

**Связь между дозой при внутривенном введении кроликам  
сульфата целлюлозы и антикоагулянтным эффектом.**

Н.Н. Дрозд<sup>1</sup>, С.А. Кузнецова<sup>2</sup>, Т.Б. Калинина<sup>1</sup>, Н.Ю. Васильева<sup>2</sup>

<sup>1</sup>- ФГБУ Гематологический научный центр Минздрава России (ген. директор – академик РАН Савченко В.Г.), <sup>2</sup> – ФГБУ Институт химии и химической технологии СО РАН (вр. и. о. директора – д.х.н. Чесноков Н.В.)<sup>2</sup>

В работе показано, что с увеличением дозы сульфата целлюлозы (динамическая вязкость 3,4 сП, содержание серы - 14,1%), полученной из соломы пшеницы, при внутривенном введении кроликам увеличиваются время свертывания плазмы в некоторых коагулологических тестах и антикоагулянтная активность плазмы. При введении сульфата целлюлозы в дозе 1 мг/кг время свертывания плазмы с антикоагулянтом (через 5 мин после введения) почти в 3 раза больше, чем при введении физиологического раствора.

N.N. Drozd<sup>1</sup>, S.A. Kuznetsova<sup>2</sup>, T.B. Kalinina<sup>1</sup>, N.Yu.Vasilieva<sup>2</sup>

It is shown that with increasing of doses the cellulose sulfate of wheat straw (dynamic-viscosity is 3.4 cps, the sulfur content - 14.1%) when administered intravenously to rabbits increases the clotting time of plasma in some coagulation tests and anticoagulant activity of plasma. It is found that cellulose sulfate when administered at a dose of 1 mg/kg of the clotting time of plasma with an anticoagulant (at 5 min. after administration) is nearly three times longer than at introduction of saline.

**ключевые слова:** сульфат целлюлозы, антикоагулянт, aIIa активность, aXa активность

адрес электронной почты для корреспонденции: [mdrozd@mail.ru](mailto:mdrozd@mail.ru)

Для профилактики и лечения тромбозов у людей, в том числе, используют и препараты из полисахаридов животного происхождения - нефракционированные (НФГ) или низкомолекулярные гепарины (НМГ) [1]. Механизм антикоагу-

лянтного (АК) действия гепаринов связан с активацией антитромбина (АТ) - плазменного ингибитора некоторых факторов свертывания крови. НФГ в одинаковой степени АТ-опосредованно снижает активность тромбина (аIIa активность) и активированного фактора X (аХа активность) [2]. Активность аХа препаратов НМГ в несколько раз больше аIIa активности. Наличие ряда побочных эффектов у препаратов гепарина предполагает разработку новых, более доступных, экономически выгодных АК [3]; для этого химически модифицируют полисахариды растительного происхождения, предполагая высокую вероятность получения новых АК с меньшим риском геморрагических осложнений [4,5].

Цель работы – исследование влияния внутривенного введения сульфата целлюлозы, выделенной из соломы пшеницы (*Triticum aestivum L*), на АК активность плазмы кроликов.

**Методика исследования.** Выделение, сульфатирование, анализ химического состава и структуры целлюлозы из соломы пшеницы проводили в лаборатории процессов синтеза и превращения углеводов Института химии и химической технологии СО РАН (Красноярск) по методике, описанной в патенте на изобретение [6]. Для сульфатирования использовали микрокристаллическую целлюлозу со степенью полимеризации 200-210 и содержанием остаточного лигнина менее 0,1 %. Содержание серы в сульфатированном образце определяли на элементном анализаторе Flash EA-1112 (Thermo Quest Italia). Рентгенофазовый анализ проведен на рентгеновском дифрактометре ДРОН-3 (излучение медное  $\text{CuK}\alpha$   $\lambda=1,5418\text{\AA}$ ; 32кV/24mA). Средневязкостную молекулярную массу (M<sub>v</sub>) натриевой соли сульфата определяли по формуле:  $[\eta]=2,1 \times 10^{-3} M_v^{0,64}$ ; при размерности  $[\eta]$  г/100 мл, на основании значений K и  $\alpha$ , аналитически найденных в литературе [7].

