

## АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ

Н. Н. Дрозд<sup>1</sup>, Г. Е. Банникова<sup>2</sup>, В. А. Макаров<sup>1</sup>, В. П. Варламов<sup>2</sup>

Изложены результаты анализа литературы о химическом строении сульфатированных полисахаридов животного, растительного, микробного происхождения, а также полусинтетических и синтетических образцов и их антикоагулянтной активности. Суммированы данные о фармакологической активности веществ *in vitro* и *in vivo*, влиянии сульфатированных полисахаридов на плазменные и клеточные звенья гемостаза, связи между структурными элементами и механизмом действия сульфатированных полисахаридов.

**Ключевые слова:** сульфатированные полисахариды, гликозаминогликаны, гепарины, сульфат гепарана, сульфат дерматана, сульфат хондроитина, гиалуроновая кислота, сульфатированные фукуаны, фукоиданы, галактаны, антикоагулянтная активность, анти-тромботическая активность, ингибирование тромбина и активированного фактора X

### ВВЕДЕНИЕ

Наличие полисахаридов в тканях животных, растений, микроорганизмов, грибов, их низкая токсичность позволяют рассматривать данный класс биополимеров как перспективный для разработки лекарственных средств. В организме млекопитающих сульфатированные полисахариды — гликозаминогликаны (ГАГ) являются составной частью промежуточной соединительной ткани. Они содержатся в большом количестве в субмукозе, хрящах; сухожилиях, сердечных клапанах, коже, межпозвоночных дисках, роговице, в базальной мембране и 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 проявляют разнообразные виды фармакологической активности: антикоагулянтную, антитромботическую, противовирусную, антисклеротическую, антипролиферативную, противоязвенную, радиопротекторную и др.

### Гликозаминогликаны

ГАГ разделяют на семь основных типов. Шесть из них — гиалуроновые кислоты, хондроитин-4-сульфат, хондроитин-6-сульфат, дерматансульфат, гепарин, гепарансульфат — структурно сходны, в полисахаридных цепях чередуются дисахаридные звенья, состоящие из остатков сульфатированных аминокислот

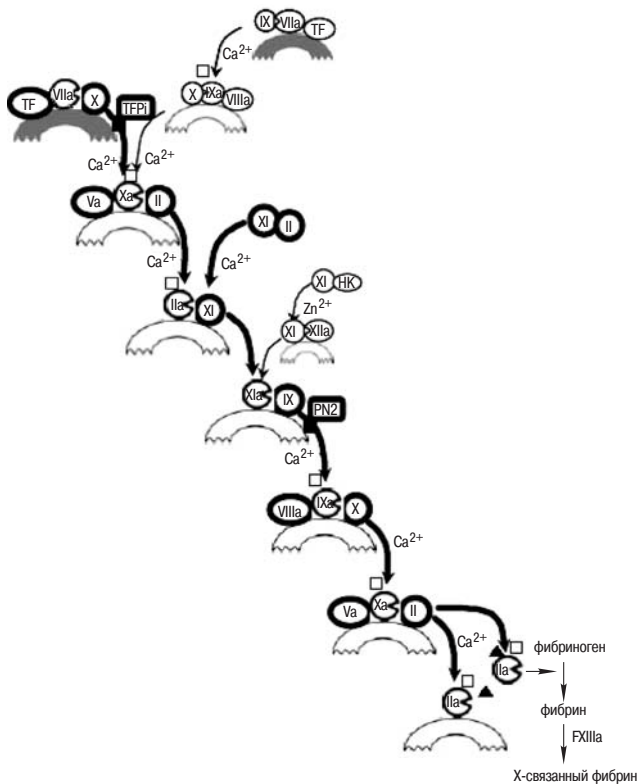
(N-ацетилглюкозамина и N-ацетилгалактозамина) и гексуриновых кислот (D-глюкуроновой или L-идуроновой). В гликозаминогликанах седьмого типа — кератансульфате, или кератосульфате, в дисахаридных звеньях вместо уроновых кислот находится D-галактоза [9, 20].

