УДК 616.151.5+547.953+543.646

Особенности про- и антикоагулянтного действия сверхнизких концентраций фосфолипидов различных категорий и их азотистых оснований

С.С.Овакимян

Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА
0014, Ереван, пр. Азатутян, 26

Ключевые слова: фибриноген, фибрин, свертывание крови, фосфолипиды, сверхнизкие дозы, тромбопластическая активность, лизофосфатидилхолины, азотистые основания, протромбиновое время, гемокоагуляция

Внутрисосудистое фибринообразование характеризуется глубокими расстройствами биохимии свертывающей системы крови [23] с одновременными нарушениями количественных соотношений между нейтральными и кислыми категориями фосфолипидов (НФЛ и КФЛ соответственно), имеющими немаловажное значение в норме и патологии процесса гемокоагуляции [33,34]. Присутствие ФЛ в составе фибриногена [12,24] свидетельствует об участии этих соединений в тромбообразовательной функции крови. Процесс трансформации фибриногена в фибрин, сопровождающийся уменьшением количественного содержания КФЛ и возрастанием уровня НФЛ, вносит существенные сдвиги в соотношения между указанными группами ФЛ, решающим образом влияющими на формирование принципиально нового стереотипа функционирования систем тромбообразования.

Результаты проведенных исследований сообщают принципиально новую научную информацию об особенностях влияния биохимической активности различных концентраций НФЛ и КФЛ на процесс гемокоагуляции. Это касается фосфатидилхолинов (ФХ), лизофосфатидилхолинов (ЛФХ), фосфатидилэтаноламинов (ФЭ), сфингомиелинов (СФМ), фосфатидилсеринов (ФС), а также входящих в их структуру фосфорных эфиров некоторых азотистых оснований типа фосфохолина, фосфоэтаноламина и фосфосерина. Ярко выраженное стимулирующее и ингибирующее действие указанных соединений на протромбиновое время (ПВ), тромбопластическую активность (ТА), время свертывания крови (ВСК), количество фибриногена (Ф) и фибринолитическую

активность (ФА) характеризуется в каждом конкретном случае их про- и антикоагулянтной активностью [28,29,35].

Материал и методы

Определение ПВ производили по Квику в модификации Кудряшова [25], ТА – по Кудряшову, ВСК – по Ли-Уайту, количество Ф и ФА – по Бидвелу [1]. В исследованиях были использованы стандарты химически чистых препаратов ФЛ и отмеченных фосфорных эфиров азотистых оснований производства «Сигма» (США).

Навески ФЛ растворяли в малых объемах хлороформа, служивших источниками для приготовления соответствующих разведений в концентрациях 0,005; 0,01; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9 и 1,0 мг испытуемого вещества. К соответствующему разведению ФЛ прибавляли необходимое количество воды с целью получения стойкой эмульсии, разливаемой в необходимых объемах по опытным пробиркам, помещаемым с целью полного удаления следов хлороформа и получения сухих остатков ФЛ на дне пробирок в водяную баню при 37°С с последующим перенесением их в вакуумный эксикатор на несколько часов и затем добавлением в них нужных количеств растворов хлористого кальция и тромбопластина (Т) с тщательным перемешиванием содержимого до образования гомогенно-мутной смеси, pH которой стабилизировали в пределах 7,1-7,4. Перед анализом пробирки вновь помещались в водяную баню при 37°С. Растворы фосфорных эфиров азотистых оснований готовились на 0,85% физиологическом растворе.

Результаты и обсуждение

Согласно данным, приведенным на рис.1, ФХ в концентрации 0,005-0,5 мг вызывал заметное сокращение ПВ от 25 до 20 сек. Дальнейшее увеличение его дозы до 0,7; 0,9 и 1,0 мг сопровождалось постепенным удлинением ПВ, достигавшим первоначального уровня и даже больших величин. В отличие от ФХ фосфохолин во всех использованных концентрациях вызывал закономерное, постепенно нараставшее сокращение ПВ от 24 до 16 сек.

