

ЛИТЕРАТУРА

1. Граник В.Г. Метаболизм L-аргинина (обзор) // Хим.-фарм. ж. — 2003. — Т. 37, №3. — С. 3–20. [Granik V.G. Molecular-biological problems of drug design and mechanism of drug action: metabolism of L-arginine (a review). *Pharmaceutical chemistry journal*. 2003; 37 (3): 111–127.]

2. Копелевич В.М. Витаминоподобные соединения L-карнитин и ацетил-L-карнитин: от биохимических исследований к медицинскому применению // Украин. биохим. ж. — 2005. — Т. 77, №4. — С. 25–45. [Kopelevich V.M. Vitamine-like substances L-carnitine and acetyl-L-carnitine: from biochemical studies to medicine. *Ukrainskiy biokhimicheskiy zhurnal*. 2005; 77 (4): 25–45. (In Russ.)]

3. Костюченко Г.И. Гипергомоцистеинемия: клиническое значение, возрастные особенности, диагностика и коррекция // Клин. геронтол. — 2007. — Т. 13, №4. — С. 32–40. [Kostuchenko G.I. Hyperhomocysteinemia: clinical significance, age characteristics, diagnosis and correction. *Klinicheskaya gerontologiya*. 2007; 13 (4): 32–40. (In Russ.)]

4. Маслов А.П., Теляков А.Т., Кузнецова А.В. Гипергомоцистеинемия и повышенный риск сердечно-сосудистых осложнений у больных ИБС с атерогенной гиперхолестеринемией // Сибир. мед. ж. (Томск). — 2009. — №4-2. — С. 25–30. [Maslov A.P., Telyakov A.T., Kouznetsova A.V. Hyperhomocysteinaemia and increased risk of cardiovascular complications in patients having ischemic heart disease with atherogenic hypercholesterolemia. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Tomsk)*. 2009; 4(2): 25–30. (In Russ.)]

5. Медведев Д.В., Звягина В.И., Фомина М.А. Способ моделирования тяжелой формы гипергомоцистеинемии у крыс // Рос. мед.-биол. вестн. им. И.П. Павлова. — 2014. — №4. — С. 42–46. [Medvedev D.V., Zvyagina V.I., Fomina M.A. Modeling of severe hyperhomocysteinemia in rats. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik im. akademika I.I. Pavlova*. 2014; 4: 42–46. (In Russ.)]

6. Панин Л.Е., Маянская Н.Н. Лизосомы: роль в адаптации и восстановлении. — Новосибирск: Наука СО, 1987. — 198 с. [Panin L.E., Mayanskaya N.N. *Lizosomy: rol v adaptatsii i vosstanovlenii*. (Lysosomes: role in adaptation and restoration.) Novosibirsk: Nauka SO. 1987; 198 p. (In Russ.)]

7. Паунова С.С. Апоптоз — физиология и патология // Нефрол. и диализ. — 2004. — №2. — С. 132–136.

[Paunova S.S. Apoptosis — physiology and pathology. *Nefrologiya i dializ*. 2004; 2: 132–136. (In Russ.)]

8. Покровский М.В., Покровская Т.Г., Кочкаров В.И., Артюшкова Е.Б. Эндотелиопротекторные эффекты L-аргинина при моделировании дефицита окиси азота // Эксперим. и клин. фармакол. — 2008. — Т. 71, №2. — С. 29–31. [Pokrovskiy M.V., Pokrovskaya T.G., Kochkarov V.I., Artyushkova E.B. Endothelioprotective properties of L-arginine on a nitric oxide deficiency model. *Ekspierimtal'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2008; 71 (2): 29–31. (In Russ.)]

9. Путьшев А.Б. Пермеабилзация лизосомальных мембран как апоптогенный фактор // Цитология. — 2011. — Т. 53, №4. — С. 313–324. [Pupyshov A.B. Lysosomal membrane permeabilization as apoptogenic factor. *Tsitologiya*. 2011; 53 (4): 313–324. (In Russ.)]

10. Хидирова Л.Д., Маянская М.Н., Антонов А.Р., Маянская С.Д. Гиперинсулинемия в повреждении миокарда // Международ. ж. прикладн. и фундамент. исслед. — 2009. — №4. — С. 95. [Khidirova L.D., Mayanskaya M.N., Antonov A.R., Mayanskaya S.D. Hyperinsulinemia in myocardial injury. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamentalnykh issledovaniy*. 2009; 4: 95. (In Russ.)]

