

УДК 547.458+615.273.53

СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АРАБИНОГАЛАКТАНА И ИХ АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

С.А. Кузнецова^{1,2*}, Н.Ю. Васильева^{1,2}, Н.Н. Дрозд³, М.А. Михайленко⁴,
Т.П. Шахтшнейдер^{4,5}, Ю.Н. Маляр^{1,2}, Б.Н. Кузнецов^{1,2}, Н.В. Чесноков^{1,2}

¹Институт химии и химической технологии СО РАН, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН»; Академгородок, 50-24, Красноярск 660036, Россия, e-mail: ksa@icct.ru

² Сибирский федеральный университет, пр. Свободный, 79, Красноярск, 660049, Россия

³ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Новый Зыковский проезд, 4, г. Москва, 125167, Россия

⁴ Институт химии твердого тела и механохимии СО РАН, ул. Кутателадзе 18, Новосибирск, 630128, Россия

⁵ Новосибирский государственный университет, ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия

В настоящей работе проведено исследование влияния на время свертывания бедной тромбоцитами плазмы человека в коагулологических тестах с активацией свертывания раствором хлорида кальция: активированное частичное тромбопластиновое время и в тесте РеаКлот-Гепарин, содержащем реагент со смесью фактора Ха и фосфолипидов и субстратную плазму как источник антитромбина, фибриногена и фактора V, сульфатированных производных арабиногалактана (САГ), отличающихся степенью сульфатирования, молекулярной массой и способом получения. Установлено, что исследованные образцы сульфата арабиногалактана являются слабыми антикоагулянтами прямого типа действия.

Показано, что антикоагулянтная активность (а_{IIa}) образцов, полученных путем сульфатирования комплексом пиридина и серного ангидрида (САГ 1) и комплексом сульфаминовой кислоты (САГ 2) составила, соответственно, 23,42±1,86 - 10,20±1,50 ЕД/мг, что в 7 - 15 раз меньше, чем у препарата сравнения - нефракционированного гепарина (НФГ). Анти-фактор Ха активность САГ, также была существенно меньше, чем у НФГ, и составила 2,13±0,42 - 0,37±0,08 ЕД/мг.

Большой интерес представляет отношение активностей а_{Ха/IIa} для САГ 1= 0,091, для САГ 2 = 0,036, что в 10 - 30 раз меньше, чем у НФГ (у НФГ это отношение равно 0,925). И есть вероятность, что образцы САГ в большей степени ингибируют тромбин, а не фактор Ха, в отличие от НФГ. Кроме этого, для получения арабиногалактана с более высокой антикоагулянтной активностью, вероятно, необходимо увеличить содержание серы в образцах.

Ключевые слова: сульфатированный арабиногалактан, молекулярная масса, содержание серы антикоагулянтная активность.

Введение

В настоящее время для профилактики и лечения тромбозов, наряду с другими лекарственными средствами, используют антикоагулянты, обладающие антитромботической активностью. Наиболее широко используемым антикоагулянтным препаратом в современной медицинской практике является природный гексозаминогликан гепарин. Гепарин используют и для улучшения гемосовместимости поверхности медицинских приспособлений с целью снижения формирования тромбов и развития воспалительных реакций [1,2]. К сожалению, его применение, как и других современных антикоагулянтов, независимо от механизма действия, может сопровождаться рядом нежелательных побочных процессов, включая тромбоцитопению и кровотечения. Это определяет актуальность разработки альтернативных антикоагулянтных средств, но с меньшей геморрагической активностью, на основе модифицированного гепарина и полианионных производных олиго- и полисахаридов. Поиск новых соединений в дополнение к препаратам гепарина осуществляют в ряду сульфатированных полисахаридов животного и растительного происхождения, например, среди морских беспозвоночных или водорослей, а также тканей наземных растений [2-5]. За счет структурного разнообразия и высокого отрицательного заряда эти биополимеры способны связываться со многими белками, в том числе и с рецепторами, проявляя тем самым разнообразную биологическую активность. Антикоагулянты, получаемые на основе синтетических сульфатированных производных полисахаридов растительного происхождения, могут также составить перспективную альтернативу гепарину [2,6-11].

Арабиногалактан (АГ) лиственницы, благодаря своим уникальным физико-химическим и фармакологическим свойствам, занимает особое место среди полисахаридов [11,12]. Макромолекула арабиногалактана (АГ), выделенного из древесины лиственницы сибирской, имеет разветвленную структуру и молекулярную массу порядка 15-20 кД. Основная цепь макромолекулы биополимера представлена галактановым кором, а звенья D-галактопиранозы связаны β -1,3-связями, большинство звеньев галактозы имеет боковые ответвления при C-6. Боковые цепи содержат 3,6-ди-O- и 6-O-замещенные остатки β -D-галактопиранозы и 3-O-замещенные остатки β -L-арабинофуранозы. Концевыми невосстанавливающимися остатками являются β -D-галактопираноза, β -D-арабинофуранозы и β -L-арабинопираноза. Соотношение галактозы и арабинозы составляет 7,5:1, две трети остатков арабинозы присутствует в фуранозной

форме, одна треть – в пиранозной. Уроновые кислоты в арабиногалактане лиственницы сибирской не обнаружены.

