

УДК 547.458+615.273.53

СУЛЬФАТИРОВАННЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ АРАБИНОГАЛАКТАНА И ИХ АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ

© С.А. Кузнецова^{1*}, Н.Ю. Васильева^{1,2}, Н.Н. Дрозд³, М.А. Михайленко⁴, Т.П. Шахтинейдер^{4,5}, Ю.Н. Маляр^{1,2}, Б.Н. Кузнецов^{1,2}, Н.В. Чесноков¹

¹ Институт 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, 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)

Проведено сравнение ИК-спектров и молекулярно-массового распределения сульфатов арабиногалактана в виде натриевой и аммониевой солевых форм, полученных с использованием различных сульфатирующих реагентов.

Согласно полученным данным, сульфатированные производные арабиногалактана отличаются друг от друга характером водородных связей и молекулярно-массовым распределением.

С использованием коагулологических тестов при активации свертывания бедной тромбоцитами плазмы человека *in vitro* проведено исследование антикоагулянтных свойств сульфатированных производных арабиногалактана в различных солевых формах, отличающихся способом получения, степенью сульфатирования и молекулярной массой.

Установлено, что образец в виде натриевой соли сульфатированного арабиногалактана (САГ 1) с содержанием серы 13.2 масс.% и степенью полидисперсности 1.52 проявил в 2 раза большую антикоагулянтную активность, чем образец в виде аммониевой соли сульфатированного арабиногалактана (САГ 2) с содержанием серы 6.6 масс.% и степенью полидисперсности 1.30.

Антитромбиновая (аПа) активность образцов, полученных путем сульфатирования комплексом пиридина и серного ангидрида (САГ 1) и комплексом сульфаминовой кислоты (САГ 2), составила, соответственно, 23.42 ± 1.86 и 10.20 ± 1.50 ЕД/мг; величина анти-фактора Ха активности САГ 1 и САГ 2 равна 2.13 ± 0.42 и 0.37 ± 0.08 ЕД/мг; а отношение аПа/аХа для САГ 1 и САГ 2 составило 11 и 28 соответственно.

Более низкий, чем у нефракционированного гепарина (НФГ), антифактор Ха (аХа) активности САГ и большие отношения активностей аПа/аХа могут способствовать меньшей провокации кровотечений образцами САГ, по сравнению с НФГ.

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

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.

Введение

В настоящее время для профилактики и лечения тромбозов, наряду с другими лекарственными сред-

Кузнецова Светлана Алексеевна – доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник,
e-mail: kuznetssvetl@ Rambler.ru

Окончание на С. 48.

ствами, используют антикоагулянты, обладающие антитромботической активностью. Наиболее широко используемым антикоагулянтным препаратом в современной медицинской практике является

* Автор, с которым следует вести переписку.

природный гликозаминогликан гепарин. Гепарин используют для улучшения гемосовместимости поверхности медицинских приспособлений [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 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.

Известно, что сульфатированные производные полисахаридов растительного происхождения могут составить перспективную альтернативу гепарину [2, 6–11]. Антикоагулянтная активность (АК) сульфатированных полисахаридов зависит от метода сульфатирования, влияющего на степень сульфатирования, характера и расположения сульфатных групп, молекулярной массы и др. Однако пропорциональной зависимости антикоагулянтной активности от изменения величин этих параметров не наблюдается [6, 12–15]. *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 [12]. В работе *De Raucourt E.* и др. приведена корреляция антикоагулянтной активности сульфатированных производных карбоксиметилированного декстрана с их степенью сульфатирования и молекулярной массой [13]. Авторами 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, проведенному в работе [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 фукана, выделенных из беспозвоночных, связана не только с плотностью и содержанием сульфатных групп, но и со стереоспецифичностью [14].

Арабиногалактан (АГ) лиственницы, благодаря своим уникальным физико-химическим и фармакологическим свойствам, занимает особое место среди полисахаридов [11, 16, 17]. Макромолекула арабиногалактана, выделенного из древесины лиственницы сибирской, имеет разветвленную структуру и молекулярную массу порядка 15–20 кДа. 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-О- и 6-О-замещенные остатки β -D-галактопиранозы и 3-О-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.