Примечательно, что данные по действию различных доз ФХ на динамику ПВ оказались значительно более демонстративными при использовании одних и тех же концентраций ЛФХ, как это показано на рис. 2. Согласно приведенному демонстрационному материалу, низкие дозы ЛФХ, в диапазоне 0,005-0,2 мг, приводили к существенному сокращению ПВ от 29 до 20 сек с последующим его удлинением до 32 и более сек при испытании 0,5-1,0 мг того же активного начала.

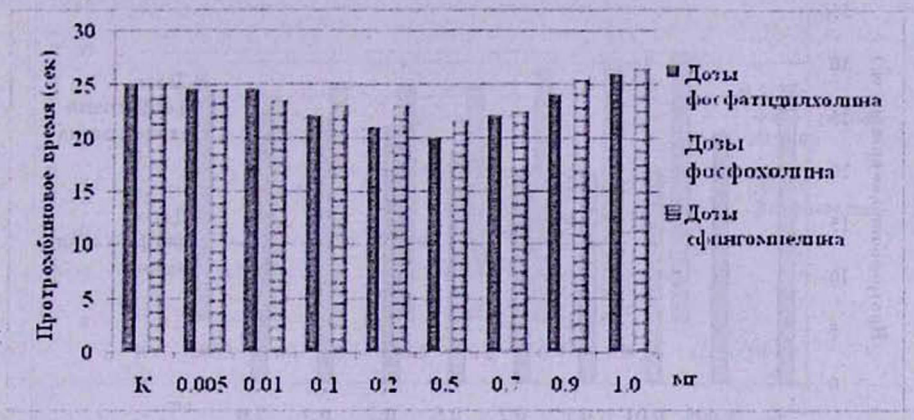

Рис. 1. Особенности действия различных концентраций фосфатидилхолина, фосфохолина и сфингомиелина на динамику протромбинового времени *in vitro*

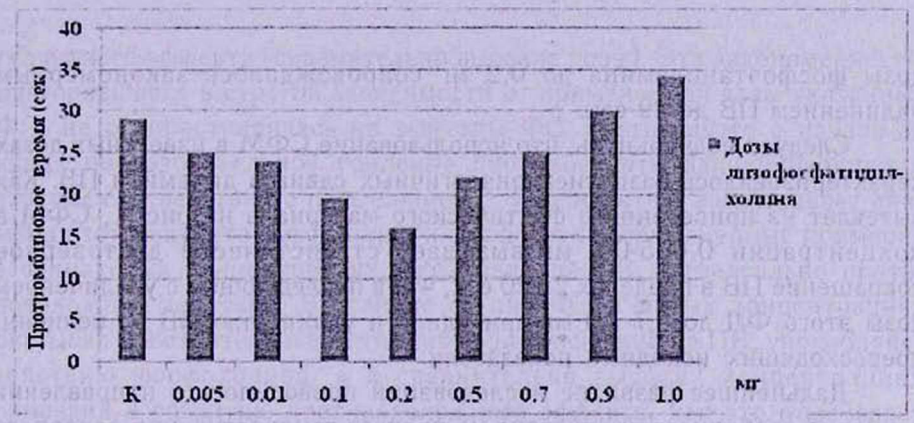

Рис. 2. Особенности действия различных концентраций лизофосфатидилхолина на динамику протромбинового времени *in vitro*

Как вытекает из данных, отраженных на рис.3, введение в исследуемую среду 0,005 ФЭ сопровождалось лишь незначительным сокращением ПВ, в то время как при концентрациях, колебавшихся в пределах 0,01; 0,1 и 0,2 мг, отмечалось его уменьшение от исходных 25 до 20 сек. В дозе же 0,5; 0,7; 0,9 и 1,0 мг ФЭ вызывал постепенное сокращение ПВ до его исходного уровня.