### Гепарины

Антикоагулянтная активность (способность подавлять образование фибрина за счет ингибирования или снижения синтеза факторов свертывания крови) некоторых природных линейных сульфатированных полисахаридов из тканей животных, также как и гепарина связана со способностью увеличивать скорость ингибирования сериновых протеиназ свертывающей системы крови (рис. 1) — тромбина (фактор IIa), факторов Xa, IXa, XIa и XIIa, в основном активируя плазменный ингибитор серпин — антитромбин. При активации другого плазменного серпина, кофактора II гепарина, происходит ингибирование только тромбина. Отмечено взаимодействие ГАГ и гепарина с ингибитором протеина C (одно из названий — PAI 3), но механизм до конца не ясен. Гепарин ускоряет ингибирование тромбина более, чем в 2000 раз, тогда как для фактора Xa ускорение ингибирования составляет  $\approx 600$  раз. В физиологических условиях ускорение ингибирования фактора Xa может быть даже выше — до 2400 раз — в присутствии ионов кальция. На этом свойстве основано использование гепарина в качестве антикоагулянта в медицине. Только часть (33 %) цепей коммерческих препаратов гепарина связывает антитромбин с высоким сродством. Антитромбинсвязывающие участки гепарина содержат специфическую последовательность из пяти сахарных остатков, их обычно называют пентасахарид H<sub>5</sub>. Пентасахарид H<sub>5</sub> ускоряет ингибирование антитромбином фактора Xa приблизительно в 300 раз, что всего лишь вдвое меньше, чем ускорение полной цепью гепарина, тогда как ингибирование

<sup>1</sup> Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза (руководитель — проф. В. А. Макаров) Гематологического научного центра РАМН, Москва, 125167, Новый Зыковский проезд, 4а.

<sup>2</sup> Лаборатория инженерии ферментов (руководитель — проф. В. П. Варламов) Центра “Биоинженерия” РАН, Москва, 117312, проспект 60-летия Октября, 7, корп. 1.



**Рис. 1.** Модель инициации тканевым фактором реакций свертывания крови. Римскими цифрами, заключенными в окружности, обозначены коагуляционные белки — зимогены, в эллипсах — кофакторы, в окружностях с вырезанными сегментами — ферменты. В прямоугольниках представлены ингибиторы Kunitz-типа, закрашенные в черный цвет квадраты располагаются в местах действия этих ингибиторов. Незакрашенные квадраты располагаются в местах действия АТ; закрашенные треугольники — в местах действия ГК. TF — тканевой фактор; НК — высокомолекулярный кининоген; TFPI — ингибитор пути тканевого фактора; PN — протеаза нексин-2; АТ — анти-тромбин; ГК — кофактор II гепарина; II — протромбин [132].

тромбина ускоряется только в 1,7 раза. Таким образом, в отличие от гепарина  $H_5$  селективно инактивирует фактор Ха.

Механизм активации антитромбина гепарином подробно описан в обзоре [46]. Существуют два разных механизма ингибирования фактора Ха и тромбина (IIa) антитромбином, активированным гепарином. В результате взаимодействия специфической пентасахаридной последовательности  $H_5$  в гепарине с пентасахаридсвязывающим участком в петле реактивного центра (RCL) образуется антитромбин-гепариновый комплекс (АТ:Н). Это приводит к значительным конформационным изменениям в реактивном центре антитромбина, происходит “выталкивание” петли реактивного центра (RCL), и образовавшаяся структура лучше распознается фактором Ха, что в свою очередь приводит к ускорению расщепления связи в реактивном центре и образованию ковалентного ингибирующего комплекса (рис. 2). Таким образом, для существенного ускорения ингибирования фактора Ха необходима конформационная активация антитромбина, при

этом ингибирование тромбина, напротив, ускоряется лишь в 2 раза. Локальное связывание антитромбина с участком  $H_5$  гепариновой цепи сопровождается связыванием тромбина с этой же цепью, но на неспецифическом участке за счет отрицательных зарядов, доступных на гепариновой цепи. В результате образуется тройной антитромбин-гепарин-тромбиновый комплекс. Тромбин, перемещаясь вдоль полианионной цепи, наталкивается на ингибитор, что приводит к ускорению ( $\approx 2000$  раз) процесса ингибирования в физиологических условиях. Для одновременного удерживания тромбина и антитромбина, приводящего к ускорению ингибирования, необходимо, чтобы гепариновая цепь состояла не менее чем из 18 остатков.

Таким образом, несмотря на то, что специфический пентасахарид  $H_5$  необходим для локального связывания гепариновых цепей, сам по себе он не способен “заставить” антитромбин ингибировать тромбин.

В качестве антитромботических средств (препятствующих развитию тромбов), кроме нефракционированного гепарина со средней молекулярной массой 15 кД, обладающего приблизительно равными ингибиторными активностями по отношению к факторам IIa (aIIa) и Ха (aХа), в настоящее время используют ряд низкомолекулярных гепаринов со средним распределением молекулярных масс от 4 до 7 кД [цетопарин натрия (*certoparin sodium*), далтепарин натрия (*dalteparin sodium*), эноксапарин натрия (*enoxaparin sodium*), надропарин кальция (*nadroparin calcium*), ревипарин натрия (*reviparin sodium*), тинзапарин натрия (*tinzaparin sodium*); используются при тромбозах глубоких вен и легочной эмболии] и отношением активностей aХа/aIIa от 1,5 до 5 [63].

