

**Изучение гемореологической активности гибридных  
макромолекулярных соединений на модели синдрома повышенной  
вязкости крови *in vitro***

Попова Е.В., Алиев О.И., \*Домнина Н.С., \*Сергеева О.Ю., Плотников М.Б.  
*Научно-исследовательский институт фармакологии СО РАМН, Томск, Россия,*

*634028, пр. Ленина 3, факс: 8(3822)41-42-35*

*E-mail: helenapharm@yandex.ru*

*\* Санкт-Петербургский государственный университет, Россия*

**Резюме.** На модели гипервязкости крови *in vitro* проведен скрининг среди гибридных макромолекулярных соединений на основе гидрофильных полимеров (декстран (40 кДа), гидроксипропилированный крахмал (200 кДа) и полиэтиленгликоль (20 кДа)) с химически привитыми к полимерной цепи фрагментами пространственно-затрудненных фенолов. В работе представлены результаты экспериментального изучения влияния гибридных макромолекулярных соединений (в конечных концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  г/мл крови) на вязкость крови и агрегацию эритроцитов. Установлено наиболее активное вещество, обладающее гемореологической активностью (О-(3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропенил)-(1->6)- $\alpha$ -D-глюкан). Выявлено, что гемореологическая активность гибридных макромолекулярных соединений зависит от молекулярной массы полимера. Наибольшее положительное влияние на реологические свойства крови оказывали соединения, синтезированные на основе декстрана, наименьшее – на основе гидроксипропилированного крахмала. Сами гидрофильные полимеры в конечных концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  г/мл крови не проявляли гемореологическую активность.

**Ключевые слова:** гибридные макромолекулярные соединения, агрегация эритроцитов, гипервязкость крови

## **The research hemorheological activity of hybrid macromolecular compounds on the model of blood hyperviscosity *in vitro***

Popova E.V., Aliev O.I., \* Domnina N.S., \* Sergeeva O.Y., Plotnikov M.B.

*Research Institution of Pharmacology, Scientific Center of Russian Academy of Medical Sciences, Tomsk, Russia, 634028, Lenin Street 3, Fax: 8(3822)41-42-35*

*\* St. Petersburg State University, Russia*

**Summary.** Screening of hybrid macromolecular compounds based on hydrophilic polymers (dextran (40 kDa), hydroxyethylated starch (200 kDa) and polyethyleneglycol (20 kDa) containing fragments of sterically hindered phenols with chemically grafted polymer chains has been performed on the model of blood hyperviscosity *in vitro*. This work demonstrates the results of an experimental study evaluating effects of hybrid macromolecular compounds (in the end concentrations  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  g/ml of blood) whole blood hyperviscosity and erythrocyte aggregation. Substance with higher hemorheological activity is determined (O-(3-(3,5-d-tert-butyl-4-hydroxyphenyl)propenyl)-(1->6)- $\alpha$ -D-glucan). Was demonstrated that the hemorheological activity of hybrid macromolecular compounds depends on molecular weight of polymer. Compounds synthesized on the basis of dextran showed high positive effect on rheological properties of blood, on the basis of hydroxyethylated starch – the least influence. Polymers of hybrid macromolecular compounds in the end concentrations  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  g/ml of blood showed noneffect on the hemorheological parameters.

**Key words:** hybrid macromolecular compounds, red blood cell aggregation, the model of blood hyperviscosity

### **ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время создан новый класс биологически активных веществ – гибридные макромолекулярные соединения (ГМС), представляющие собой антиоксиданты, иммобилизованные на полимерах. Благодаря своей структуре ГМС растворимы в воде, а, следовательно, пригодны для разработки на их основе лекарственных препаратов, используемых внутривенно с целью экстренной терапии. Известно, что эти соединения проявляют свойства антиоксидантов [1, 2, 5], повышают выживаемость животных при острой кровопотере [10].

