

УДК 612.115.3

СРАВНИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ КОМПЛЕКСНЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ГЕПАРИНОВ ЖИВОТНОГО И РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

© 2023 г. М. С. Успенская¹, Л. А. Ляпина¹ *,
С. М. Сороколетов², М. Г. Ляпина¹, М. Д. Калугина¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, Москва, Россия

²Городская клиническая больница им. С.П. Боткина, Москва, Россия

*e-mail: lyapinal@mail.ru

Поступила в редакцию 17.02.2023 г.

После доработки 05.03.2023 г.

Принята к публикации 05.03.2023 г.

Получены комплексные средства на основе гепаринов животного и растительного происхождения с включением в их состав глутаминовой кислоты в весовом соотношении 1 : 4. В качестве гепаринов животного происхождения использовали коммерческие препараты высокомолекулярного и низкомолекулярного гепаринов (ВМГ и НМГ). В качестве гепарина растительного происхождения применяли гепариноид, выделенный из корней пиона Академик Садовничий. Изучали их влияние на состояние плазменного гемостаза в условиях *in vitro* в сравнительном аспекте. Установлено, что все комплексные соединения обладают антикоагулянтной активностью, которая, по результатам наших исследований, реализуется разными механизмами их действия на свертывание крови — на внутренний, внешний или общий пути свертывания крови. Комплексы ВМГ с глутаминовой кислотой обладают антитромбиновым эффектом, влияя на внутренний и общий пути свертывания. Комплексы НМГ с глутаминовой кислотой, демонстрируя анти-Ха-активность, влияют на внутренний путь активации свертывания. Соединение гепариноида с глутаминовой кислотой ингибирует факторы не только внутреннего, но и внешнего путей свертывания крови. Кроме того, последнее соединение проявляет слабую антитромбиновую активность. Показано также, что все комплексы гепаринов препятствуют полимеризации фибрина, усиливая фибриндеполимеризационную активность плазмы, причем в гепариноидном соединении, по сравнению с другими коммерческими средствами, эта активность была выше на 10–17%. Таким образом, наилучшим по эффективности и безопасности противосвертывающим средством является гепариноидный комплекс с глутаминовой кислотой.

Ключевые слова: гепарины высоко- и низкомолекулярные, гепариноид из корней пиона, комплексы гепарина с глутаминовой кислотой, антикоагулянтная активность, полимеризация фибрина

DOI: 10.31857/S0042132423040105, **EDN:** FHUQAH

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что все гепарины в той или иной степени проявляют антикоагулянтный эффект (Onishi et al., 2016; Beurskens et al., 2020). В то же время высокомолекулярный (ВМГ) или нефракционированный гепарин обладает рядом нежелательных побочных свойств, которые в основном предопределены его структурой. ВМГ представляет собой смесь кислых макромолекулярных цепей сульфатированных анионов гликозаминогликанов с высоковариабельной молекулярной массой от 6 до 40 кДа. Основные эффекты ВМГ — антитромбиновый и антитромбопластиновый. Это обусловлено взаимодействием комплекса гепарин–антитромбин III с тромбином и рядом факторов свертывания (Ха, XIIa, XIa, IXa). Для ингиби-

рования тромбина необходимы, как минимум, 18 сахарных остатков в молекуле гепарина, что возможно при его молекулярной массе не менее 5.5 кДа. Соотношение у ВМГ анти-Па- и анти-Ха-активности составляет 1 : 1. Благодаря гетерогенности структуры ВМГ биодоступность его равна 30%, поскольку он взаимодействует как с белками, так и с клетками (крови, эндотелия и т.д.). Антигепариновый фактор 4 тромбоцитов, ингибируя гепарин, может вызвать гепариновую иммунную тромбоцитопению из-за образования антител к этому комплексу и привести к тромбозу. Кроме того, нежелательным эффектом ВМГ при его длительном и частом применении в больших дозах служит истощение антитромбина III, а это в свою очередь также может вызвать гиперкоагуляцию (Берковский и др., 2015; Marbet, 2003). Из-

вестно также, что низкомолекулярный гепарин (НМГ) обладает антифакторной Ха-активностью и не ингибирует тромбин (Берковский и др., 2015). В то же время гепариноиды из пионов (древовидного, Млокосевича, молочноцветкового и др.), включая низкомолекулярные фракции гепарина, как и коммерческий НМГ, могут проявлять антифакторную Ха-активность (Ляпина и др., 2016).