Определение аIIa активности сульфата целлюлозы (СЦ) с использованием теста активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ; НПО “Ренам”, Москва) и плазмы человека (НПО “Ренам”, Москва) проводили по методу Teien A. и др. [8]. Определение аХа активности СЦ по увеличению времени свертывания плазмы человека с добавлением фактора Ха в тесте РеаКлот-Гепарин (НПО “Ренам”, Москва) осуществляли по Teien A. и др. [9]. При расчете активностей СЦ использовали калибровочные кривые НФГ (ОАО “Белмедпрепарат”, Минск; аIIa=160 ЕД/мг; аХа=145 ЕД/мг измеряли по 1 Международному стандарту низкомолекулярного гепарина NIBSC 85/600). Фармакологическую активность СЦ определяли при внутривенном введении 50 кроликам обоего пола породы Советская шиншилла массой 3,2–4,4 кг (получены из филиала “Электрогорский” ФГБУН НЦБМТ ФМБА). Исследования на лабораторных животных проводили с соблюдением “Правил для проведения работ с использованием экспериментальных животных” (Приказ Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755). Для оценки фармакодинамических параметров, СЦ в физиологическом растворе вводили в краевую вену правого уха кроликов в дозах 1, 3 и 5 мг/кг. Для контроля вводили физиологический раствор или НФГ (ОАО “Белмедпрепарат”, Минск; аIIa активность 160 ЕД/мг, аХа активность 145 ЕД/мг) в дозах 1 и 5 мг/кг. Кровь отбирали до введения и через 5,10,15,30,60,120,180, 240,300,360 и 1440 мин после введения. Бедную тромбоцитами плазму кроликов получали центрифугированием (1300g, 20 мин, комнатная температура) крови, собранной по каплям из надреза на краевой вене левого уха в пластиковую пробирку с 0,11 М раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Определяли время свертывания плазмы в тестах АЧТВ, РеаКлот-гепарин и, сравнивая показания с калибровочными кривыми НФГ, рассчитыва-

ли аIIa/aXa активности плазмы. Время появления фибриновых сгустков плазмы человека/кроликов фиксировали на коагулометре «Минилаб 701-М».

Результаты исследования представляли как средние арифметические со стандартными ошибками средних арифметических. Достоверность различий между показаниями ( $p < 0,05$ ) оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы StagraphicsPlus.

**Результаты исследования.** Динамическая вязкость СЦ составила 3,4 сП, содержание серы-14,1%. Антитромбиновая (аIIa) активность СЦ достигала  $93,8 \pm 1,0$  ЕД/мг (аXa- $9,9 \pm 0,6$  ЕД/мг).

Для оценки степени АК эффекта терапевтических доз НФГ в клинической практике используют тест АЧТВ [10]; время свертывания плазмы (ВСП) пациентов при таких дозах НФГ может быть в 1,6–6,2 раза больше, чем в контрольной плазме [1]. В настоящей работе ВСП кроликов в тесте АЧТВ на протяжении 300 мин после введения СЦ в трех дозах достоверно различалось ( $p = 0,002-0,003$ ) с ВСП при введении физиологического раствора (рис.1а). Максимальное увеличение ВСП кроликов в тесте АЧТВ наблюдали через 5 мин после введения 1 и 3 мг/кг СЦ ( $69,0 \pm 7,3$  и  $255,7 \pm 23,4$  с., соответственно). При введении 5 мг/кг СЦ максимум ВСП ( $380,9 \pm 12,1$  с.) отмечали через 10 мин после введения. Время действия СЦ составило 300-360 мин. Активность аIIa плазмы кроликов после введения СЦ возрастала с увеличением дозы (рис.2а). Через 5 мин после введения 1, 3 и 5 мг/кг СЦ аIIa активность была максимальна и достигала  $0,44 \pm 0,04$ ;  $1,33 \pm 0,28$  и  $1,85 \pm 0,12$  ЕД/мл, соответственно. Терапевтический диапазон аIIa активности плазмы при использовании НФГ у людей составляет 0.2-0.4 ЕД/мл [11]. Большие ВСП и аIIa активности плазмы после введения НФГ,

чем после введения СЦ закономерны, так как аIIa активность НФГ в 1,7 раз больше, чем таковая для СЦ.