11. Barret A.J., Kirshke H. Cathepsin B, cathepsin H, cathepsin L // *Methods in Enzymol.* — 1981. — Vol. 80. — P. 535–561.

12. Felbor U., Dreier L., Bryant R.A. et al. Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII // *EMBO J.* — 2000. — Vol. 19, N 6. — P. 1187–1194.

13. Jin M., Klionsky D.J. Regulation of autophagy: modulation of the size and number of autophagosome // *FEBS Letters.* — 2014. — Vol. 588. — P. 2457–2463

14. Rajasekar P., Palanisamy N., Anuradha C.V. Increase in nitric oxide and reduction in blood pressure, protein kinase C beta II and oxidative stress by L-carnitine: a study in the fructose-fed hypertensive rat // *Clin. Exp. Hypertens.* — 2007. — Vol. 29, N 8. — P. 517–530.

15. Repnik U., Turk B. Lysosomal-mitochondrial cross-talk during cell death // 2010. — Vol. 10, N 6. — P. 662–669. — DOI: 10.1016/j.mito.2010.07.008.

16. Terman A., Kurz T., Gustafsson B., Brunket U. Lysosomal labilization // *IUBMB Life.* — 2006. — Vol. 58, N 9. — P. 531–539.

17. Yap Y.W., Whiteman M., Bay B.H. et al. Hypochlorous acid induces apoptosis of cultured cortical neurons through activation of calpains and rupture of lysosomes // *J. Neurochem.* — 2006. — Vol. 98. — P. 1597–1609.

УДК 615.273.53: 615.32: 615.076.9

## ПОЛУЧЕНИЕ, ОЧИСТКА И ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕПТИДНОГО АНТИКОАГУЛЯНТА ИЗ САПРОПЕЛЯ

Евгений Павлович Калинин\*, Даниэль Игоревич Бояринцев, Сергей Леонидович Галян

Тюменский государственный медицинский университет, г. Тюмень, Россия

**Реферат**

**DOI: 10.17750/KMJ2015-824**

**Цель.** Получить экстракт сапропеля, содержащий пептидный антикоагулянт, провести его очистку от соэкстрагируемых соединений, подтвердить химическую природу очищенного антикоагулянта, дать характеристику аминокислотного состава и оценить его воздействие на свёртывающую активность крови в пробирочных тестах и влияние на показатели гемостаза лабораторных животных.

**Методы.** Источником антикоагулянта послужил сапропель озера Тараскуль (Тюменская область). Получали и очищали эффектор по разработанной нами методике, включающей экстракцию, осаждение гуминовых кислот высаливанием и удаление фульвокислот и низкомолекулярных фракций гуминовых кислот ионообменной хроматографией. Оценку чистоты и гомогенности полученного антикоагулянта проводили с помощью высоко-

эффективной жидкостной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле. Определяли химическую природу эффектора, проводя его кислотный гидролиз и идентифицируя фенилтиогидантоиновые производные аминокислот с помощью обращённо-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Специфическую антикоагулянтную активность оценивали по влиянию эффектора на тромбин-зависимое превращение фибриногена в фибрин и тромбиновое время плазмы крови после введения лабораторным животным.

**Результаты.** Из сапропеля выделен и очищен пептидный антикоагулянт, активность которого реализуется на этапе взаимодействия тромбина с фибриногеном. Эффектор удлиняет время образования фибринового сгустка как в модельной тестовой системе, так и при внутривенном введении крысам. Антикоагулянтный эффект пептида при введении животным выявляется в течение не менее 60 мин, при этом выраженное токсическое действие не проявляется.

**Вывод.** Выделенный эффектор может послужить основой для разработки лекарственных средств с антикоагулянтным действием.

**Ключевые слова:** лекарственные средства природного происхождения, анализ, стандартизация, идентификация, антикоагулянт, сапропель.

#### PREPARATION, PURIFICATION AND COMMON CHARACTERISTICS OF ANTICOAGULANT PEPTIDE FROM PELOID

*E.P. Kalinin, D.I. Boyarintsev, S.L. Galyan*

*Tyumen State Medical University, Tyumen, Russia*

**Aim.** To obtain the peloid extract containing peptide anticoagulant, to separate it from co-extracted compounds, to confirm the chemical structure of the purified anticoagulant, to characterize the amino acid profile and to evaluate its effect on blood clotting activity *in vitro* and the effect on hemostasis in laboratory animals.

