

УДК 547.458;612.115;616.002

©Коллектив авторов

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОИДАНОВ ИЗ БУРЫХ ВОДОРΟΣЛЕЙ

*Н.А. Ушакова¹, Г.Е. Морозевич¹, Н.Е. Устюжанина², М.И. Билан², А.И. Усов²,
Н.Э. Нифантьев², М.Е. Преображенская^{1*}*

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва,
Погодинская ул., 10; тел.: (499)246-50-72; факс (499)245-08-57;
эл. почта: marina.preobrajenskaya@ibmc.msk.ru

²Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Москва.

Изучена антикоагулянтная активность полисахаридов фукоиданов, выделенных из 11 видов бурых водорослей. Антикоагулянтную активность определяли как влияние на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое и тромбиновое время. По всем трём тестам исследованные препараты фукоиданов существенно различались между собой. Так, фукоиданы из водорослей *Laminaria saccharina* и *Fucus distichus* обладали высокой антикоагулянтной активностью, тогда как фукоиданы из *Cladosiphon okamuranus* и *Analipus japonicus* были практически неактивны. Остальные фукоиданы обладали промежуточной степенью активности. Изучено влияние фукоиданов на активность тромбина и фактора Ха в присутствии и в отсутствие природного ингибитора тромбина – антитромбина III (АТ III). Большая часть фукоиданов ингибировала тромбин в отсутствие АТ III, что отличало их от наиболее изученного антикоагулянта – гепарина. В присутствии АТ III ингибиторная активность фукоиданов по отношению к тромбину значительно возрастала. В отличие от гепарина фукоиданы слабо влияли на активность фактора Ха в присутствии АТ III и не проявляли ингибиторного действия в отсутствие АТ III. Сопоставление антикоагулянтной активности изученной серии фукоиданов с обнаруженным нами ранее противовоспалительным действием этих препаратов не выявило корреляции между двумя типами их биологической активности. Можно предполагать, что эти два типа активности определяются различными структурными особенностями фукоиданов. Представленные данные указывают на возможность получения фукоиданов с высокой противовоспалительной активностью, но при этом проявляющих слабое антикоагулянтное действие. Антикоагулянтная активность исследуемых фукоиданов прямо не зависела от содержания в них фукозы, других нейтральных сахаров и сульфатов, а также от структуры основной цепи молекулы.

Ключевые слова: фукоидан, гепарин, свертывание крови, тромбин, фактор Ха, антитромбин III.

ВВЕДЕНИЕ. Фукоиданы из бурых морских водорослей представляют собой сложные разветвленные полисахариды, молекулы которых построены в основном из сульфатированных остатков L-фукозы, но могут содержать в качестве минорных компонентов ряд других сахаров, а также некоторое количество О-ацетильных групп. Многочисленные исследования показали, что фукоиданы обладают широким спектром биологической активности. Так, фукоиданы проявляют антиадгезивное, противоопухолевое и антивирусное действие, влияют на ангиогенез и взаимодействуют с рядом факторов, стимулирующих пролиферацию фибробластов, являются ингибиторами альтернативного и

* - адресат для переписки

классического путей активации комплемента [1-4]. Фукоиданы являются одними из наиболее мощных ингибиторов Р- и L-селектин-лигандного взаимодействия [2, 5, 6]. Этот процесс лежит в основе механизма блокирования фукоиданами селектин-зависимого межклеточного взаимодействия, что, возможно, обуславливает некоторые стороны их биологического действия. На ряде экспериментальных моделей показано, что фукоиданы обладают противовоспалительным действием. Так, введение фукоидана в область миокарда подавляет инфильтрацию нейтрофилов в участок поражения при ишемии-реперфузии [7] и снижает экстравазацию лейкоцитов в цереброспинальную жидкость при менингите [8]. На модели Р-селектин-зависимого острого перитонита у крыс нами была исследована противовоспалительная активность серии нативных фукоиданов из разных видов бурых водорослей [5, 9, 10]. Обнаружено, что все изученные нативные фукоиданы обладают противовоспалительным действием в разной степени, ингибируя экстравазацию нейтрофилов в область воспаления. Степень противовоспалительного действия фукоиданов зависела от дозы вводимого препарата. Так например, фукоидан из *Laminaria saccharina* в дозе 4 мг на кг веса крыс практически полностью подавлял выход нейтрофилов в область воспаления. Одним из наиболее изученных биологических свойств фукоиданов является их антикоагулянтная активность [1, 3]. Показано, что некоторые фукоиданы ингибируют ключевые ферменты процесса свертывания крови – тромбин и фактор Ха, образуя комплексы с природными ингибиторами этих протеиназ АТ III и гепариновым кофактором II [1, 11, 12], тогда как другие прямо ингибируют тромбин, независимо от АТ III [13]. Поскольку тромбин является не только ферментом, ответственным за тромбообразование в очаге воспаления, но и стимулирует адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам через Р-селектин [14], представляло интерес исследовать влияние серии фукоиданов, обладающих противовоспалительным действием, на процесс свертывания крови в целом, а также на ключевые ферменты этого процесса – тромбин и фактор Ха. Предварительное определение антикоагулянтной активности фукоиданов этой серии показало, что большая часть изученных препаратов обладает противосвертывающим действием, причем величина активности отдельных препаратов значительно различается [10].