Для контроля за терапией НФГ, в ряде клиник США и Европы наряду с АЧТВ используют определение аХа активности плазмы с помощью метода НерТест (отечественный аналог- РеаКлот-Гепарин, НПО Ренам) или с помощью хромогенных субстратов. При введении кроликам 1, 3 и 5 мг/кг СЦ наблюдали достоверные различия в ВСП в тесте РеаКлот-Гепарин с показаниями в контроле ( $p=0,0021-0,1$ ) через 30, 180 и 240 мин после введения, соответственно (рис.1б). Максимальные величины ВСП и аХа активности плазмы кроликов возрастали с увеличением дозы СЦ и через 5 мин после введения составили  $24,4\pm 0,8$ ;  $32,9\pm 2,5$ ;  $72,8\pm 9,0$  с. и  $0,14\pm 0,03$ ;  $0,28\pm 0,04$ ;  $0,75\pm 0,07$  ЕД/мл, соответственно (рис.1б, рис.2б). Время действия СЦ по РеаКлот-Гепарин и по аХа активности плазмы, в зависимости от дозы, достигало 30, 180, 240 мин и 240, 300, 360 мин, соответственно. Через 5 мин после введения кроликам 1 и 5 мг/кг НФГ ВСПР в тесте РеаКлот-Гепарин и аХа активность плазмы были в 1,6-3,5 и в 3,3-11 раз больше, чем после введения СЦ в таких же дозах (аХа активность НФГ почти в 15 раз больше, чем у СЦ); время действия НФГ и СЦ по аХа активности в одинаковых дозах было сравнимо.

Таким образом, увеличение дозы (1-5 мг/кг) сульфата целлюлозы соломы пшеницы (динамическая вязкость 3,4 сП, содержание серы - 14,1%.) при внутривенном введении кроликам приводит к увеличению антитромбиновой и антифактор Ха активностей плазмы. При введении сульфата целлюлозы в дозе 1 мг/кг ВСП, через 5 мин после введения, почти в 3 раза больше, чем ВСП в контроле при введении физиологического раствора; а аХа активность плазмы кроликов достигает нижнего предела терапевтического диапазона аХа активности плазмы у людей при введении НФГ. В перспективе следует сравнить влияние

на плазму экспериментальных животных внутривенного введения сульфата целлюлозы в дозах менее 1 мг/кг и аптечного инъекционного раствора НФГ.

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 г.» (пр. RFMEFI60714X0031) и программы Президиума РАН «Фундаментальные науки–медицине».

### Литература

1. *Garcia D.A., Baglin T.P., Weitz J.I. et al.* // *Chest*. 2012. V. 141. 2 Suppl. e24S-43S.
2. *Mousa S.A.* // *Methods. Mol. Biol.* 2010. № 663. P. 109-132.
3. *Tosetto A., Castaman G., Rodeghiero F.* // *J. Thromb. Haemost.* 2013. V. 11. Suppl. 1. P. 142–150.
4. *Andrade G.P., Lima M.A., de Souza Junior A.A. et al.* // *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 94. № 1. P. 647-654.
5. *Cai W., Xie L, Chen Y, Zhang H.* // *Carbohydr. Polym.* 2013. V. 92. № 2. P. 1086-1090.
6. *Левданский В.А., Кузнецова С.А., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н.* Патент РФ № 2404994; Бюл. № 33. 2010.
7. *Петропавловский Г.А.* // *Гидрофильные частично замещенные эфиры целлюлозы и их модификация путем химического сшивания*, Ленинград, Наука, 1988.
8. *Teien A., Lie M.* // *Thromb. Res.* 1977. Vol. 10. № 3. P. 399-410.
9. *Teien A., Lie M., Abildgaard U.* // *Thromb. Res.* 1976. Vol. 8. № 3. P. 413-416.
10. *Marlar R.A., Gausman J.* // *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2013. Vol. 137. № 1. P. 77-82.
11. *Liveris A., Bello R.a., Friedmann P. et al.* // *Pediatr. Crit. Care. Med.* 2014. Vol. 15. № 2. e72-79.