Васильева Наталья Юрьевна – кандидат химических наук, доцент, старший научный сотрудник,
e-mail: vasilyeva.nata@mail.ru

Дрозд Наталья Николаевна – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник,
e-mail: nndrozd@mail.ru

Михайленко Михаил Александрович – кандидат химических наук, научный сотрудник,
e-mail: mikhailenko@solid.nsc.ru

Шахтинейдер Татьяна Петровна – доктор химических наук, ученый секретарь, e-mail: shah@solid.nsc.ru

Маляр Юрий Николаевич – кандидат химических наук, научный сотрудник, e-mail: yumalyar@gmail.com

Кузнецов Борис Николаевич – доктор химических наук, профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий лабораторией, заведующий кафедрой,
e-mail: bnk@icct.ru

Чесноков Николай Васильевич – доктор химических наук, директор ИХХТ СО РАН, e-mail: cnv@icct.ru

Уроновые кислоты в арабиногалактане лиственницы сибирской не обнаружены. Из немногочисленных литературных источников [18–21] 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 методом сульфатирования АГ комплексом SO_3 -диметилформамида в диметилсульфоксиде был получен сульфатированный арабиногалактан в виде калиевой соли [18]. В предварительных доклинических исследованиях препарат показал себя перспективным гипополидемическим средством с выраженным антикоагулянтным действием [20].

Комплексы серного ангидрида с различными основными реагентами, несмотря на высокие коррозионные свойства, находят широкое применение для сульфатирования арабиногалактана и других полисахаридов [2, 9, 18, 22–25].

Известно использование сульфаминовой кислоты в качестве сульфатирующего агента. 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 [23, 26–28]. 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.

Цель данной работы – сравнение строения и антикоагулянтных свойств сульфатированных производных арабиногалактана, полученных с использованием различных сульфатирующих агентов в виде аммониевой и натриевой солей.

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 [25].

Сульфат аммониевой соли арабиногалактана получен сульфатированием арабиногалактана комплексом сульфаминовой кислоты в диоксане в присутствии основного катализатора мочевины в течение 2.5 ч при температуре 75–80 °С (образец САГ 2) по запатентованной нами методике [26].

Проведенные токсикологические исследования на базе аккредитованного испытательного центра г. Красноярск показали, что натриевая и аммониевая соли арабиногалактана в дозе 2000 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 LiNO_3 , 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 РФ в пластиковый шприц S-Monovette 5ml 9NC (Sardstedt) с 0.11 М 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, антитромбиновая 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 CaCl₂ 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 CaCl₂ 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. Специфические антикоагулянтные активности образцов (антитромбиновую/аПa и антифактор Ха/аХа активности) определяли, сравнивая показания кривых концентрация-время свертывания плазмы (в 4-х независимых определениях) для САГ с калибровочными кривыми НФГ (Bio-pharm CoLtd, Шанхай-Гонконг, Китай) со средней молекулярной массой 15000, аПa активность – 160 ЕД/мг, аХа активность – 148 ЕД/мг [32].

Обсуждение результатов

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

Согласно данным ЯМР ¹³С 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 [28].

Введение сульфатной группы в структуру АГ подтверждается появлением в ИК-спектрах сульфатированных образцов АГ новых полос поглощения, характерных для сульфатной группы (рис. 2). В ИК-спектрах САГ 1 в отличие от исходного АГ, присутствует полоса поглощения высокой интенсивности, принадлежащая асимметричным валентным колебаниям (O=S=O), ν_{as} 1260 см⁻¹. Наличие в спектре полос поглощения в областях 812–814 и 861–862 см⁻¹ связано с деформационными колебаниями C-O-S, характерными для первичной и вторичной экваториальных сульфатных групп при С6 и С2 и вторичной аксиальной сульфатной группы при С4 1,3-связанного остатка β-галактозы [33].