В работах по изысканию антитромботических средств исследуют и другие представители гликозаминогликанов (гиалуроновые кислоты [12, 21, 75], хондроитин 4-сульфат — хондроитинсульфат А [14, 45, 82], хондроитин-6-сульфат — хондроитинсульфат С, хондроитинсульфат В [14, 82], дерматансульфат В [14, 36, 38, 73], сульфат гепарана [68, 75, 82]). Основной особенностью ГАГ (кроме гиалуроновой кислоты) является наличие сульфатированных сахаров и ковалентной связи (в нативной форме) с белком. Сульфатированные ГАГ различаются по составу входящих в них мономеров, гликозидным связям, количеству и положению сульфатных заместителей. Гепарин способен связываться со многими типами клеток, включая тромбоциты, клетки эндотелия артерий и печеночные клетки. Хондроитинсульфат, дерматансульфат и гепарансульфат связываются с разными участками клеточной поверхности, например, фибробластов.

В обзоре [91] собрана информация относительно корреляции между структурой и антикоагулянтной, антитромботической и геморрагической (способность вызывать кровотечения) активностью 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. Соединения, содержащие 2-О-сульфатированные остатки идуроновой кислоты и идуроновую кислоту, а также небольшие количества глюкуроновой кислоты, как в гепарине, или смесь глюкуроновой и идуроновой кислот (гепарины моллюсков) обладают высокой аШа и аХа активностью. Результаты указывают на то, что, комбинируя эти элементы можно получить эффективные антитромботические вещества. Гепарин, выделенный из креветок (*shrimp mimics*), фармакологически активнее низкомолекулярных гепаринов. Производные сульфата гепарана из поджелудочной железы быка и сульфатированные фуканы 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 сульфатированных полисахаридов (СП) обусловлена, по крайней мере частично, их действием на эндотелиальные клетки (стимулируя синтез сульфата гепарана). Все антитромботические вещества производные гепарина и другие СП обладают геморрагической активностью. Исключение составляют сульфат гепарана из бычьей поджелудочной железы и сульфатированные фуканы из бурых морских водорослей, у которых отсутствует геморрагическая активность, а антитромботическая активность *in vivo* высока. Когда структура этих соединений будет полностью определена, создание “идеального” антитромботического средства станет возможным.

### Сульфат гепарана

Сульфат гепарана (СГ), в отличие от гепарина, содержится в плазматических мембранах различных клеток и в межклеточном веществе. СГ из слизистой кишечника свиней демонстрировал ингибирование тромбина и фактора Ха, активируя антитромбин [115]. Однако для достижения максимальной скорости катализа в случае тромбина необходима концентрация в 50 раз большая в сравнении с гепарином, а в случае фактора Ха — в 5 раз.

В то же время СГ из тунца *Artemia franciscana* проявлял активность в большей степени через кофактор II гепарина [36] и имел незначительную активность против фактора Ха. По антикоагулянтному эффекту в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) он в 5–10 раз слабее гепарина. Но СГ, выделенный из бычьей поджелудочной железы эффективно предотвращал развитие моделированного артериального и венозного тромбозов у животных. Авторы предполагают стимулирование процессов ингибирования коагуляции с помощью эндотелиальных

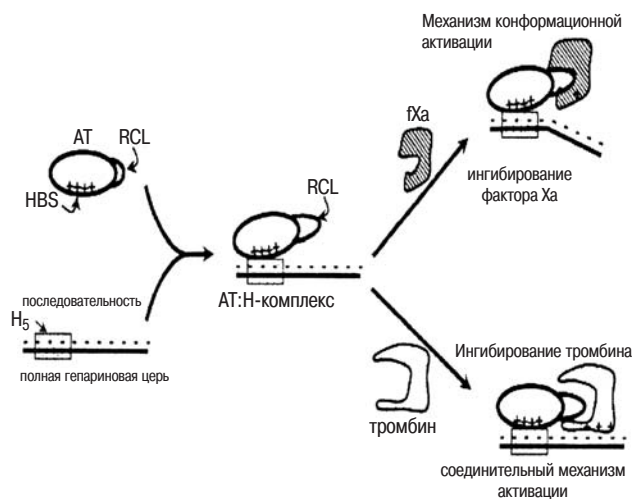


Рис. 2. Механизм ингибирования антитромбином фактора Ха и тромбина в присутствии гепарина с ММ 15 кД.

Комплекс антитромбин-гепарин (АТ-Г) формируется вследствие взаимодействия высокоаффинной пентасахаридной последовательности (Н<sub>5</sub>) гепарина с пентасахаридсвязывающим участком (HBS). Происходит выталкивание петли реактивного центра (RCL), что ведет к лучшему распознаванию фактора Ха (fХа). Подобный механизм называется механизмом конформационной активации. Ингибирование тромбина в добавлении к конформационной активации требует связывания тромбина и антитромбина на цепи гепарина. Экзосайт (показан как “+++”) тромбина неспецифически связывает отрицательно заряженные доступные участки на цепи гепарина. Подобный механизм называется соединительным механизмом активации и преобладает преимущественно в инактивации тромбина.