Применение фармакологических гепариновых препаратов, в том числе и с включением аминокислот, — практика, используемая на протяжении последних десятилетий специалистами различных направлений. Известно, что аминокислоты выполняют роль нейромедиаторов, способствуют адекватной реализации функций макро- и микроэлементов (Стручкова, Брилкина, 2016), поэтому их взаимодействие с гепаринами обычно приводит к дополнительным положительным эффектам. Показано, что глутаминовая кислота (ГК) активно связывается с гепарином, образуя соединение, которое при пероральном введении в организм проявляет антикоагулянтные эффекты (Николаева, Ляпина, 2019). Эта аминокислота участвует в белковом и углеводном обмене, стимулирует окислительные процессы, а также в азотистом обмене, способствуя обезвреживанию аммиака. В медицинской практике она в основном находит применение при заболеваниях ЦНС.

Нормальный гемостаз обеспечивается регуляторными взаимоотношениями свертывающей и противосвертывающей систем крови (Кузник, 2010; Ляпина и др., 2012). В случае нарушения этих взаимоотношений возможно возникновение тромботических осложнений. Для борьбы с ними в настоящее время используют препараты НМГ, которые относительно безопасны и не вызывают кровоточивости при передозировке (Кричевский, 2015). Получают эти препараты или путем деполимеризации ВМГ животного происхождения или непосредственно из тканей животных (свиней, крупного рогатого скота). Обычно препараты НМГ применяют подкожно или внутривенно (Xiao et al., 2016). Значительный интерес представляет поиск пероральных препаратов растительной природы. Известно, что многие растения служат источником лекарственного сырья для получения антикоагулянтов, фибринолитиков и тромболитиков (Li et al., 2012; Wu et al., 2015; Zhang, 2016).

Некоторые растения содержат компоненты, являющиеся составной частью гепарина и других гликозаминогликанов (Кузнецова и др., 2010). В корнях травянистых пионов обнаружено гепариноподобное вещество, оказывающее антикоагулянтные эффекты в исследованиях *in vitro* и при внутривенном введении животным (Ляпина и др., 2016). В настоящее время препаратам НМГ отводится особая роль, поскольку они применяются для борьбы с тромбозами при COVID-19. Поэтому разработка препаратов НМГ разной природы

без побочных отрицательных эффектов на организм человека приобретает в настоящее время особую актуальность.

Цель настоящей работы — создать средства на основе гепаринов животного и растительно-го происхождения совместно с ГК, изучить их влияние на свертывание крови в сравнительном аспекте и выявить наиболее эффективное по противосвертывающим свойствам соединение гепарина с ГК в условиях *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В опытах использовали животных, которых выращивали в питомнике станции Столбовой Московской обл. Пушкинского р-на — здоровых крыс-самцов линии Вистар массой тела 220–250 г. До начала экспериментов и в период проведения опытов крысы находились на обычном лабораторном рационе и содержались в стандартных условиях вивария (искусственное освещение день/ночь — 12/12 ч, принудительная вентиляция, температура 22–26°C, относительная влажность 50–70%) со свободным доступом к воде и пище. Все эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 15.06.2006), Базельской декларацией и Хельсинкской декларацией о гуманном отношении к животным.