**Methods.** The anticoagulant was derived from lake Taraskul (Tyumen region) peloid. The effector was prepared and purified by original method including extraction, sedimentation of humic acids by salting-out, and removal of fulvic acids and low molecular weight fractions of humic acids by ion exchange chromatography. Purity and homogeneity of gained anticoagulant was evaluated by high performance liquid chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. The chemical composition of the active substance was determined by acid hydrolysis and identification of phenylthiohydantoin amino acid derivatives by reversed-phase high performance liquid chromatography. Specific anticoagulant activity was evaluated by substance's influence on effect of thrombin-dependent conversion of fibrinogen to fibrin and serum thrombin clotting time after being administered to laboratory animals.

**Results.** Peptide anticoagulant was isolated of the peloid and purified. Its activity is realized at the stage of thrombin and fibrinogen interaction. The substance prolongs the fibrin clotting time both in a model test system and when administered intravenously to rats. The anticoagulant effect of the peptide when administered to animals lasts at least 60 min, and no significant toxic effects appear.

**Conclusion.** An isolated active substance might be a basis for the drug development of anticoagulants.

**Keywords:** natural crude drug, analysis, standardization, identification, anticoagulant, peloid.

Выбор современных лекарственных средств с антикоагулянтной активностью достаточно широк [5], однако поиск соединений, способных угнетать гемокоагуляцию, если судить по количеству публикаций, не прекращается [9]. Интерес к прогивосвёртывающим средствам обусловлен как высокой частотой развития тромбозов, так и осложнениями, сопровождающими применение известных антикоагулянтов [6].

При этом, судя по литературным источникам, практически не рассматривают возможность целенаправленного воздействия на образование фибрин-мономеров (за исключением ингибиторов тромбина) и сборку фибрина, хотя доказано существование эндогенных ингибиторов этого процесса [1] и природных агентов, способных стать фармакологическими средствами для такой регуляции.

Так, установлено, что в ряде растений содержатся антикоагулянты прямого действия, представляющие собой гликопептиды, механизм действия которых отличен от известных антикоагулянтов, но имеет сходство с механизмом ограничения плазмокоагуляции пептидами, выделенными из плаз-

мы крови человека и животных. Их эффект реализуется на уровне заключительной фазы свёртывания — превращения фибриногена в фибрин, преимущественно на ранних этапах образования олиго- и полимеров. По литературным данным [3], растительные гликопептиды действуют достаточно продолжительно (до 24 ч после однократной инъекции), не вызывают «рикошетной» гиперкоагулемии и не обладают токсическим действием.

Также показано, что сходные по природе и механизму действия эффекторы могут быть выделены из сапропеля [7]. Главная проблема, препятствующая дальнейшему изучению пептидных антикоагулянтов из сапропеля, — недостаточная очистка действующего вещества от сопутствующих соединений, сожстрагируемых из сырья. Основной такой примесью являются гуминовые кислоты — крайне гетерогенное как по молекулярным массам, так и по представленному набору функциональных групп семейство органических веществ.

Учитывая, что пептидные ингибиторы свёртывания крови, выделенные из растительных источников, оказались достаточно устойчивыми соединениями, не демонстри-

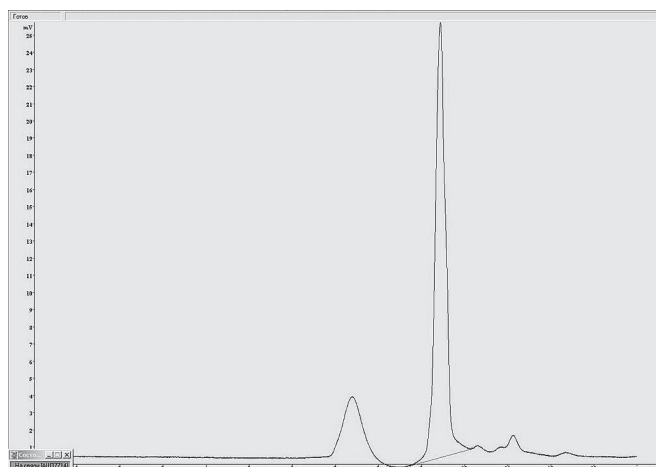


Рис. 1. Профиль элюции антикоагулянта из сапропеля. Условия разделения в тексте. Внесённый на колонку очищенный экстракт сапропеля элюируется одним пиком, что соответствует единственному пептидному соединению

рующими выраженного токсического действия и проявляющими устойчивый дозозависимый эффект, представляется важным на максимально возможном уровне очистить антикоагулянт, уточнить его химическую природу и воздействие на свёртывание крови, поскольку вероятность получения пептидного эффектора из сапропеля как новой фармакологической субстанции высока.