клеток [90]. Увеличение содержания сульфатных групп повышает антикоагулянтную активность сульфатов гепарана.

### Сульфат дерматана

Сульфат дерматана (СД) имеет структуру, подобную гепарину и сульфату гепарана, но ацетилгалактозамин замещен на глюкозамин и идуроновая кислота присоединена через 1→3 гликозидную связь к гексозамину. Исследовали взаимосвязь между его структурой и способностью создавать комплексы с кофактором II гепарина. Небольшие фракции СД были выделены осаждением белка первого компонента системы комплемента в весьма специфических условиях при низкой ионной силе и в присутствии ионов кальция. Содержание серы и антикоагулянтная активность фракции СД, выделенной в осадке, оказались выше, соответственно, чем в исходном материале. Результаты подтверждают, что такая фракция может быть использована в качестве средства, способного ингибировать тромбин [22, 34].

Антикоагулянтная активность СД осуществляется не с помощью ингибирования ферментов свертывающей системы крови антитромбином [100, 101]. СД связывается и активирует кофактор II гепарина для ускорения ингибирования тромбина, т.е. он является специфическим непрямым ингибитором тромбина.

Были получены сверхсульфатированные (содержание серы до 11,5 %) низкомолекулярные образцы СД для изучения связи между зарядом, молекулярной массой и антитромбиновой активностью (аIIa) *in vivo* [74, 76]. Только гексасахаридная последовательность сульфата дерматана с более чем тремя сульфатными группами может связываться с кофактором II гепарина, с различными константами связывания в зависимости от числа сульфатных групп [118]. Для связи с серпином СД необходимо наличие в нем Arg-189, в то время как для гепарина отсутствие этой аминокислоты не является значимым [131]. СД демонстрирует слабую антикоагулянтную активность [90]. Дополнительное сульфатирование приводит к появлению способности ингибировать тромбин непосредственно специфическим взаимодействием. При достижении максимальной степени сульфатирования (4 сульфатные группы на дисахаридную единицу) катализ ингибирования тромбина осуществляется через антитромбин [49]. Преимуществом сульфата дерматана является меньшая в сравнении с НМГ геморрагическая активность [78]. Десмин 370 (Desmin 370) — низкомолекулярный сульфат дерматана индуцирует снижение роста тромба при венозном тромбозе у крыс и кроликов, а также провоцирует лизис тромба [19]; ингибирует активность как свободного тромбина, так и активность тромбина, связанного с фибрином, что препятствует росту тромбов. Низкомолекулярный СД слабо ингибирует активность фактора Ха и стимулирует выход из эндотелия в кровь ингибитора пути тканевого фактора (TFPI — tissue factor pathway inhibitor). Но, в основном антитромботический эффект связан с активацией фибринолиза за счет умеренного усиления выхода из эндотелия в кровь тканевого активатора плазминогена и выраженного снижения активности ингибитора последнего — PAI-1 (plasminogen activator inhibitor type-1). Такого рода стимуляция фибринолиза способствует ликвидации свежих тромбов, предупреждает рост и рецидивирование последних. СД уменьшает застой крови в зоне микроциркуляции и улучшает венозный отток [1].

СД из гребешков петухов показал лучшую антитромботическую активность *in vivo* в сравнении с сульфатом дерматана из плаценты человека с молекулярной массой 40 кД [43]. В этом СД (16 кД) присутствует дисахарид, относящийся к гексасахариду, имеющему высокое сродство к кофактору II гепарина [70].

Исследовали влияние содержания и положения сульфатов в образцах СД из асцидий на их антикоагулянтную активность (вместе с нативным и гиперсульфатированным сульфатом дерматана млекопитающих) [110]. Все СД из асцидий имеют высокое содержание 2-О-сульфатов в остатке  $\alpha$ -L-идуроновой кислоты, но различаются структурой N-ацетил- $\beta$ -D-галактозаминовых фрагментов. *Styela plicata* и *Halocynthia pyriformis* содержат 4-О-сульфаты, в то время как *Ascidian nigra* — 6-О-сульфаты. СД из *Ascidian nigra* не облада-

ет заметной антикоагулянтной активностью, что свидетельствует о важности 4-О-сульфата в N-ацетил- $\beta$ -D-галактозаминах. СД из *Styela plicata* и *Halocynthia pyriformis* проявляют более высокую антикоагулянтную активность (в 6 и 10 раз) по отношению к кофактору II гепарина по сравнению с нативным и гиперсульфатированным СД млекопитающих.

Сульфаты гепарана и дерматана, имеющие степень сульфатирования в два раза меньшую, чем низкомолекулярные гепарины, в меньшей степени способны ингибировать активацию протромбина и катализировать ингибирование тромбина в плазме [108].