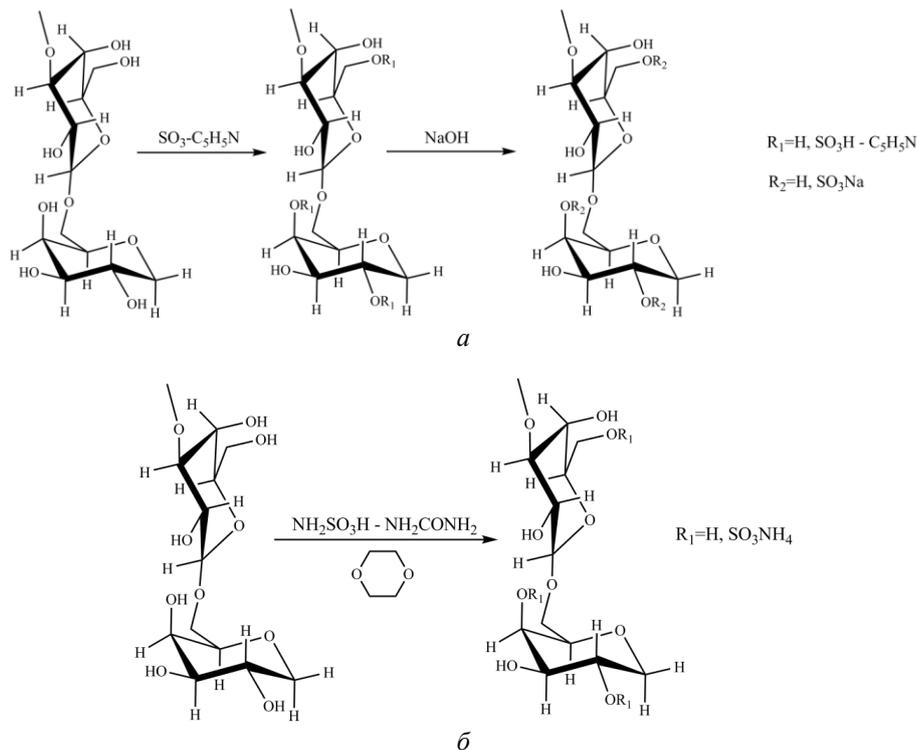


Рис. 1. а – схема получения САГ 1, б) – схема получения САГ 2

Полосы поглощения, соответствующие колебаниям сульфатных групп, а также полосы поглощения валентных колебаний связей О–Н в САГ 2, по сравнению с соответствующими полосами поглощения САГ 1, находятся в области более высоких длин волн. Так, в ИК-спектре САГ 2 полоса высокой интенсивности, принадлежащая асимметричным валентным колебаниям $\nu_{as}(\text{O}=\text{S}=\text{O})$, находится при 1222 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 различие ИК-спектров сульфатированных производных арабиногалактана, полученных в различных солевых формах, можно связать с разным характером водородных связей в САГ 2 и САГ 1. В ИК-спектре САГ 2, в отличие от 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 САГ 2 имеется интенсивная полоса поглощения при 1450 см^{-1} , соответствующая колебаниям N–H связей катиона аммония.

Результаты гель-проникающей хроматографии (ГПХ) исходного арабиногалактана и его сульфатированных производных представлены на рисунке 3. В таблице приведены данные ГПХ, а также содержание серы в образцах и их антикоагулянтная активность.

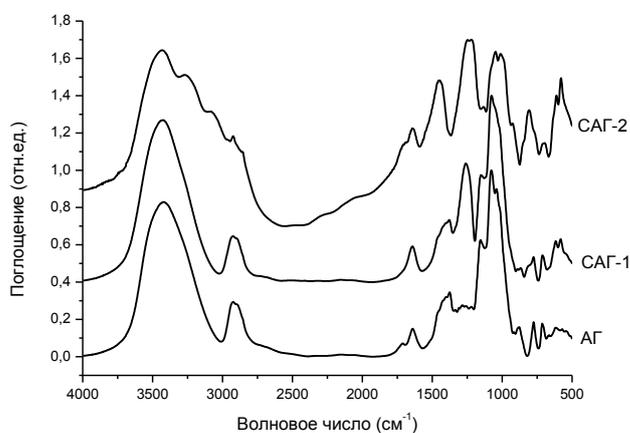


Рис. 2. ИК-спектры исходного арабиногалактана и его сульфатированных производных

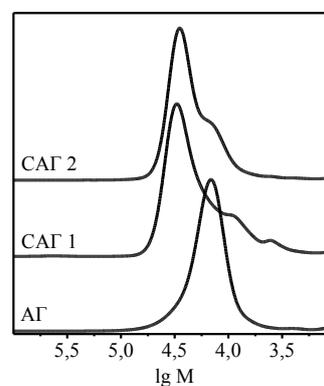


Рис. 3. Гель-хроматограммы исходного арабиногалактана и его сульфатированных производных

Структурные параметры и антикоагулянтная активность сульфатов арабиногалактана и НФГ

Образцы	Mn, Да	Mw, Да	Mn/Mw	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 [#]

Примечания. * 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.; Mn – средне-числовая молекулярная масса; Mw – средне-весовая молекулярная масса; Mn/Mw – степень полидисперсности.