В настоящей работе проводилось изучение антикоагулянтной активности 11 препаратов фукоиданов, выделенных из разных видов бурых водорослей. Все препараты, по нашим данным, обладали противовоспалительным действием. Исследовано влияние фукоиданов этой серии на так называемые “внутренний” и “внешний” пути процесса свертывания крови, а также на активность тромбина и фактора Ха в присутствии и в отсутствие АТ III. Изучение антикоагулянтной активности фукоиданов проводилось в сравнении с активностью природного ингибитора тромбина – гепарина. Известно, что широко используемый в качестве антикоагулянта полисахарид гепарин имеет ряд существенных недостатков. Так, при клиническом применении гепарина наблюдаются побочные эффекты, такие как развитие тромбоцитопении [15] и геморрагии [16]. Кроме того, гепарин препаративно выделяется из тканей животных, где он содержится в очень малых количествах, причем получаемые препараты могут быть загрязнены вирусами и токсичными белками [3]. Это стимулирует поиски растительных сульфатированных полисахаридов со сходным биологическим действием. Такими полисахаридами являются фукоиданы – одни из наиболее распространенных в природе сульфатированных полисахаридов.

МЕТОДИКА. *Характеристика фукоиданов.* Методы выделения и очистки изучаемых фукоиданов, а также определение их состава и особенностей строения отдельных препаратов описаны ранее [10, 17-22]. Образец фукоидана из водоросли *Cladosiphon okamuranus* был любезно предоставлен нам Dr. M. Iho (South Product Co. Suzuki, Japan) и не подвергался химической модификации и фракционированию. Расчет состава исследованных фукоиданов выражали в % от навески.

Определение антикоагулянтной активности фукоиданов. Антикоагулянтное действие фукоиданов определяли по трем тестам: увеличению АЧТВ, протромбинового времени и тромбинового времени. В работе использовали наборы реагентов для исследования гемостаза НПО “Ренам” (Россия).

Для определения величины АЧТВ к 80 мкл контрольной плазмы крови человека с нормальным уровнем системы гемостаза добавляли 20 мкл водного раствора фукоидана (от 0,3 до 20 мкг), и смесь прогревали 1 мин при 37°C. Далее вносили 100 мкл смеси фосфолипидов сои и активатора – эллаговой кислоты, инкубировали 2 мин при 37°C и, после добавления 100 мкл 0,025 М CaCl₂, прогретого при 37°C, фиксировали время образования сгустка. Величину АЧТВ выражали в единицах гепарина на мг фукоидана, используя в качестве стандарта гепарин с активностью 140 международных единиц/мг (“Fluka”, Швейцария).

Протромбиновое время определяли в присутствии 10 мкг фукоидана в пробе. К 100 мкл контрольной плазмы добавляли 20 мкл водного раствора фукоидана, смесь инкубировали 1 мин при 37°C. После добавления тромбопластин-кальциевой смеси, прогретой 30 мин при 37°C, фиксировали время образования сгустка.

Тромбиновое время определяли в присутствии 2-20 мкг фукоидана в пробе в зависимости от активности полисахарида. К 100 мкл контрольной плазмы добавляли 20 мкл водного раствора фукоидана, смесь инкубировали 2 мин при 37°C. После добавления 100 мкл раствора тромбина фиксировали время образования сгустка.

Определение влияния фукоиданов на активность тромбина и фактора Ха в присутствии и в отсутствие АТ III. Использовали наборы реагентов “РеаХром АТ III тест” и “РеаХром-Гепарин” НПО “Ренам” (Россия).

К 20 мкл буферного раствора (0,15 мМ трис-HCl буфер, pH 8,4), содержащего разное количество фукоидана, добавляли 50 мкл буфера или 50 мкл раствора АТ III (активность 0,2 ед./мл). Реакцию инициировали добавлением 50 мкл водного раствора тромбина человека (активность 4 ед./мл). После 3 мин инкубации смеси при 37°C добавляли 50 мкл синтетического хромогенного субстрата и через 2 мин реакцию останавливали, добавляя 220 мкл 50% уксусной кислоты. Оптическую плотность свободного *пара*-нитроанилина определяли на спектрофотометре Ultrospec II, (“LKB”, Швейцария) при длине волны 405 нм. За короткое время инкубации, используемое для измерения активности тромбина, не наблюдали заметного ингибирования тромбина АТ III в отсутствие полисахарида.