Примечательно при этом проявление ярко выраженного прокоагулянтного действия незначительных доз использованных фосфорных эфиров этаноламина в количестве 0,001; 0,01 и 0,03 мг, вызывавших заметное сокращение ПВ от 20 до 16 сек. Постепенное увеличение

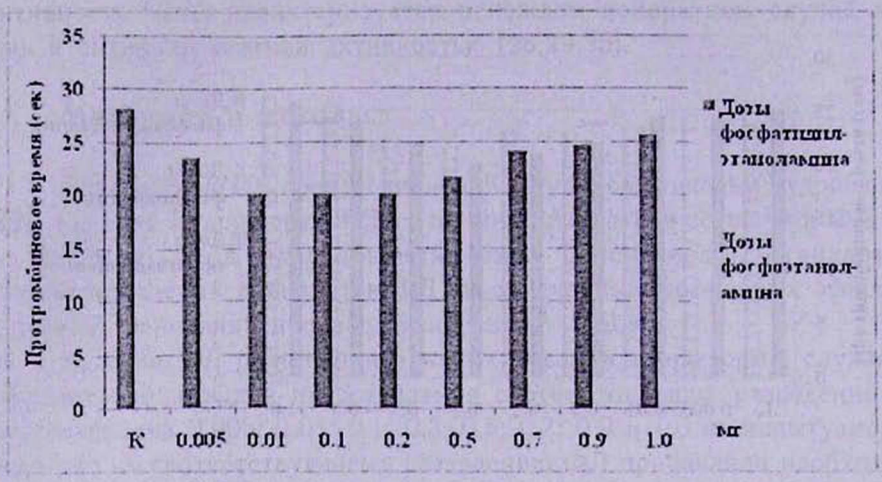

Рис. 3. Особенности действия различных концентраций фосфатидилэтаноламина и фосфоэтаноламина на динамику протромбинового времени *in vitro*

дозы фосфоэтаноламина до 0,2 мг сопровождалось закономерным удлинением ПВ до 29 сек.

Следует подчеркнуть, что использование СФМ в известных дозах характеризовалось развитием аналогичных сдвигов динамики ПВ. Как вытекает из приведенного фактического материала на рис. 1, СФМ в концентрации 0,005-0,5 мг вызывает статистически достоверное сокращение ПВ в пределах 25-20 сек, что в последующем с увеличением дозы этого ФЛ до 0,7-1,0 мг приводило к удлинению ПВ до величин, превосходящих исходные показатели.

Дальнейшее развитие исследований проводилось в направлении изучения особенностей действия на процесс гемокоагуляции основного представителя КФЛ – ФС и фосфорного эфира его азотистого основания – серина. Как вытекает из рис. 4, введение в опытную пробирку 0,005 - 0,5 мг ФС не сопровождалось заметными отклонениями ПВ от нормы и колебалось в пределах 25-26 сек. Вместе с тем его концентрации в пределах 0,7 -1,0 мг вызывали проявление антикоагулянтного эффекта в виде возрастания величины ПВ до 28, 29 и 30 сек.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о существовании тесной взаимосвязи между изменениями в величине ПВ и концентрацией в среде изученных ФЛ и азотистых оснований, входящих в их строение (опыты *in vitro*). Примечательно, что динамика ПВ под действием ФХ, ФЭ и СФМ отличается своей однотипностью и характеризуется его первоначально чувствительным сокращением (малые дозы), сменяющимся последующим развитием антикоа-