При сульфатировании, углеводов и родственных им соединений нашли широкое применение комплексы серного ангидрида с различными основными реагентами [2,9,13,14-18]. Известные способы получения сульфатированных производных арабиногалактана также заключаются в его сульфатировании комплексами SO_3 в среде различных растворителей [16-18]. Например, при получении препарата «Агсулар®», представляющего калиевую соль сульфатированного арабиногалактана и обладающего гипополидемической и антикоагулянтной активностью, применяется метод сульфатирования АГ комплексом SO_3 -диметилформамид в диметилсульфоксиде [16].

Во всех перечисленных способах получения сульфатированных производных арабиногалактана применяются экологически небезопасные сульфатирующие реагенты и растворители.

Сульфатирующим агентом, близко примыкающим к комплексам серного ангидрида с основаниями, является сульфаминовая кислота $\text{SO}_3 \cdot \text{NH}_3$ [15]. По свойствам в реакциях сульфатирования сульфаминовая кислота близка к комплексам SO_3 -третичный амин. Сульфатирование сульфаминовой кислотой проводят в присутствии катализаторов типа морфолина, триэтиламина или мочевины [15,19-21]. Применение в качестве сульфатирующего реагента сульфаминовой кислоты имеет ряд существенных преимуществ по сравнению с комплексами серного ангидрида, в отличие от серного ангидрида сульфаминовая кислота представляет собой кристаллическое стабильное вещество.

Нами разработан более простой и экологически безопасный способ сульфатирования арабиногалактана сульфаминовой кислотой в диоксане и диметилсульфоксиде в присутствии основного катализатора мочевины [19-21].

Известно, что антикоагулянтная активность сульфатированных полисахаридов напрямую зависит от метода сульфатирования, влияющего на степень сульфатирования, характер и расположение сульфатных групп, молекулярной массы и др. [6, 22-25]. Молекулярная масса полисахарида и его степень сульфатирования являются одними из важных параметров, влияющих на биологическую активность, но пропорциональной зависимости увеличения антикоагулянтная активность от изменения величины этих параметров не наблюдается.

Ciancia M. и др. показали, что антикоагулянтная активность сульфатов арабиногалактана из зеленых морских водорослей *Codium fragile* и *Codium vermilara* увеличивалась с увеличением SO_3Na от 5,2 до 20,3% и от 21,9 до 30,4%, соответственно [22].

В работе De Raucourt E. и др. [23] приведена корреляция антикоагулянтной активности сульфатированных производных карбоксиметилированного декстрана с их степенью сульфатирования и молекулярной массы. Авторами [23] показано, что антикоагулянтная активность этих производных декстрана с молекулярной массой в диапазоне 10000 – 80000 Да снижается с уменьшением содержания серы (0,03 – 1,66%) и молекулярной массы.

Согласно исследованию, приведенному в [6], антикоагулянтная активность сульфатов пуллулана увеличивалась не только с увеличением степени сульфатирования (от 0,17 до 1,99) и молекулярной массы (от 15 до 250 кДа), но и с увеличением числа сульфатных групп в положениях 2,3 и 4. Также показано, что высокая антикоагулянтная активность сульфатов галактана и фукуана, выделенных из беспозвоночных, связана не только с плотностью и содержанием сульфатных групп, но и со стереоспецифичностью [24].

Химически полностью сульфатированные полисахариды, включая ксилан ($\rightarrow 4\text{Xyl} \rightarrow - (1 \rightarrow 4) \text{Xyl} \rightarrow 1 \rightarrow$), амилозу ($\rightarrow 4\text{Glc} - (1 \rightarrow 4) \text{Glc} 1 \rightarrow$), целлюлозу ($\rightarrow 4\text{Glc} \rightarrow - (1 \rightarrow 4) \text{Glc} \rightarrow 1 \rightarrow$), курдлан ($\rightarrow 3\text{Glc} \rightarrow - (1 \rightarrow 3) \text{Glc} \rightarrow 1 \rightarrow$) и галактан ($\rightarrow 3\text{Gal} \rightarrow - (1 \rightarrow 3) \text{Gal} \rightarrow 1 \rightarrow$), которые были выделены из корейского моллюска, и их антикоагулянтная активность была исследована в работе [25]. Результаты свидетельствуют о том, что активность может зависеть не от аномерной конфигурации (α или β) или видов моносахаридов, а от гликозидной связи, либо (1 → 3), либо (1 → 4). ^1H ЯМР исследования этих модифицированных полисахаридов показывают, что соседние сульфатные группы в положениях C-2 и C-3 могли вызывать конформационные изменения каждого моносахарида с 4 C1 до 1 C4. Кроме того, влияние 6-сульфатных остатков на антикоагулянтную активность было исследовано с использованием специфической десульфатированной реакции для химически полностью сульфатированных полисахаридов. 6-сульфатная группа очень важна для определения антикоагулянтной активности (1 → 3) -связанных полисахаридов, тогда как на активность не влияет присутствие или отсутствие 6-сульфатной группы в (1 → 4) -связанных полисахаридах.