Сырьем для получения гепариноидов служили корни пионов, которые получены из экологически чистых растений, произрастающих в Ботаническом саду МГУ (Москва, Россия). Виды пионов определяли сотрудники Ботанического сада МГУ под руководством М.С. Успенской. В качестве гепариноида использовали древовидный пион Академик Садовничий, который создан в результате скрещивания двух дикорастущих видов: *P. suffruticosa* Andrews с *P. lutea* Franch. Сырье заготавливали в осенний период (с конца августа до середины октября) и хранили при температуре +3...+5°C. Для экспериментов готовили исходный 5%-ный экстракт из сухих чистых корней, которые растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния, далее производили выделение и очистку гепариноидов, для чего осаждали примеси белков путем добавления спиртового раствора с последующим центрифугированием и упариванием супернатанта, в котором и определяли наличие гепарина с использованием химического и фотоэлектроколориметрических методов (Шестаков, 1975; Шубина, Оберган, 2021). Обнаружено, что в 1 мг сухого порошка гепариноида содержится 35 мкг (30 МЕ) гепарина, для сравнения: в 1 мг коммерческого ВМГ (Spofa, Česko) содержится 100 МЕ гепарина. Сравнение препаратов всех гепаринов проводили при одинаковых концентрациях гепаринов в исследуемых веществах. В качестве стандартных препаратов сравнения использовали гепарины животного происхождения —

НМГ (Celsus, USA) и ВМГ (Spofa, Česko). Создавали комплексные соединения гепариновых препаратов с ГК следующим образом: каждый из гепаринов и ГК растворяли в воде (рН 7.0–7.2) и соединяли их таким образом, чтобы в получаемых растворах весовое соотношение гепарина и ГК составляло 1 : 4. Эти смеси инкубировали при 37°C в течение 15–20 мин. Далее все комплексные соединения гепарина разбавляли в 100 раз, вследствие чего в 1 мл исходных растворов комплексов содержалось 10 мкг гепаринов и 40 мкг ГК. Делали от 5 до 10 повторов по каждому разведенному образцу. Все расчеты проводили на основе используемого гепарина.

Для проведения исследований кровь брали из яремной вены (*vena jugularis*) с анестезией телазолом (общепринятый метод для взятия крови у крыс) с использованием в качестве консерванта 3.8%-ного цитрата натрия в соотношении 9 : 1. Для получения бедной тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали при 3000 g в течение 10–12 мин.

Для выявления механизма антикоагулянтного действия полученных соединений, содержащих гепарин или гепариноид, совместно с ГК использовали разные тесты по изучению временных интервалов свертывания крови, а именно: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), характеризующее внутренний путь свертывания крови, тромбиновое время (ТВ), свидетельствующее об общем пути свертывания крови, и протромбиновое время (ПВ), оценивающее внешний путь свертывания крови. Для характеристики параметров фибринолитического звена противосвертывающей системы крови готовили пластины нестабилизированного фактором XIIa фибрина с наличием непрочных водородных связей в растворимом фибрин-полимере. В плазме крови определяли следующие биохимические параметры гемостаза: на нестабилизированных фибриновых пластинах – суммарную фибринолитическую активность (СФА), включающую активность комплексов гепарина с компонентами плазмы крови и активность пламина; фибриндеполимеризационную активность (ФДПА), отражающую процессы деполимеризации фибрина. Кроме того, проводили измерение концентрации фибриногена.

Все указанные методы исследования подробно описаны в монографиях (Баркаган, Момот, 2008; Ляпина и др., 2012; Шубина, Оберган, 2021).

Статистический анализ данных осуществляли, используя пакет статистических программ Statistica 8 (StatSoft Inc., USA). Эмпирические распределения проводили с использованием критерия Шапиро–Уилка. Для полярного сравнения независимых групп применяли непараметрический критерий Манна–Уитни. Полученные данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные для анализа соединения каждого из гепариновых препаратов (коммерческие ВМГ и НМГ, гепариноид) с ГК включали 10 мкг гепаринов. При сравнении антикоагулянтного действия соединений каждого из гепаринов с ГК выявлен достоверный антикоагулянтный эффект, по сравнению с контролем (0.85% NaCl), по тесту АЧТВ у соединений с гепариноидом (увеличение на 27%), с ВМГ (увеличение на 20%) и с НМГ (повышение на 15%). В то же время наблюдалось достоверное удлинение ТВ на 21% под влиянием соединения с ВМГ, и отмечалась лишь тенденция к увеличению ТВ на 8% при действии комплекса с гепариноидом, по сравнению с контролем. При анализе влияния соединений на внешний путь свертывания крови по результатам определения ПВ установлено, что только соединение ГК с гепариноидом достоверно удлиняло ПВ. Комплекс коммерческого НМГ с ГК не оказывал эффекта на изменение ТВ и ПВ, по сравнению с контрольными пробами. Из составных частей соединений лишь ВМГ в дозе, эквивалентной его содержанию в комплексе, удлинял ТВ на 13%, а также гепариноид повышал ПВ на 13%, по сравнению с контролем (табл. 1).

