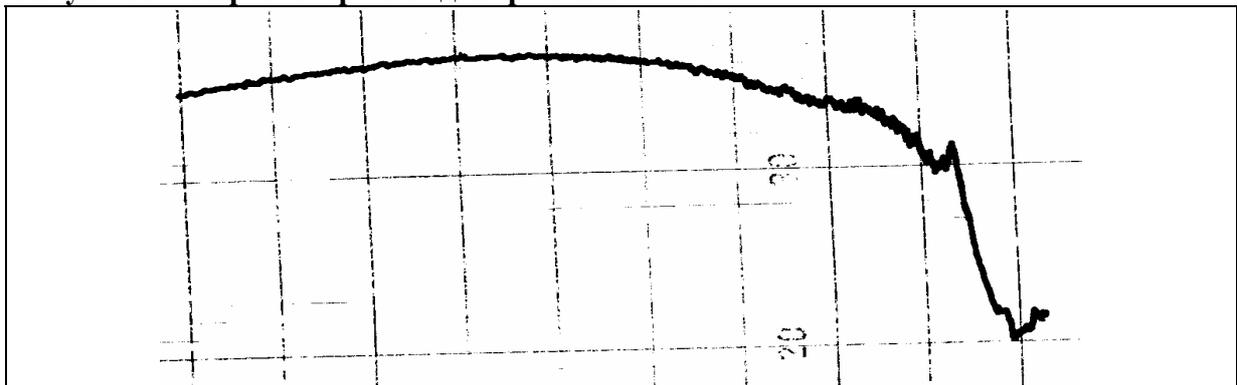


Рисунок 16. Агрегатограмма плазмы в присутствии эффектора I.

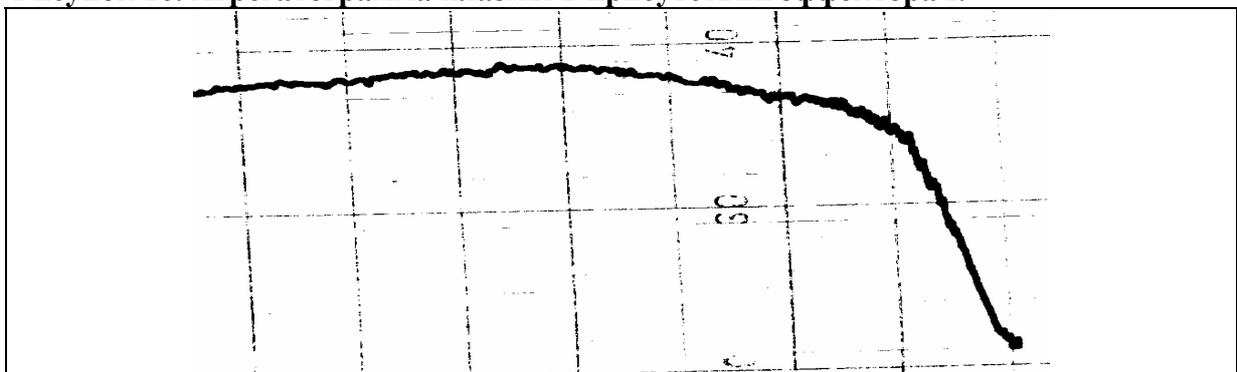


Рисунок 17. Агрегатограмма плазмы в присутствии эффектора II.

Представленные агрегатограммы показывают, что при концентрации АДФ 10 мкг/мл в контроле и в присутствии эффектора II первая волна АГ не выявляется. Максимальная величина АГ в контроле составляет 73,6%, время достижения максимальной агрегации – 205 с. В присутствии эффектора II максимальная величина АГ – 49,2% (меньше контрольного значения на 33,15%), время достижения максимальной АГ – 190 с (меньше контрольного значения на 7,32%). В присутствии эффектора I АГ имеет двухволновой характер: \max_1 – 26,4%, $t_{\max 1}$ – 76 с, \max_2 – 39,1% (меньше соответствующей величины в контроле на 46,87%), $t_{\max 2}$ – 240 с (больше контрольной величины на 17,07%); что свидетельствует о более мощном угнетении фракцией I АДФ-зависимой АГ. Максимальная скорость АГ в контроле составляет 1,33 в присутствии эффектора I – 0,68 в присутствии эф-

фактора II – 0,87 (меньше контрольной величины на 48,87% и 34,59%, соответственно). ДезАГ не наблюдается ни в контроле, ни в присутствии обоих эффекторов.

