

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ИОННЫХ КОМПЛЕКСОВ ПОЛИСАХАРИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ ХИТОЗАН, СУКЦИНИЛХИТОЗАН И СУЛЬФАТИРОВАННЫЙ ГАЛАКТОМАННАН

Н.Н. Дрозд, А.В. Ильина**, Н.М. Местечкина***,
А.С. Толстенков*, Е.С. Лапикова*, А.И. Давыдова*, А.Н. Левов**,
В.А. Макаров*, В.П. Варламов**, В.Д. Щербухин****

*Гематологический научный центр РАМН, Москва, E-mail: nndrozd@mail.ru

**Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, E-mail: varlamov@biengi.ac.ru

***Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, E-mail: mestnm@inbi.ras.ru

ANTICOAGULANT ACTIVITY OF POLYSACCHARIDES ONIC COMPLEXES WITH CHITOSAN, SUCCINYLATED CHITOSAN AND SULPHATED GALACTOMANNAN

N.N. Drozd, A.V. Ilzina**, N.M. Mestechkina***,
A.S. Tolstenkov*, E.S. Lapikova*, A.I. Davydova*, A.N. Levov,**
V.A. Makarov*, V.P. Varlamov**, V.D. Scherbukhin****

*National Scientific Center for Hematology RAMS, Moscow, E-mail: nndrozd@mail.ru

**Centre «Bioengineering» RAS, Moscow, E-mail: varlamov@biengi.ac.ru

***A.N.Bakh Institute of Biochemistry RAS, Moscow, E-mail: mestnm@inbi.ras.ru

ABSTRACT

We investigated a connection between a chemical structure and anticoagulant activity of complexes on the basis of natural heteropolysaccharides. Decrease in a sulphation degree of «-» sulphated galactomannan with 1,46 up to 0,60 leads to decrease of a polysaccharides ionic complexes anticoagulant activity.

Для профилактики и лечения тромбозов используют нефракционированный и низкомолекулярный гепарины [1] — природные сульфатированные полисахариды (СП). Известно, что в качестве антикоагулянтов, лишенных побочных эффектов гепаринов, могут выступать СП растительного происхождения (из водорослей, лишайников, грибов, высших растений), а также СП из тканей животных организмов (морских беспозвоночных, членистоногих, млекопитающих) [2]. Для придания молекулам полисахаридов необходимых свойств в них вводят дополнительные функциональные группы, получают конъюгаты с макромолекулами других полисахаридов, в некоторых случаях их деполимеризуют. Структура макромолекулы СП играет важную роль при проявлении антикоагулянтной активности (АА). Так, под воздействием хитозана, модифицированного аргинином, происходят конформационные изменения молекулы тромбина. Известно, что N,O-кватернизованные и N-ацильные (пропаноил-, гексаноил-) производные сульфат хитозана обладают повышенной АА. При изменении положительного заряда поверхности полимерного биоматериала на основе хитозана в результате введения полиэтиленгликоля и гексанала на нейтральный или отрицательный (HSO_3^- -группы), наблюдали снижение адгезии тромбоцитов и возрастание биосовместимости с кровью, причем эффект положительно коррелировал с содержанием полиэтиленгликоля.

Цель настоящего исследования заключалась в анализе величин АА *in vitro* полисахаридных ионных комплексов (ПИК), компонентами которых служили галактозилированный хитозан, N-сукцинилхитозан и сульфатированный галактоманнан в разных весовых пропорциях.

Материалы и методы. Хитозан с молекулярной массой (М.м.) 72 кДа (средневязкостная), степенью дезацетилирования (СД) $0,89 \pm 0,03$ получали ферментативной деполимеризацией высокомолекулярного (М.м. 700 кДа, СД $0,89 \pm 0,03$) крабового хитозана [3]. Галактозилированное производное низкомолекулярного хитозана (А) со степенью

замещения (С3) по галактозе $0,10 \pm 0,03$, СД $0,79 \pm 0,03$ получали методом активированных N-оксисукцинильных эфиров [4]. N-сукцинилхитозан (В) со С3 0,80 и характеристической вязкостью 1,23 дL/g получали деполимеризацией исходного со С3 0,80 и вязкостью 2,80 дL/g, производимого ЗАО «Биопрогресс», г. Щёлково.