## Сульфат хондроитина

Сульфат хондроитина (СХ) — натуральное средство для лечения заболеваний суставов. Участвует в регуляции фосфорно-кальциевого обмена в хрящевой ткани. Замедляет резорбцию костной ткани и снижает потери кальция, ускоряет процессы восстановления костей и хрящей. Известно, что ингибирование тромбина антитромбином и кофактором II гепарина значительно ускоряется хондроитинсульфатом тромбомодулина эндотелия [8]. Гликановая основа СХ состоит из остатков D-глюкуроновой кислоты и D-галактозамина [20].

На модели артериального тромбоза у крыс, индуцированного обработкой сосуда раствором хлористого железа, исследована сравнительная антитромботическая активность препаратов супероксиддисмутазы и хондроитинсульфата по отдельности и в виде ковалентного и нековалентного комплексов. Показано, что наибольший антитромботический эффект вызывает препарат ковалентного конъюгата супероксиддисмутазы с хондроитинсульфатом. Высокая антитромботическая активность ковалентного конъюгата обусловлена его сорбцией на гликокаликсе клеточной поверхности сосудистой стенки и прочностью ковалентной связи между субъединицами супероксиддисмутазы и хондроитинсульфатом [6].

Хондроитин-4 и хондроитин-6 сульфаты слабо усиливали ингибиторную активность антитромбина по отношению к тромбину [114]. В большей степени эти вещества усиливали взаимодействие антитромбин — фактор Ха или кофактор гепарина II — тромбин.

## Гиалуриновая кислота

Гиалуриновая кислота (ГК) — высокомолекулярный линейный биополимер, молекулы которого построены из чередующихся остатков D-глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина, соединённых  $\beta$ -(1 → 4)- и  $\beta$ -(1 → 3)-связями. Широко представлена в тканях животных и человека в качестве важнейшего компонента основного вещества соединительной ткани, синовиальной жидкости, стекловидного тела; в больших количествах обнаружена в пупочном канатике, коже, оболочках яйцеклеток, роговице, костях, клапа-

нах сердца. Молекулярная масса гиалуроновой кислоты велика и составляет 100 – 10 000 кД.

Производные гиалуроновой кислоты, по-разному сульфатированные и с различной молекулярной массой, демонстрируют различия в ингибировании некоторых сериновых протеиназ свертывающей системы крови [20, 40, 130]. Их антикоагулянтная активность тесно коррелирует со степенью сульфатирования макромолекул и растет с увеличением числа сульфатных групп на дисахаридную единицу. Низкомолекулярные образцы с высокой степенью сульфатирования ингибируют тромбин непосредственно и через кофактор II гепарина. Образцы с наибольшей молекулярной массой электростатически взаимодействуют с кофактором II гепарина. Увеличение ингибирования тромбина кофактором II гепарина в присутствии сульфатированных гликозаминогликанов зависит от плотности заряда [31, 48, 74, 105, 117]. Инактивация фактора Ха осуществляется комплексом гиалуроновой кислоты с антитромбином. Сульфатированная гиалуроновая кислота [12, 21, 75] приобретает новые биологические свойства (ингибирование агрегации тромбоцитов, антикоагулянтная активность, увеличение скорости роста эндотелиальных клеток), отличные от активности нативной молекулы [126]. Кроме того, вследствие сульфатирования появляется стабильность молекулы гиалуроновой кислоты, которая ведет к увеличению периода полуэлиминации.

### **Антитромботические средства на основе гликозаминогликанов**

Известен ряд антитромботических средств на основе смесей в различных соотношениях и сочетаниях гликозаминогликанов, выделенных в основном из слизистых оболочек млекопитающих. К ним относятся сулодексид (sulodexide), оргаран (orgaran), десмин (desmin), гемовассал (hemovassal). Основу для этих препаратов заложили исследования 20-летней давности [98, 120]. Эти препараты сочетают антитромботический, гипофибринемический, ангиопротекторный, гиполипидемический эффекты. Сулодексид получают из слизистых оболочек тонкого кишечника свиней. Он состоит из высокоподвижных гепариновых фракций (80 %) и сульфата дерматана (20 %). Высокоподвижная гепариноподобная фракция имеет молекулярную массу около 7 кД и более низкую степень сульфатирования, чем нефракционированный гепарин. СД сулодексида представляет полидисперсный полисахарид с молекулярной массой 25 кД. Специфические особенности химического состава этого СД обуславливают антикоагулянтную и антитромботическую активность препарата, который активирует кофактор II гепарина и антитромбин. Присутствие в его составе гепариноподобной фракции и СД обеспечивает синергический эффект, повышающий антитромботический потенциал сулодексида в сравнении с гепарином. Риск кровотечения при внутривенном введении этого препарата

ниже, чем при введении гепарина, при равной антикоагулянтной активности плазмы [32, 33].