Итак, при использовании различных тестов определения изменения антикоагулянтной активности крови (на внутренний, внешний и общий пути свертывания крови) под воздействием исследуемых нами препаратов следует отметить, что механизмы антикоагулянтного действия соединений ВМГ с ГК обусловлены их влиянием и на внутренний, и на общий пути свертывания крови; механизм антикоагулянтного действия гепариноидного комплекса с ГК реализуется через внешний и внутренний пути свертывания, так как мы наблюдали удлинение временных параметров по тестам АЧТВ и ПВ; комплекс коммерческого НМГ с аминокислотой также влиял на внутренний и внешний пути свертывания крови, но в меньшей степени, чем гепариноидное соединение, причем гепариноидное соединение обладало слабым антитромбиновым эффектом, влияя на общий путь свертывания крови. Следовательно, наибольший антикоагулянтный эффект обнаружен в основном у комплекса гепариноида с ГК.

Таким образом, при взаимодействии гепаринов с аминокислотой возникает новое соединение с новыми свойствами. При сравнении эффектов всех трех комплексных соединений отмечено, что комплексы ВМГ с аминокислотой из-за значительной антитромбиновой активности (удлинение ТВ) при передозировке могут оказать негативное влияние на гемостатическую систему организма и вызвать или кровоточивость, или рикошетный эффект. В то же время комплекс гепариноида с ГК, обладая значительной антикоагулянтной активностью по тесту АЧТВ, умеренной по тесту ПВ и слабой по тесту ТВ, при передозировке исключает проявление отрицательного эффекта в виде геморагий. Соединение же коммерческого НМГ с ГК,

Таблица 1. Антикоагулянтная активность по тестам АЧТВ, ТВ, ПВ комплексных соединений разных видов гепаринов (ВМГ, НМГ, гепариноид) с ГК и их составных частей в эквивалентном количестве в условиях *in vitro* ($M \pm m$)

Исследуемые вещества	Антикоагулянтная активность по тестам		
	АЧТВ, с (%)	ТВ, с (%)	ПВ, с (%)
Контроль (0.85%-ный NaCl), $n = 10$	34.5 ± 1.5 (100%)	21.4 ± 0.5 (100%)	19.4 ± 1.5 (100%)
Комплекс ВМГ с ГК, $n = 9$	$41.4 \pm 1.3^*$ (120%)	$26.0 \pm 1.5^*$ (121%)	21.6 ± 1.3 (111%)
Комплекс НМГ с ГК, $n = 8$	$39.8 \pm 1.3^*$ (115%)	21.5 ± 1.5 (100%)	21.7 ± 0.9 (111%)
Комплекс гепариноида с ГК, $n = 10$	$44.0 \pm 0.7^*$ (127%)	23.1 ± 0.7 (108%)	$25.1 \pm 1.0^*$ (127%)
ВМГ, $n = 7$	37.0 ± 0.9 (107%)	$25.3 \pm 1.7^*$ (113%)	21.1 ± 1.3 (109%)
НМГ, $n = 7$	36.0 ± 1.1 (104.7%)	21.4 ± 1.0 (100%)	21.2 ± 1.3 (110%)
Гепариноид, $n = 8$	36.5 ± 1.3 (105%)	22.2 ± 1.1 (103.7%)	$22.2 \pm 1.2^*$ (113%)
ГК, $n = 7$	34.7 ± 1.3 (101%)	21.33 ± 1.1 (100%)	19.3 ± 1.0 (100%)

Примечание: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятых за 100%, * $p < 0.05$. ВМГ и НМГ – коммерческие препараты.