Деполимеризацию осуществляли, как описано в работе [5]. В экспериментах был использован галактоманнан гуар из семян *Cyamopsis tetragonoloba*, выделенный и очищенный из коммерческого источника (Gum Guar «Sigma» США), как описано в [6]. Для уменьшения молекулярной массы полисахарид деполимеризовали по методу Божика. Соотношение мономеров определяли после полного кислотного гидролиза с помощью газовой хроматографии на приборе Shimadzu GC 2010, детектор GC MS-2010 (Япония). Молекулярную массу рассчитывали на основе характеристической вязкости. После деполимеризации М.м. = 67,6 кДа, соотношение манноза: галактоза (Ман:Гал) = 1,67. Процесс сульфатирования галактоманнана осуществляли так, как описано в [7]. Для испытаний были отобраны 2 образца с различной С3 — 1,47 (препарат Б₁) и 0,6 (Б₂), Ман:Гал в этих образцах составило 1,66 и 1,68, соответственно. Создание полисахаридных ионных комплексов (ПИК) проводили по [4, 10]. Структурные характеристики и соотношение (в весовых частях и %-ных соотношениях) полисахаридов в ионных комплексах представлены в таблице.

Структурные характеристики и соотношение (пропорции в частях и процентах) полисахаридов в ионных комплексах

Номер образца	(А), галактозилированный хитозан NH ₃ ⁺ (СД = 0,79)	ГМ — HSO ₃ ⁻		(В), хитозан-сукцинил — COO ⁻ (С3 = 0,80)
		(Б1) С3 = 1,46	(Б2) С3 = 0,6	
1	0	1 (50%)	—	0
11	0	—	1 (50%)	0
2	1 (50%)	1 (50%)	—	0
3	1 (16,7%)	3,3 (55%)	—	1,7 (28,3%)
33	1 (16,7%)	—	3,3 (55%)	1,7 (28,3%)
4	1 (16,7%)	4 (67%)	—	2 (33,3%)
44	1 (16,7%)	—	4 (67%)	2 (33,3%)
5	1 (21%)	2,5 (53 %)	—	1,25 (26,3%)
55	1 (21%)	—	2,5(53 %)	1,25 (26,3%)
6	1 (28,3%)	1,7 (48 %)	—	0,83 (23,5%)
66	1 (28,3%)	—	1,7(48 %)	0,83 (23,5%)

Для определения АА использовали плазму крови кроликов, которую получали, собирая капли из надреза на краевой вене уха в пластиковую пробирку с 0,11 М раствором цитрата натрия ($C_6H_5O_7Na \cdot 2H_2O$ «Sigma») в соотношении 9:1. Для получения обедненной тромбоцитами плазмы ее центрифугировали при 1400 g 20 мин. Алифатично высушенная плазма крови человека была получена от НПО «Ренам».

Влияние образцов ПИК на активность внутреннего пути свертывания исследовали в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (аЧТВ, НПО «Ренам») [8]. Способность образцов ПИК нейтрализовать активированный фактор X (Ха) в плазме определяли с помощью наборов Реаклот-гепарин (НПО «Ренам») [9]. Для расчета специфических антитромбиновой (анти-фактор IIa, аIIa) и анти-фактор Ха (аХа) активностей использовали калибровочные кривые 5-го Международного стандарта НФГ (нейфракционированный гепарин) и 1-го Международного стандарта НМГ (низкомолекулярный гепарин). Для статистической обработки данных применяли пакет программ «Biostat».

Результаты и их обсуждение. Исследования АА в плазме крови кроликов. ПИК в конечных концентрациях от 12,4 до 62,4 мкг/мл удлиняли время свертывания плазмы крови кроликов в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (аЧТВ) от $14,5 \pm 0,2$ с (контроль) до 41,2–85,0 с. Концентрации ПИК, при которых время свертывания плазмы крови в тесте аЧТВ удлинялось в два раза (2аЧТВ), составили

7,4–41,0 мкг/мл. Индивидуальный сульфат галактоманнана (образец 1) имел для 2аЧТВ концентрацию $9,0 \pm 0,6$ мкг/мл и антитромбиновую (аIIa) активность — 33 ± 5 ЕД/мг. Наименьшие эффективные концентрации ($7,4 \pm 0,5$ и $7,5 \pm 0,3$ мкг/мл) демонстрировали образцы 3 и 4 с соотношениями А:Б1:В = 1:3,3:1,7 и 1:4:2; аIIa-активности для этих образцов были также максимальны и составили $52,8 \pm 3,5$ и 51 ± 4 ЕД/мг. И только образец 2, в котором присутствовали компоненты А и Б1 и отсутствовал компонент В, показал эффективную концентрацию больше в 4,6 раза и аIIa-активность в 2,5 раза меньше, чем образец 1. ПИК в конечных концентрациях от 1,1 до 8,0 мкг/мл удлиняли время свертывания плазмы крови кроликов в тесте PeaKlot (определение ингибиторной активности в отношении фактора свертывания крови Xa по образованию фибринового сгустка плазмы) с $18,6 \pm 0,3$ с (контроль) до 45,7–56,3 с. Конечные концентрации ПИК, при которых время свертывания плазмы в тесте PeaKlot удлинялось в два раза (2PeaKlot), составили 4,1–6,9 мкг/мл. Достоверных различий между концентрациями 2PeaKlot и аХа-активностями образцов 3–6 и 1 не обнаружено. Образец 2 продемонстрировал увеличение концентрации 2PeaKlot в 2 раза и снижение аХа-активности в 3 раза по сравнению с образцом 1.

Исследования АА в плазме крови человека. ПИК в конечных концентрациях от 1,0 до 18,0 мкг/мл удлиняли время свертывания плазмы в тесте аЧТВ с $33,1 \pm 0,5$ с (контроль) до 61,2–79,3 с. Концентрации 2аЧТВ для ПИК составили 3,5–16,5 мкг/мл. Наименьшую концентрацию ($9,7 \pm 0,8$ мкг/мл) демонстрировал образец 11 (компонент Б2 — индивидуальный сульфат галактоманнана с СЗ = 0,60, см. табл.). Добавление компонентов А и В приводило к достоверному росту концентраций 2аЧТВ в 1,7–1,9 раза и снижению аIIa-активности в 2 раза.

В интервале процентной доли компонента Б2 в комплексах от 48–67% антитромбиновая активность не менялась. ПИК в конечных концентрациях от 2,7 до 68,0 мкг/мл удлиняли время свертывания плазмы в тесте PeaKlot с $20,5 \pm 0,3$ сек (контроль) до 48,9–73,1 с. Концентрации 2PeaKlot ПИК составили 18,5–44,0 мкг/мл. Наименьшие эффективные концентрации ($18,5 \pm 0,6$ и $19,0 \pm 1,0$ мкг/мл) демонстрировали образцы 11 и 66. В образце 66 доля Б2 составила 48% (наименьшая среди исследованных).

Эффективные концентрации образцов 33, 44 и 55 превышали исходную в 1,3–2,3 раза. Активности против фактора Xa (аХа) для образцов 11–66 совпали. Таким образом, использование в ионных комплексах сульфата галактоманнана с СЗ = 0,60, в сравнении с сульфатом галактоманнана с СЗ = 1,46, приводит к росту концентраций 2аЧТВ/2PeaKlot и к снижению аIIa/аХа-активностей. Этот результат подтверждается литературными данными о том, что АА полисахаридов возрастает с увеличением степени сульфатирования [10].

ВЫВОДЫ

1. Полисахаридные ионные комплексы, содержащие ГМ – HSO₃⁻ (СЗ = 1,46 и 0,60), галактозилированный хитозан (СЗ = 0,10; СД 0,79) – NH₃⁺ и хитозан-сукцинила – COO⁻ (СЗ = 0,80) в разных весовых пропорциях демонстрируют антикоагулянтную активность *in vitro*.

2. В комплексах ГМ – HSO₃⁻ (СЗ = 1,46) с галактозилированным хитозаном (СЗ = 0,10; СД = 0,79) – NH₃⁺ и хитозан-сукцинилом – COO⁻ (СЗ = 0,80) с увеличением доли первого до 67% антитромбиновая активность (рассчитанная по стандарту гепарина) возрастает в 1,6 раза в сравнении с чистым сульфатом галактоманнана.

3. Добавление к ГМ – HSO₃⁻ (СЗ = 1,46) галактозилированного хитозана (СЗ = 0,10; СД = 0,79) – NH₃⁺ и хитозан-сукцинил – COO⁻ (СЗ = 0,80) не приводит к изменению эффективной концентрации 2PeaKlot с плазмой крови кроликов и аХа-активности (по стандарту гепарина).

4. Отсутствие в сочетании хитозан-сукцинила – COO⁻ (С = 30,80) приводит к росту эффективных концентраций 2аЧТВ/2PeaKlot и снижению аIIa- и аХа-активностей.

5. Снижение степени сульфатирования ГМ – HSO₃⁻ с 1,46 до 0,60 приводит к снижению антикоагулянтной активности галактоманнана и ПИК.

Работа поддержана грантами РФФИ: 05-03-32883-а, 06-04-08140-офи, 07-04-12112-офи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Segal J.B., Streiff M.B., Hofmann L.V., Thornton K., Bass E.B. Management of Venous Thromboembolism: A Systematic Review for a Practice Guideline // Ann Intern Med. 2007. V. 146. N 3. P. 211–222.
2. Imbert A., Lortat-Jacob H., Pezrez S. Structural view of glycosaminoglycan–protein interactions // Carbohydrate Research. 2007. V. 342. № 3–4. P. 430–438.
3. Ильина А.В., Ткачева Ю.В., Варламов В.П. Деполимеризация высокомолекулярного хитозана ферментным препаратом Целловиридин Г20х // Прикл. биохимия микробиол. 2002. Т. 38. № 2. С. 132–135.
4. Ильина А.В., Варламов В.П. Галактозилированные производные низкомолекулярного хитозана: получение, свойства // Прикл. биохимия микробиол. 2007. Т. 43. № 1. С. 82–87.
5. Ильина А.В., Варламов В.П. Ферментативная деполимеризация N-сукцинилхитозана // Биоорганическая химия. 2007. Т. 33. № 1. С. 156–159.
6. Щербухин В.Д., Местечкина Н.М., Смирнова Н.И. и др. Галактоманнана гладичии обыкновенной *Gleditsia triacanthos* L., интродуцированной в России // Прикладная биохимия и микробиология. 1997. Т. 33. № 2. С. 213–216.
7. Местечкина Н.М., Егоров А.В., Щербухин В.Д. Синтез сульфатов галактоманнанов // Прикладная биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 3. С. 324–329.
8. Баракаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза.— М.: «Ньюдиамед», 2001. С. 219.
9. Колмен Р.У. Нарушения реакций образования тромбина.— М.: «Медицина», 1988. С. 239.
10. Noti C., Seeberger P. Chemical Approaches to Define the Structure-Activity Relationship of Heparin-like Glycosaminoglycans // Chemistry & Biology. 2005. V. 12. № 7. P. 731–756.