### **Синтетические олигосахариды**

В настоящее время синтезированы пентасахариды, ингибиторы второй фазы (propagation-распространение) каскада свертывающей системы крови [129]. Арикстра (arixtra) и индрапаринукс (idraparinux) — синтетические аналоги пентасахаридов гепарина для парентерального введения с высоким сродством к антитромбину. Взаимодействуя в плазме только с антитромбином, эти лекарственные средства демонстрируют дозозависимую реакцию. Исследования взаимодействия арикстры с сывороткой пациентов с гепарин-индуцированной тромбоцитопенией не показали перекрестной реакции [18, 51, 127]. В силу своей структуры ни арикстра, ни индрапаринукс не служат мостом между антитромбином и тромбином, а увеличивают скорость инактивации фактора Ха антитромбином, вследствие чего блокируется генерация тромбина, но влияния на скорость ингибирования тромбина эти вещества не оказывают. Оба лекарственных средства имеют значительную биодоступность после подкожного введения. Арикстра не метаболизируется, выводится исключительно почками [128] и демонстрирует дозо-независимый период полуэлиминации приблизительно 15 ч [30]. Поэтому его можно вводить подкожно один раз в день. Индрапаринукс, более сульфатированное производное арикстры, связывает антитромбин с такой высокой аффинностью, что плазменный период полуэлиминации достигает 130 ч [62], как у антитромбина. Следовательно, индрапаринукс можно вводить подкожно один раз в неделю. Ни арикстра, ни индрапаринукс не взаимодействуют с антагонистом гепарина протамина сульфатом. Поэтому при геморрагических осложнениях можно вводить рекомбинантный фактор VIIa [24]. Однако фактор VIIa дорог и может стимулировать тромботические осложнения. Арикстра, аналог природного пентасахаридов, расщепляется и инактивируется гепариназой, которая может являться потенциальным его антагонистом. Напротив, индрапаринукс не расщепляется гепариназой. Поэтому при длительном периоде полуэлиминации отсутствие антагониста может явиться ограничивающим фактором. Антитромботическая эффективность арикстры демонстрировалась на одной из стадий клинических испытаний при тромбопрофилактике после хирургического вмешательства в случае перелома бедра или артропластики колена, а также при лечении начальной стадии венозного тромбоза глубоких вен или легочной эмболии и острого коронарного синдрома [52, 53, 56, 71, 122].

Синтетический пентасахарид, изученный в работе [42], обладал аХа активностью не менее 750 Ед/мг и не обладал антитромбиновой активностью. Отмечается, что гепариназа способна расщеплять этот пентасахарид на ди- и трисахариды, при этом антикоагулянт-

ная активность исчезает. Дополнительно введенная гепариназа может действовать как нейтрализующий агент.

Антитромботическим эффектом также обладают и олигосахариды гепарина, их антикоагулянтная активность зависит от молекулярной массы [26, 79].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показана способность синтетического гексадекасахарида SR-123781 ускорять ингибирование фактора Ха и тромбина посредством антитромбина [60]. Этот полимер содержит два домена: пентасахарид, который связывает антитромбин, и тромбинсвязывающий домен, разделенные центральным незаряженным олигосахаридом. Новая разновидность гексадекасахарида SanOrg 123781 А способна ингибировать связанные со сгустком фактор Ха и тромбин [61].

Синтез олигосахаридов со структурой гепарина и его тромбин-ингибирующим эффектом дает возможность получать синтетические аналоги гепарина с определенным механизмом действия [106], лишённые побочных эффектов. Структура, биологическая активность и терапевтический потенциал гепариноподобных веществ, включающих сульфатированные полисахариды из тканей растительного и животного происхождения, их синтетические производные, кислые олигосахариды и их небольшие синтетические аналоги, рассмотрены в работе [57].

Конформационные изменения антитромбина, индуцируемые пентасахаридами и гепаринами, приводят к значительному 150 – 500-кратному ускорению инактивации факторов Ха, IXa и VIIa и умеренному, приблизительно 50-кратному, ускорению ингибирования фактора XIIa и ингибированию тканевого активатора плазминогена. Благодаря закреплению антитромбина и протеиназы на молекуле гепарина ингибирование тромбина ускоряется в 1000 – 3000 раз, ускорение инактивации факторов IXa и XIa — значительно меньше (в 250 – 350 раз) [46].

### Полисахариды из водорослей и беспозвоночных

Известна только одна работа об антикоагулянтной активности полисахаридов, выделенных из зеленых водорослей [59]. Восемь образцов, ингибирующих сериновые протеиназы посредством кофактора II гепарина, были выделены из *Chlorophyta*. Ингибиторная активность образцов по отношению к тромбину выше, чем у гепарина и сульфата дерматана. Активация кофактора II гепарина этими полисахаридами происходит преимущественно по аллостерическому механизму.