Подписи к рисункам.

Рисунок 1. Время свертывания плазмы кроликов (сек) в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (а) и в тесте РеаКлот-Гепарин (б) после внутривенного введения сульфата целлюлозы (СЦ) и нефракционированного гепарина (НФГ)

К – контроль, введение физиологического раствора (доза 0 мг/кг); \* ( $p < 0,05$ ) – достоверность различий с показаниями до введения; 2\* ( $p < 0,05$ ) - достоверность различий с показаниями при введении контроля; 3\* ( $p < 0,05$ ) - достоверность различий с показаниями при введении СЦ в дозе 1 мг/кг; 4\* ( $p < 0,05$ ) - достоверность различий с показаниями при введении СЦ в дозе 3 мг/кг; 5\* ( $p < 0,05$ ) достоверность различий с показаниями при введении НФГ в дозе 1 мг/кг;  $n=6-9$ .

1- Контроль, 0 мг/кг; 2 - СЦ 1 мг/кг; 3 – СЦ 3 мг/кг; 4 – СЦ 5 мг/кг; 5 – НФГ 1 мг/кг; 6 – НФГ 5 мг/кг.

Рисунок 2. Антитромбиновая (а) и анти-фактор Ха (б) активности плазмы кроликов после внутривенного введения сульфата целлюлозы (СЦ) и нефракционированного гепарина (НФГ)

Антитромбиновая и аХа активности плазмы до введения и в разные интервалы времени после введения физиологического раствора составили 0 ЕД/мл; \* ( $p < 0,05$ ) – достоверность различий с показаниями при введении 1 мг/кг СЦ; \*\* ( $p < 0,05$ ) - достоверность различий с показаниями при введении 3 мг/кг СЦ; \*\*\* ( $p < 0,05$ ) - достоверность различий с показаниями при введении 1 мг/кг НФГ;  $n=6-9$ .

1 - СЦ 1 мг/кг; 2 – СЦ 3 мг/кг; 3 – СЦ 5 мг/кг; 4 – НФГ 1 мг/кг; 5 – НФГ 5 мг/кг.

Рисунок 1.