На гель-проникающей хроматограмме исходного АГ (рис. 2, табл.) наблюдается одна основная фракция, которой соответствует пик с максимумом $\lg M$ 4.2 ($M_w \sim 16000$ Да), и довольно узким молекулярно-массовым распределением ($M_n=13133$, $M_w=15872$ Да, $M_n/M_w=1.21$). В отличие от исходного АГ, на хроматограмме образца САГ 1 наблюдается наличие нескольких фракций с $\lg M$: 3.6, 3.9, 4.5; соответствующих мо-

лекулярным массам ~4000, ~8000 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 [17]. На хроматограмме образца САГ 2, полученного путем сульфатирования АГ комплексом сульфаминовой кислоты с мочевиной в диоксане в более мягких условиях, присутствует плечо малой интенсивности ($M_w \sim 16000$ Да) с IgM ~ 4.2, соответствующее 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 тесты АЧТВ и РеаКлот-Гепарин, рекомендованные как для мониторинга за антикоагулянтной терапией нефракционированным гепарином, так и для определения специфических антикоагулянтных активностей (аПа и аХа) соединений с подобным НФГ механизмом действия. В тесте АЧТВ отражаются изменения активности факторов внутреннего пути свертывания крови [30, 32]. В основе теста РеаКлот-Гепарин заключена способность незначительного количества гепарина (или соединения, подобного гепарину), добавленного к плазме в присутствии антитромбина, нейтрализовать экзогенный активированный фактор Ха [13, 31, 32].

Антитромбиновая активность (аПа) образцов САГ 2 и САГ 1 составила 10.20 ± 1.50 и 23.42 ± 1.86 ЕД/мг соответственно, что приблизительно в 7–16 раз меньше, чем у препарата сравнения НФГ; при этом АЧТВ концентрации образцов сульфатированного арабиногалактана были в 6–17 раз больше таковых для НФГ (табл.). Следует отметить, что у образцов САГ 2 и САГ 1 антитромбиновая активность была больше, чем у гликоконъюгата арабиногалактана, выделенного из листьев плодового дерева *Genipa Americana* [35], поскольку АЧТВ концентрации гликоконъюгата арабиногалактана из листьев плодового дерева *Genipa Americana* составляют до 100 мкг/мл, что в 5–15 раз выше, чем у исследованных нами образцов САГ (табл.). Антифактор Ха активность (аХа) образцов САГ 2 и САГ 1 была меньше, чем у НФГ, и достигала 0.37 ± 0.08 ЕД/мг и 2.13 ± 0.42 ЕД/мг, а величины 2РеаКлот концентраций соответственно и закономерно были больше, чем у НФГ (табл.).

Ранее мы показали, что сульфат арабиногалактана (выделенный из древесины лиственницы) с содержанием серы 0.75% и средней молекулярной массой 3000 опосредованно (зависимо от антитромбина) ингибировал амидолитическую активность тромбина [21]; но при такой низкой молекулярной массе мы не наблюдали опосредованного антитромбином ингибирования амидолитической активности фактора Ха.

Несмотря на малую величину специфических активностей САГ, большой интерес представляет отношение активностей аПа/аХа, которое для САГ 1 составляет 11, а для САГ 2 – 28, что в 12 и 30 раз больше, чем у НФГ (у НФГ, использованного в настоящей работе, отношение активностей аПа/аХа равно 0.925). Поэтому можно предположить, что образцы сульфатированных образцов арабиногалактана в большей степени ингибируют активность тромбина, а не фактора Ха, в отличие от НФГ, который опосредованно ингибирует тромбин и фактор Ха в одинаковой степени.

Более высокую антикоагулянтную активность образца в виде натриевой соли арабиногалактана (САГ 1) можно объяснить влиянием на антикоагулянтную активность продуктов частичной деполимеризации арабиногалактана с высоким содержанием сульфатных групп и соответственно большим содержанием серы в образце.

Выводы

Проведено сравнение ИК-спектров и молекулярно-массового распределения сульфатов арабиногалактана в виде натриевой и аммониевой солевых форм, полученных с использованием различных сульфатирующих реагентов.

Согласно полученным данным исследуемые сульфатированные производные арабиногалактана отличаются характером водородных связей и молекулярно-массовым распределением.

С использованием коагулологических тестов при активации свертывания бедной тромбоцитами плазмы человека *in vitro* проведено исследование антикоагулянтных свойств сульфатированных производных арабиногалактана в различных солевых формах, отличающихся способом получения, степенью сульфатирования и молекулярной массой.