Тестирование биологической активности сульфатированных производных арабиногалактана находится в начальной стадии изучения. Из немногочисленных литературных источников [16,26,27,28] известно, что сульфатированные производные арабиногалактана обладают гипополидемической и антикоагулянтной активностью. В лаборатории природных синтонов и лигандов Иркутского института химии им А.Е. Фаворского СО РАН впервые методом направленного синтеза с целью создания нового представителя класса полусинтетических гепариноидов разработана оригинальная наноструктурированная фармакологически активная субстанция, представляющая собой сульфатированный арабиногалактан в виде калиевой соли (AGSK) [16]. В предварительных доклинических исследованиях AGSK показала себя перспективным гипополидемическим средством с выраженным гипотриглицеридемическим эффектом и антикоагулянтным действием [16,27].

Целью данной работы являлось изучение строения и антикоагулянтных свойств полученных разными способами сульфатированных производных арабиногалактана.

Экспериментальная химическая часть.

В качестве исходного сырья использовали арабиногалактан (АГ), полученный по оригинальной методике [29] из древесины лиственницы сибирской (*Larix sibirica* Ledeb.).

Сульфат арабиногалактана в виде натриевой соли был получен путем сульфатирования арабиногалактана комплексом пиридина и серного ангидрида в пиридине (образец САГ 1) по запатентованной методике [18].

Сульфат аммониевой соли арабиногалактана получен сульфатированием арабиногалактана комплексом сульфаминовой кислоты в диоксане в присутствии основного катализатора мочевины в течение 2,5 часов при температуре 75-80 °С (образец САГ 2) по запатентованной нами методике [19].

Проведенные токсикологические исследования на базе аккредитованного испытательного центра г. Красноярска показали, что натриевая и аммониевая соли арабиногалактана в дозе 2 000 мг/кг не являются токсичными и согласно международной токсикологической классификации их можно отнести к 4 классу малотоксичных веществ.

ИК-спектры АГ и продуктов его сульфатирования сняты с использованием ИК-Фурье спектрометра Tensor-27 (Bruker, Германия) в области длин волн 400-4000 см⁻¹.

Обработка спектров проведена по программе OPUS (версия 5.0). Твердые образцы для анализа готовили в виде таблеток в матрице KBr (2 мг образца / 1000 мг KBr).

Молекулярно-массовое распределение (ММР) образцов определяли методом гель-проникающей хроматографии (ГПХ) на хроматографе Agilent 1200 с рефрактометрическим детектором 1260 Infinity (30 °С, PL aquagel-ОН 40 300*7.5 мм, 0,1 М LiNO₃, 1 мл/мин). Калибровка колонки осуществлялась с помощью стандартных образцов декстранов (Sigma-Aldrich) с молекулярными массами 10600, 20000, 41272, 70000. Хроматограммы нормированы на максимум поглощения рефрактометрического детектора. Для анализа использовали разбавленные растворы с концентрацией 0,2 %. При таких условиях определения молекулярных масс стандартное отклонение составляло не более 5 %.

Содержание серы определяли на элементном анализаторе Flash EA-1112 (Thermo Quest Italia).

Экспериментальная биологическая часть.

В определениях антикоагулянтной активности использовали пул бедной тромбоцитами плазмы человека от 10 доноров, приготовленный следующим образом: на станции переливания крови ФГБУ “Национальный медицинский исследовательский центр гематологии” Министерства здравоохранения Российской Федерации, в пластиковый шприц S-Monovette 5ml 9NC (Sardstedt) с 0,11М раствором цитрата натрия до метки отбирали кровь из локтевой вены; стабилизированную кровь центрифугировали при 1200-1400 g 15-20 мин при температуре 4° С на центрифуге Sigma 2K15.

Для оценки антикоагулянтной активности соединений анализировали влияние исследуемых образцов *in vitro* на свертывание плазмы человека в общепринятых коагулологических тестах НПО “Ренам” – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), РеаКлот-гепарин и использовали программируемые оптико-механические коагулометры Минилаб 701М.

Оценку влияния сульфатированных производных арабиногалактана на время свертывания плазмы в тесте АЧТВ проводили по методике, описанной в работе [30]. К 0,1 мл плазмы человека, содержащей САГ или нефракционированный гепарин -НФГ (“Bio-pharm CoLtd”, Шанхай-Гонконг, Китай, антиромбиновая активность - 160 ЕД/мг) в концентрациях 0,01 – 20,0 мкг/мл добавляли 0,1 мл смеси эллаговой кислоты с

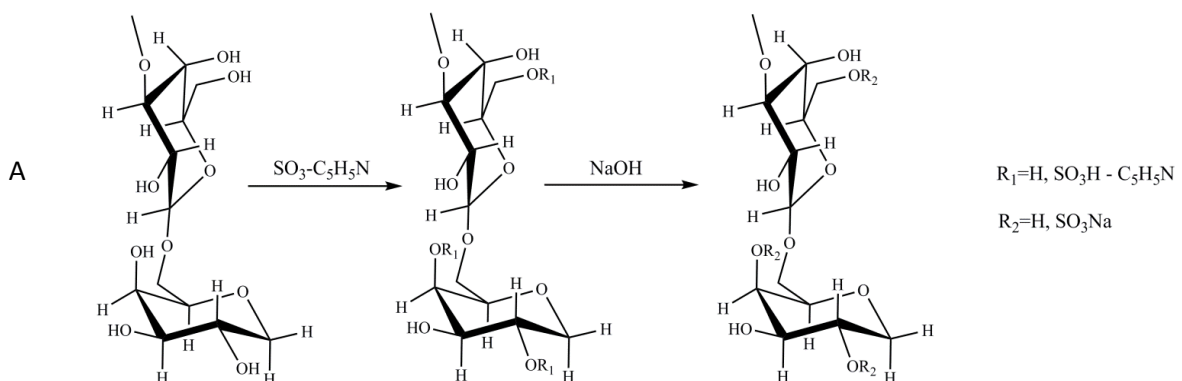
фосфолипидами. Через 3 мин инкубирования при 37 °С добавляли 0,1 мл 0,025 М раствора CaCl_2 и фиксировали на коагулометре время появления сгустка.