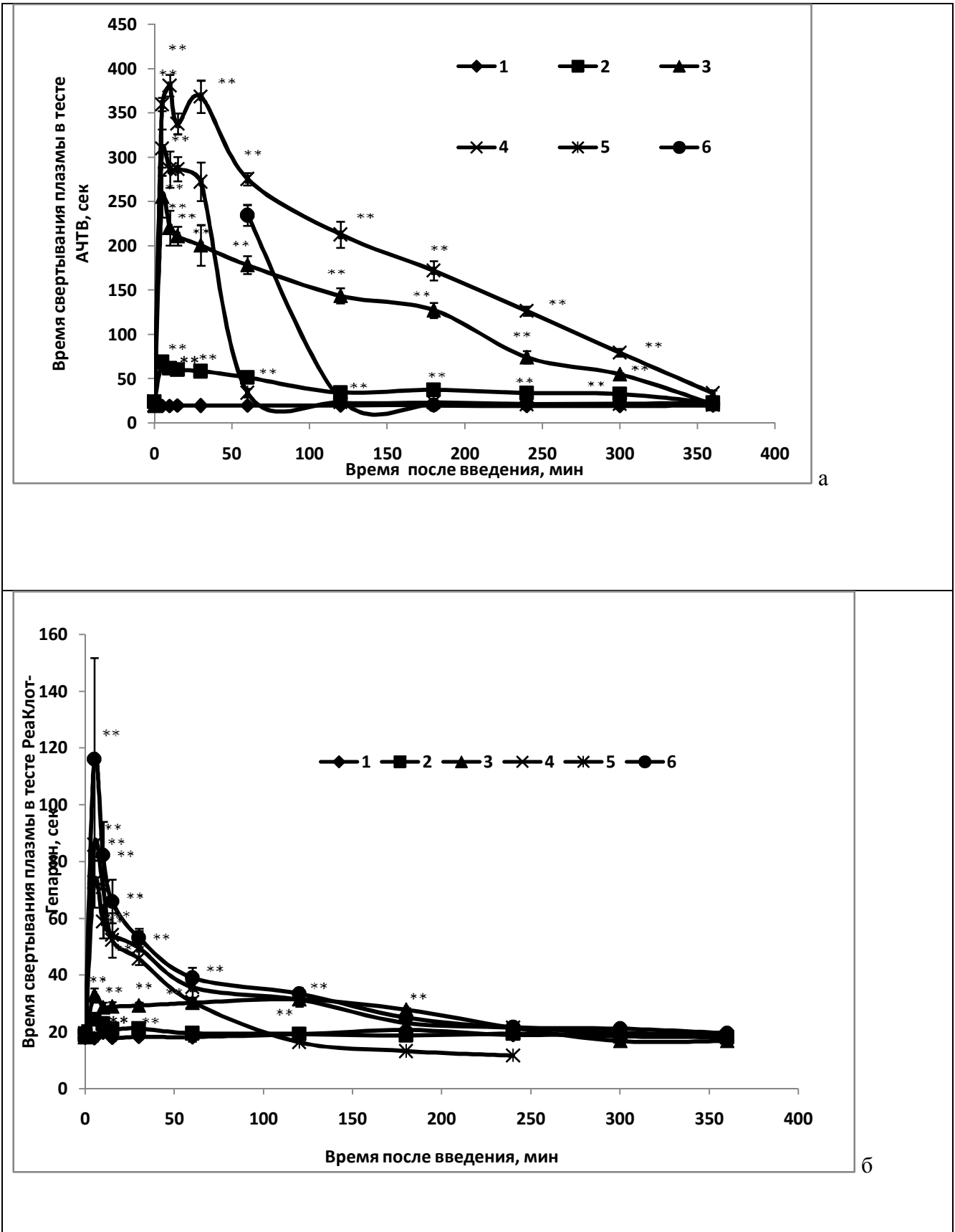




Рисунок 2.