Сульфатированные полисахариды, выделенные из бурых морских водорослей и морских беспозвоночных (морские ежи, голотурии, асцидии и др.), называют фукоиданами и фуканами, высокосульфатированные полисахариды их красных морских водорослей — галактанами, каррагинанами [23].

### Сульфатированные галактаны

Сульфатированные D-галактаны красных морских водорослей *Botryocladia occidentalis* демонстрировали антитромбиновую активность от 22 до 150 ЕД/мг в тесте активированного частичного тромбопластинового времени [54]. Кроме того, исследованные образцы усиливали ингибирование тромбина и фактора Ха плазменными ингибиторами сериновых протеиназ — антитромбином и кофактором II гепарина.

В экспериментах *in vitro* на моделях активирования альтернативного и классического путей комплемента изучено действие полисахаридов из красных морских водорослей [7]. Обнаружено, что высокомолекулярные сульфатированные галактаны из красных водорослей влияют на активирование комплемента. При сравнении активности агара, агарозы и каррагинанов выдвинуто предположение, что для действия полисахаридов из красных водорослей на активирование комплемента необходимо присутствие сульфогрупп в молекуле галактанов, при этом их положение не является значимым. Активность полисахаридов повышается с увеличением степени сульфатирования.

Антикоагулянтный эффект сульфатированных галактанов из водорослей реализуется главным образом через активацию плазменных ингибиторов сериновых протеиназ свертывающей системы крови [83]. Для взаимодействия сульфатированных галактанов с ингибиторами коагуляции и их мишенями протеиназами необходима определенная плотность заряда полисахарида. Структурная основа этих взаимодействий — комплекс, включающий природно гетерогенные полисахариды со сложным распределением сульфатных групп и определенным моносахаридным составом. Для проявления антикоагулянтной активности сульфатированных галактанов требуется существенно большая длина цепи, чем у гепарина. Возможно, для сульфатированного галактана структура в целом, а не специфические минорные компоненты, как у гепарина, определяют его взаимодействие с антитромбином. 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 более 45 кД. Сульфатированный галактан и гепарин связываются с различными участками антитромбина. Сульфатированные галактаны менее эффективны, чем гепарин при ускорении конформационной активации антитромбина. Эти наблюдения показывают, что для сульфатов галактанов преобладает иной механизм, приводящий к антитромбинсвязывающей антикоагулянтной активности, а не только обусловленной конформационной активацией антитромбина. Возможно, сульфатированный галактан может удерживать вместе более, чем одну молекулу протеиназы и/или плазменного кофактора в нековалентном комплексе, тем самым переводя протеиназу в

неактивную форму. Конформационная активация антитромбина и последующее образование ковалентного комплекса с тромбином, по-видимому, менее важно для проявления антикоагулянтной активности сульфатированного галактана, чем для гепарина. Полученные результаты приводят к заключению, что механизм гепарин-антитромбинового взаимодействия не может быть распространен на другие сульфатированные полисахариды. Каждый тип полисахарида может образовывать особенный комплекс с ингибиторами плазмы и протеиназами-мишенями.

## Каррагинаны

Впервые термин “каррагин” появился в 1837 году — так называли морские водоросли, произрастающие вблизи местечка Каррагин на южном побережье Ирландии, их использовали в пищу. В настоящее время основное производство каррагинанов находится в странах Восточной Азии (Южная Корея, Китай, Япония), где в морях сосредоточены заросли красных водорослей (класс Rhodophyceae). Различные типы каррагинанов могут быть использованы в пищевой промышленности — как загустители, эмульгаторы, стабилизаторы в производстве кондитерских и молочных изделий, детского и диетического питания. В медицинской практике — для приготовления лекарственной таблеточной массы, рентгеноскопии желудка, как антикоагулянты, противовоспалительные, иммуностимулирующие и противоопухолевые препараты, в фармацевтической промышленности — для приготовления противоожоговых повязок, кремов, лосьонов, бальзамов, в биотехнологии — для приготовления плотных сред и иммобилизации клеток [4].

## Сульфатированные фукуаны и фукоиданы

Среди сульфатированных полисахаридов, обладающих антикоагулянтной активностью, большой интерес представляют фукоиданы, выделенные из водорослей и морских беспозвоночных [84, 86, 93, 102, 110, 119].