Данное исследование посвящено поиску среди ГМС средств, обладающих гемореологической активностью.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили ГМС, полученные из гидрофильных полимеров и пространственно-затрудненных фенолов (ПЗФ) по разработанным ранее методикам [1, 2, 3, 15]. Для синтеза ГМС в качестве полимеров использовали: декстран (40 кДа) (Д), гидроксиэтилированный крахмал (200 кДа) (ГЭК) и полиэтиленгликоль (20 кДа) (ПЭГ). В работе исследовали соединения: О-(3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропенил)-(1->6)- $\alpha$ -D-глюкан (Д-КФ), О-(3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропенил)-О-(2-гидроксиэтил)-крахмал (ГЭК-КФ), полиэтиленгликоля бис-3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)-пропионат (ПЭГ-КФ), О-[2-бензамидо-3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)акрилоил]-(1->6)- $\alpha$ -D-глюкан (Д-АзФ), О-[2-бензамидо-3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)акрилоил]-О-(2-гидроксиэтил)-крахмал (ГЭК-АзФ). Содержание химически присоединенных пространственно-затрудненных фенолов в ГМС составляло: Д-КФ – 5,4 масс.%, ПЭГ-КФ – 2,7 масс.%, ГЭК-КФ – 5,3 масс.%, Д-АзФ – 12,9 масс.%, ГЭК-АзФ – 8,5 масс.%.

Эксперименты проведены на 10 беспородных крысах-самцах массой 420–445 г., полученных из лаборатории биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН (сертификат здоровья животных № 24-03). Животные находились в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе и свободном доступе к воде и пище. Содержание животных осуществлялось в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных целей (Страсбург, 1986). Эвтаназию производили, соблюдая Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных, утверждённые Министерством здравоохранения РФ.

Забор проб крови проводили через катетер из общей сонной артерии под эфирным наркозом. Кровь стабилизировали 3,8% цитратом натрия в соотношении 9:1. Активность ГМС исследовали в конечных концентрациях  $10^{-5}$  и  $10^{-6}$  г/мл крови в объеме 10 мкл на 0,5 мл крови. Изучаемые показатели регистрировали до и после инкубации проб крови при температуре  $43,0 \pm 0,4$  °С в течение 60 мин (модель гипервязкости крови) [11]. В контрольные пробы добавляли эквивалентное количество 0,9% натрия хлорида (контроль 1) или полимеры: Д или ПЭГ или ГЭК (в зависимости от полимерной основы исследуемого соединения – контроль 2).

Влияние ГМС на реологические свойства крови оценивали по значениям вязкости крови и спонтанной агрегации эритроцитов. Вязкость крови регистрировали на ротационном гемовискозиметре АКР-2 в диапазоне скоростей сдвига от  $10 \text{ с}^{-1}$  до  $300 \text{ с}^{-1}$  [9]. Спонтанную агрегацию эритроцитов исследовали методом силлектометрии [12]. Критерием агрегационной активности эритроцитов служил полупериод агрегации эритроцитов –  $T_{1/2}$ .

Эвтаназию животных проводили передозировкой эфирного наркоза.