В следующей серии экспериментов мы в качестве индуктора использовали раствор адреналина. Изучали АГ нормальной донорской плазмы и плазмы в присутствии эффекторов I и II взятых в тех же концентрациях что и в предыдущих экспериментах (рис. 18, 19 и 20).

Как следует из рисунков 18-20 и таблицы 5, адреналин-зависимая АГ нормальной плазмы без добавления эффекторов имеет двухволновой характер: \max_1 – 17,3%, $t_{\max 1}$ – 38 с, \max_2 – 55,8%, $t_{\max 2}$ – 315 с, максимальная скорость агрегации – 0,82.

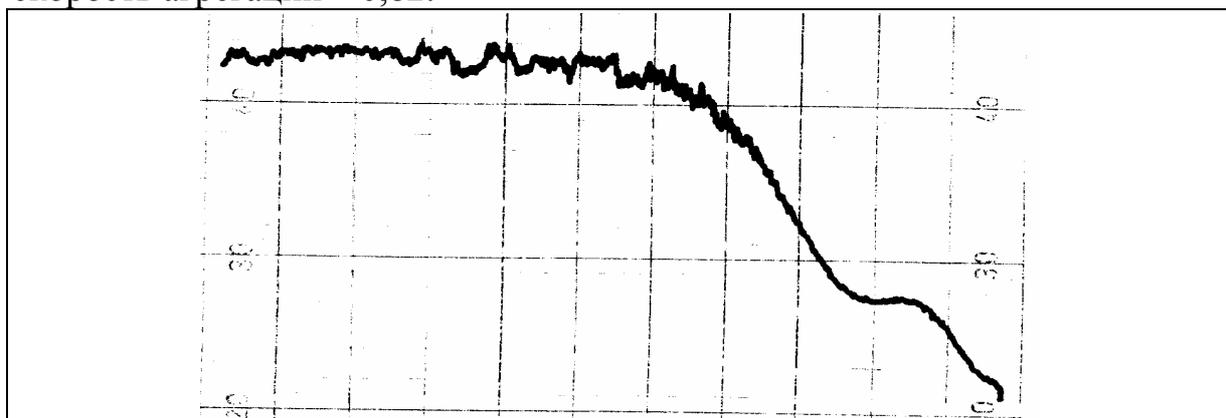


Рисунок 18. Агрегатограмма нормальной донорской плазмы

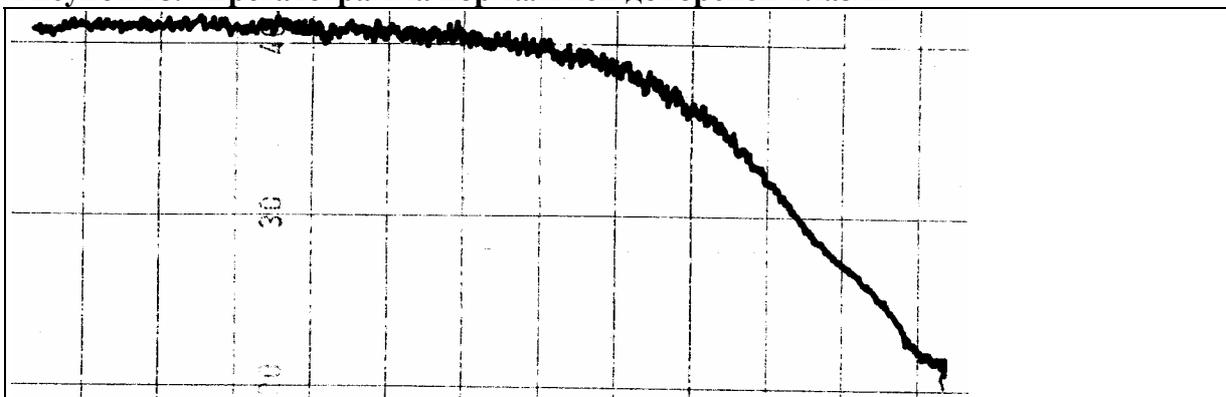


Рисунок 19. Агрегатограмма плазмы в присутствии эффектора I.