Влияние САГ на время свертывания плазмы в тесте РеаКлот – Гепарин проводили по методике, описанной в работе [31]: инкубировали 1 мин при 37° С 0,1 мл плазмы, содержащей САГ или НФГ (“Bio-pharm CoLtd”, Шанхай-Гонконг, Китай, анти-фактор Ха или аХа активность - 148 ЕД/мг) в концентрациях 0,01 – 800 мкг/мл. Затем добавляли 0,05 мл смеси фосфолипидов с фактором Ха, через 3 мин инкубации при 37° С добавляли 0,05 мл 0,035 М раствора CaCl_2 и фиксировали время свертывания плазмы на коагулометре.

Для оценки антикоагулянтного потенциала соединений графически определяли ингибиторные концентрации 2АЧТВ и 2РеаКлот. Эти концентрации являются абсциссами точек, расположенных на кривых зависимости времени свертывания от концентрации; определяли концентрации, при которых время свертывания плазмы в два раза больше, чем в контроле. Для расчета антитромбиновой (аПа) и анти-фактор Ха (аХа) активностей соединений использовали калибровочные кривые НФГ (“Bio-pharm CoLtd”, Шанхай-Гонконг, Китай) со средней молекулярной массой 15000, аПа активность -160 ЕД/мг, аХа активность - 148 ЕД/мг. Специфические антикоагулянтные активности образцов (антитромбиновую и анти-фактор Ха активности) определяли, сравнивая показания кривых концентрация-время свертывания плазмы (в 4-х независимых определениях) для САГ с калибровочными кривыми НФГ [32].

Обсуждение результатов

На рисунке 1 приведены схемы получения сульфатированных производных арабиногалактана в виде натриевой (А) и аммониевой солей (Б).



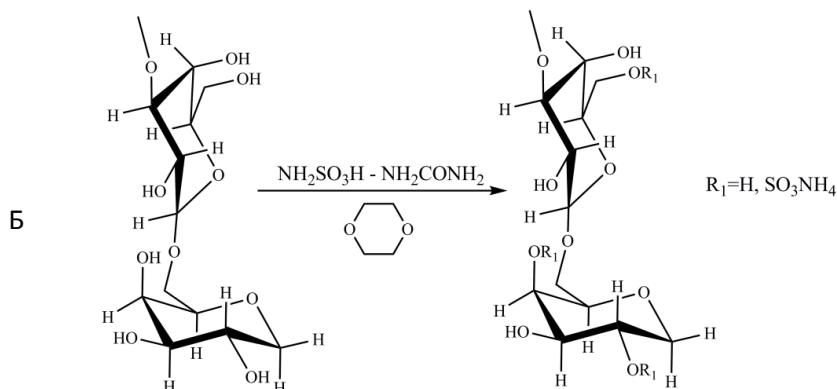


Рис. 1. А) Схема получения САГ 1. Б) Схема получения САГ 2.

Согласно данным ЯМР ^{13}C спектроскопии в сульфатированном АГ сульфатные группы находятся при С2 и С4 углеродных атомах основной галактановой цепи и при С6 углеродных атомах концевых звеньев галактозы основной и боковой цепей арабиногалактана [21].

Введение сульфатной группы в структуру АГ подтверждается появлением в ИК-спектрах сульфатированных образцов АГ новых полос поглощения, характерных для сульфатной группы.

В ИК-спектрах натриевой соли сульфатированного арабиногалактана (САГ 1) в отличие от исходного АГ, присутствует полоса высокой интенсивности, принадлежащая асимметричным валентным колебаниям ($O=S=O$), ν_{as} , 1260 см^{-1} . Наличие в спектре полос поглощения в областях $812\text{--}814\text{ см}^{-1}$ и $861\text{--}862\text{ см}^{-1}$ связано с деформационными колебаниями С-О-S, характерными для первичной и вторичной экваториальной сульфатной группы при С6 и С-2 и вторичной аксиальной сульфатной группы при С-4 1,3-связанного остатка β -галактозы [33].