Для статистической обработки данных использовали пакет программного обеспечения “Statistica 6.0”. Рассчитывали средние значения показателей и стандартные ошибки среднего значения. Достоверность различий ( $p < 0,05$ ) между группами определяли с помощью t-критерия Стьюдента.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группе контроль 1 с добавлением к образцам крови 0,9% раствора NaCl и последующей инкубацией в течение часа при температуре  $43,0 \pm 0,4 \text{ }^\circ\text{C}$  наблюдались закономерные изменения гемореологических параметров. Вязкость крови возрастала во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига на 17–35% по сравнению с исходными значениями (табл.).  $T_{1/2}$  снижался на 20–42%, что свидетельствовало об активации процессов эритроцитарной агрегации. Инкубирование проб крови с добавлением полимеров (Д, ПЭГ или ГЭК) также приводило к повышению вязкости крови при скоростях сдвига  $10 \text{ с}^{-1}$ ,  $50 \text{ с}^{-1}$  и  $300 \text{ с}^{-1}$  на 17–33% и снижению  $T_{1/2}$  на 17–41%. Достоверных различий при добавлении в пробы крови 0,9% раствора NaCl (контроль 1) и полимеров (контроль 2) не выявлено. Минимальное влияние на сдвиги гемореологических параметров при инкубации крови оказали соединения на основе ГЭК. Так, ГЭК-АзФ, внесенный в пробу в конечной концентрации  $10^{-6}$  г/мл крови, не оказывал статистически значимого воздействия на вязкость крови и агрегацию эритроцитов. В концентрации  $10^{-5}$  г/мл крови ГЭК-АзФ значимо ограничивал возрастание вязкости крови только при  $300 \text{ с}^{-1}$  на 13%. ГЭК-КФ в концентрации  $10^{-6}$  г/мл крови достоверно, по сравнению с контролем, сдерживал повышение вязкости крови при скоростях сдвига  $10 \text{ с}^{-1}$  и  $50 \text{ с}^{-1}$  на 17% и 15% соответственно и сохранял  $T_{1/2}$  на уровне исходных значений, что достоверно выше аналогичного показателя в контроле на 62%. Однако, при добавлении в пробу крови ГЭК-КФ в концентрации  $10^{-5}$  г/мл крови, наблюдаемые сдвиги гемореологических показателей не достигали необходимого уровня статистической значимости.

Использование Д-АзФ в концентрации  $10^{-6}$  г/мл крови не оказывало закономерного влияния на реологические свойства крови. Инкубирование проб крови с добавлением Д-АзФ в концентрации  $10^{-5}$  г/мл крови сдерживало повышение вязкости крови на 7–12% в исследуемом диапазоне скоростей сдвига, при этом  $T_{1/2}$  оставался на исходном уровне, превышая показатель в контроле на 72%. ПЭГ-КФ в конечной концентрации  $10^{-6}$  г/мл крови способствовал ограничению вязкости крови во всем изучаемом диапазоне скоростей сдвига на 6–9% и сохранял  $T_{1/2}$  на уровне исходных значений. При использовании ПЭГ-КФ в конечной концентрации  $10^{-5}$  г/мл крови наблюдалось сдерживание роста вязкости крови только при скорости сдвига  $10 \text{ с}^{-1}$  на 14%, при этом  $T_{1/2}$  повышался на 54% по сравнению с контролем.

Максимальную активность из всех исследованных соединений проявил Д-КФ, добавление которого в пробу крови приводило к ограничению вязкости крови на 12–17% по отношению к контрольным значениям во всем изучаемом диапазоне скоростей сдвига в конечных концентрациях  $10^{-5}$  г/мл и  $10^{-6}$  г/мл крови. Также под действием Д-КФ в конечной концентрации  $10^{-6}$  г/мл крови отмечалось сохранение  $T_{1/2}$  на исходном уровне (показатель оставался выше контрольного на 46%).

### ОБСУЖДЕНИЕ

Патологические изменения реологических свойств крови играют значительную роль в развитии таких заболеваний как ишемический инсульт, инфаркт миокарда, гипертоническая болезнь, бронхиальная астма, диабет и др. [4, 6, 7, 8, 13, 14, 16]. Несмотря на большое количество публикаций, указывающих на формирование синдрома повышенной вязкости крови при данных заболеваниях, фармакологическая коррекция нарушений реологии крови недостаточно эффективна. В связи с этим, представляет интерес поиск новых химических соединений для разработки активных гемореологических препаратов, в частности, исследование гемореологической активности нового класса биологически активных соединений – ГМС на основе гидрофильных полимеров (Д, ПЭГ, ГЭК) с химически привитыми к полимерной цепи фрагментами ПЗФ (КФ, АзФ).

Установлено, что сами полимеры – декстран, полиэтиленгликоль, гидроксипропилированный крахмал не оказывали влияния на исследуемые показатели реологии крови. По гемореологической активности в порядке нарастания эффекта исследуемые соединения можно расположить в следующий ряд: ГЭК-АзФ, ГЭК-КФ < Д-АзФ < ПЭГ-КФ < Д-КФ.