Материалом для исследования послужил сапропель озера Большой Тараскуль, расположенного в Тюменской области, антикоагулянт из которого получали по ранее разработанному методу [4], усовершенствованному нами.

Оценку чистоты полученного антикоагулянта проводили с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях. Высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) проводили на модульном хроматографе «Gilson» (Франция), используя в качестве детектора спектрофотометр с проточной кюветой «Gilson-119» (UV/vis, рабочая длина волны 210 и 254 нм). Электрофорез в полиакриламидном геле выполняли в варианте диск-фореза с использованием комплекта оборудования производства «Реанал» (Венгрия), с последующей окраской кумасси голубым (Coomassie Brilliant Blue R-250).

Антикоагулянтную активность выделенного пептида оценивали по удлинению тромбинового времени в модельных пробирочных тестах и при внутривенном введении нелинейным белым крысам.

После удаления соэкстрагируемых из сапропеля гуминовых веществ и очистки

предполагаемого эффектора оценивали его гомогенность с использованием ВЭЖХ на колонке «ReproSil C-18». В качестве элюента использовали ацетатный буфер с pH=5,0, содержащий 30% ацетонитрила в присутствии 1% дихлорэтана, скорость протока 1 мл/мин, детектирование при длине волны 210 нм. Очищенная фракция элюировалась с колонки одним пиком, что позволяет говорить о достаточной чистоте полученного эффектора (рис. 1).

Дополнительно провели электрофорез полученной фракции экстракта в полиакриламидном геле (градиент концентрации геля 5–25%) в присутствии додецил-сульфата натрия. После окраски геля кумасси голубым визуализировалась единственная окрашенная зона, что подтверждает как чистоту полученного эффектора, так и его химическую природу, поскольку использованный краситель специфичен для веществ белково-пептидной природы.

На этом этапе тестировали полученное соединение на наличие антикоагулянтной активности, используя модельную тест-систему (раствор фибриногена в трис-HCl буфере с pH=7,4 и раствор коммерческого тромбина). По полученным данным рассчитывали эффективность торможения по формуле  $i=1-(t_k/t_0)$ , где  $t_k$  и  $t_0$  — время затраченное на образование сгустка фибрина в контрольной и опытной пробах соответственно.

Очищенная фракция экстракта выражено и дозозависимо удлиняла время образования фибринового сгустка (рис. 2), что позволяет утверждать, что выделен и очищен эффектор свёртывания крови, являющийся

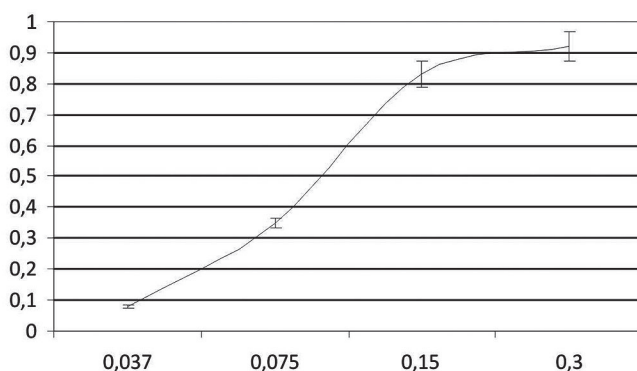


Рис. 2. Зависимость эффективности торможения взаимодействия тромбина с фибриногеном в модельной системе от концентрации антикоагулянта из сапропеля. Абсцисса – концентрация эффектора, ордината – эффективность торможения (способ расчёта и описание модельной системы приведены в тексте)

целевым соединением.

Исходя из полученных данных, для уточнения природы эффектора провели его кислотный гидролиз (6N хлористоводородная кислота при 110 °С, 24 ч) [2] с последующим разделением продуктов распада тонкослойной хроматографией, окрашивая хроматограмму нингидрином.

В результате гидролиза полученный эффектор распадается на ряд нингидрин-положительных соединений со значениями удерживания, близкими к аминокислотам (рис. 3).