Установлено, что образец в виде натриевой соли арабиногалактана (САГ1) с содержанием серы 13.2 масс.% и степенью полидисперсности 1.52 проявил в 2 раза большую антикоагулянтную активность,

чем образец в виде аммониевой соли арабиногалактана (САГ 2) с содержанием серы 6.6 масс.% и степенью полидисперсности 1.30.

Антитромбиновая (аПа) активность образцов, полученных путем сульфатирования комплексом пиридина и серного ангидрида (САГ 1) и комплексом сульфаминовой кислоты (САГ 2) составила, соответственно, 23.42 ± 1.86 и 10.20 ± 1.50 ЕД/мг. Величина Анти-факторов Ха активности САГ 1 и САГ 2 равна 2.13 ± 0.42 и 0.37 ± 0.08 ЕД/мг, а отношение аПа/аХа для САГ 1 и САГ 2 составило – 11 и 28 соответственно, что в 12 и 30 раз больше, чем у НФГ.

Наличие существенно меньшей, чем у нефракционированного гепарина (НФГ), анти-фактор Ха (аХа) активности САГ и большие отношения активностей аПа/аХа могут способствовать меньшей провокации кровотечений образцами САГ, чем НФГ.

Выражаем благодарность сотрудникам центра коллективного пользования ИХХТ СО РАН, ФИЦ КНЦ СО РАН за снятие ИК-спектров образцов.

Список литературы

- Zamani M., Khafaji M., Naji M., Vossoughi M., Alemzadeh I., Haghhighipour N. A Biomimetic Heparinized Composite Silk-Based Vascular Scaffold with sustained Antithrombogenicity // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. N1. Article 4455. DOI: 10.1038/s41598-017-04510-1.
- Крылов В.Б., Устюжанина Н.Е., Нифантьев Н.Э. Синтез низкомолекулярных углеводных миметиков гепарина // *Биоорганическая химия*. 2011. Т. 37. №6. С. 745–779.
- Mourão P.A. Perspective on the Use of Sulfated Polysaccharides from Marine Organisms as a Source of New Antithrombotic Drugs // *Marine Drugs*. 2015. Vol. 13. N5. Pp. 2770–2784. DOI: 10.3390/md13052770.
- Durić K., Kovac Besovic E.E., Njksic H., Muratovic S., Sofic E. Anticoagulant activity of some *Artemisia dracunculoides* leaf extracts // *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*. 2015. Vol. 15. N2. Pp. 9–14. DOI: 10.17305/bjbm.2015.384.
- Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart S. Chemical Structures and Bioactivities of Sulfated Polysaccharides from Marine Algae // *Marine Drugs*. 2011. Vol. 9. N2. Pp. 196–223. DOI: 10.3390/md9020196.
- Alban S., Schauerte A., Franz G. Anticoagulant sulfated polysaccharides: Part I. Synthesis and structure–activity relationships of new pullulan sulfates // *Carbohydrate Polymers*. 2002. Vol. 47. N3. Pp. 267–276. DOI: 10.1016/S0144-8617(01)00178-3.
- Desai U.R. New antithrombin-based anticoagulants // *Medical Research Reviews*. 2004. Vol. 24. N2. Pp. 151–181. DOI: 10.1002/med.10058.
- Патент №2571555 (РФ). 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 / 20.12.2015.
- Huang H., Zhang W.-D. Preparation of Cellulose Sulphate and Evaluation of its Properties // *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*. 2010. Vol. 3. N1. Pp. 32–39. DOI: 10.3993/jfbi06201006.
- Paulsen B.S., Barsett H. Bioactive Pectic Polysaccharides // *Polysaccharides 1: Structure, characterization and use*. Berlin: Springer-Verlag, 2005. Pp. 69–101. DOI: 10.1007/b136817.
- 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. Vol. 5. N3. Pp 1–3. DOI: 10.4172/2329-6631.1000166.
- Ciancia M., Quintana I., Vizcargüenaga M. I., Kasulin L., de Dios A., Estevez J. M., Cerezo A.S. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermicularis* with controversial effects on hemostasis // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2007. Vol. 41. N5. Pp. 641–649. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2007.08.007.
- 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. Vol. 41. N1. Pp. 49–57. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199807)41:1<49::AID-JBM6>3.0.CO;2-Q.
- 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. Vol. 12. N10. Pp. 573–580. DOI: 10.1093/glycob/cwf077.
- 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. Vol. 337. N10. Pp. 925–933. DOI: 10.1016/S0008-6215(02)00078-2.
- 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. Vol. 124. Pp. 2171–2178. DOI 10.1002/app.35239.
- Dushkin A.V., Meteleva E.S., Tolstikova T.G., Tolstikov G.A., Polyakov N.E., Neverova N.A., Medvedeva E.N., Babkin V.A. Mechanochemical preparation and pharmacological activities of water-soluble intermolecular complexes of arabinogalactan with medicinal agents // *Russian Chemical Bulletin*. 2008. Vol. 57. N6. Pp. 1299–1307.
- Патент №2319707 (РФ). Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана, обладающих антикоагулянтной и гиполипидимической активностью / Я.А. Костыро, Т.В. Ганенко, С.А. Медведева, Б.Г. Сухов, Б.А. Трофимов / 20.03.2008.