проявляя слабую антикоагулянтную активность по тесту АЧТВ и ПВ, также не способен вызывать при передозировке кровоточивость. Таким образом, соединение гепариноида с ГК имеет преимущество перед другими исследованными нами комплексами с коммерческими препаратами, поскольку это соединение, хотя и незначительно, но ингибирует тромбин, видимо, за счет дополнительных компонентов, что требует дальнейшего изучения.

По влиянию комплексных соединений разных видов гепаринов на процессы полимеризации фибрина отмечено следующее: максимальные антиполимеризационные изменения фибрина имеются у соединения гепариноида с ГК. Показано, что СФА и ФДПА этого соединения, по сравнению с другими комплексами, включающими гепарины животного происхождения, максимальны и превышают контрольный уровень в 6.2 и в 6.4 раза соответственно, в то время как соединение коммерческого НМГ с ГК превышает по этим активностям контрольный уровень в меньшей степени – в 5.1 и 5.2 раза соответственно. Комплекс ВМГ с ГК, по сравнению с другими соединениями, в наименьшей степени ингибировал полимеризацию фибрина. Следует также отметить, что все исследуемые комплексные соединения не вызывают изменения концентрации фибриногена плазмы, что указывает на отсутствие их влияния на фибринолиз (табл. 2).

В отношении влияния комплексных препаратов на степень полимеризации фибрина необходимо подчеркнуть, что исходные препараты гепаринов ее не изменяли, в то время как исследуемые комплексные гепариновые соединения с ГК проявляли СФА в основном за счет усиления ФДПА, то

есть препятствовали полимеризации фибрина. Установлена максимальная ФДПА у соединений растительного гепариноида с ГК (табл. 2).

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что гепариноид (из пиона Академик Садовничий), как и коммерческий НМГ, демонстрирует не только антикоагулянтный эффект, но и способность препятствовать полимеризации фибрина, усиливая свое фибриндеполимеризационное действие. По данным литературы, при действии других растительных антикоагулянтов (Кричевский, 2015; Pawlaczyk et al., 2011) также выявлено их фибринолитическое действие. Ранее (Бышевский и др., 2012) сообщалось об ограничении взаимодействия тромбина с фибриногеном с последующим предотвращением процессов полимеризации фибрина под влиянием ингибиторов растительного происхождения, что мы и наблюдали в наших исследованиях. Возможным механизмом активирующего действия гепариноида из пиона на антикоагулянтные свойства плазмы и суммарную фибринолитическую активность является блокада активности фермента тромбина и факторов как внутреннего, так и внешнего (в том числе тканевого фактора) механизмов свертывания крови. Установлено, что соединение гепариноида с ГК снижает степень полимеризации фибрина, в связи с чем этот гепариноид представляет фармакологический интерес в плане его применения для профилактики заболеваний, осложняющихся тромбозами.

Многие растения обладают способностью модифицировать гемостаз. Антикоагулянтная активность извлечений из растений обусловлена содержанием в них гликопептидов, механизм действия

Таблица 2. СФА, ФДПА и концентрация фибриногена в плазме крыс после воздействия комплексных соединений разных видов гепаринов (ВМГ, НМГ, гепариноида) с ГК и их составных частей в эквивалентном количестве в условиях *in vitro* ($M \pm m$)