Для идентификации аминокислотных остатков получали их фенилтиогидантоиновые производные, обрабатывая гидролизат

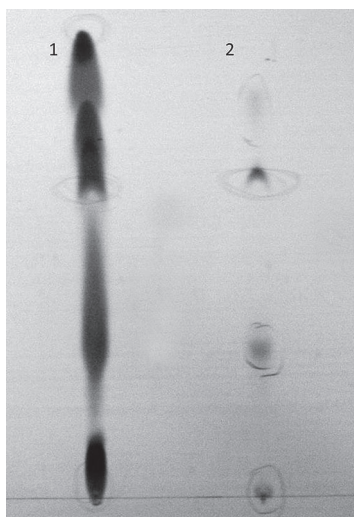


Рис. 3 Тонкослойная хроматография стандартной смеси аминокислот (1) и гидролизата антикоагулянта из сапропеля (2). Пластины «Silufol», хроматографическая система – н-бутанол:уксусная кислота:вода (4:1:5). Окрашенные компоненты гидролизата имеют значения удерживания, близкие к аминокислотам

антикоагулянта смесью фенилизотиоцианата, воды, этанола и триэтиламина (1:1:7:1), с последующим разделением продуктов дериватизации с помощью ВЭЖХ (элюент А –  $\text{CH}_3\text{OH}$ , элюент В – 12 мМ натрий-фосфатный буфер, рН=5,5, градиент от 10 до 50% А в течение 30 мин, скорость потока 1 мл/мин, температура 40 °С) [8]. В продуктах гидролиза по времени удержания идентифицируются аспарагиновая и глутаминовая кислоты, глицин, тирозин и лейцин.

Для оценки антикоагулянтного действия полученного эффектора при введении лабораторным животным растворяли антикоагулянт в изотоническом растворе натрия хлорида с концентрацией эффектора 10 мг/мл.

Тестирование проводили на двух группах самцов нелинейных белых крыс с массой тела  $176 \pm 9$  г. В экспериментальных группах (две группы по 10 животных) крысам, находящимся под наркозом, вводили раствор антикоагулянта в яремную вену из расчёта 5 мг на 100 г массы тела. В контрольных группах (две группы по 7 животных) вводили изотонический раствор натрия хлорида.

Через 5 или 60 мин после введения отбирали 4 мл крови, стабилизировали её цитратом натрия и получали бестромбоцитную плазму, в которой определяли тромбиновое время (табл. 1).

Таблица 1

Изменения тромбинового времени плазмы крови крыс на фоне антикоагулянта из сапропеля через 5 мин (ТВ 5) и 60 мин (ТВ 60) после введения

Тест	Контроль, с	Опыт, с	Эффективность торможения
ТВ 5	9,05±0,25	14,55±2,4	0,378
ТВ 60	9,12±0,26	10,33±0,64	0,117

Все животные контрольных и экспериментальных групп после выхода из наркоза идентично восстановили пищевое поведение, физическую активность и поведенческие стереотипы.

## ВЫВОДЫ

1. Из сапропеля выделен и очищен от примесей антикоагулянт, специфично угнетающий заключительный этап свёртывания крови. По химической природе выделенный и очищенный эффектор является пептидом.

2. Как в модельных пробирочных тестах, так и при введении животным выделенный пептид тормозит тромбиновое время плазмы крови, а его эффект сохраняется не менее 60 мин.

3. Введение антикоагулянта не приводит к гибели животных или явным нарушениям их физического состояния, что свидетельствует об отсутствии острого токсического действия.

4. Выделенный пептидный антикоагулянт из сапропеля можно рассматривать как основу для разработки фармакологического средства коррекции гемостаза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бышевский А.Ш., Чирятёв Е.А., Умутбаева М.К. О возможной роли ингибитора самосборки фибрина в регуляции свёртывания крови // Гематол. и трансфузиол. — 1985. — Т. 30, №1. — С. 35-38. [Byshvskiy A.Sh., Chiryat'ev E.A., Umutbaeva M.K. The possible role of fibrin self-assemble inhibitor in blood clotting regulation. *Gematologiya i Transfuziologiya*. 1985; 30 (1): 35-38. (In Russ.)]

2. Дарбре А. Практическая химия белка / Под ред.