19. Shurygina I.A., Sukhov B.G., Fadeeva T.V., Umanets V.A., Shurygin M.G., Ganenko T.V., Kostyro 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. Vol. 7. N6. Pp. 827–833. DOI: 10.1016/j.nano.2011.03.003.
20. Костыро Я.А., Ковальская Г.Н. Сульфатированный арабиногалактан – перспективный отечественный аналог сулодексида // *Acta Biomedica Scientifica*. 2008. Т. 60. №2. С. 117.
21. 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 кедр // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008. Т. 71. №4. С. 30–34.
22. 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. Vol. 11. N10. Pp. 2558–2566. DOI: 10.1021/bm100402n.
23. Джильберт Э.Е. Сульфирование органических соединений. М., 1969. 416 с.
24. Patent 101054420 (CN). Method of preparing arabinogalactan sulphate / G. Fang / 17.10.2007.
25. Патент №2466143 (РФ). Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана / Н.Ю. Васильева, Б.Н. Кузнецов, Г.П. Скворцова, С.А. Кузнецова / 10.11.2012.
26. Патент №2521649 (РФ). Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана / Н.Ю. Васильева, Г.П. Скворцова, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов, И.В. Королькова, А.С. Казаченко / 10.07.2014.
27. Патент №2546965 (РФ). Способ получения сульфатированных производных арабиногалактана / Н.Ю. Васильева, А.В. Левданский, Б.Н. Кузнецов, Г.П. Скворцова, С.А. Кузнецова / 10.04.2015.
28. 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/jcrpm.1401087.
29. Патент №2273646 (РФ). Способ получения арабиногалактана / С.А. Кузнецова, Б.Н. Кузнецов, А.Г. Михайлов, Г.П. Скворцова / 10.04.2006.
30. Stuart R., Michel A. Monitoring Heparin Therapy with the Activated Partial Thromboplastin Time // *Canadian Medical Association Journal*. 1971. Vol. 104. N5. 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. Vol. 81. N2. Pp. 298–310.
32. Макаров В.А., Спасов А.А., Плотников М.Б., Белозерская Г.Г., Васильева Т.М., Дрозд Н.Н., Свистунов А.А., Кучерявенко А.Ф., Малыгина Л.С., Науменко Л.В., Неведрова О.Е., Петрухина Г.Н., Алиев О.И., Плотникова Т.М. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз // *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. Москва, 2012. С. 453–479.
33. Matsuhira B. Vibrational spectroscopy of seaweed galactans // *Hydrobiologia*. 1996. Vol. 326/327. N1. 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. Vol. 75. N7. 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. Vol. 202. Pp. 554–562. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.09.003.

Поступила в редакцию 9 января 2019 г.

После переработки 29 марта 2019 г.

Принята к публикации 16 апреля 2019 г.

Для цитирования: Кузнецова С.А., Васильева Н.Ю., Дрозд Н.Н., Михайленко М.А., Шахтшнейдер Т.П., Мальяр Ю.Н., Кузнецов Б.Н., Чесноков Н.В. Сульфатированные производные арабиногалактана и их антикоагулянтная активность // *Химия растительного сырья*. 2019. №4. С. 47–56. DOI: 10.14258/jcrpm.2019044845.

Kuznetsova S.A.^{1*}, Vasilyeva N.Yu.^{1,2}, Drozd N.N.³, Mikhailenko M.A.⁴, Shakhtshneider T.P.^{4,5}, Malyar Yu.N.^{1,2}, Kuznetsov B.N.^{1,2}, Chesnokov N.V.¹ SULFATED DERIVATIVES OF ARABINOGALACTAN AND THEIR ANTICOAGULANT ACTIVITY

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

²Siberian Federal University, pr. Svobodny, 79, Krasnoyarsk, 660049 (Russia)

³FGBU "National Medical Research Center of Hematology" of the Ministry of Health of the Russian Federation., Novy Zhykovsky Proezd, 4, Moscow, 125167 (Russia)

⁴Institute of Solid State Chemistry and Mechanochemistry SB RAS, ul. Kutateladze, 18, Novosibirsk, 630128 (Russia)

⁵Novosibirsk State University, ul. Pirogova, 2, Novosibirsk, 630090 (Russia)

The IR spectra and molecular mass distribution of arabinogalactan sulfates in the form of sodium and ammonium salts, obtained using various sulfating reagents, were compared.