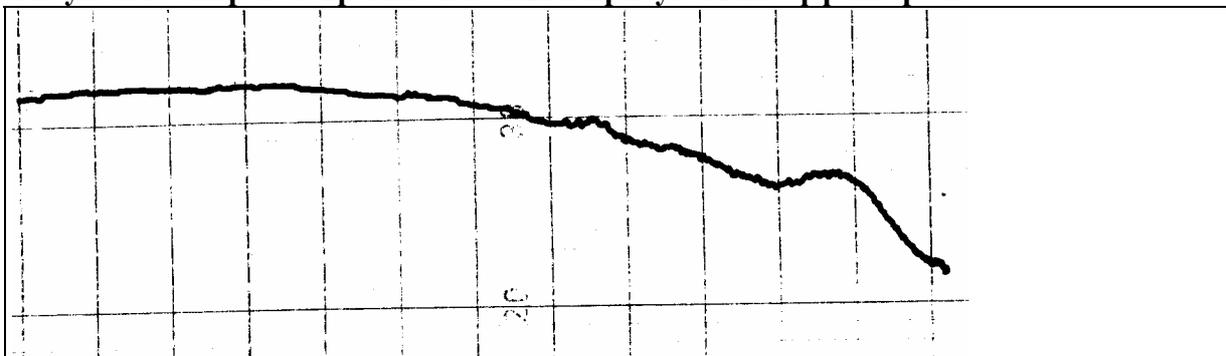


Рисунок 20. Агрегатограмма плазмы в присутствии эффектора II.

Эффектор I сглаживает первую волну АГ, увеличивая время достижения максимума и его величину: $\max_2 - 50,4\%$ (меньше соответствующего контрольного значения на 9,68%), $t_{\max 2} - 355$ с (больше контрольной величины на 12,7%), максимальная скорость АГ – 0,53 (меньше такового в контроле на 35,37%). Эффектор II практически не изменяет максимума первой волны: $\max_1 - 16,6\%$ (меньше соответствующего контрольного значения на 4,05%), но в 2 раза увеличивает время необходимое для его достижения $t_{\max 1} - 76$ с; а так же значительно угнетает реакцию высвобождения внутренних индукторов АГ: $\max_2 - 27,7\%$ (меньше контрольной величины на 50,36%), $t_{\max 2} - 380$ с (больше контрольного значения на 20,63%), максимальная скорость АГ в присутствии эффектора II – 0,44, что меньше соответствующей контрольной величины на 46,34%.

Таблица 5

Влияние эффекторов фракций I и II на агрегационную функцию тромбоцитов

Индуктор	Контроль				
	$\max_1, \%$	$t_{\max 1}, \text{с}$	$\max_2, \%$	$t_{\max 2}, \text{с}$	min, %
АДФ(2,5мкг/мл)	25,3±1	40±4	55,9±2	320±10	32,7
АДФ(10мкг/мл)	-	-	73,6±2	205±12	-
Адреналин	17,3±1	38±3	55,8±2	315±10	-
	Эффектор I				
	$\max_1, \%$	$t_{\max 1}, \text{с}$	$\max_2, \%$	$t_{\max 2}, \text{с}$	min, %
АДФ(2,5мкг/мл)	26,2±1	40±4	37±1*	120±8*	19,2±2*
АДФ(10мкг/мл)	26,4±1	76±5	39,1±2*	240±6*	-
Адреналин	-	-	50,4±2*	355±7*	-
	Эффектор II				
	$\max_1, \%$	$t_{\max 1}, \text{с}$	$\max_2, \%$	$t_{\max 2}, \text{с}$	min, %
АДФ(2,5мкг/мл)	27,4±1	38±3	44,1±2*	200±12*	-
АДФ(10мкг/мл)	-	-	49,2±2*	190±10	-
Адреналин	16,6±1	56±4*	27,7±1*	380±13*	-

Примечание: $\max_1, \%$ - максимальная величина “первой волны” агрегации определяется по отношению исходной величины светопропускания богатой тромбоцитами плазмы (0%), к величине светопропускания бедной тромбоцитами плазмы (100%); $t_{\max 1}, \text{с}$ - время затраченное на достижение максимальной величины “первой волны” агрегации; $\max_2, \%$ - максимальная величина “второй волны” агрегации; $t_{\max 2}, \text{с}$ - время затраченное на достижение максимальной величины “второй волны” агрегации; min, % - минимальная величина агрегации через 240 с.