Таким образом, среди ГМС наиболее активным соединением оказался Д-КФ в конечных концентрациях  $10^{-5}$  г/мл и  $10^{-6}$  г/мл крови, добавление которого в пробу крови сдерживало повышение вязкости крови по отношению к контрольным значениям во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига и сохраняло  $T_{1/2}$  на уровне значений до инкубации. ПЭГ-КФ в конечной концентрации  $10^{-6}$  г/мл крови также способствовал ограничению возрастания вязкости крови во всем изучаемом диапазоне скоростей сдвига. В конечной концентрации  $10^{-5}$  г/мл крови ПЭГ-КФ предотвращал рост вязкости крови только при скорости сдвига  $10 \text{ с}^{-1}$ , что соответствует полученным данным о влиянии данного соединения на агрегацию эритроцитов. Инкубирование проб крови с добавлением Д-АзФ в концентрации  $10^{-5}$  г/мл крови ограничивало возрастание вязкости крови при скоростях сдвига от  $10 \text{ с}^{-1}$  до  $300 \text{ с}^{-1}$ , при этом  $T_{1/2}$  не изменялся. Минимальная гемореологическая активность свойственна соединениям на основе ГЭК (ГЭК-АзФ и ГЭК-КФ). Различия в фармакологическом действии ГМС, вероятно, обусловлены их структурами [1], различающимися природой и молекулярной массой базового полимера, количеством привитых фрагментов ПЗФ, типом ковалентной связи ПЗФ с полимерной цепью, природой и длиной вставки-спейсера между ядром ПЗФ и полимером. Известно, что с ростом молекулярной массы полимера-носителя антирадикальная активность ГМС снижается, в этом случае возникают стерические препятствия для взаимодействия антиоксиданта со свободным радикалом [1]. Этим можно объяснить относительно невысокую гемореологическую активность соединений на основе ГЭК с молекулярной массой 200 кДа (ГЭК-КФ и ГЭК-АзФ).

### ВЫВОДЫ

1. Гибридные макромолекулярные соединения (ГМС) способны ограничивать развитие состояния гипервязкости крови *in vitro*.
2. Гемореологическая активность ГМС в основном определяется молекулярной массой полимера. Наибольшей гемореологической активностью обладает О-(3-(3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)пропенил)-(1->6)- $\alpha$ -D-глюкан (Д-КФ).

Таблица

Влияние ГМС на вязкость крови (мПа·с) и  $T_{1/2}$  (с) до инкубации и через 60 минут после инкубации проб крови при  $43 \pm 0,4^\circ\text{C}$  (n=3)