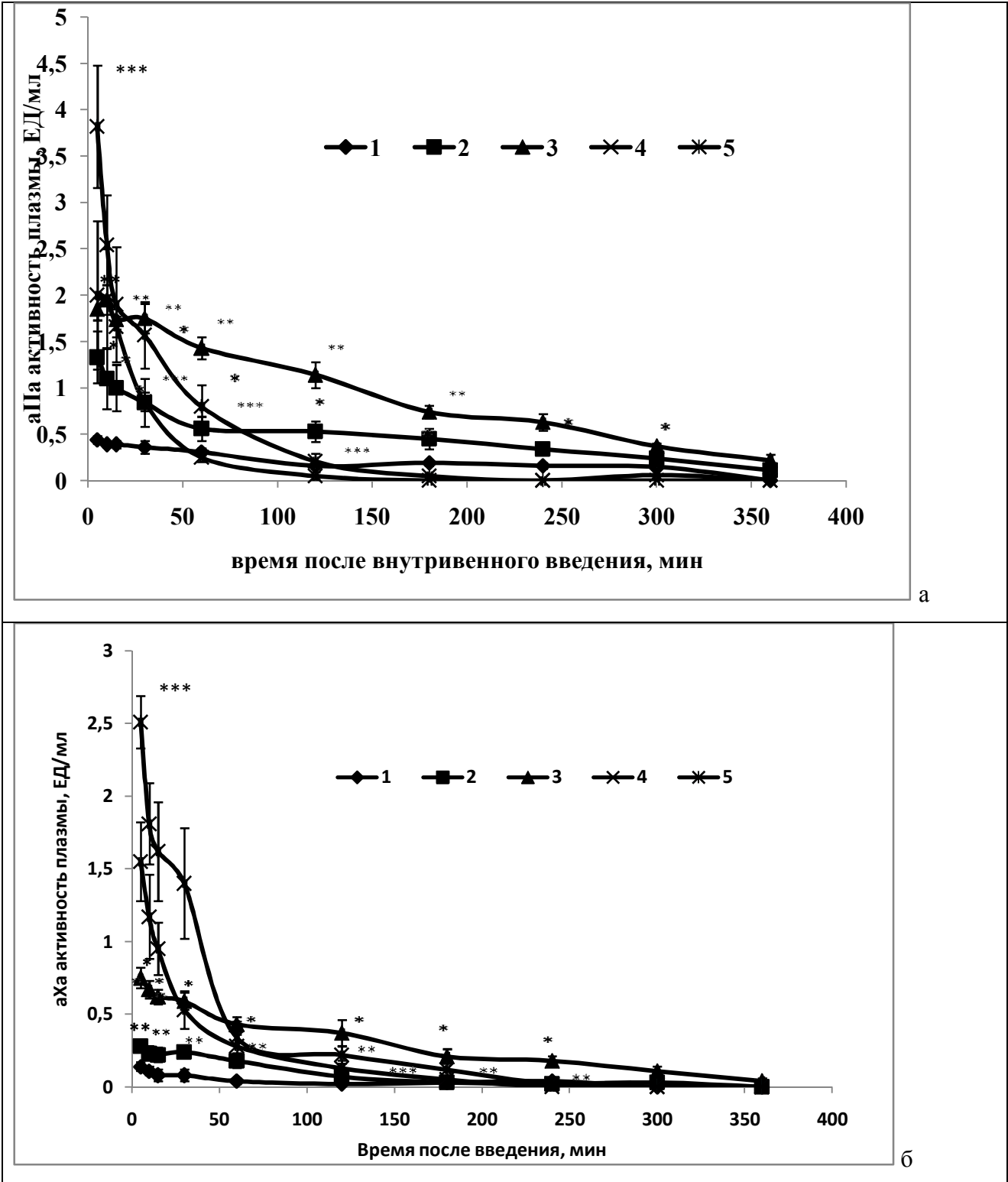


Таблица к рисунку 1а. Время свертывания плазмы кроликов (сек) в тесте активированного частичного тромбопластинового времени после внутривенного введения сульфата целлюлозы и нефракционированного гепарина (n=6-9)

доза, мг/кг	Время после введения, мин											
	0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	360	1440
К, 0	20,5±0,6	19,3±0,7	19,4±1,0	20,1±0,6	19,7±0,7	19,8±0,9	20,1±0,6	20,1±0,5	19,4±0,7	19,6±0,5	19,9±0,3	19,3±0,6
СЦ,1	23,9±1,5	69,0±7,3 *, 2*	61,9±5,0 *, 2*	60,4±3,6 *, 2*	58,5±2,8 *, 2*	51,7±1,4 *, 2*	34,5±1,5 *, 2*	37,7±1,1 *, 2*	34,1±1,5 *, 2*	33,1±1,5 *, 2*	22,8±0,9	22,5±0,6
СЦ,3	19,7±0,7	255,7±23,4 *, 2*, 3*	220,3±19,8 *, 2*, 3*	211,0±10,6 *, 2*, 3*	200,6±23,0 *, 2*, 3*	176,8±10,0 *, 2*, 3*	143,8±8,5 *, 2*, 3*	127,4±8,6 *, 2*, 3*	74,5±6,9 *, 2*, 3*	55,0±6,9 *, 2*, 3*	21,3±1,5	19,4±0,4
СЦ,5	20,1±0,4 3*	359,7±7,6 *, 2*, 3*, 4*	380,9±12,1 *, 2*, 3*, 4*	338,0±11,9 *, 2*, 3*, 4*	368,5±18,2 *, 2*, 3*, 4*	275,5±6,9 *, 2*, 3*, 4*	212,8±14,7 *, 2*, 3*, 4*	172,1±11,0 *, 2*, 3*, 4*	126,6±5,1 *, 2*, 3*, 4*	79,6±4,4 *, 2*, 3*	33,7±3,3 *, 2*, 3*, 4*	20,0±0,3
НФГ,1	24,4±1,5	310,0±21,5 *, 2*	286,4±20,5 *, 2*	286,7±13,7 *, 2*	272,4±21,8 *, 2*	34,2±4,8 *, 2*	23,4±1,6	23,4±1,2	21,2±1,1	21,3±0,4	20,3±0,2	но
НФГ,5	21±1,2	>120	>120	>120	>120	234,6±11,8 *, 2*, 5*	27±1,8 *, 2*	20,4±1,5	21,4±1,0	22,1±1,8	22,3±0,9	22,0±1,4