Как следует из вышеприведенных данных, оба эффектора ограничивают агрегационную способность ТЦ, однако механизм их влияния на АГ различен. Эффектор I преимущественно ограничивает АДФ-индуцированную АГ с угнетением реакции высвобождения, а адреналин-зависимую - не значительно. Эффектор II сильно угнетает реакцию высвобождения адреналин-зависимой АГ и, в меньшей степени, ограничивает АДФ-зависимую.

Гемокоагуляционные изменения при внутривенном введении эфффекторов из сапропеля лабораторным животным.

Если в опытах по выделению, изучению природы и механизма влияния на плазмокоагуляцию пептидных ингибиторов из сапропеля вполне устраивало выражение количества ингибиторов в ЕА, то в этих экспериментах посчитали необходимым установить их количественное содержание в весовых единицах. Для этого накопили эфффекторы I и II, и объединили их в пропорции, соответствующей содержанию в нативном сапропеле, поместили в стеклянный бюкс и высушили в вакуум-сушильном шкафу при температуре 50°C. Сухой остаток взвесили и сопоставили количество ЕА, содержащихся в 1 мг субстанции. Установили, что 1 мг субстанции содержит 137,5 ЕА. В дальнейших экспериментах мы ориентировались на эти цифры.

Проанализировали состояние плазмокоагуляции в ответ на внутривенное ведение эфффекторов. Определяли показатели, которые интегрально отражают свертывающую активность плазмы крови, взаимодействие ТР с ФГ и полимеризацию ФМ, а также действие антикоагулянта при тромбонемии, вызванной инъекцией взвеси ТП провели предварительное изучение изменений агрегационной активности ТЦ после введения эфффекторов.

Первоначально изучили зависимость проявляемого антикоагулянтного эфффекта от дозы вводимого субстрата (9,2, 7,0 и 4,8 мг/кг массы тела животного). Отбор проб производили через 30 мин после инъекции, контрольным животным вводили физ. раствор (табл. 6).

Таблица 6

ВР, ТВ и ВС при внутривенном введении эфффектора из сапропеля в разных дозах

Концентрация эфффектора, мг/кг	Определяемый показатель		
	ВР, с	ТВ, с	ВС, с
Контроль	64 ± 1,0	21 ± 0,5	38 ± 1,5
9,2	248 ± 6,0*	72 ± 1,0*	312 ± 4,0*
7,0	132 ± 3,5*	69 ± 2,5*	184 ± 4,5*
4,8	122 ± 2,0*	37 ± 2,5*	138 ± 2,0*

Примечание: значком * показаны достоверные отличия.

Приведенные в таблице 6 данные свидетельствуют о выраженной дозозависимости антикоагулянтного эфффекта. Так, при дозе вводимого субстрата 4,8 мг/кг ВР по сравнению с контролем увеличивается в 1,9 раза, ТВ - в 1,7 и ВСФ - в 3,6 раза. При увеличении дозы эфффекторов до 7,0 мг/кг (в 1, 4 раза) эти же показатели становятся выше контрольных значений в 2,1, 3,3 и 4, 8 раза. При дальнейшем увеличении дозы до 9,2 мг/кг массы тела животного ВР по сравнению с контролем возрастает в 3,9 раза, ТВ - в 3,4 и ВСФ в плазме крови - в 8,2 раза.

Эфффективной дозой прямых антикоагулянтов должна быть такая доза, которая удлиняет ВР в 1,5 - 3 раза. В нашем случае оптимальной дозой

эффекторов-антикоагулянтов можно считать дозу 7,0 мг/кг массы тела животного, удлиняющую ВР плазмы крови при однократной инъекции в 2,1 раза.

Мы проследили динамику изменений показателей свертывающей активности плазмы крови во времени. Лабораторным животным вводили сумму эффекторов в дозе 7,0 мг/кг массы, отбирая кровь через 3 мин, 30 мин, 1, 3, 6, 12 и 18 часов (табл. 7).