Определение активности фактора Ха проводили, как описано выше для определения ингибирования тромбина АТ III, за исключением того, что концентрация АТ III составляла 0,5 ед./мл, а вместо тромбина в инкубационную смесь добавляли 50 мкл водного раствора фактора Ха (активность 2 ед./мл). Высокие концентрации фукоиданов в пробах при определении активности фактора Ха не позволяли измерять оптическую плотность в присутствии 50%-ной уксусной кислоты из-за помутнения раствора. Поэтому по окончании реакции к пробам приливали 220 мкл буфера, и оптическую плотность свободного *пара*-нитроанилина немедленно измеряли при 405 нм.

Достоверность разницы определяли с использованием критерия t Стьюдента, различие считали статистически достоверным при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Сравнительное исследование антикоагулянтной активности было выполнено на серии из 11 фукоиданов, выделенных из разных видов бурых водорослей. Состав изученных фукоиданов приведен в таблице 1. Содержание сульфатных групп в полисахаридах варьировало от 15% (фукоидан из *Cladosiphon okamuranus*) до 36% (фукоидан из *Fucus evanescens*). Кроме фукозы фукоиданы содержали уроновые кислоты (в основном не более 10%) и минорные количества других нейтральных сахаров – глюкозы, галактозы, маннозы и ксилозы [10]. По структуре главной цепи изучаемые фукоиданы разделялись на две группы. Первая группа, в которую входили фукоиданы из *Laminaria saccharina* [17], *Laminaria digitata*, *Analipus japonicus* [22], *Cladosiphon okamuranus* [23] и *Chorda filum* [18], представлена

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОИДАНОВ

полимерами, молекулы которых содержат главные цепи, построенные из (1-3)-связанных α -L-фукопиранозных остатков. В качестве боковых ответвлений к этим цепям могут присоединяться единичные остатки α -L-фукопиранозы или α -D-глюкуроновой кислоты. Вторая группа, к которой относились фукоиданы, выделенные из *Ascophyllum nodosum* и представителей рода *Fucus*, представляла собой полимеры, главные цепи которых построены из чередующихся (1-3)- и (1-4)-связанных остатков α -L-фукопиранозы. Примером такого полисахарида может служить фукоидан из *Fucus distichus* [20], молекула которого построена из чередующихся 3-связанных остатков 2,4-дисульфата фукозы и 4-связанных остатков 2-сульфата фукозы. Все препараты были неоднородны по молекулярной массе и содержали главным образом молекулы с массой от 200 до 500 кДа [10].

Таблица 1. Состав исследованных фукоиданов.

№	Источник выделения фукоидана	Фукоза	Ксилоза	Манноза	Глюкоза	Галактоза	Уровеньные кислоты	Сульфат
1	<i>Laminaria saccharina</i>	36,7	1,2	1,0	2,2	4,6	4,8	29,6
2	<i>Laminaria digitata</i>	30,1	1,9	1,7	1,4	6,3	7,0	27,5
3	<i>Fucus distichus</i>	40,8	0,8	-	-	0,8	<1	34,8
4	<i>Fucus serratus</i>	24,8	2,4	2,1	2,0	4,8	8,2	29,2
5	<i>Fucus evanescens</i>	58,7	1,6	-	-	1,6	<1	36,3
6	<i>Fucus spiralis</i>	33,0	2,8	1,4	1,2	3,0	8,2	25,9
7	<i>Ascophyllum nodosum</i>	26,6	4,4	2,6	1,1	4,7	9,4	24,4
8	<i>Fucus vesiculosus</i>	26,1	2,4	3,1	2,2	5,0	10,3	23,6
9	<i>Chorda filum</i>	64,0	0,6	0,5	0,5	1,3	-	26,5
10	<i>Analipus japonicus</i>	44,1	2,2	-	-	5,8	5,9	22,9
11	<i>Cladosiphon okamuranus</i>	30,9	0,7	-	2,2	-	23,4	15,1

Примечание: результаты выражены в % от навески.