Примечание: К – контроль, введение физиологического раствора (доза 0 мг/кг); \* (p<0,05) – достоверность различий с показаниями до введения; 2\* (p<0,05) – достоверность различий с показаниями при введении контроля; 3\* (p<0,05) – достоверность различий с показаниями при введении СЦ в дозе 1 мг/кг; 4\* (p<0,05) – достоверность различий с показаниями при введении СЦ в дозе 3 мг/кг; 5\* (p<0,05) – достоверность различий с показаниями при введении НФГ в дозе 1 мг/кг.

Таблица к рисунку 1б. Время свертывания плазмы кроликов (сек) в тесте РеаКлот-Гепарин после внутривенного введения сульфата целлюлозы и нефракционированного гепарина (n=6-9)

доза, мг/кг	Время после введения, мин											
	0	5	10	15	30	60	120	180	240	300	360	1440
К, 0	18±1,0	17,8±1,1	19,7±1,4	17,9±1	18,3±0,8	18,2±1,5	19,2±1,6	20,7±2	18,9±1,3	19,5±0,9	18,9±0,7	19,8±0,4
СЦ, 1	18,9±0,6	24,4±0,8 *, 2*	22,9±1,5 *	21±0,6 *, 2*	21,2±0,4 *, 2*	19,5±0,4	19,3±0,2	18,8±1,8	19,4±1,2	18,5±0,5	18,1±0,3	18,5±0,8 *
СЦ, 3	18,2±0,8	32,9±2,5 *, 2*, 3*	28,6±1,8 *, 2*	29±1,5 *, 2*, 3*	29,3±1,1 *, 2*, 3*	30,3±1,1 *, 2*, 3*	31,5±1,8 *, 2*, 3*	27,8±0,7 *, 2*, 3*	21,5±0,8 *, 3*	16,8±0,3 2*, 3*	16,9±0,4	16,8±0,7 *
СЦ, 5	18,8±0,7	72,8±9,0 *, 2*, 3*, 4*	58,9±5,9 *, 2*, 3*, 4*	54,1±7,8 *, 2*, 3*, 4*	49,6±6 *, 2*, 3*, 4*	35,7±3,5 *, 2*, 3*, 4*	31,4±2,5 *, 2*, 3*	23,1±1,8 *, 3*, 4*	21,5±0,9 *	19,5±0,9 4*	18,3±0,5	19,1±0,4
НФГ, 1	19,6±0,4 *	85, 9±10,6 *, 2*	71±8,3 *, 2*	52,4±14,3 *, 2*	45,7±9,0 *, 2*	30,5±4,2 *, 2*	16,4±2,8 *	13,2±0,8 *, 2*	11,6±0,2 *, 2*	НО	НО	НО
НФГ, 5	19,9 ±2,6 *	116,1±35,7 *, 2*, 5*	82,3±11,8 *, 2*	66±6 *, 2*	53,2±7,7 *, 2*	39,1±3,2 *, 2*	33,5±3,6 *, 2*, 5*	25±2 5*	21,7±1,7 5*	21,2±1,2	19,5±0,4	19,8±0,4

Примечание: К – контроль, введение физиологического раствора (доза 0 мг/кг); \* (p<0,05) – достоверность различий с показаниями до введения; 2\* (p<0,05 - достоверность различий с показаниями при введении контроля; 3\* (p<0,05) - достоверность различий с показаниями при введении СЦ в дозе 1 мг/кг; 4\* (p<0,05) - достоверность различий с показаниями при введении СЦ в дозе 3 мг/кг; 5\* (p<0,05) достоверность различий с показаниями при введении НФГ в дозе 1 мг/кг.