Таблица 7

ВР, ТВ и ВС в разные сроки после введения эффекторов свертывания крови

Отбор проб крови производили через:	<u>Определяемый показатель</u>		
	ВР, с	ТВ, с	ВС, с
Контроль	72 ± 1,0	24 ± 1,5	38 ± 1,0
3 мин	108 ± 2,5*	50 ± 2,0*	102 ± 2,5*
30 мин	150 ± 1,5*	76 ± 4,0*	184 ± 2,5*
1 час	211 ± 2,0*	89 ± 2,5*	256 ± 4,5*
3 часа	188 ± 3,2*	74 ± 2,5*	224 ± 5,0*
6 часов	113 ± 2,5*	58 ± 1,5*	192 ± 3,0*
12 часов	104 ± 5,0*	44 ± 3,0*	176 ± 1,5*
18 часов	78 ± 3,5	24 ± 1,0	121 ± 3,0*

Из таблицы 7 видно, что уже на 3 мин после инъекции субстрата наблюдается снижение скорости реакции плазмокоагуляции: ВР увеличилось на 150%, ТВ - на 208%, ВСФ - на 268%.

Изучили защитное действие исследуемых пептидов, используя экзогенную тромбопластинемию как модель, которая позволяла оценить эффективность субстрата из сапропеля в качестве средства, повышающего толерантность животных к воздействиям, вызывающим активацию ТР-геназа. Коммерческий препарат тканевого ТП (активность 20,5 с) вводили в яремную вену в дозе 40 мг/кг массы тела (контрольным животным вводили изотонический раствор хлорида натрия), через 30 мин после предварительного введения субстрата в дозе 7,0 и 9,2 мг/кг массы тела. Регистрировали количество погибших животных в группе, а также время наступления их гибели. В предварительных опытах было установлено, что в случае выживания от указанной дозы ТП, гибель после 24 часов не наступает, поэтому время наблюдения за подопытными животными было ограничено 24 ч. Результаты представлены в таблице 8.

Согласно приведенным данным, при внутривенном введении подопытным животным ТП (на фоне предварительного введения изотонического раствора хлорида натрия) летальность составила 70%. При этом основная часть животных (14 особей) погибла в течение первых 4-х часов. На фоне предварительного внутривенного введения субстрата из сапропеля в дозе 7,0 мг/кг массы тела животного, после введения ТП летальность составила 26,6%, а при дозе 9,2 мг/кг – только 6,6%, причем гибель животных (в обеих группах) наблюдалась на протяжении 15 часов. Следовательно-

но, антикоагулянт в дозах 7,0 и 9,2 мг/кг массы тела снижает частоту гибели подопытных животных в 2,6 и 10,5 раза соответственно.

Таблица 8

Частота гибели животных при введении тромбопластина на фоне предварительного воздействия эффекторов из сапропеля

	Экстракт в дозе, мг/кг	Число крыс	Выжило	Погибло	Частота гибели, %	P
Контроль	–	30	9	21	70,0	–
Опыт	7,0	30	22	8	26,6	<0,05
	9,2	30	28	2	6,6	<0,05

Влияние эффекторов из сапропеля на агрегационную функцию тромбоцитов при их внутривенном введении лабораторным животным.

Исследуя изменения АГ ТЦ при внутривенном введении эффекторов, беспородным белым крысам вводили субстрат в дозе 5 мг/кг массы тела животного. Отборы крови производили через 3 мин, 30 мин, 1, 3 и 6 часов, ориентируясь на изменения показателей плазмокоагуляции. Оценивали максимум АГ и время его достижения в богатой ТЦ плазме, используя в качестве индукторов растворы АДФ (2,5 и 10 мкг/мл) или адреналина.

Из таблицы 9 видно, что максимальное снижение индуцированной АГ происходит на 3 мин после внутривенной инъекции субстрата: максимум АГ при использовании в качестве индуктора раствора АДФ (2,5 мкг/мл) меньше контрольного значения на 45,98%, при использовании более высокой концентрации АДФ (10 мкг/мл) - на 46,65%, а при активации АГ адреналином - на 33,58%. Для наглядности происходящих процессов, мы приводим агрегатограммы на пике (3-я минута после внутривенного введения эффекторов) антиагрегантной активности (рис. 21 – 23).