Ингибирующее действие фукоиданов на активность факторов свертывания крови определяли с помощью нескольких тестов. Влияние на протеиназы “внутреннего пути” процесса свертывания определяли как увеличение АЧТВ и выражали в единицах гепарина на мг препарата. Из 11 изученных препаратов фукоиданов 8 обладали статистически достоверным антикоагулянтным действием (табл. 2). Наблюдали существенные различия в ингибиторной активности отдельных препаратов. Наиболее активными (20-30 ед./мг) были фукоиданы из водорослей *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata* и *Fucus distichus*. Пять фукоиданов обладали примерно вдвое меньшей ингибиторной активностью (12-15 ед./мг) и три (из водорослей *Cladosiphon okamuranus*, *Chorda filum* и *Analipus japonicus*) практически не обладали антикоагулянтным действием (0,5-1,5 ед./мг). Фукоиданы, увеличивающие величину АЧТВ, удлинляли также протромбиновое и тромбиновое время, причем препараты, более активные по

тесту АЧТВ, были также более активны и по двум последним тестам, но для выявления их ингибирующего действия требовались более высокие концентрации препаратов. Фукоиданы, не оказывающие влияния на величину АЧТВ, не влияли и на величины тромбинового и протромбинового времени. Приведенные данные показали, что нативные фукоиданы из бурых водорослей существенно различаются между собой по антикоагулянтной активности по всем трём используемым тестам. Среди них встречаются как высокоактивные препараты, например фукоидан из *Laminaria saccharina*, так и практически неактивные, как фукоидан из *Cladosiphon okamuranus*.

Таблица 2. Влияние фукоиданов на активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое и тромбиновое время.

	Источник выделения фукоидана	АЧТВ (единиц/мг)	Протромбиновое время (сек)	Тромбиновое время (сек)
1	<i>Laminaria saccharina</i>	33,0±2,0	40,8±0,8	72,8±2,1
2	<i>Laminaria digitata</i>	24,2±1,2	33,2±1,1	36,0±1,0
3	<i>Fucus distichus</i>	26,9±1,7	33,0±0,6	29,0±1,0
4	<i>Fucus serratus</i>	19,1±1,6	22,2±1,0	24,5±0,5
5	<i>Fucus evanescens</i>	15,1±0,9	29,6±0,2	26,8±0,8
6	<i>Fucus spiralis</i>	13,6±1,4	21,8±1,0	20,5±0,5
7	<i>Ascophyllum nodosum</i>	13,4±1,1	21,5±0,6	18,2±0,8
8	<i>Fucus vesiculosus</i>	9,4±1,2	21,7±0,3	22,0±0,6
9	<i>Chorda filum</i>	1,4±0,2	16,0±0	13,8±0,2
10	<i>Anelipes japonicus</i>	1,3±0,2	16,5±0,5	13,7±1,2
11	<i>Cladosiphon okamuranus</i>	0,5±0,1	15,8±0,8	11,8±0,2
	Контрольная плазма		16,0±0	11,8±0,3

Примечание: АЧТВ выражали в единицах гепарина на мг фукоидана. Использовали стандарт гепарина с активностью 140 ед/мг (Fluka). Протромбиновое время определяли в присутствии 10 мкг фукоидана в пробе. Тромбиновое время для фукоиданов №№ 1-8 определяли в присутствии 2 мкг фукоидана в пробе; №№ 9-11 - в присутствии 20 мкг фукоидана в пробе. Представлены средние значения ± ошибка средней (SEM) для серии из 4-6 определений. Значения для №№ 1-8 статистически достоверны по отношению к контролю для всех трех методов ($p < 0,05$). Значения для №№ 9-11 статистически недостоверны по отношению к контролю для всех трех методов ($p > 0,05$).

Для более подробного изучения механизма антикоагулянтного действия фукоиданов рассматривали влияние некоторых из них на активность ключевых ферментов процесса свертывания крови – тромбина и фактора Ха. Определение проводилось как в присутствии, так и в отсутствие природного ингибитора тромбина АТ III (рис., табл. 3). Большая часть изученных фукоиданов, в отличие от гепарина, прямо ингибировала тромбин без добавления АТ III. В присутствии АТ III степень ингибирования тромбина значительно увеличивалась - от 5 до 14 раз в зависимости от источника выделения фукоидана. Для наиболее активного фукоидана из *Laminaria saccharina* величина, необходимая для 50%-ного ингибирования тромбина без АТ III, составляла 8,3 мкг/мл и снижалась до 0,6 мкг/мл в присутствии АТ III. Для фукоидана из *Cladosiphon okamuranus*, имеющего очень слабую антикоагулянтную активность по тесту АЧТВ, не удалось достигнуть 50%-ного ингибирования даже при дозе 1200 мкг/мл. Полученные результаты показали, что нативные фукоиданы из бурых водорослей, с одной

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОИДАНОВ

стороны, подобно гепарину, взаимодействуют с АТ III и способствуют активации тромбина с образованием комплекса с тромбином и АТ III, с другой стороны, в отличие от гепарина, обладают способностью прямо ингибировать тромбин. Способность нативных фукоиданов из бурых водорослей прямо ингибировать тромбин также отличала их от фукоиданов, выделенных из беспозвоночных. Последние требовали для ингибирования тромбина обязательного присутствия АТ III или гепаринового кофактора II [1].