Следует отметить, что полосы поглощения, соответствующие колебаниям сульфатных групп, а также полосы поглощения валентных колебаний связей О-Н в сульфатированных производных арабиногалактана, выделенных в виде аммонийных солей, по сравнению с соответствующими полосами поглощения сульфатированного полисахарида, выделенного в виде натриевой соли, находятся в области более высоких длин волн. Так, в ИК-спектре аммониевой соли сульфатированного арабиногалактана полоса высокой интенсивности, принадлежащая асимметричным валентным колебаниям ν_{as} ($O=S=O$), находится при $1221,6\text{ см}^{-1}$, а полоса поглощения, связанная с

деформационными колебаниями С-О-S вторичной экваториальной сульфатной группы при С-2, и полоса поглощения, относящаяся к вторичной аксиальной сульфатной группе при С-4 1,3-связанного остатка β -галактозы, присутствуют при $809\text{-}810\text{ см}^{-1}$ и при $855\text{-}860\text{ см}^{-1}$. Такое изменение характера ИК-спектров сульфатированных производных арабиногалактана, полученных в различных солевых формах, можно связать с образованием большего числа водородных связей в аммониевой соли сульфатированного полисахарида по сравнению с натриевой солью этого полимера. В ИК-спектре аммониевой соли сульфатированного полисахарида (САГ 2), в отличие от его натриевой соли (САГ 1), полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям О–Н и С–Н связей, находятся в области $3434\text{-}2925\text{ см}^{-1}$ и уширяются за счет наложения полос поглощения валентных колебаний N–H связей в катионе аммония. Также в ИК-спектре аммониевой соли (САГ 2) имеется интенсивная полоса поглощения при 1450 см^{-1} , соответствующая колебаниям N–H связей катиона аммония.

Результаты гель-проникающей хроматографии исходного и сульфатированного арабиногалактана представлены на рисунке 2 и в таблице 1. В таблице 1 также приведено содержание серы в образцах и антикоагулянтная активность.

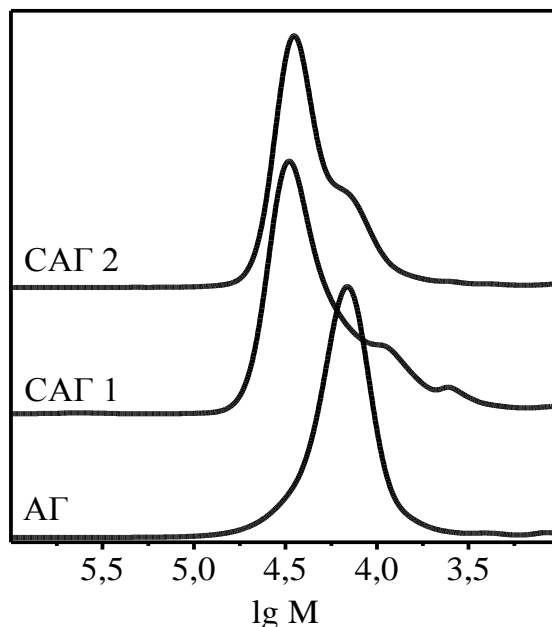


Рис. 2. Гель-хроматограммы исходного арабиногалактана и его сульфатированных производных.

Таблица 1.

Структурные параметры и антикоагулянтная активность
сульфатов арабиногалактана и НФГ

Образцы	Среднечисл. мол. масса, M_n , Да	Средне-вес. мол. масса, M_w , Да	Ст. полидисп. M_n/M_w	Содержание серы, масс. %	Тест АЧТВ		Тест РеаКлот-Гепарин	
					2АЧТВ, мкг/мл плазмы	aПа, ЕД/мг	2РеаКлот, мкг/мл плазмы	aХа, ЕД/мг
САГ 1	15108	23037	1,52	13,2±1,2	6,54±1,39&	23,42±1,86	39,35±5,84&	2,13±0,42
САГ 2	18956	24588	1,30	6,6±0,7	18,70±2,90&	10,20±1,50	291,8±38,1&	0,37±0,08
НФГ		3000 – 30000*		2,3–2,4*	1,11±0,28	160#	0,63±0,08	148#

*сульфатных групп на дисахаридную единицу [34];

- величины активностей, указанные в документах к нефракционированному гепарину фирмы "Bio-pharm Co Ltd" (Шанхай-Гонконг, Китай);

& - достоверность различий ($p < 0,05$) с показаниями для НФГ.

Согласно данным ГПХ, АГ имеет одну основную фракцию, которой соответствует пик с максимумом IgM 4.2 ($M_w \sim 16000$ Да) на хроматограмме, и довольно узким молекулярно-массовым распределением ($M_n = 13133$ Да, $M_w = 15872$ Да, $M_n/M_w = 1,21$). В отличие от исходного АГ, на гель-хроматограмме образца САГ 1 наблюдается наличие нескольких фракций с IgM: 3,6, 3,9, 4,5; соответствующих молекулярным массам ~ 4000 Да, ~ 8000 Да и ~ 32000 Да. Основная фракция образца САГ 1 имеет максимум на хроматограмме при IgM 4.5. Появление в составе САГ 1 низкомолекулярных фракций с IgM 3,6 и 3,9, вероятно, обусловлено процессами частичной деструкции как исходного, так и сульфатированного арабиногалактана. Аналогичное снижение молекулярной массы наблюдалось ранее при механохимической активации АГ [13]. На хроматограмме образца САГ 2, полученного путем сульфатирования АГ комплексом сульфаминовой кислоты с мочевиной в диоксане в более мягких условиях по сравнению с условиями сульфатирования АГ хлорсульфоново́й кислотой при синтезе САГ 1, присутствует плечо малой интенсивности ($M_w \sim 16000$ Да) с Ig M $\sim 4,2$. Это плечо соответствует основной

фракции АГ. При этом на хроматограмме САГ 2 отсутствуют пики, принадлежащие низкомолекулярным фракциям продуктов деструкции..