According to the obtained data, the sulfated derivatives of arabinogalactan differ from each other by the nature of the hydrogen bonds and the molecular weight distribution.

Using coagulological tests at the activation of coagulation of platelet-poor human plasma, in vitro study of the anticoagulant properties of arabinogalactan sulfated derivatives in various salt forms differing in methods of preparation, degree of sulfation and molecular weight was conducted.

It was established that the sample in the form of arabinogalactan sodium salt (SAG 1) with a sulfur content of 13.2 wt.% and a polydispersity degree of 1.52 showed 2 times more anticoagulant activity than the sample in the form of ammonium salt of arabinogalactan (SAG 2) with the sulfur content of 6.6 wt.% and the degree of polydispersity of 1.30.

Antithrombin (aIIa) activity of samples obtained by sulfation with pyridine and sulfuric anhydride complex (SAG 1) and sulfamic acid complex (SAG 2) was, respectively, 23.42±1.86 and 10.20±1.50 U/mg; the anti-factor Xa activity of SAG 1 and SAG 2 was 2.13±0.42 and 0.37±0.08 U/mg; and the ratio aIIa/aXa for SAG 1 and SAG 2 was 11 and 28, respectively.

The less activity of antifactor Xa(aXA) of SAG as compared to unfractionated heparin (UFG) and higher ratios of activities aIIa/aXa may contribute the less provocation of bleeding by SAG samples in the comparison with UFG.

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

References

- Zamani M., Khafaji M., Naji M., Vossoughi M., Alemzadeh I., Haghighipour N. *A Scientific Reports*, 2017, vol. 7, no. 1, article 4455, DOI: 10.1038/s41598-017-04510-1.
- Krylov V.B., Ustyuzhanina N.Ye., Nifant'yev N.E. *Bioorganicheskaya khimiya*, 2011, vol. 37, no. 6, pp. 745–779. (in Russ.).
- Mourão P.A. *Marine Drugs*, 2015, vol. 13, no. 5, pp. 2770–2784, DOI: 10.3390/md13052770.
- Durić K., Kovac Besovic E.E., Njksic H., Muratovic S., Sofic E. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, 2015, vol. 15, no. 2, pp. 9–14, DOI: 10.17305/bjbms.2015.384.
- Jiao G., Yu G., Zhang J., Ewart S. *Marine Drugs*, 2011, vol. 9, no. 2, pp. 196–223, DOI: 10.3390/md9020196.
- Alban S., Schauerte A., Franz G. *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 47, no. 3, pp. 267–276, DOI: 10.1016/S0144-8617(01)00178-3.
- Desai U.R. *Medical Research Reviews*, 2004, vol. 24, no. 2, pp. 151–181, DOI: 10.1002/med.10058.
- Patent 2571555 (RU). 20.12.2015. (in Russ.).
- Huang H., Zhang W.-D. *Journal of Fiber Bioengineering and Informatics*, 2010, vol. 3, no. 1, pp. 32–39, DOI: 10.3993/jfbi06201006.
- Paulsen B.S., Barsett H. *Polysaccharides 1: Structure, characterization and use*. Berlin: Springer-Verlag, 2005, pp. 69–101, DOI: 10.1007/b136817.
- Oliveira R.C.R., Almeida R.R., Gonçalves T.A. *Journal of Developing Drugs*, 2016, vol. 5, no. 3. Pp 1–3, DOI: 10.4172/2329-6631.1000166.
- Ciancia M., Quintana I., Vizcargüenaga M. I., Kasulin L., de Dios A., Estevez J. M., Cerezo A.S. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2007, vol. 41, no. 5, pp. 641–649, DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2007.08.007.
- de Raucourt E., Mauray S., Chaubet F., Maiga-Revel O., Jozefowicz M., Fischer A. M. *Journal of Biomedical Materials Research*, 1998, vol. 41, no. 1, pp. 49–57, DOI: 10.1002/(SICI)1097-4636(199807)41:1<49::AID-JBM6>3.0.CO;2-Q.
- Pereira M.S., Melo F.R., Mourão P.A.S. *Glycobiology*, 2002, vol. 12, no. 10, pp. 573–580, DOI: 10.1093/glycob/cwf077.
- Chaidedgumjorn A., Toyoda H., Woo E.R., Lee K.B., Kim Y.S., Toida T., Imanari T. *Carbohydrate Research*, 2002, vol. 337, no. 10, pp. 925–933, DOI: 10.1016/S0008-6215(02)00078-2.
- Fan L., Gao S., Wang L., Wu P., Cao M., Zheng H., Xie W., Zhou, J. *Journal of Applied Polymer Science*, 2012, vol. 124, pp. 2171–2178, DOI 10.1002/app.35239.
- Dushkin A.V., Meteleva E.S., Tolstikova T.G., Tolstikov G.A., Polyakov N.E., Neverova N.A., Medvedeva E.N., Babkin V.A. *Russian Chemical Bulletin*, 2008, vol. 57, no. 6, pp. 1299–1307.
- Patent 2319707 (RU). 20.03.2008. (in Russ.).