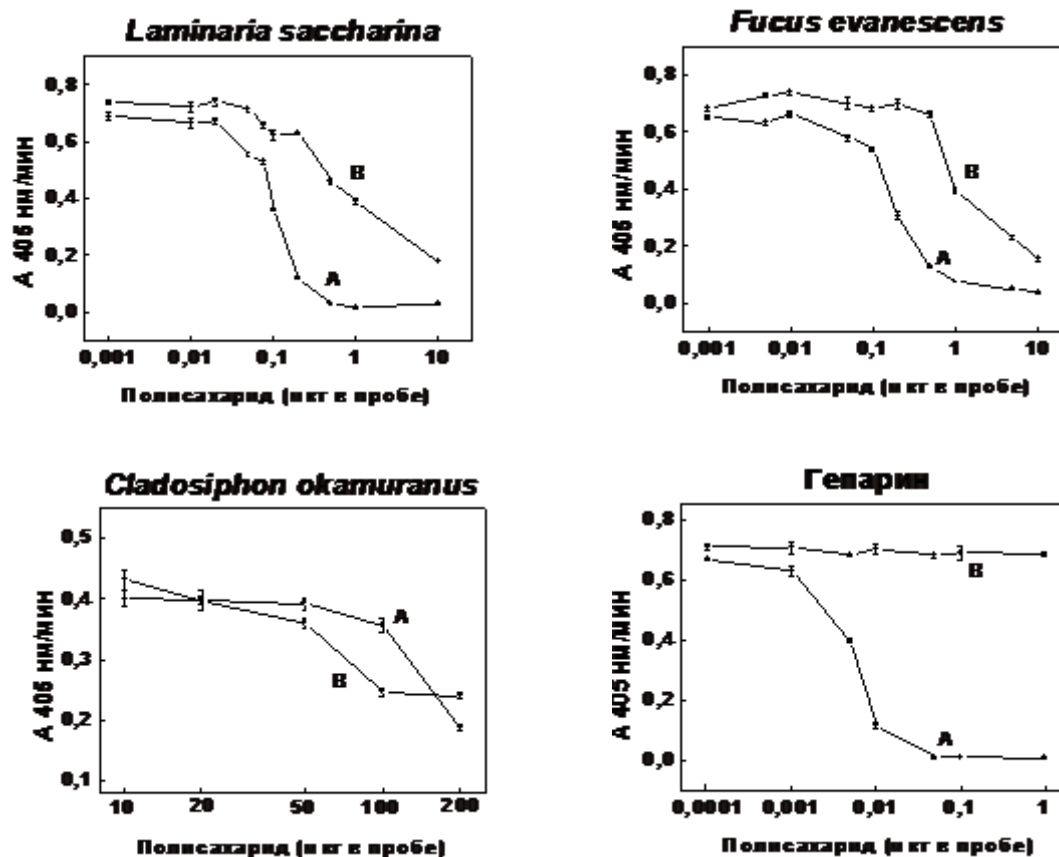


Рисунок.

Ингибирующее действие фукоиданов и гепарина на активность тромбина в присутствии и в отсутствие антитромбина III.

По оси абсцисс - концентрация полисахарида в пробе (мкг). По оси ординат - активность тромбина (А 405 нм/мин). Условные обозначения: А - активность тромбина в присутствии АТ III; В - в отсутствие АТ III.

Представлены средние значения \pm ошибка средней (SEM) для серии из 3 опытов.

Все исследованные фукоиданы, в отличие от гепарина, очень слабо ингибировали фактор Ха в присутствии АТ III (табл. 3). Лишь для одного из исследованных фукоиданов из *Laminaria saccharina* удалось установить величину 50%-ного ингибирования. Ни один из исследованных фукоиданов не ингибировал фактор Ха в отсутствие АТ III.

Таблица 3. Влияние фукоиданов на активность тромбина и фактора Ха в присутствии и в отсутствие антитромбина III.

Полисахарид	IC ₅₀ , мкг/мл			
	Тромбин		Фактор Ха	
	+ АТ III	без АТ III	+ АТ III	без АТ III
Фукоиданы:				
<i>Laminaria saccharina</i>	0,6±0,01	8,3±0,8	45,6±5,3	н.и.
<i>Fucus evanescens</i>	1,1±0,03	9,4±0,8	>1200	н.и.
<i>Laminaria digitata</i>	1,8±0,07	21,2±1,6	>1200	н.и.
<i>Fucus distichus</i>	3,6±0,3	17,4±1,1	>1200	н.и.
<i>Ascophyllum nodosum</i>	5,9±0,4	30,6±3,2	н.д.	н.д.
<i>Fucus vesiculosus</i>	35,8±2,8	55,8±5,3	н.д.	н.д.
<i>Chorda filum</i>	44,1±7,1	276±53	н.и.	н.и.
<i>Cladosiphon okamuranus</i>	1060±29	>1200	н.и.	н.и.
Гепарин	0,036±0,001	н.и.	0,035±0,001	н.и.