Для анализа антикоагулянтной активности образцов САГ, в качестве модельных были выбраны следующие тесты: АЧТВ - с активацией реакций свертывающего каскада, ведущих к образованию сериновых протеиназ – фактора XII/ калликреина, фактора XI, фактора IX, фактора X и тромбина, и положительным обратным реакциям тромбина - активация фактора VIII и фактора V; РеаКлот-гепарин – с активацией реакций свертывающего каскада при добавлении фактора Ха (источником фактора Va, антитромбина и фибриногена служит субстратная плазма) [23]. В настоящей работе показано, что антитромбиновая активность (aIIa) образцов САГ 2 и САГ 1 составила $10,2 \pm 1,5$ и $23,42 \pm 1,86$ ЕД/мг, что в 6.5-10 раз меньше, чем у препарата сравнения НФГ; при этом 2АЧТВ концентрации образцов сульфатированного арабиногалактана были в 6-17 раз больше таковых для НФГ (табл. 1). В работе [35] авторы наблюдали высокие 2АЧТВ концентрации гликоконъюгата арабиногалактана, выделенного из листьев плодового дерева *Genipa Americana*, до 100 мкг/мл, что в 5 - 15 раз выше, чем у исследованных нами образцов САГ .

Анти-фактор Ха активность (aХа) образцов САГ 2 и САГ 1 также была меньше, чем у НФГ, и составила $0,37 \pm 0,08$ и $2,13 \pm 0,42$ ЕД/мг, а величины 2РеаКлот концентраций были больше, чем у НФГ, в 68-463 раза.

Проведенные исследования показали, что исследуемые образцы сульфатов арабиногалактана являются слабыми антикоагулянтами прямого действия. Влияния молекулярной массы сульфатированных образцов арабиногалактана (в узком исследуемом диапазоне) на антикоагулянтную активность мы не наблюдали. Образец САГ 1 с содержанием серы 13,2 масс.% проявил большую антикоагулянтную активность, чем образец САГ 2 с содержанием серы 6,6 масс.%. Увеличение антикоагулянтной активности САГ в результате увеличения содержания серы закономерно

Несмотря на малую величину специфических активностей САГ большой интерес представляет отношение активностей aХа/IIa, которое для САГ 1 составляет 0,091, а для САГ 2 - 0,036, что в 10 - 30 раз меньше, чем у НФГ (у НФГ это отношение равно 0,925). Можно предположить, что образцы САГ в большей степени ингибируют тромбин, а не фактор Ха, в отличие от НФГ, который ингибирует тромбин и фактор Ха в одинаковой степени. Ранее мы показали, что сульфат арабиногалактана (выделенного из древесины

лиственницы) с содержанием серы 0.75% и средней молекулярной массой 3000 опосредованно (зависимо от антитромбина) ингибировал амидолитическую активность тромбина [28]; но при такой низкой молекулярной массе мы не наблюдали опосредованного антитромбином ингибирования амидолитической активности фактора Ха и 2АЧТВ концентрация образца САГ была велика и достигала 2940 ± 330 мкг/мл. В своем исследовании Tsirigotis-Maniecka М и др. [36] также показали, что за опосредованное антитромбином ингибирование активности тромбина при добавлении полифенол-полисахаридного комплекса, выделенного из надземной части растения *Agrimonia eupatoria L.*, отвечает арабиногалактан, связанный с высоко этерифицированным рамногалактурананом.

С учетом проведенных экспериментов и анализа литературных данных можно предположить, что для увеличения антикоагулянтной активности САГ необходимо подобрать условия сульфатирования, обеспечивающие более равномерное сульфатирование и повысить содержание серы в образцах.

Исследование выполнено в рамках базового проекта ИХХТ СО РАН № 0356-2016-0503 V.46.4.3 Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013-2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zamani M., Khafaji M., Naji M., Vossoughi M., Alemzadeh I., Haghighipour N. A Biomimetic Heparinized Composite Silk-Based Vascular Scaffold with sustained Antithrombogenicity // *Scientific Reports*. 2017. V. 7, № 1. pp. 4455(1-14). doi: 10.1038/s41598-017-04510-1.
2. Крылов В.Б., Устюжанина Н.Е., Нифантьев Н.Э. Синтез низкомолекулярных углеводных миметиков гепарина // *Биоорганическая химия*. 2011. Т. 37, № 6. с. 745-779
3. Mourão P.A. Perspective on the Use of Sulfated Polysaccharides from Marine Organisms as a Source of New Antithrombotic Drugs // *Marine Drugs*. 2015. V. 13, № 5. pp. 2770 – 2784. doi: 10.3390/md13052770
4. Durić K., Kovac Besovic E.E., Njksic H., Muratovic S., Sofic E. Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculus* leaf extracts // *Bosnian journal of basic medical sciences*. 2015. V. 15, № 2. pp. 9 – 14. doi: 10.17305/bjbms.2015.384
5. Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae // *Marine Drugs*. V. 9, № 2. pp. 196 – 223. doi: 10.3390/md9020196
6. Alban S., Schauerte A., Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure–activity relationships of new pullulan sulfates // *Carbohydrate Polymers*. 2002. V. 47, № 3. pp. 267 – 276. doi: 10.1016/S0144-8617(01)00178-3.
7. Desai U.R. New antithrombin-based anticoagulants // *Medical Research Reviews*. 2004. V. 24, № 2. pp. 151 – 181. doi: 10.1002/med.10058
8. Патент 2571555 (RU). Антитромботическое средство из целлюлозы пихты сибирской / С.А. Кузнецова, Н.Н. Дрозд, Е.Ю. Савчик, Н.Т. Мифтахова, Н.Ю. Васильева, В.А. Макаров, Б.Н. Кузнецов // *Опубли.* 20.12.2015, Бюл. № 35.
9. Huang H., Zhang W.-D. Preparation of Cellulose Sulphate and Evaluation of its Properties // *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*. 2010. V. 3, № 1. pp. 32 – 39. doi: 10.3993/jfbi06201006
10. Paulsen B.S., Barsett H. Bioactive Pectic Polysaccharides // *Polysaccharides 1: Structure, characterization and use*. Springer-Verlag, Berlin. 2005. pp. 69 – 101. doi: 10.1007/b136817
11. Oliveira R.C.R, Almeida R.R., Gonçalves T.A. A Review of Plant Sulfated Polysaccharides and their Relations with Anticoagulant Activities // *Journal of Developing Drugs*. 2016, V. 5, № 3. pp 1-3. DOI: 10.4172/2329-6631.1000166.