Препарат	Концентрация, г/мл крови	Группа	Вязкость крови			$T_{1/2}$ , с
			10 с <sup>-1</sup>	50 с <sup>-1</sup>	300 с <sup>-1</sup>	
Д-КФ	10 <sup>-6</sup>	До инкубации	7,4±0,1	5,2±0,1	4,5±0,1	16,2±1,2
		Контроль 1	9,3±0,2*	6,4±0,1*	5,6±0,2*	11,3±2,3
		Контроль 2	9,2±0,1*	6,3±0,1*	5,6±0,1*	11,0±2,0
		Опыт	7,7±0,1 <sup>#</sup>	5,7±0,1* <sup>#</sup>	5,0±0,2* <sup>#</sup>	16,0±2,8
	10 <sup>-5</sup>	До инкубации	7,2±0,1	5,0±0,1	4,1±0,1	15,8±1,1
		Контроль 1	9,0±0,1*	6,7±0,1*	5,3±0,1*	10,4±0,7*
		Контроль 2	9,0±0,1*	6,6±0,1*	5,2±0,1*	10,9±1,1*
		Опыт	7,9±0,1* <sup>#</sup>	5,7±0,1* <sup>#</sup>	4,7±0,2* <sup>#</sup>	15,2±1,3 <sup>#</sup>
ПЭГ-КФ	10 <sup>-6</sup>	До инкубации	7,6±0,1	5,3±0,1	4,4±0,1	18,0±0,8
		Контроль 1	9,2±0,1*	6,4±0,1*	5,3±0,1*	14,4±3,2
		Контроль 2	9,0±0,1*	6,2±0,1*	5,3±0,1*	14,8±2,4
		Опыт	8,4±0,1* <sup>#</sup>	6,0±0,1* <sup>#</sup>	4,9±0,1* <sup>#</sup>	17,3±0,6
	10 <sup>-5</sup>	До инкубации	7,7±0,1	4,8±0,1	4,2±0,1	15,1±0,9
		Контроль 1	9,2±0,1*	6,3±0,1*	5,0±0,1*	12,0±2,1
		Контроль 2	9,1±0,1*	6,3±0,1*	4,9±0,1*	12,5±1,8
		Опыт	7,8±0,1 <sup>#</sup>	5,4±0,3*	4,6±0,2*	18,5±1,6 <sup>#</sup>
Д-АзФ	10 <sup>-6</sup>	До инкубации	7,3±0,1	5,2±0,1	4,5±0,1	15,0±0,9
		Контроль 1	9,8±0,3*	6,8±0,2*	5,7±0,2*	10,2±1,9
		Контроль 2	9,7±0,3*	6,7±0,3*	5,6±0,1*	10,6±2,8
		Опыт	8,9±0,2*	7,0±0,1*	5,4±0,1*	10,8±1,5
	10 <sup>-5</sup>	До инкубации	7,3±0,1	5,1±0,1	4,4±0,1	16,3±0,8
		Контроль 1	9,2±0,1*	6,4±0,1*	5,7±0,2*	9,4±2,2*
		Контроль 2	9,2±0,2*	6,3±0,1*	5,7±0,3*	9,6±1,6*
		Опыт	8,5±0,2* <sup>#</sup>	5,7±0,2* <sup>#</sup>	4,7±0,2 <sup>#</sup>	16,2±1,0 <sup>#</sup>
ГЭК-КФ	10 <sup>-6</sup>	До инкубации	7,6±0,1	4,8±0,1	4,2±0,1	13,0±0,1
		Контроль 1	9,3±0,2*	6,5±0,3*	5,2±0,1*	8,1±1,0*
		Контроль 2	9,2±0,3*	6,4±0,2*	5,1±0,2*	8,4±1,0*
		Опыт	7,7±0,1 <sup>#</sup>	5,5±0,1* <sup>#</sup>	4,7±0,2	13,1±1,7 <sup>#</sup>
	10 <sup>-5</sup>	До инкубации	7,1±0,1	4,7±0,1	4,2±0,1	12,5±1,2
		Контроль 1	8,9±0,2*	5,9±0,1*	5,2±0,2*	10,3±2,1
		Контроль 2	8,8±0,2*	5,8±0,1*	5,3±0,1*	10,6±1,9
		Опыт	8,2±0,2*	5,4±0,2*	4,8±0,1*	14,1±1,8
ГЭК-АзФ	10 <sup>-6</sup>	До инкубации	7,1±0,1	5,0±0,1	4,3±0,1	17,8±1,3
		Контроль 1	8,8±0,2*	6,2±0,2*	5,2±0,1*	12,3±0,8*
		Контроль 2	8,7±0,2*	6,1±0,2*	5,2±0,1*	11,9±2,1*
		Опыт	8,5±0,2*	5,9±0,2*	5,0±0,1*	13,0±2,3*
	10 <sup>-5</sup>	До инкубации	7,5±0,1	5,3±0,1	4,5±0,1	17,3±0,9
		Контроль 1	9,6±0,3*	6,7±0,2*	5,2±0,1*	11,3±1,6*
		Контроль 2	9,5±0,3*	6,6±0,3*	5,2±0,1*	12,0±2,3*
		Опыт	8,6±0,3*	5,8±0,3*	4,9±0,2 <sup>#</sup>	12,1±0,7*

Примечание: \* – различия достоверны в сравнении с исходными значениями;

<sup>#</sup> – различия достоверны в сравнении с соответствующим контролем (p<0,05).