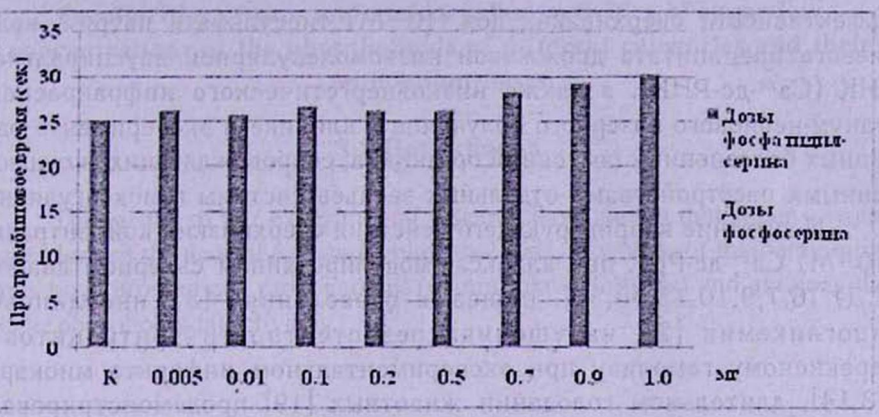

Рис. 4. Особенности действия различных концентраций фосфатидилсерина и фосфосерина на динамику протромбинового времени *in vitro*

гулянтного эффекта (сравнительно высокие дозы). Эта закономерность, повторявшаяся в строгой зависимости от примененной дозы указанных ФЛ, не распространялась на эффекты ФС, вызывавшего с начала до конца последовательное усиление противосвертывающей реакции в строгом соответствии с повышением его количества. Заслуживает внимания тот факт, что фосфохолин и фосфосерин, примененные примерно в одинаковых концентрациях, оказывали на ПВ диаметрально противоположное действие. В отличие от них ФЭ в малых концентрациях оказывал чувствительное стимулирующее действие на ПВ, уподобляясь действию фосфохолина, а в сравнительно высоких концентрациях приводил к развитию противоположного эффекта, как это отмечалось при испытании фосфосерина.

Таким образом, полученные результаты позволяют предполагать, что специфика действия изученных ФЛ на ПВ во многом зависит от природы азотистого основания, входящего в их строение. Добытый нами фактический материал со всей убедительностью подчеркивает исключительную правомерность развиваемой в настоящее время концепции проф. Е.Б.Бурлаковой [3-5] о высокой степени результативности сверхнизких доз факторов химической и физической природы, в том числе физиологически активных соединений и лекарственных препаратов. Достоверность подобных положений нашла свое подтверждение во многих научных центрах стран ближнего и дальнего зарубежья. Они в значительной степени нашли свое отражение и в результатах проведенных нами исследований последних лет. По сути своей результаты проведенных нами фундаментальных работ проде-

монстрировали со всей очевидностью высокую степень терапевтической эффективности сверхнизких доз (10^{-12}М) тиосульфата натрия, кальциевого преципитата дрожжевой низкомолекулярной двуспиральной РНК (Ca^{2+}-дс-РНК), а также низкоэнергетического инфракрасного гелиум-неонового лазерного облучения в клинике и эксперименте различных болезненных состояний организма, сопровождающихся существенными расстройствами отдельных звеньев системы гемокоагуляции.

Испытание корригирующего действия сверхнизких концентраций (10^{-12}М) Ca^{2+}-дс-РНК при аллоксан-модулированном сахарном диабете (СД) [6,7,9,10,15,16,32], пищевых отравлениях [8], инсулиновой гипогликемии [2], нарушениях резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу при экспериментальном инфаркте миокарда [13,14], длительном голодании животных [19] продемонстрировало исключительно высокую степень целебного эффекта. Аналогичные закономерности были зарегистрированы нами и при изучении особенностей действия тиосульфата натрия в тех же концентрациях при гипоксии новорожденных [20-22], коразол-индуцированных эпилептиформных припадках [26,27], а также под действием ультрафиолетового [11,18,31] и низкоэнергетического инфракрасного гелиум-неонового лазерного облучений [17,30]. При этом следует особо акцентировать несравненно высокий уровень антистрессорного антиоксидантного действия сверхнизких доз примененных нами факторов химической и физической природы при их сочетанном комбинированном использовании [10], что, по всей вероятности, совершается по принципам биологически оправданного синергизма в активности факторов однонаправленного, в данном случае, антиоксидантного действия.