12. Fan L., Gao S., Wang L., Wu P., Cao M., Zheng H., Xie W., Zhou, J. Synthesis and Anticoagulant Activity of Pectin Sulfates // *Journal of Applied Polymer Science*. 2012. V. 124, pp. 2171–2178. DOI 10.1002/app.35239
13. Pawar R.P., Kushekar B.A., Jadhav B.S. Arabinogalactan in Clinical Use // *Biodegradable Polymers in Clinical Use and Clinical Development*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 2011. pp. 217-247. doi: 10.1002/9781118015810.ch7
14. Xu Y., Dong Q., Qiu H., Cong R., Ding K. Structural Characterization of an Arabinogalactan from *Platycodon grandiflorum* Roots and Antiangiogenic Activity of Its Sulfated Derivative // *Biomacromolecules*. 2010. V. 11, № 10. pp. 2558 – 2566. doi: 10.1021/bm100402n
15. Джильберт Э.Е. Сульфирование органических соединений. М., 1969. 416 с.
16. Патент 2319707 (RU). Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана, обладающих антикоагулянтной и гиполипидимической активностью / Костыро Я.А., Ганенко Т.В., Медведева С.А., Сухов Б.Г., Трофимов Б.А. // Оpubл. 20.03.2008, Бюл. № 8.
17. Патент 101054420 (CN). Method of preparing arabinogalactan sulphate / Fang G. // Publ. date 17.10.2007.
18. Патент 2466143 (RU). Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана / Васильева Н.Ю., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П., Кузнецова С.А. // Оpubл. 10.11.2012, Бюл. № 31
19. Патент 2521649 (RU). Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана / Васильева Н.Ю., Скворцова Г.П., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н., Королькова И.В., Казаченко А.С. // Оpubл. 10.07.2014, Бюл. № 19.
20. Патент 2546965 (RU). Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана / Васильева Н.Ю., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П., Кузнецова С.А. // Оpubл. 10.04.2015, Бюл. № 10.
21. Васильева Н.Ю., Левданский А.В., Кузнецов Б.Н., Скворцова Г.П., Казаченко А.С., Djakovitch L., Pinel C. Сульфатирование арабиногалактана сульфаминовой кислотой в диоксане // *Химия растительного сырья*. 2014. № 1. С. 87-95. doi: 10.14258/jcprm.1401087
22. Ciancia M., Quintana I., Vizcargüénaga M. I., Kasulin L., de Dios A., Estevez J. M., Cerezo A.S. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermilara* with controversial effects on hemostasis // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007. V. 41, № 5. pp. 641–649. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2007.08.007