Примечание: представлены средние значения ± ошибка средней (SEM) для серии из 3 определений. Различия между величинами IC₅₀ в присутствии и в отсутствие АТ III статистически достоверны (p<0,05). н.и. - не ингибирует; н.д. - нет данных.

Сопоставление антикоагулянтной активности фукоиданов и изученного ранее [10] противовоспалительного действия тех же фукоиданов не обнаружило корреляции между этими двумя типами биологического действия. Одни из них, в частности, фукоиданы из водорослей *Laminaria saccharina* и *Laminaria digitata*, обладали значительной антикоагулянтной активностью и ингибировали тромбин как в присутствии, так и в отсутствие АТ III. Эти два фукоидана проявляли наиболее выраженное противовоспалительное действие в ряду изученных фукоиданов (в опытах на крысах в дозе 4 мг на кг веса они ингибировали выход нейтрофилов в область воспаления соответственно на 94,1 и 91,0%). Другие фукоиданы, в том числе фукоиданы из *Cladosiphon okamuranus* и *Chorda filum*, практически не обладали антикоагулянтной активностью и не ингибировали тромбин, но также оказывали значительное противовоспалительное действие (ингибировали выход нейтрофилов на 88,6 и 78,9% в той же дозе). Таким образом, изученные фукоиданы, проявляющие примерно одинаковое противовоспалительное действие, сильно отличались по величинам их антикоагулянтной активности. Среди них обнаружены как высокоактивные антикоагулянты, прямо связывающие тромбин, так и фукоиданы, практически не проявляющие антикоагулянтного действия. Это позволяет предполагать, что проявление противовоспалительного действия фукоиданов прямо не зависит от их антикоагулянтной активности, а также от ингибирования тромбина, и в большей степени определяется воздействием на другие процессы, в частности, на блокирование селектин-лигандного взаимодействия.

Обнаружение фукоиданов, не имеющих антикоагулянтной активности или имеющих низкую активность, но тормозящих развитие воспаления, таких как фукоиданы из водорослей *Cladosiphon okamuranus* и *Anelipus japonicus*, представляет особый интерес. В настоящее время появились работы, посвященные поиску полисахаридов, в том числе производных гепарина, не обладающих антикоагулянтной активностью, но проявляющих различного рода биологические свойства. Показано, что химически модифицированные гепарины, лишенные противосвертывающей активности, сохраняют способность

взаимодействовать с селектинами и ингибировать воспаление [24, 25], а также предотвращать Р-селектин-опосредованную адгезию раковых клеток к тромбоцитам [26]. Предполагается, что указанные производные гепарина могут быть использованы в терапевтических целях как противовоспалительные и антиметастатические средства. Поскольку среди фукоиданов имеются как препараты, обладающие антикоагулянтной активностью и ингибирующие тромбин, так и не обладающие такой активностью, но блокирующие воспаление, их изучение представляется перспективным с точки зрения получения потенциальных противовоспалительных средств.