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арефьев Д.В., Белостоцкая И.С., Вольева В.Б. и др. Гибридные макромолекулярные антиоксиданты на основе гидрофильных полимеров и пространственно-затрудненных фенолов // Изв. РАН. Сер. хим. – 2007. – Т. 4. – С. 751–760.
2. Арефьев Д.В., Домнина Н.С., Комарова Е.А. и др. Синтез и антирадикальная активность конъюгатов декстрана и 2-(4-гидрокси-3,5-дитрет.бутилфенил)пропионовой кислоты // Журн. прикл. химии. – 1999. – Т. 72, вып. 4. – С. 670–673.
3. Белостоцкая И.С., Вольева В.Б., Домнина Н.С. и др. Синтез и свойства макромолекулярных эфиров карбоксизамещенных производных пространственно-затрудненных фенолов. // ЖОрХ, 2010. – Т. 46, № 11.– С. 1646–1651.
4. Габриелян Э.С., Акопов С.Э. Клетки крови и кровообращение. Ереван: Айастан, 1985. – 400 с.
5. Домнина Н.С., Сергеева О.Ю., Хрусталева Р.С. и др. Гибридные макромолекулярные фенольные антиоксиданты. Свойства и применение в медицине //Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты, изд-во Научный мир», 2010. – ASBM. – С. 45–53.
6. Лапотников В.А., Моисеев С.И. Микроциркуляторный гемостаз и реология крови при периферическом и коронарном атеросклерозе // Врач. дело. – 1988. – № 4. – С. 60–63.
7. Люсов В.А., Белоусов Ю.Б. Роль гемостаза и реологии крови в патогенезе ишемической болезни сердца // Кардиология. – 1986. – № 5. – С. 8–14.
8. Муравьев А.В., Чепоров С.В. Гемореология (экспериментальные и клинические аспекты реологии крови). – Ярославль: Изд-во ЯГПУ, 2009. – 178 с.
9. Парфенов А.С., Пешков А.В., Добровольский Н.А. Определение реологических свойств крови: Метод. рекомендации. – М., 1994. – 15 с.
10. Патент РФ № 2273483. Домнина Н.С., Хрусталева Р.С., Сергеева О.Ю. и др. Водорастворимый полимерный антиоксидант, плазмозаменитель с антиокислительной и антирадикальной активностью (варианты) и способ поддержания уровня артериального давления и процессов антиоксидантной защиты в организме при острой кровопотере.
11. Плотников М.Б., Алиев О.И., Маслов М.Ю. и др. (Plotnikov M.B., Aliev O.I., Maslov M.Yu. et al.). Correction of the high blood viscosity syndrome by a mixture of diquertin and ascorbic acid in vitro and in vivo. – Phytother. Res. – 2003. – Vol. 17. – P. 276–278.



12. Плотников М.Б., Алиев О.И., Попель Ф.В. Модификация микроколориметра МКМФ-1 для регистрации агрегации эритроцитов // *Клин. лаб. диагностика*. 1995. – № 3. – С. 457–458.
13. Покалев Г.М., Китаева Н.Д., Шабанов В.А., Левин Г.Я. Микроциркуляция и реология сердечно-сосудистых заболеваний: физиологические, клинические и фармакологические аспекты // *Кардиология*. – 1983. – № 11. – С. 89–92.
14. Савенков М.П. Диагностика и фармакологическая коррекция реологических свойств крови у больных ишемической болезнью сердца: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – М., 1988. – 33 с.
15. Сергеева О.Ю., Арефьев Д.В., Домнина Н.С., Комарова Е.А. Синтез и антиокислительные свойства конъюгатов декстрана и 4-(4-гидрокси-3,5-ди-трет.бутил-бензилиден)-2-фенил-4,5дигидроксиазол-5-она. // *Журн. прикл. химии*. 2005. – Т. 78. – № 6. – С. 962.
16. Berman W. Jr., Berman N., Pathak D., Wood S.C. Effects of pentoxifylline (Trental) on blood flow, viscosity, and oxygen transport in young adults with inoperable cyanotic congenital heart disease // *Pediatr. Cardiol.* – 1994. – Vol. 15, Suppl. 2. – P. 66–70.