23. de Raucourt E., Mauray S., Chaubet F., Maiga-Revel O., Jozefowicz M., Fischer A. M. Anticoagulant activity of dextran derivatives // *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998. V. 41, № 1. pp. 49 – 57. doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199807)41:1<49::AID-JBM6>3.0.CO;2-Q
24. Pereira M. S., Melo F.R., Mourão P.A.S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? // *Glycobiology*. 2002 V. 12, № 10. pp. 573 – 580. doi: 10.1093/glycob/cwf077
25. Chaidedgumjorn A., Toyoda H., Woo E. R., Lee K. B., Kim Y. S., Toida T., Imanari T. Effect of (1→3)- and (1→4)-linkages of fully sulfated polysaccharides on their anticoagulant activity // *Carbohydrate Research*. 2002. V. 337, № 10. pp. 925–933. doi: 10.1016/S0008-6215(02)00078-2
26. Shurygina I.A., Sukhov B.G., Fadeeva T.V., Umanets V.A., Shurygin M.G., Ganenko T.V., Kostyuro Y.A., Grigoriev E.G., Trofimov B.A. Bactericidal action of Ag(0)-antithrombotic sulfated arabinogalactan nanocomposite: coevolution of initial nanocomposite and living microbial cell to a novel nonliving nanocomposite // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2011. V. 7, № 6. pp. 827 – 833. doi: 10.1016/j.nano.2011.03.003
27. Костыро Я.А., Ковальская Г.Н. Сульфатированный арабиногалактан -перспективный отечественный аналог сулодексида // *Acta Biomedica Scientifica*. 2008. Т. 60, № 2. С. 117.
28. Дрозд Н.Н., Кузнецова С.А., Лапикова Е.С., Давыдова А.И., Макаров В.А., Кузнецов Б.Н., Бутылкина А.И., Васильева Н.Ю., Скворцова Г.П. Антикоагулянтная активность in vitro сульфатированного арабиногалактана и экстракта коры кедрa // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008. Т. 71, № 4. С. 30-34.
29. Патент 2273646 (RU). Способ получения арабиногалактана / Кузнецова С.А., Кузнецов Б.Н., Михайлов А.Г., Скворцова Г.П. // Оpubл. 10.04.2006, Бюл. № 10.
30. Stuart R., Michel A. Monitoring Heparin Therapy with the Activated Partial Thromboplastin Time // *Canadian Medical Association Journal*. 1971. V. 104, № 5, pp. 385 – 388.
31. Yin E., Wessler S., Butler J. Plasma heparin: a unique, practical, submicrogram-sensitive assay // *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 1973. V. 81, № 2. pp. 298 – 310.
32. Макаров В.А., Спасов А.А., Плотников М.Б. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Москва, 2012. С. 453 – 479.

33. Matsuhiro B. Vibrational spectroscopy of seaweed galactans // *Hydrobiologia*. 1996. V. 326/327, № 1. pp. 481–489. doi: 10.1007/BF00047849
34. Rosenberg R.D., Armand G., Lam L. Structure-function relationships of heparin species // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1978 V. 75, № 7. pp. 3065 – 3069.
35. Madeira J.C., da Silva G.V.L., Batista J.J., Saraiva G.D., Santos G.R.C., Assreuy A.M.S., Mourão P.A.S., Pereira M.G. An arabinogalactan-glycoconjugate from *Genipa americana* leaves present anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects // *Carbohydrate Polymers*. 2018. V.202, pp. 554–562. doi: 10.1016/j.carbpol.2018.09.003
36. Tsirigotis-Maniecka M., Pawlaczyk-Graja I., Ziewiecki R., Balicki S., Matulová M., Capek P., Czechowski F., Gancarz R. The polyphenolic-polysaccharide complex of *Agrimonia eupatoria* L. as an indirect thrombin inhibitor - isolation and chemical characterization // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2019. V. 125, pp. 124-132. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.12.017

**STRUCTURE AND ANTICOAGULANT ACTIVITY
SULFATED DERIVATIVES OF ARABINO GALACTAN OBTAINED BY DIFFERENT
METHODS**

S.A. Kuznetsova^{1,2}, N.Yu. Vasilyeva², N.N. Drozd³, M.A. Mikhailenko⁴,
T.P. Shakhtshneider^{4,5}, Yu.N. Malyar¹, B.N. Kuznetsov^{1,2}, N.V. Chesnokov^{1,2}

¹ *Institute of Chemistry and Chemical Technology SB RAS, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center SB RAS", Akademgorodok 50/24, Krasnoyarsk, 660036, Russia, E-mail: ksa@icct.ru*

² *Siberian Federal University, Svobodny ave., 79, Krasnoyarsk, 660049, Russia*

³ *FGBU "National Medical Research Center of Hematology" of the Ministry of Health of the Russian Federation, Novy Zhykovsky Proezd, 4,*

Moscow, 125167, Russia

⁴ *Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS, Kutateladze str., 18, Novosibirsk, 630128, Russia*

In this paper was studied the influence on the clotting time of platelet poor human plasma in coagulation sulfated derivatives of arabinogalactan (SAG), differing in the degree of sulfation, molecular weight and obtained by different ways. The following tests were used: activated partial thromboplastin time, and the ReaKlot-Heparin test containing reagent with a mixture of Xa factor and phospholipids and substrate plasma as a source of anti-thrombin, fibrinogen and V factor

The clotting was activated by calcium chloride solution. It was found that the investigated samples of sulfated arabinogalactan possessed weak anticoagulant properties of direct action type.

It was shown that anticoagulant activity (aIIa) of SAG 1 and 2 samples was $23.42 \pm 1.86 - 10.20 \pm 1.50$ U/mg, which was 7 - 15 times less than that of the comparison drug heparin. Anti-factor Xa activity of SAG was also significantly less than that of the unfractionated heparin, and was equal to $2.13 \pm 0.42 - 0.37 \pm 0.08$ U/mg.

The factor of great interest is the ratio of the activities aHa / Iia equal to 0.091 for the SAG 1, and 0.036 for the SAG 2, which is 10 - 30 times less than that of the unfractionated heparin (for UFH, this ratio is equal to 1). It is possible that in contrast to UFH, SAG samples largely inhibit thrombin than Xa factor. In addition, to obtain a higher arabinogalactan anticoagulant activity, probably it is necessary to increase the sulfur content in the samples.

Keywords: Sulfated arabinogalactan, molecular weight, sulfur content, anticoagulant activity.