Различия в антикоагулянтной активности между фукоиданами из разных источников обусловлены, по-видимому, особенностями их структуры. В связи с тем, что нативные фукоиданы гетерогенны, и их структура очень сложна, нам пока не удалось установить связи между активностью и особенностями строения отдельных фукоиданов. Антикоагулянтная активность изученных фукоиданов не зависела от содержания в них фукозы и других нейтральных сахаров, а также от строения главной цепи молекулы фукоиданов. Об этом говорит тот факт, что два наиболее активных фукоидана (*Laminaria saccharina* и *Fucus distichus*) имели главные цепи разного строения – первый из них содержал главные цепи, построенные только из (1-3)-связанных α -L-фукопиранозных остатков, второй содержал главные цепи, построенные из чередующихся (1-3)- и (1-4)-связанных остатков α -L-фукопиранозы. С другой стороны, неактивный фукоидан из *Cladosiphon okamuranus* имел главную цепь, аналогичную фукоидану из *Laminaria saccharina*. Есть данные, указывающие, что противосвертывающая активность фукоиданов зависит от степени сульфатирования молекулы [27]. Однако при сравнении фукоиданов исследуемой группы, выраженной зависимости антикоагулянтной активности от содержания в них сульфатов не обнаружено. Например, фукоиданы из *Laminaria saccharina* и *Fucus serratus* значительно отличались по антикоагулянтной активности (табл. 2), но содержали одинаковое количество сульфатных групп (около 29%; табл. 1). Несколько более низкое содержание сульфата обнаружено в фукоидане из *Cladosiphon okamuranus* (около 15%), что может являться одной из причин слабой антикоагулянтной активности этого фукоидана. Можно думать, что активность фукоиданов определяется не только плотностью заряда, но и более тонкими структурными особенностями их молекул, в частности, распределением сульфатных групп, а также общей конфигурацией молекулы. Исследование структурных особенностей фукоиданов, определяющих их биологическое действие, является предметом наших дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Исследовали антикоагулянтное действие фукоиданов из 11 видов бурых водорослей. Сравнение антикоагулянтной активности отдельных препаратов проводили по 3 тестам: влиянию на АЧТВ, протромбиновое и тромбиновое время. Установлено, что по всем тестам ингибиторная активность препаратов фукоиданов из разных видов водорослей значительно различалась. Некоторые из них, такие как фукоидан из *Laminaria saccharina*, обладали высокой антикоагулянтной активностью, тогда как другие, в частности фукоидан из *Cladosiphon okamuranus*, практически не обладали антикоагулянтным действием. Изучение влияния фукоиданов на активность тромбина показало, что большая часть исследованных препаратов прямо ингибировали тромбин в отсутствие природного ингибитора тромбина – АТ III, что отличало их от наиболее изученного антикоагулянта – гепарина. Степень ингибирования зависела от дозы препарата (IC_{50} варьировала от 8,3 до 276 мкг/мл). В присутствии АТ III ингибиторная активность фукоиданов по отношению к тромбину значительно возрастала, для фукоидана из *Laminaria saccharina* более, чем в 10 раз. При изучении влияния фукоиданов на фактор Ха обнаружено, что, в отличие от гепарина, фукоиданы очень слабо влияли на активность фактора Ха в присутствии АТ III, тогда как в отсутствие АТ III ингибирующее действие вообще

не наблюдалось. Антикоагулянтная активность исследуемых фукоиданов прямо не зависела от содержания в них фукозы, других нейтральных сахаров и сульфатов, а также от структуры основной цепи молекулы. Сопоставление антикоагулянтной активности изученной серии фукоиданов и обнаруженного нами ранее противовоспалительного действия этих препаратов не выявило корреляции между двумя сторонами их биологического действия. Это позволяет предполагать, что противовоспалительное действие фукоиданов осуществляется через механизмы, прямо не связанные с их антикоагулянтным действием. Полученные результаты указывают на целесообразность исследования фукоиданов как потенциальных противовоспалительных и противосвертывающих средств.

Настоящая работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 04-04-49464, 06-04-08140, 06-03-33080 и 08-04-00812).

ЛИТЕРАТУРА

1. *Pereira M.S., Mulloy B., Mourao P.A.S.* (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 7656-7667.
2. *Berteau O., Mulloy B.* (2003) *Glycobiology*, **13**, 29R-40R.
3. *Mourao P.A.S.* (2004) *Curr. Pharm. Des.*, **10**, 967-981.
4. *Кузнецова Т.А., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н., Беседнова Н.Н.* (2004) *Антибиот. химиотер.*, **49** (5), 24-30.
5. *Семенов А.В., Мазуров А.В., Преображенская М.Е., Ушакова Н.А., Михайлов В.И., Берман А.Е., Усов А.И., Нифантьев Н.Э., Бовин Н.В.* (1998) *Вопр. мед. химии*, **44**(2), 135-144.
6. *Ушакова Н.А., Преображенская М.Е., Берд М.И., Прист Р., Семенов А.В., Мазуров А.В., Нифантьев Н.Э., Почечуева Т.В., Галанина О.Е., Бовин Н.В.* (2005) *Биохимия*, **70**, 523-532.
7. *Omata M., Matsui N., Inomata N., Ohno T.* (1997) *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **30**, 714-724.
8. *Granert C., Raud J., Waage A., Lindquist L.* (1999) *Infect. Immun.*, **67**, 2071-2074.
9. *Preobrazhenskaya M.E., Berman A.E., Mikhailov V.I., Ushakova N.A., Mazurov A.V., Semenov A.V., Usov A.I., Nifant'ev N.E., Bovin N.V.* (1997) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **43**, 443-451.
10. *Cumashi A., Ushakova N.A., Preobrazhenskaya M.E., D'Incecco A., Piccoli A., Totani L., Tinari N., Morozovich G.E., Berman A.E., Bilan M.I., Usov A.I., Ustyuzhanina N.E., Grachev A.A., Sanderson C.J., Kelly M., Rabinovich G.A., Iacobelli S., Nifantiev N.E.* (2007) *Glycobiology*, **17**, 541-552.
11. *Church F.C., Meade J.B., Treanor R.E., Whinna H.* (1989) *J. Biol. Chem.*, **264**, 3618-3623.
12. *Yoon S-J., Pyun Y-R., Hwang J-K., Mourao P.A.S.* (2007) *Carbohydr. Res.*, **342**, 2326-2330.
13. *Graufel V., Kloareg B., Mabeau S., Durand P., Jozefonvicz J.* (1989) *Biomaterials*, **10**, 363-368.
14. *Vestweber D., Blank J.E.* (1999) *Physiol. Reviews*, **79**, 181-213.
15. *Warkentin T.E.* (1999) *Thromb. Haemost.*, **82**, 439-447.
16. *Kakkar V.V., Kakkar S., Sanderson R.M., Peers C.E.* (1986) *Haemostasis*, **16**, 19-24.
17. *Усов А.И., Смирнова Г.П., Билан М.И., Шапков А.С.* (1998) *Биоорг. химия*, **24**, 437-445.
18. *Chizhov A.O., Dell A., Morris H.R., Haslam S.M., McDowell R.A., Shashkov A.S., Nifant'ev N.E., Khatuntseva E.A., Usov A.I.* (1999) *Carbohydr. Res.*, **320**, 108-119.
19. *Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I.* (2002) *Carbohydr. Res.*, **337**, 719-730.
20. *Bilan M.I., Grachev A.A., Ustuzhanina N.E., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I.* (2004) *Carbohydr. Res.*, **339**, 511-517.