Таблица 9

Изменения агрегации тромбоцитов в разные сроки после внутривенного введения субстрата, содержащего эффекторы I и II.

Отбор проб крови произ- водили че- рез:	Индуктор					
	АДФ(2,5 мкг/мл)		АДФ(10 мкг/мл)		Адреналин	
	max., %	t, с	max., %	t, с	max., %	t, с
Контроль	13,2±0,7	52±2	35,8±2	122±8	26,5±2	257±7
3 мин	7,13±0,2*	78±4*	19,1±0,6	108±5	17,6±1	272±8
30 мин	8,6±0,1*	81±3*	23,8±1	116±5	19,1±1	268±9
1 час	9,4±0,3*	75±3*	26,3±1,5	120±6	21,5±1,5	263±11
3 часа	11,1±0,2	62±2*	29,2±2	123±4	23,9±2	265±8
6 часов	12,3±0,6	54±2	31,6±2	128±7	24,8±3	262±12

Примечание: Максимальная величина (max., %) агрегации определяется по отношению исходной величины светопропускания богатой тромбоцитами плазмы (0%), к величине светопропускания бедной тромбоцитами плазмы (100%); t, с – время затраченное на достижение максимальной величины агрегации.

В течении последующих 6 часов антиагрегантный эффект введенной суммы эффекторов постепенно снижается и по истечении этого времени приближается к контрольным величинам, но не достигает их. Через 6 часов после введения при активации АГ раствором АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл максимальная величина АГ составляет 93,18% от контроля, а время необходимое для её достижения - 103,85% от такового в контроле. При индуцировании АГ раствором АДФ в концентрации 10 мкг/мл эти величины составляют 88,27% и 104,92%, а при использовании в качестве индуктора раствора адреналина 90,64% и 101,94% соответственно.

Приведенные выше данные показывают, что внутривенное введение пептидов из сапропеля снижает АГ ТЦ при активации процесса различными дозами АДФ и адреналином. Их эффект достаточно продолжителен, хотя и не в такой степени, как на плазмокоагуляцию.

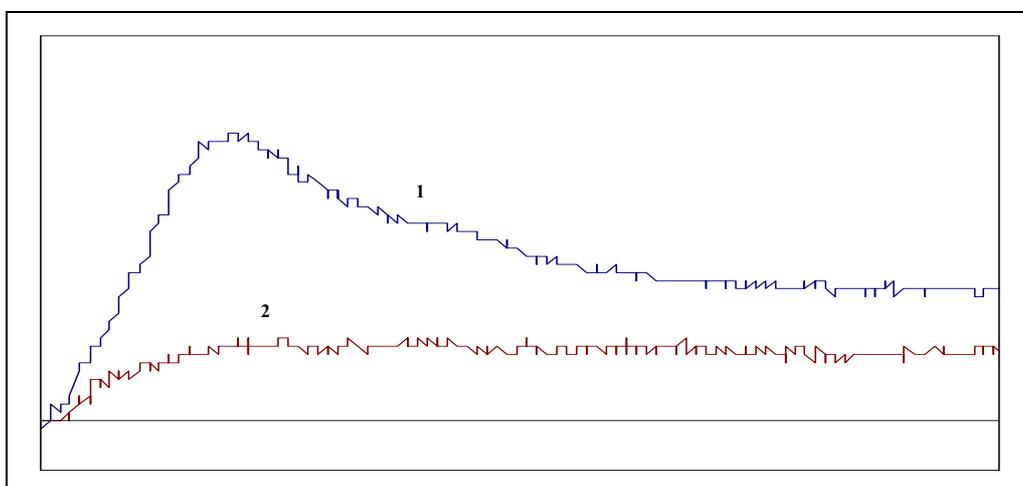


Рисунок 21. Агрегатограммы богатой тромбоцитами плазмы крысы. Индуктор – раствор АДФ в концентрации 2,5 мкг/мл. 1 – контрольная агрегатограмма; 2 – агрегатограмма на фоне предварительного введения эффекторов (5 мг/кг).