* Corresponding author.

19. Shurygina I.A., Sukhov B.G., Fadeeva T.V., Umanets V.A., Shurygin M.G., Ganenko T.V., Kostyro Y.A., Grigoriev E.G., Trofimov B.A. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 2011, vol. 7, no. 6, pp. 827–833, DOI: 10.1016/j.nano.2011.03.003.
20. Kostyro Ya.A., Koval'skaya G.N. *Acta Biomedica Scientifica*, 2008, vol. 60, no. 2, p. 117. (in Russ.).
21. Drozd N.N., Kuznetsova S.A., Lapikova Ye.S., Davydova A.I., Makarov V.A., Kuznetsov B.N., Butylkina A.I., Vasil'yeva N.Yu., Skvortsova G.P. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 2008, vol. 71, no. 4, pp. 30–34. (in Russ.).
22. Xu Y., Dong Q., Qiu H., Cong R., Ding K. *Biomacromolecules*, 2010, vol. 11, no. 10, pp. 2558–2566, DOI: 10.1021/bm100402n.
23. Dzhil'bert E.Ye. *Sul'firovaniye organicheskikh soyedineniy*. [Sulfonation of Organic Compounds]. Moscow, 1969, 416 p. (in Russ.).
24. Patent 101054420 (CN). 17.10.2007.
25. Patent 2466143 (RU). 10.11.2012. (in Russ.).
26. Patent 2521649 (RU). 10.07.2014. (in Russ.).
27. Patent 2546965 (RU). 10.04.2015. (in Russ.).
28. Vasil'yeva N.Yu., Levdanskiy A.V., Kuznetsov B.N., Skvortsova G.P., Kazachenko A.S., Djakovitch L., Pinel C. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2014, no. 1, pp. 87–95, DOI: 10.14258/jcprm.1401087. (in Russ.).
29. Patent 2273646 (RU). 10.04.2006. (in Russ.).
30. Stuart R., Michel A. *Canadian Medical Association Journal*, 1971, vol. 104, no. 5, pp. 385–388.
31. Yin E., Wessler S., Butler J. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 1973, vol. 81, no. 2, pp. 298–310.
32. Makarov V.A., Spasov A.A., Plotnikov M.B., Belozerskaya G.G., Vasil'yeva T.M., Drozd N.N., Svistunov A.A., Kucheryavenko A.F., Malykhina L.S., Naumenko L.V., Nevedrova O.Ye., Petrukhina G.N., Aliyev O.I., Plotnikova T.M. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*. [Guidelines for preclinical studies of drugs]. Moscow, 2012, pp. 453–479. (in Russ.).
33. Matsuhiro B. *Hydrobiologia*, 1996, vol. 326/327, no. 1, pp. 481–489, DOI: 10.1007/BF00047849.
34. Rosenberg R.D., Armand G., Lam L. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 1978, vol. 75, no. 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. *Carbohydrate Polymers*, 2018, vol. 202, pp. 554–562, DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.09.003.

Received January 9, 2019

Revised March 29, 2019

Accepted April 16, 2019

For citing: Kuznetsova S.A., Vasilyeva N.Yu., Drozd N.N., Mikhailenko M.A., Shakhtshneider T.P., Malyar Yu.N., Kuznetsov B.N., Chesnokov N.V. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2019, no. 4, pp. 47–56. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2019044845.