Исследуемые вещества	Показатели гемостаза		
	СФА, мм ²	ФДПА, мм ²	концентрация фибриногена (мг%) (%)
Контроль (0.85%-ный NaCl), $n = 8$	4.0 ± 0.5	3.8 ± 1.0	310 ± 10.5 (100%)
Комплекс ВМГ с ГК, $n = 7$	$16.2 \pm 1.2^*$	$15.5 \pm 1.3^*$	310 ± 8.5 (100%)
Комплекс НМГ с ГК, $n = 7$	$20.8 \pm 1.1^*$	$20.5 \pm 1.5^*$	308 ± 12.1 (99.3%)
Комплекс гепариноида с ГК, $n = 8$	$25.0 \pm 0.7^*$	$25.1 \pm 0.7^*$	301 ± 5.5 (97%)
ВМГ, $n = 5$	5.0 ± 0.9	4.0 ± 1.3	308 ± 12.1 (99%)
НМГ, $n = 5$	3.5 ± 1.1	3.0 ± 0.7	308 ± 2.1 (99%)
Гепариноид, $n = 5$	5.5 ± 1.3	5.0 ± 1.1	307 ± 1.4 (99%)
ГК, $n = 5$	0.7 ± 0.3	1.0 ± 0.1	309 ± 7.4 (100%)

Примечание: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятых за 100%, * $p < 0.05$.

которых имеет сходство с N-концевыми аналогами участка α -цепи молекулы фибриногена, ограничивающими ферментативное превращение фибриногена в фибрин. Интересен тот факт, что прямые антикоагулянты растительного происхождения, отличаясь по механизму действия от используемых в настоящее время антикоагулянтов животного происхождения, не обладают выраженным токсическим действием на организм лабораторного животного (Криштанов и др., 2005). Таким образом, можно заключить, что остается актуальным поиск и изучение новых средств направленного воздействия на гемостаз, оказывающих быстрый и достаточно продолжительный эффект. Значительное место в этих исследованиях занимают растения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые установлена способность гепариноида из корней пиона Академик Садовничий совместно с глутаминовой кислотой проявлять синергические антикоагулянтные и фибриндеполимеризационные эффекты, превышающие таковые одного гепариноида в тех же концентрациях.

Исследованный нами гепариноид из пиона Академик Садовничий совместно с глутаминовой кислотой обладает как ингибирующим эффектом на внутренний и внешний механизмы свертывания, так и антитромботической активностью, ингибируя не только фактор Ха, но и частично тромбин.

Установлена закономерность проявления антикоагулянтного действия средств на основе разных гепаринов при включении в систему глута-

миновой кислоты и показано, что комплексные средства глутаминовой кислоты с высокомолекулярным гепарином животного происхождения обладают антитромбиновым действием, с растительным гепарином — проявляют высокую антикоагулянтную активность по тестам АЧТВ и ПВ и слабое антитромбиновое действие. Наилучшим по эффективности и безопасности противосвертывающим средством является комплекс растительного гепарин(оид)а.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. М.: Ньюдиамед, 2008. 282 с.
- Берковский А.Л., Сергеева Е.В., Суворов А.В. и др. Методы определения активности гепарина. Учебно-методическое пособие. М.: ДПО РМАПО, 2015. 64 с.
- Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П. и др. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения // Мед. наука образов. Урала. 2012. Т. 13 (1). С. 163–170.

- Кричевский Л.А. Низкомолекулярные гепарины в современной системе управления свертываемостью крови // *Anesthesiol. Crit. Care Med.* 2015. Т. 117 (16). С. 42–48.
- Криштанов Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц. и др. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств // *Вестник ВГУ. Сер. Биол. Хим. Фарм.* 2005. № 1. С. 212–221.
- Кузнецова С.А., Дрозд Н.Н., Кузнецов Б.Н. и др. Антикоагулянтное средство. Патент № 2399377. Рег. 13.03.2009. Публ. 20.09.2010.
- Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство, 2010. 832 с.
- Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М.: Адвансед Солюшнз, 2012. 160 с.
- Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С. О механизме антикоагулянтного действия экстракта из корней пиона молочноцветкового // *Межд. журн. прикл. фундамент. исслед.* 2016. № 11. С. 1091–1093.
- Николаева Л.С., Ляпина Л.А. Метод создания новых высокоактивных антикоагулянтов крови на основе термодинамических моделей химических равновесий и коагуляционного анализа *in vivo* и *in vitro*. М.: Ким Л.А., 2019. 132 с.
- Стручкова И.В., Брилкина А.А. Аминокислоты. Учебно-методическое пособие. Н. Новгород: ННГУ, 2016. 32 с.
- Шестаков В.А. Принципы коррекции гипергепаринематических кровотечений // *Грудная хирургия.* 1975. № 2. С. 41–44.
- Шубина Т.А., Оберган Т.Ю. Функциональное состояние противосвертывающей системы крови. Практические вопросы. М.: Ким Л.А., 2021. 134 с.
- Beurskens D.M.H., Huckriede J.P., Schrijver R. et al. The anticoagulant and nonanticoagulant properties of heparin // *Thromb. Haemost.* 2020. V. 120 (10). P. 1371–1383.
<https://doi.org/10.1055/s-0040-1715460>
- Li H., Mao W., Hou Y. et al. Preparation, structure and anticoagulant activity of a low molecular weight fraction produced by mild acid hydrolysis of sulfated rhamnan from *Monostroma latissimum* // *Bioresour. Technol.* 2012. V. 114. P. 414–418.
- Marbet G.A. Heparins // *Ther. Umsch.* 2003. V. 60 (1). P. 10–13.
<https://doi.org/10.1024/0040-5930.60.1.10>
- Onishi A., Ange K.St., Dordick J.S., Linhardt R.J. Heparin and anticoagulation // *Front. Biosci.* 2016. V. 21 (7). P. 1372–1392.
<https://doi.org/10.2741/4462>
- Pawlaczyk I., Czerchawski L., Kuliczowski W. et al. Anticoagulant and antiplatelet activity of polyphenolic-poly-saccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. // *Thromb. Res.* 2011. V. 127 (4). P. 328–340.
- Wu M., Xu L., Zhao L. et al. Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from sea cucumber // *Mar. Drugs.* 2015. V. 13 (4). P. 2063–2084.
<https://doi.org/10.3390/md13042063>
- Xiao C., Lian W., Zhou L. et al. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors // *Thromb. Res.* 2016. V. 146. P. 59–68.
<https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.08.027>
- Zhang S.B. *In vitro* antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates // *Food Chem.* 2016. V. 202. P. 1–8.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.108>

Comparative Studies of Complex Products Based on Heparins of Animal and Plant Origin

M. S. Uspenskaya^a, L. A. Lyapina^{a, *}, S. M. Sorokoletov^b, M. G. Lyapina^a, and M. D. Kalugina^a

^aLomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

^bBotkin City Clinical Hospital, Moscow, Russia

*e-mail: lyapinal@mail.ru

Complex preparations based on heparins of animal and vegetable origin with the inclusion of glutamic acid in a weight ratio of 1 : 4 were obtained. High molecular weight (HMH) and low molecular weight (LMWH) commercial preparations of heparins were used as heparins of animal origin, heparinoid was used as heparin of plant origin, isolated from the roots of the peony Akademik Sadovnichy (heparinoid). Their influence on the state of plasma hemostasis under *in vitro* conditions was studied in a comparative aspect. It has been established that all complex compounds have anticoagulant activity, which, according to the results of our studies, is realized by a different mechanism of their action on blood coagulation — on the internal, external, or general pathways of blood coagulation. HMH complexes with glutamic acid had an antithrombin effect, affecting the internal and general coagulation pathways, while LMWH complexes with glutamic acid, exerting anti-Xa activity, affected the internal pathway of coagulation activation, and the combination of heparinoid with glutamic acid inhibited factors not only internal, but also external ways of blood coagulation. In addition, the latter compound exhibited weak antithrombin activity. It was also shown that all heparin complexes prevented fibrin polymerization, increasing the fibrin depolymerization activity of plasma, and in the heparinoid compound, this activity was higher by 10–17% compared to other commercial agents. Thus, the best anticoagulant in terms of efficacy and safety is the heparinoid complex with glutamic acid.

Keywords: high and low molecular weight heparins, peony root heparinoid, heparin-glutamic acid complexes, anticoagulant activity, fibrin polymerization