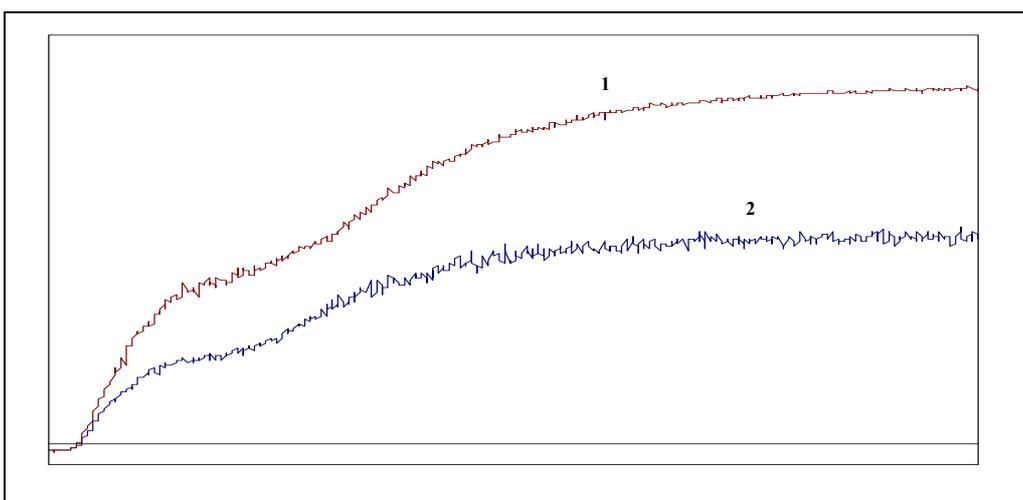


Рисунок 22. Агрегатограммы богатой тромбоцитами плазмы крысы. Индуктор – раствор АДФ в концентрации 10 мкг/мл. 1 – контрольная агрегатограмма; 2 – агрегатограмма на фоне предварительного введения эффекторов (5 мг/кг).

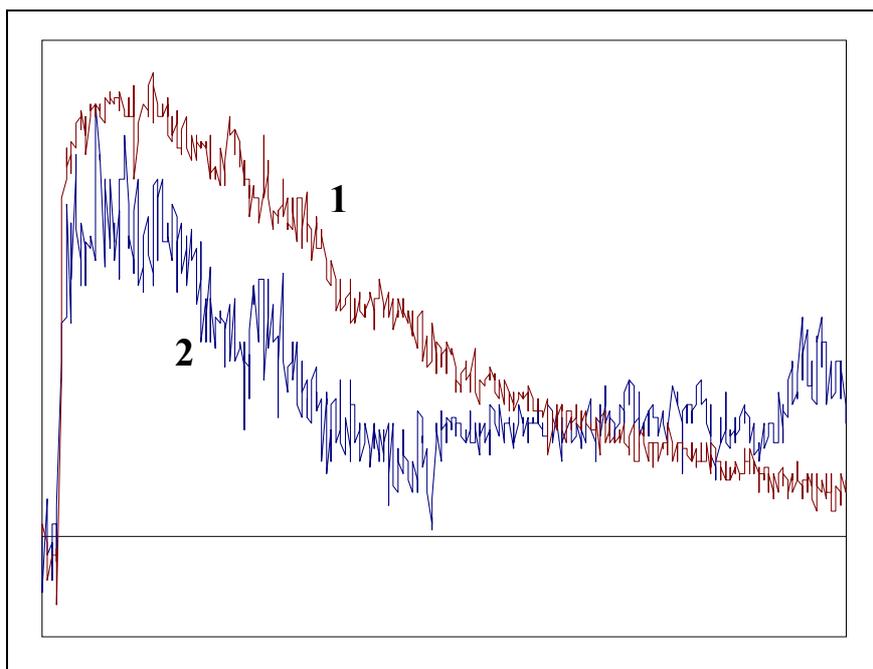


Рисунок 23. Агрегатограммы богатой тромбоцитами плазмы крыс. Индуктор – раствор адреналина. 1 – контрольная агрегатограмма; 2 – агрегатограмма на фоне предварительного введения эффекторов (5 мг/кг).