Поступила 11.12.09

Ֆոսֆոլիպիդների տարբեր առանձնատեսակների և նրանց ազոտային հիմքերի գերցածր քանակների խթանիչ և արգելակիչ ազդեցությունը արյան մակարդունակության վրա

Ս.Ս.Հովակիմյան

Կատարված հետազոտությունների արդյունքները վկայում են այն մասին, որ չեզոք և թթու ֆոսֆոլիպիդների և նրանց կառուցվածքում գտնվող ազոտային հիմքերի ֆոսֆորական եթերների գերցածր քանակները ցուցաբերում են վառ արտահայտված խթանիչ (չեզոք ֆոսֆոլիպիդներ) և արգելակիչ (թթու ֆոսֆոլիպիդներ) ազդեցություն արյան մակարդունակության արագության վրա:

Peculiarities of pro- and anticoagulant activities of super low concentrations of the phospholipids of different categories and their ammonium bases

S.S.Hovakimyan

The results of our experimental research have shown that super low concentrations of the neutral and acidic phospholipids, as well as of their ammonium bases have pronounced procoagulant (neutral phospholipids) and anticoagulant (acidic phospholipids) activities.

Литература

1. *Андреевко Г.В.* Определение фибриногена и фибринолитической активности в крови при патологических состояниях. Пробл. гематол. и перелив. крови, 1962, т. 9, с. 31-36.
2. *Бдоян О.К., Едоян Л.В., Казарян А.В., Карагезян К.Г.* Особенности качественно-количественных изменений фосфолипидов в эритроцитарной массе и мембранах эритроцитов белых крыс с инсулиновой гипогликемией. Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 1, с. 44-47.
3. *Бурлакова Е.Б.* Эффект сверхмалых доз. Вестник РАН, 1994, т. 64, 5, с. 425-431.
4. *Бурлакова Е.Б.* Особенности действия сверхмалых доз биологически активных веществ и физических факторов низкой интенсивности. Рос. хим. журнал, 1999, т. 43, 5, с. 3-11.
5. *Бурлакова Е.Б.* Действие фенозана и экзогенного ацетилхолина на ацетилхолинэстеразу и систему липидной пероксидации в мембранах клеток головного мозга. Рос. хим. журнал, 1999, т. 43, 5, с. 63-71.
6. *Едоян Л.В., Карян Ш.С., Едоян А.Р., Карагезян К.Г.* Особенности действия сверхмалых доз кальциевого преципитата двуспиральной РНК при нарушении углеводного и фосфолипидного метаболизма у аллоксандиабетических белых крыс. Информационные технологии и управление, Ереван, 2003, т. 2, с. 212-218.
7. *Едоян Л.В., Карян Ш.С., Амирханян О.М., Джанполадян Е.Г., Поладян А.А., Арутюнян В.М., Едоян А.Р., Карагезян К.Г.* Особенности нарушений процессов свободно-радикального окисления липидов в митохондриях аллоксандиабетических белых крыс и пути их эффективного корригирования применением сверхмалых доз Ca^{2+}-дс-РНК. International Journal on Immunoreabilitation, 2003, v. 5, 1, p. 87.
8. *Едоян А.Р., Карагезян М.К., Бояджян А.С., Осипян Л.Л., Овсепян Л.М.* Особенности действия сверхмалых доз Ca^{2+}-дс-РНК в нормализации обмена фосфолипидов при отравлениях микотоксином зеараленоном и аллоксановом диабете. II Международная конференция по химии органических и элементоорганических пероксидов – ПЕРОКСИДЫ, тез. докл., М., 2003, тез. С37. с.183-184.
9. *Едоян А.Р., Карян Ш.С., Едоян Л.А., Арутюнян В.М., Акопян Г.С., Карагезян К.Г.* Эффекты сочетанного применения сверхмалых доз кальциевого преципитата дрожжевой низкомолекулярной двуспиральной РНК с тиосульфатом натрия на метаболизм жирных кислот головного мозга белых крыс с аллоксановым диабетом. Современные вопросы сахарного диабета, Материалы VII ежегодной научной сессии, Ереван, 2003, с. 62-63.
10. *Едоян А.Р., Овакимян С.С., Амирханян Л.Т., Василян А.В., Овсепян Л.М., Карян Ш.С., Едоян Л.В., Карагезян К.Г.* Комбинированная антиоксидантотерапия как

эффективный регулятор нарушений тканевых процессов фосфолипидного метаболизма при сахарном диабете в эксперименте. I Всероссийская конференция по иммунотерапии, Сочи, 2003, т. 5, 1, с. 87.