Таблица к рисунку 2а. Антитромбиновая (aIIa) активность плазмы кроликов после внутривенного введения сульфата целлюлозы и нефракционированного гепарина (n=6-9).

доза, мг/кг	Время после введения, мин										
	5	10	15	30	60	120	180	240	300	360	1440
СЦ, 1	0,44±0,04	0,39±0,03	0,39±0,04	0,36±0,07	0,31±0,04	0,16±0,02	0,19±0,03	0,16±0,03	0,15±0,02	0	0
СЦ, 3	1,33±0,28*	1,10±0,33*	1,00±0,25*	0,84±0,26	0,56±0,13	0,53±0,11	0,45±0,11	0,34±0,05	0,24±0,06	0,11±0,05	0
СЦ, 5	1,85±0,12 *·**	1,95±0,16 *·**	1,74±0,11 *·**	1,75±0,16 *·**	1,43±0,12 *·**	1,14±0,14 *·**	0,74±0,07*	0,63±0,09*	0,37±0,03*	0,22±0,06	0
НФГ, 1	2,00±0,80	1,96±0,54	1,66±0,11	0,85±0,10	0,25±0,05	0,05±0,04	0	0	0	0	0
НФГ, 5	3,82±0,66 ***	2,54±0,54	1,90±0,62	1,57±0,36 ***	0,80±0,23 ***	0,21±0,08 ***	0,05±0,02	0	0,06±0,05	0	0

Примечание: \* (p<0,05) – достоверность различий с показаниями при введении 1 мг/кг СЦ; \*\* (p <0,05) - достоверность различий с показаниями при введении 3 мг/кг СЦ; \*\*\* (p <0,05) - достоверность различий с показаниями при введении 1 мг/кг НФГ.

Таблица к рисунку 2б. Анти-фактор Ха (аХа) активность плазмы кроликов после внутривенного введения сульфата целлюлозы и нефракционированного гепарина (n=6-9).

доза, мг/кг	Время после введения, мин										
	5	10	15	30	60	120	180	240	300	360	1440
СЦ, 1	0,14±0,03	0,11±0,03	0,08±0,04	0,08±0,04	0,04±0,02	0,02±0,01	0,03±0,01	0,04±0,01	0	0	0
СЦ, 3	0,28±0,04	0,23±0,05	0,22±0,05	0,24±0,04	0,18±0,05	0,07±0,03	0,03±0,01	0,02±0,01	0,03±0,01	0	0
СЦ, 5	0,75±0,07 *· **	0,67±0,06 *· **	0,62±0,05 *· **	0,59±0,06 *· **	0,43±0,05 *· **	0,37±0,09 *· **	0,21±0,05 *· **	0,18±0,03 *· **	0,11±0,03	0,04±0,02	0
НФГ, 1	1,55±0,27	1,17±0,29	0,95±0,18	0,53±0,13	0,28±0,08	0,13±0,05	0,05±0,02	0	0	0	0
НФГ, 5	2,51±0,18 ***	1,81±0,28	1,62±0,34	1,40±0,38	0,34±0,11	0,22±0,06	0,12±0,04 ***	0,02±0,01	0	0	0

Примечание: \* (p<0,05) – достоверность различий с показаниями при введении 1 мг/кг СЦ; \*\* (p <0,05) - достоверность различий с показаниями при введении 3 мг/кг СЦ; \*\*\* (p <0,05) - достоверность различий с показаниями при введении 1 мг/кг НФГ.

Дрозд Наталья Николаевна, Drozd Natalia Nikolaevna: ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ, лаб. патологии и фармакологии гемостаза, 127165, Москва, Новый Зыковский пр., 4. Тел. 8 916 077 9139; e-mail: nndrozd@mail.ru

Кузнецова Светлана Алексеевна, Kuznetsova Svetlana Alekseevna

Калинина Татьяна Борисовна, Kalinina Tatiana Borisovna

Васильева Наталья Юрьевна, Vasilieva Natalya Yurievna