УДК 612.753: 612.084: 616-008.853.8: 615.917: 616.15

## БИОХИМИЧЕСКИЕ МАРКЁРЫ КОСТНОГО И ОСТЕОКЛАСТИЧЕСКОГО ДИФФЕРОНОВ В ПЛАЗМЕ КРОВИ ПРИ ПОДОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ДИХЛОРЭТАНОМ

Феликс Хусаинович Камиров<sup>1</sup>, Екатерина Рафаэловна Фаршатова<sup>1</sup>,  
Дамир Ахметович Еникеев<sup>1</sup>, Галина Васильевна Иванова<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия;

<sup>2</sup>ООО «Проммедэко», г. Уфа, Россия

### Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2015-828

**Цель.** Исследовать в плазме крови содержание растворимого лиганда рецептора активатора ядерного фактора κВ (RANKL), остеопротегерина и склеростина в модели подострой интоксикации дихлорэтаном у крыс.

**Методы.** Эксперименты проведены на 20 половозрелых самцах крыс с массой тела 180–200 г. Крысам опытной группы ежедневно внутривенно в течение 2 мес вводили дихлорэтан в оливковом масле из расчёта 0,84 мг/кг массы тела, что в суммарной дозе составило 0,1 ЛД<sub>50</sub>. Животным контрольной группы вводили соответствующий объём оливкового масла. С использованием коммерческих наборов реагентов методом иммуноферментного анализа в плазме крови определяли содержание растворимого RANKL (реагенты «Free RANKL»), остеопротегерина («Osteoprotegerin») и склеростина («Sclerostin») фирмы «Biomedica Medizinprodukte Gmb and CoKG».

А. Дарбре. — М.: Мир, 1989. — 621 с. [Practical protein chemistry — a handbook. Ed. by A. Darbre. John Wiley and Sons, Chichester. 1986; 620 p. Russ Ed.: A. Darbre. *Prakticheskaya khimiya belka*. Moscow: Mir. 1989; 621 p.]

3. Деметьева И.А. Защитное действие недиализующейся фракции экстракта медуницы при угрозе тромбоза / В кн.: Обмен веществ в норме и патологии. / Под ред. А.Ш. Бышевского. — Тюмень: ТюмГМИ, 1992. — С. 30. [Dement'eva I.A. Protective activity of nondialyzable fraction of lungwort extraction at the risk of thrombosis, in *Obmen veshchestv v norme i patologii*. (Metabolism in health and disease.) Ed. by A.Sh. Byshevskiy. Tyumen: Tyumen State Medical Institute. 1992; 30 p. (In Russ.)]

4. Калинин Е.П., Русакова О.А., Чирятёв Е.А. Способ получения антикоагулянта из сапропеля. Патент на изобретение №RUS2175552 от 16.03.2000. [Kalinin E.P., Rusakova O.A., Chiryat'ev E.A. A method for obtaining anticoagulant from peloid. Patent for invention №RUS2175552, issued at 16.03.2000. (In Russ.)]

5. Государственный реестр лекарственных средств. — <http://www.grls.rosminzdrav.ru> (дата обращения: 30.08.2015). [State Drug Registry. <http://www.grls.rosminzdrav.ru> (Access date: August 30, 2015).]

6. Суханова Г.А., Меликян А.Л., Вахрушева М.В. и др. Варфариновый некроз кожи у пациента с дефицитом протеина С // Тромбоз, гемостаз и реология. — 2014. — №1. — С. 75-82. [Sukhanova G.A., Melikyan A.L., Vachrusheva M.V. Warfarin-induced skin necrosis in patient with deficiency of protein C. *Tromboz, gemostaz i reologiya*. 2014; 1: 75-82. (In Russ.)]

7. Чирятёв Е.А., Бышевский А.Ш., Яковлева Н.В., Платонов Е.В. Способ получения средства, обладающего антикоагулянтной активностью Патент на изобретение №RUS2101023 от 10.01.1998. [Chiryat'ev E.A., Byshevskiy A.Sh., Yakovleva N.V., Platonov E.V. A method for obtaining a substance with anticoagulant activity. Patent for invention №RUS2101023, issued at 10.01.1998. (In Russ.)]

8. Dimova N. RP/PLC analysis of amino acids with UV-detection // *Compter rendus l'Academie bulgare des Sciences*. — 2003. — Vol. 56, N 12. — P. 75-78.

9. Ellis G., Camm A.J., Datta S.N. Novel anticoagulants and antiplatelet agents; a guide for the urologist // *BJU International*. — 2015, Mar 23. — DOI: 10.1111/bju.13131. [Epub ahead of print]