11. *Казарян А.В.* Особенности структурных изменений фосфолипидов головного мозга белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном. Изд. Международной конференции "Ломоносов, 2005", М., 2005, с. 437-439.
12. *Карагезян К.Г.* О фосфолипидном составе препаратов фибриногена и фибрина нормальной свежей бычьей крови. Биол. ж. АН Арм. ССР, 1968, т. 21, 2, с. 16-24.
13. *Карагезян К.Г, Мелкумян А.В., Геворкян Д.М., Овакимян С.С., Погосян А.Ю., Данилова Л.Л., Ордян В.В., Геворкян Г.А., Эдилян М.М., Карагезян М.К.* Особенности нарушений молекулярных механизмов регуляции резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу и формирования гипоксического синдрома при остром крупноочаговом инфаркте миокарда. Вестник хирургии Армении, 1995, 3, с. 57-63.
14. *Карагезян К.Г., Мелкумян А.В., Геворкян Д.М., Овакимян С.С., Карагезян М.К., Погосян А.Ю., Эдилян М.М., Геворкян Г.А., Данилова Л.Л., Ордян В.В., Элбакян Г.В.* Гипоксический синдром в патогенезе расстройств резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу в клинике острого крупноочагового инфаркта миокарда. Мед. наука Армении НАН РА, 1995, т. XXXV, 1-2, с. 80-87.
15. *Карагезян К.Г., Едоян А.Р., Едоян Л.В., Овсепян Л.М.* Воздействие сверхмалых доз модифицированной двуспиральной РНК на жирнокислотный состав фосфолипидов мозговой ткани аллоксандиабетических белых крыс. ДНАН РА, 2003, т. 103, 3, с. 251-256.
16. *Карагезян К.Г., Едоян А.Р., Карян Ш.С., Едоян Л.В.* Особенности нормализующего действия сочетанного применения сверхмалых доз кальциевого преципитата двуспиральной РНК с тиосульфатом натрия на метаболизм жирных кислот головного мозга белых крыс с аллоксановым диабетом. ДНАН РА, 2003, т. 103, 4, с. 336-341.
17. *Карагезян К.Г., Едоян А.Р., Овсепян Л.М., Едоян Л.В., Аганянц М.А., Карян Ш.С., Мартиросян Э.А.* Особенности количественных сдвигов нейтральных и кислых гликолипидов в крови аллоксандиабетических белых крыс и эффекты низкоэнергетического гелиум-неонового лазерного облучения на этом фоне. Международная Академия наук экологии и безопасности жизнедеятельности, Вестник. СПб., 2003, т. 8, 4, с. 194-196.
18. *Мартиросян А.А., Казарян А.В., Секоян Э.С., Карабашян Л.В., Джанполадян Е.Г., Амирханян О.М., Овакимян С.С., Овсепян Л.М., Данилова Л.Л.* Специфика корригирующего действия ультрафиолетового облучения при нарушениях резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу у белых крыс с сахарным диабетом, моделированным аллоксаном. Аллергология и иммунология, Афины, 2005, т. 6, 3, с. 368.
19. *Мелкумян А.В., Бдоян О.К., Тер-Григорян А.С., Едоян Л.В., Казарян А.В., Карагезян К.Г.* Особенности нарушений фосфолипидов в мозговой и печеночной тканях белых крыс при оксидативном стрессе, моделированном различными сроками голодания. Мед. наука Армении НАН РА, 2006, т. XLVI, 4, с. 9-15.
20. *Мелкумян А.В.* Дезинтеграция фосфолипидного компонента и нарушения антирадикальной защиты при гипоксических состояниях новорожденных и пути по их эффективной коррекции и нормализации. VII Международная конференция "БИОАНТИОКСИДАНТ". М., 2006, с. 191-193.
21. *Мелкумян А.В.* Особенности нарушений резистентности эритроцитов к перекисному гемолизу как тяжелейшее осложнение гипоксий новорожденных и корригирующее действие тиосульфата натрия на этом фоне. ДНАН РА, Ереван, 2007, т. 107, 3, с. 279-284.
22. *Мелкумян А.В.* Динамика качественно-количественных изменений фосфолипидов в крови новорожденных с гипоксическим синдромом и особенности терапевтической эффективности сверхнизких доз тиосульфата натрия на этом фоне. Мед. наука Армении НАН РА, 2007, т. XLVII, 2, с. 38-43.