Таким образом, внутривенное введение пептидов из сапропеля вызывает выраженный дозозависимый и продолжительный гипокоагуляционный эффект, оказывая преимущественное влияние на III фазу свертывания крови. Их превентивное введение ограничивает развитие тромбоза, вызываемое экзогенной тромбопластинемией. Эффекторы из сапропеля оказывают выраженное антиагрегационное действие *in vivo*, ограничивая интенсивность АДФ- и адреналин-индуцированной агрегации.

Все вышесказанное свидетельствует о необходимости дальнейшего подробного изучения эффекторов из сапропеля, как перспективных антикоагулянтов прямого действия.

6. ВЫВОДЫ

1. Установлен источник антикоагулянтов прямого действия – сапропель.

2. Разработан способ, позволяющий получать из сапропеля два индивидуальных высокоочищенных эффектора свертывания крови с антикоагулянтной активностью.

3. Механизм действия эффекторов из сапропеля отличается от механизма действия прямого антикоагулянта – гепарина. Ингибиторный эффект реализуется на уровне коагуляционного превращения фибриногена, в частности, на этапе аутополимеризации мономерного фибрина путем образования малоактивных комплексов эффекторов с фибринмономером посредством электростатических связей.

4. Механизм действия эффекторов I и II не идентичен между собой. Эффектор I ограничивает формирование из олигомеров протофибрилл, а эффекттор II – образование олигомеров. При их совместном влиянии на коагуляционное превращение фибриногена наблюдается синергизм эффекторов.

5. Эффекторы из сапропеля обладают антиагрегационной активностью, ограничивая АДФ- и адреналин-зависимую агрегацию тромбоцитов. Эффектор I преимущественно ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию, а эффекттор II - адреналин-зависимую, угнетая высвобождение внутренних факторов агрегации тромбоцитов.

6. Внутривенное введение лабораторным животным суммы эффекторов из сапропеля приводит к развитию стойкой гипокоагулемии, обусловленной угнетением плазменного и тромбоцитарного компонентов гемостаза. Превентивное введение эффекторов предотвращает гибель животных от тромбоза при экзогенной тромбопластинемии.

7. Сочетание антикоагулянтных и антиагрегантных свойств эффекторов из сапропеля определяет необходимость их дальнейшего изучения, как перспективных средств коррекции гемостаза.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Кортусов, В.Л. Некоторые свойства антикоагулянтов из сапропеля. / В.Л. Кортусов, Е.А. Чирятьев, Е.П. Калинин, и др. // Тромбоз, гемостаз и реология. Мат. IV национальной конф. «Атеротромбоз и артериальная гипертензия». – 2001. - №1(5). – С.140-141.
2. Кортусов, В.Л. Прокоагулянты средней массы растительного происхождения: выделение и природа. / В.Л. Кортусов, Е.А. Чирятьев, О.А. Русакова // Медицинская наука и образование Урала. – 2005. - №5(39). – С. 76.
3. Кортусов, В.Л. Изучение лекарственной флоры Тюменской области кафедрой фармакогнозии и ботаники ТюмГМА. // В.Л. Кортусов, Е.А. Чирятьев, И.Я. Герберт и др. // Мат. медико-фармацевтической науч.-практ. конф. УралФО «Актуальные вопросы лекарственного обеспечения населения УралФО в системе ДЛО». Тюмень: ГОУ ВПО ТюмГМА Росздрава, 2006. – С. 113-117.
4. Кортусов, В.Л. Пептидные ингибиторы свертывания крови./ В.Л. Кортусов, Е.А. Чирятьев, О.А. Русакова, и др. // Медицинская наука и образование Урала и Сибири. – 2007. - №3(47). – С. 96-103.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ФМ – фибринмономер

ТР – тромбин

ФГ – фибриноген

ВР – время рекальцификации

ТВ – тромбиновое время

ГК – гуминовые кислоты

ГП – гепарин

АТ-III – антитромбин III

ТЦ – тромбоциты

АВР – активированное время рекальцификации

АЧТВ - активированное частичное время рекальцификации

ВСФ – время свертывания фибрина

ФБ – фибрин

ФП – фибринопептиды

АГ – агрегация

КОРТУСОВ ВАДИМ ЛЕОНИДОВИЧ

**ЭФФЕКТОРЫ СВЕРТЫВАНИЯ КРОВИ
ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ
(экспериментальное исследование)**

**Автореферат диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук**