

# АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

*Н.Н. Дрозд\**, *Г.Е. Банникова\*\**, *В.А. Макаров\**

\*Гематологический научный центр РАМН, Москва, E-mail: [nndrozd@mail.ru](mailto:nndrozd@mail.ru)

\*\*Центр "Биоинженерия" РАН, Москва

## ANTICOAGULANT ACTIVITY OF A SULFATE POLYSACCHARIDES

*N.N. Drozd\**, *G.E. Bannikova\*\**, *V.A. Makarov\**

\*Haematological Research Center RAMS, Moscow, E-mail: [nndrozd@mail.ru](mailto:nndrozd@mail.ru)

\*\*Center "Bioengineering" RAS, Moscow

### ABSTRACT

In the present article the results of the literature review about a chemical structure of the sulfated polysaccharides of animal, vegetable, microbean, fungusan of an origin are stated, and synthetic or semi-synthetic derivatives and their anticoagulant activities are expounded.

Наличие полисахаридов в тканях животных, растений, микроорганизмов, грибов, их низкая токсичность позволяют считать данный класс биополимеров перспективными для разработки лекарственных средств. В организме млекопитающих сульфатированные гетерополисахариды – гликозаминогликаны (ГАГ) являются составной частью промежуточной соединительной ткани, содержатся в субмукозе, хрящах, сухожилиях, сердечных клапанах, коже, межпозвоночных дисках, роговице, базальной мембране, среднем слое кровеносных сосудов; фиксированы на эндотелии и поддерживают его отрицательный заряд, тромборезистентность и устойчивость ко многим повреждающим факторам, в том числе к воздействию протеиназ, экзо- и эндотоксинов, иммунных комплексов и др. ГАГ в составе протеогликанов располагаются на поверхности клеток и играют важную роль в ионном обмене, иммунных реакциях, дифференцировке тканей. Сульфатированные полисахариды (СП) демонстрируют разные виды фармакологической активности, такие, как антикоагулянтная (АК), антитромботическая, противовирусная, антисклеротическая, антипролиферативная, противоязвенная, радиопротекторная и др.

Члены суперсемейства серпинов – ингибиторов сериновых протеиназ играют важную роль в ингибировании сериновых протеиназ свертывающей системы крови, особенно центрального фермента в этой системе, – тромбина. Контролируя процессы тромбообразования. Так антитромбин (АТ) и кофактор гепарина II (ГК) ингибируют прокоагулянтную активность тромбина [1]. Ингибитор протеина С (ИПС) снижает активность комплекса тромбин / тромбомодулин, в котором тромбин играют роль АК. При взаимодействии с ГАГ активность этих серпинов увеличивается в сотни и тысячи раз [2]. Такие ГАГ, как гепарин, сульфат гепарана и сульфат дерматана, значительно ускоряют взаимодействие между серпинами и протеиназой.

Более 50 лет в лечебной практике для профилактики и лечения тромбозов используют гетерополисахарид нефракционированный гепарин (НФГ). АК-действие НФГ достигается в основном через потенцирование активности антитромбина и кофактора гепарина II по отношению к тромбину и фактору Ха [3]. Для активации гепарином конформационных изменений в антитромбине требуется специфическая пентасахаридная последовательность [4]. Кроме этого, НФГ может осуществлять АК-активность, соединяя на своей молекуле (шаблонный механизм) протеиназу (используя экзосайты тромбина) и антитромбин [5]. В ингиби-

ровании же активности фактора Ха прежде всего принимает участие конформационно измененный АГ. В качестве антитромботических средств, кроме нефракционированного гепарина со средней молекулярной массой 15 кД, обладающего приблизительно равными активностями против факторов Па и Ха, в настоящее время используется ряд низкомолекулярных гепаринов со средним распределением молекулярных масс от 4 до 7 кД (Certoparin, Dalteparin, Enoxaparin, Nadroparin, Reviparin, Tinzaparin, используются при тромбозах глубоких вен и легочной эмболии) и отношением  $a\text{Ха}/a\text{Па}$  от 1,5 до 5 [6].

ГК связываясь с ГАГ, специфически ингибирует только тромбин [7]. Однако, кроме физиологических активаторов ГК (гепарин/сульфат гепарана и сульфат дерматана) различные полианионы, включая полифосфаты, полисульфаты и поликарбоксилаты, способны ускорить ГК-ингибирование тромбина [8]. ГАГ связывающий участок ГК идентифицирован [9]. Шаблонный механизм ингибирования участвует в незначительной степени при ускорении гепарином и никакого участия не принимает при ускорении сульфатом дерматана [10]. Основным механизмом ГАГ-ускорения является аллостерический с использованием конформационной активации серпина. Многие годы физиологическим активатором ГК считали экстравазкулярный сульфат дерматана [11]. Maimone и Tollefsen [12] описали структуру гексахарида сульфата дерматана, за счет которого происходит связывание с ГК. Кроме того, протеогликан сульфата дерматана на поверхности культуры фибробластов и клеток гладкой мускулатуры сосудов, очищенный бигликан и протеогликан декорин сульфат дерматан ускоряют ГК-ингибирование тромбина [13]. Протеогликан сульфата дерматана во внеклеточном матриксе и на некоторых клеточных поверхностях могут локализовать ГК в участках, приспособленных к ингибированию тромбина. Введение сульфата дерматана мышам с недостатком ГК увеличивало антитромботический [14]. ГК выполняет главную роль в регулировании тромбина на внесосудистых участках ткани, следующих за повреждением сосуда.

ИПС ингибирует в основном “аргиниспецифичные” сериновые протеиназы, включая трипсин, тромбин (в отсутствие и присутствие тромбомодулина), активированный протеин С, акрозин, калликреин, урокиназу, тканевой активатор пламиногена и фактор Ха. ГАГ-связывающие участки ИПС идентифицированы [15], обе области имеют последовательности основных остатков совместимых с общими гепарин-связывающими последовательностями. В отличие от АГ и ГК, не имеется аллостерического механизма активации. Только образование тройного комплекса с мостом-гепарином, серпином и протеиназой приводит к ускорению ингибирования последней [16]. Гепарин связывается с ИПС и активированным протеином С умеренно в отсутствие ионов кальция [17]. При ингибировании тромбина ИПС происходит незначительное ускорение с участием гепарина. Значительное ускорение наблюдают при ингибировании ИПС тромбина, связанного с тромбомодулином [18]. Это совместимое с ИПС регулирование антикоагулянтного пути протеина С, потому что комплекс тромбина – ТМ начинает этот путь активацией профермента протеина С. Увеличение скорости ингибирования тромбина связанного с ТМ, которое измеряется с ИПС, не включает сульфат хондроитина входящий в ТМ, а скорее домен ТМ похожий на эпидермальный фактор роста. Подобно ГК, ИПС имеет широкую ГАГ/полианион-специфичность ускорения реакций ингибирования протеиназ [16]. Ряд ГАГ и полианионов [(НФГ, НМГ, сульфат гепарана, фукоидан, и другие полианионы (фосвитин)] ускоряют ИПС-ингибирование и тромбина, и активированного протеина С; это происходит за счет неспецифического гепарин-связывающего сайта в ИПС. Какой-либо специфической последовательности для связи с ИПС у гепарин/сульфат гепарана не обнаружено. Содержащие гепаран сульфат протеогликан были вовлечены в связь с ИПС при использовании культуры эпителиальных почечных клеток опухоли человека (TCL-598); кроме того, содержащие дерматан сульфат протеогликан были вовлечены в связь с ИПС во внеклеточном матриксе [19].

Интенсивно используются в разработках по изысканию противотромботических средств и другие представители основных классов гликозаминогликанов (ги-

алуроновые кислоты, хондроитин-4-сульфат — хондроитинсульфат А, хондроитин-6-сульфат — хондроитинсульфат С, хондроитинсульфат В, сульфат дерматана, сульфат гепарана.

В обзоре [20] собрана информация относительно корреляции между структурой и антикоагулянтной, антитромботической и геморрагической активностями гепарина, сульфата гепарана, низкомолекулярных гепаринов и гепариноподобных соединений из различных источников. Гепариноподобные соединения, состоящие исключительно из 2-О-сульфатированных остатков идуроновой кислоты, обладают слабой антикоагулянтной активностью, в то время как содержащие и 2-О-сульфатированные остатки идуроновой кислоты, и саму идуроновую кислоту, а также небольшие количества глюкуроновой кислоты, как в гепарине, или смесь глюкуроновой и идуроновой кислот (гепарины моллюсков) обладают высокими антитромбиновой и анти-Ха активностями. Комбинируя эти элементы можно получить антитромботические вещества со значительной активностью. Гепарин, выделенный из креветок (*shrimp mimics*), фармакологически активнее низкомолекулярных гепаринов. Гепарансульфатные производные из поджелудочной железы быка и сульфатированные фукуаны бурых морских водорослей продемонстрировали антитромботическую активность на моделях артериального и венозного тромбозов у животных. Однако в экспериментах *in vitro*, в чистой системе с сериновыми протеиназами свертывающего каскада крови активность была незначительной. Эти и ряд других результатов свидетельствуют о том, что антитромботическая активность гепарина и других СП обусловлена, по крайней мере частично, их действием на эндотелиальные клетки (стимулируя синтез гепарансульфата). Все антитромботические вещества производные гепарина и другие СП обладают геморрагической активностью. Исключение составляют гепарансульфат из бычьей поджелудочной железы и сульфатированные фукуаны из бурых морских водорослей, у которых отсутствует геморрагическая активность, а антитромботическая активность *in vivo* высока.

Сульфатированные полисахариды, выделяемые из бурых морских водорослей и морских беспозвоночных (морские ежи, морские огурцы, асцидии и др.), называют фукоиданами и фуканами, высокосульфатированные полисахариды их красных морских водорослей — каррагинаны [21–23]. Многие годы фукоиданы использовались как потенциальный источник L-фукозы, хотя их АК-активность была давно известна. Эти полисахариды ингибируют тромбин и фактор Ха в присутствии АТ или ГК. При значительной молекулярной массе (80–100 кДа) удельная антитромбиновая активность достигает у отдельных фукоиданов (как правило, выделенных из морских беспозвоночных) 130 ЕД/мг. Специфическая последовательность фукоиданов для связи с серпинами пока не обнаружена. Полисахариды из бурых водорослей (*Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*) обладают рядом фармакологических активностей: 1) в зависимости от концентрации ингибируют тромбопластин- или кефалин-каолин-индуцированную генерацию тромбина тромбоцитами; 2) в зависимости от концентрации ингибируют тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов; 3) тромбин имеет гипотензивный эффект, который снижается под действием разных концентраций сульфатов фукоиданов; 4) когда аорта стимулируется тромбином, она становится адгезивной для полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ); сульфаты фукоиданов в зависимости от концентрации снижают прилипание ПЯЛ к аорте кроликов; 5) дозозависимо ингибируют тромбин-индуцированный тромбоз [24]. АК активность сульфатированных галактанов достигается главным образом через активацию плазменных ингибиторов протеиназ. Результаты исследования этого механизма показали, что: 1) для взаимодействия сульфатированных галактанов с ингибиторами коагуляции и их мишенями протеиназами необходима определенная плотность заряда полисахарида; 2) структурная основа этих взаимодействий — комплекс, включающий гетерогенные полисахариды, в тоже время зависит от распределения сульфатных групп и от моносахаридного состава; 3) для проявления АК активности сульфатированных галактанов требуется существенно большая длина цепи, чем для гепарина; 4) возможно, для сульфатированного галактана, структура, в целом, а не специ-

фические минорные компоненты, как в гепарине, определяют его взаимодействие с антитромбином; 5) сульфатированные галактаны с молекулярной массой от 15 до 45 кД связываются с антитромбином, но они не способны соединить ингибитор и тромбин. Для осуществления последнего эффекта необходим полисахарид с молекулярной массой выше 45 кД; 6) сульфатированный галактан и гепарин связываются с различными участками антитромбина; 7) сульфатированные галактаны менее эффективны, чем гепарин при ускорении конформационной активации антитромбина. Для сульфатов галактанов преобладает иной механизм, приводящий к антитромбинсвязывающей АК активности, не только связанный с конформационной активацией антитромбина. Возможно, сульфатированный галактан может удерживать вместе более, чем одну молекулу протеиназы и / или плазменного кофактора в нековалентном комплексе, тем самым удерживая протеиназу в неактивной форме. Конформационная активация антитромбина и последующее образование ковалентного комплекса с тромбином, по-видимому, менее важны для проявления АК-активности сульфатированного галактана, чем для гепарина. Механизм гепарин-антитромбинового взаимодействия не может быть распространен на другие сульфатированные полисахариды. Каждый тип полисахарида может образовывать особенный комплекс с плазменными ингибиторами протеиназ [25].

Кроме природных сульфатированных полисахаридов многие доступные природные полимеры, такие как хитозан, декстран, сульфатируют для придания им гепариноподобных свойств. Так, Huang R. и соавторы отметили увеличение времени свертывания плазмы крови в тестах активированного частичного тромбопластинового времени, тромбинового времени, протромбинового времени под влиянием сульфата хитозана [26]. В работе [27] сульфаты хитозана со степенью замещения 2,13 и молекулярными массами 71; 35 и 19 кД показали высокую АК-активность с тем же механизмом действия, что и стандартный гепарин. При исследовании АК-активности *in vitro* и *in vivo* образцов сульфатированного хитозана с молекулярной массой 61–82 кД, степенью сульфатирования 1,58–1,86 антитромбиновая активность составила 30–52 ЕД/мг, активности против активированного фактора Ха не наблюдали [28]. Сульфатированные хитозаны ускоряли ингибирование тромбина, создавая эквивалентный комплекс с антитромбином, при концентрации антикоагулянта в плазме > 1 аПа ЕД/мл происходила активация кофактора II гепарина [29]. При совместном внутривенном введении в равных весовых соотношениях нефракционированного гепарина и сульфата хитозана отмечалось потенцирование антитромботической активности гепарина [30].

В заключение следует отметить, что все сульфатированные природные или полусинтетические полисахариды животного, растительного или микробного происхождения в той или иной степени обладают антикоагулянтной, антитромботической активностями. Демонстрируют свою фармакологическую активность сульфополисахариды, как правило, либо катализируя плазменные ингибиторы сериновых протеиназ свертывающей системы крови – антитромбин, кофактор гепарина II, ингибитор протеина С, при этом скорость инактивации некоторых факторов коагуляции увеличивается в сотни и тысячи раз; либо, ингибируя генерацию сериновых протеиназ – факторов IIa, Ха, XIa; либо, способствуя выбросу в кровотока ингибитора пути тканевого фактора или сульфата гепарана из эндотелиальных клеток сосудистой стенки. В некоторых случаях полусинтетические сульфатированные полисахариды напрямую ингибируют активность тромбина, без вовлечения антитромбина. Значимого прямого ингибирования полисахаридами фактора Ха не отмечено.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Beguin, Y., Lindhout, T., and Hemker, H. C. 1988. Thromb. Haemostasis 60, 457–462.
2. Pike R.N., Buckle A.M., Bonnicie B.F., Church F.C. FEBS Journal, 2005, 272 (19), 48–42.
3. Silverman GA, Bird PI, Carrell RW et al. 2001. J Biol Chem 276, 33293–33296.
4. Desai U.R., Petitou M., Bjork I. & Olson S.T. 1998. J Biol Chem 273, 7478–7487.
5. Izaguirre G., Zhang W., Swanson R., Bedsted T. & Olson S.T. 2003. Biol Chem 278, 51433–51440.
6. R.G. Holzheimer, Eur J Med Res., 2004, 9(4), 225–239.

7. *Parker K.A. & Tollefsen D.M.* 1985. *J Biol Chem* 260, 3501–3505.
8. *Tollefsen D.M.* 1997. Heparin cofactor II. *Adv Exp Med Biol* 425, 3544.
9. *Baglin T.P., Carrell R.W., Church F.C., Esmon C.T. & Huntington J.A.* 2002. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 11079–11084.
10. *Fortenberry YM, Whinna HC, Gentry HR et al,* 2004. *J Biol Chem* 279, 43237–43244.
11. *Shirk RA, Parthasarathy N, San Antonio JD et al,* 2000. *J Biol Chem* 275, 18085–18092.
12. *Maimone MM & Tollefsen DM,* 1990. *J Biol Chem* 265, 18263–18271.
13. *Whinna HC, Choi HU, Rosenberg LC & Church FC,* 1993. *J Biol Chem* 268, 3920–3924.
14. *Vicente CP, He L, Pavao MS & Tollefsen DM,* 2004. *Blood* 104, 3965–3970.
15. *Neese LL, Wolfe CA & Church FC,* 1998. *Arch Biochem Biophys* 355, 101–108.
16. *Pratt CW & Church FC,* 1992. *J Biol Chem* 267, 8789–8794.
17. *Rezaie AR,* 2003. *Trends Cardiovasc Med* 13, 815–820.
18. *Yang L, Manithody C, Walston TD, Cooper ST & Rezaie AR,* 2003. *J Biol Chem* 278, 37465–37470.
19. *Prigtinger U, Geiger M, Bielek E, Vanyek E & Binder BR,* 1994. *J Biol Chem* 269, 14705–14710.
20. *H.B. Nader, C.C. Lopes, H.A. Rocha, E.A. Santos,* *Curr. Pharm. Des.*, 2004, 10(9), 951–966.
21. *O. Berteau, B. Mulloy,* *Glycobiology*, 13(6), 29R–40R (2003).
22. *Melo FR, Pereira MS, Foguel D, Mourao PAS,* *J. Biol. Chem.*, 2004, 279(20), 20824–20835
23. *Mulloy B, Mourao PAS, Gray E,* *J. Biotechnology*, 2000, 77, 123–135
24. *Trento F, Catianeo F, Pescador R et al,* *Thromb. Res.*, 102(5), 457–465 (2001).
25. *Melo FR, M.S. Pereira, D. Foguel, P.A. Mourao,* *J. Biol. Chem.*, 279(20), 20824–20835 (2004).
26. *Huang R, Du Y, Yang J, Fan L,* *Carbohydr Res.*, 338(6), 483–489 (2003).
27. *Vongchan P, Sajomsang W, Subyen D, Kongtawelert P,* *Carbohydr. Res.*, 337(13), 1233–1236 (2002).
28. *Drozd N.N., Sher A.I., Makarov V.A. et al,* *Tromb. Res.*, 102(5), 445–455 (2001).
29. *Дрозд Н.Н., Башков Г.В., Макаров В.А. и др.* *Вопр. Мед. Хим.*, 38(5), 12–14 (1992).
30. *Дрозд Н.Н., Макаров В.А., Башков Г.В. и др.* *Эксп. и клин. фармакол*, 59(1), 30–33 (1996).