23. *Овакимян С.С.* Фосфолипиды фибриногена и изменение их содержания в процессе фибринообразования. Дис. .... канд.биол.наук, Ереван, 1970, 195 с.
24. *Овакимян С.С., Карагезян К.Г.* Фосфолипиды фибриногена и их изменения в процессе фибринообразования. Биол. ж. АН Арм. ССР, 1970, т. 23, 2, с. 18-23.
25. *Предтеченский Б.Е.* Лабораторные методы исследования. М., 1950, т. 11, с. 113.
26. *Симонян Л.А. , Симонян А.А., Бадалян Р.Б., Маргарян А.С., Симонян Р.А., Карагезян К.Г.* Корригирующий эффект α-токоферола и тиосульфата натрия на активность АТР-фосфогидролазы в митохондриях печени крыс с моделированным коразолом эпилептиформным припадком. Международная академия наук экологии и безопасности жизнедеятельности. Вестник, СПб., 2005, т. 10, 5, с. 174-176.
27. *Симонян Л.А.* Дисбаланс между анти- и прооксидантными статусами при эпилепсии у подростков. Биол. ж. НАН РА, 2004, т. 56, 3-4, с. 232-235.
28. *Chargaff E., Bendich A., Cohen S.S.* The thromboplastic protein structure properties disintegration. J. Biol. Chem., 1944, v. 156, p. 161-166.
29. *Chargaff E.* Studies on the mechanism of the tromboplastic effect. J. Biol. Chem., 1948, v. 133, p. 253-257.
30. *Edoyan A.R., Karageuzyan K.G. Hovsepyan L.M.* Effect of super small doses of low energetic He-Ne irradiation on phospholipids in brain at alloxan diabetes. Journal of Neurochemistry, 2003, v. 85, suppl.1, abstr. N CP01-10, p. 70.
31. *Ghazaryan A.V., Hovsepyan L.M., Karageuzyan K.G.* Specificities of phospholipids metabolism in rat brain tissue under the conditions of diabetes mellitus, modulated by alloxan. Iranian Journal of Biochemistry and Molecular Biology, Iran, 2005, p. 31.
32. *Karageuzyan K.G., Sekoyan E.S., Hovsepyan L.M., Danilova L.L., Melkumyan A.V., Bdoyan H.K., Elbakyan G.V.* Peculiarities of rat brain and erythrocytes phospholipids composition disorders at alloxan induced hyperglycemia and effects of RNA calcium precipitate on this background. Международный симпозиум под эгидой ЮНЕСКО "Проблемы биохимии, молекулярной, радиационной биологии и генетики", посвященный 100-летию академика Н.М. Сисакяна, Ереван, 2007, с. 75.
33. *Lilly E.* Some aspects of blood coagulation. Res. Today, 1959, v. 15, 2, p. 169-173.
34. *Silver M.J., Turner D.L., Tocantins L.M.* Phospholipid antithromboplastin. Amer. J. Physiol., 1957, v. 190, 8, p. 153-158.
35. *Silver M.J.* Role of calcium ions and phospholipids in platelet aggregation and plug formation. Amer. J. Physiol., 1965, v. 209, 6, p. 1128-1133.