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОИДАНОВ

21. *Bilan M.I., Grachev A.A., Shashkov A.S., Nifantiev N.E., Usov A.I.* (2006) Carbohydr. Res., **341**, 238-245.
22. *Билан М.И., Захарова А.Н., Грачев А.А., Шапиков А.С., Нифантьев Н.Э., Усов А.И.* (2007) Биоорг. химия, **33**, 44-53.
23. *Nagaoka V., Shibata H., Kimura-Takagi I., Hashimoto S., Kimura K., Makino T., Aiyama R., Ueyama S., Yokokura T.* (1999) Glycoconjugate J., **16**, 19-26.
24. *Wang J.-G., Mu J.-S., Zhu H.-S., Geng J.-G.* (2002) Inflamm. Res., **51**, 435-443.
25. *Gao Y., Li N., Fei R., Chen Z., Zheng S., Zeng X.* (2005) Mol. Cells, **19**, 350-355.
26. *Wei M., Tai G., Gao Y., Li N., Huang B., Shou Y., Hao S., Zeng X.* (2004) J. Biol. Chem., **279**, 29202-29210.
27. *Qiu X., Amarasekara A., Doctor V.* (2006) Carb. Polymers, **63**, 224-228.

Поступила: 08. 11. 2007.

ANTICOAGULANT ACTIVITY OF FUCOIDANS FROM BROWN ALGAE

*N.A. Ushakova¹, G.E. Morozovich¹, N.E. Ustyuzhanina², M.I. Bilan², A.I. Usov²,
N.E. Nifantiev², M.E. Preobrazhenskaya¹*

¹Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia; e-mail: marina.preobrazhenskaya@ibmc.msk.ru

²Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow

The anticoagulant activity of polysaccharide fucoidans from 11 species of brown algae was studied. The anticoagulant activity was measured by the activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time and thrombin time. Inhibitory action of fucoidans varied significantly from one species to another. Fucoidans from *Laminaria saccharina* and *Fucus distichus* showed high anticoagulant activities, while fucoidans from *Cladosiphon okamuranus* and *Analipus japonicus* were almost inactive. The fucoidan inhibitory effect on thrombin and factor Xa in the presence or in the absence of natural thrombin inhibitor, antithrombin III (AT III), was also studied. In contrast to the best studied anticoagulant heparin the most of the fucoidans inhibited thrombin in the absence of AT III. In the presence of AT III inhibitory effect of fucoidans was increased considerably. Unlike heparin, the effect of fucoidans on factor Xa was very weak in the presence of AT III and was not observed in the absence of AT III. The correlation between the anticoagulant activities of this series of fucoidans and their anti-inflammatory action, studied by us earlier, was not found. It is expected that two these types of fucoidan activities depend on different structural features of fucoidans. These findings show the possibility to obtain fucoidans with high anti-inflammatory action and with low anticoagulant activity. Anticoagulant activity of the fucoidans did not depend on the content of fucose, the other neutral sugars and sulfates in the preparations, and also on the structure of the backbone of molecule. Taken together, these results indicate on prospects of fucoidan study as potential therapeutic agents.

Key words: fucoidan, heparin, blood coagulation, thrombin, factor Xa, antithrombin.