Впервые фукоиданы выделили в 1913 г. Многие годы фукоиданы использовали как источник L-фукозы, хотя их антикоагулянтная активность была известна давно [64]. Эти полисахариды составлены в основном из сульфатированной L-фукозы, легко выделяются из клеточной стенки бурых водорослей горячей водой [113] или раствором кислоты [27] и могут достигать более 40 % сухой массы выделенных клеточных стенок [56]. Фукоиданы были предложены как вариант, альтернативный гепарину. Будучи субстанциями растительного происхождения, они с меньшей вероятностью содержат инфекционные агенты типа вирусов или прионов. Подобно гепарину, фукоиданы обладают широким спектром фармакологической активности (антикоагулянтная [58], антитромботическая [80], противовоспалительная [29]), проявляют способность к усилению пролиферации и адгезии [112], устойчивость к вирусной инфекции [109].

При исследовании фукоиданов водорослей всегда возникали вопросы, связанные с номенклатурой и чистотой. Фукоиданы представляют высокое ульфатированные, обычно разветвленные полисахариды, содержащие, помимо фукозы, галактозу, маннозу, ксилозу, уроновые кислоты и иногда белки. Кроме того, их состав изменяется в зависимости от вида водорослей, процесса экстракции, времени сбора и местных климатических условий. Первоначально фукоиданы определяли как гомофукуаны. Многие авторы до сих пор используют устаревший термин “фукоидин”. По-видимому, наиболее целесообразно в соответствии с рекомендациями IUPAC называть сульфатированными фукуанами полисахариды, основанные главным образом на сульфатированной фукозе, с менее чем 10 % других моносахаридов. Этот термин был применен к сульфатированным фукуанам морских беспозвоночных, тогда как термин “фукоидан” использовали для фукуанов, экстрагированных из водорослей [85].

Фукоиданы — биологически активные природные полимеры и перспективные соединения для разработки новых лекарственных препаратов антикоагулянтного, противовирусного, противоопухолевого, противовоспалительного и иммуномодулирующего действия. Однако до сих пор не удается проследить, каким образом структура этих полимеров влияет на проявление их фармакологических свойств, поскольку известны лишь единичные примеры фукоиданов водорослей с точно установленным строением [67].

Низкомолекулярный фукоидан (4 кД) лучше, чем низкомолекулярный гепарин предотвращал развитие артериального тромбоза у животных [35]. Низкомолекулярные фукоиданы проявляли антикоагулянтную активность *in vitro* в тесте активированного частичного тромбопластинового времени и *in vivo*: (8, 11 – 40 кД), выделенные из кислотных экстрактов бурых водорослей [39, 47]; выделенные из бурых морских водорослей *Dictyota menstrualis* [15]; (7,8 – 8,3 кД), полученные с помощью перекиси водорода из высокомолекулярных фукоиданов, экстрагированных из бурых водорослей *Ascophyllum nodosum* [28].

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что сульфатированные полисахариды из бурых водорослей *Fucus evanescens* Охотского моря проявляют антикоагулянтную активность, подобную гепарину. Антикоагулянтные свойства фукоидана были определены по ингибированию тромбина посредством антитромбина [5]. Подробно изучено строение фукоидана из тихоокеанской бурой водоросли *Fucus evanescens* C. Ag [25].

Фукоидан из *Laminaria saccharina* представлял практически чистый сульфатированный и ацелированный фукуан, содержащий фукозу, сульфат и ацетат в мольном соотношении 1:1,23:0,36 [10]. Фукоидан из *Laminaria brasiliensis* имел большую антитромбиновую активность (30 ЕД/мг), хотя содержание сульфатных групп в его молекуле меньше [23]. Высокая актив-

ность гепарина зависит от определенной пентасахаридной последовательности, обладающей высокой аффинностью к ингибитору сериновых протеиназ антитромбину. По всей вероятности, данная последовательность отсутствует у фукоиданов. Однако очищенные фракции фукоидана (из *Ecklonia kurome* [94, 96], *Ascophyllum nodosum* [92], *Palvetia caniculata* [39]) имеют сходство не только к антитромбину, но и к другому плазменному ингибитору сериновых протеиназ — кофактору II гепарина [41]. Гепарин взаимодействует с кофактором II гепарина посредством регулярно повторяемой гексасахаридной последовательности [81]. Высвобождение ингибитора пути тканевого фактора (TFPI — tissue factor pathway inhibitor) из эндотелия, которое стимулируется фукоиданом более чем гепарином, может усиливать антитромботический эффект [55].

Полисахариды из бурых водорослей (*Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*) вызывают ряд фармакологических эффектов: зависимым от концентрации образом ингибируют тромбопластин- или кефалин-каолин-индуцированную генерацию тромбина тромбоцитами и тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов; снижают гипотензивный эффект тромбина; снижают прилипание полиморфноядерных лейкоцитов к аорте кроликов; ингибируют тромбин-индуцированный тромбоз [119]. Специфическая антитромбиновая активность фукоидана из *Fucus Vesiculosus*, измеренная в тесте активированного частичного тромбопластинового времени, составила 9 – 16 ЕД/мг относительно разных стандартов гепарина [86]. Сравнение молекулярных масс, антикоагулянтной активности и спектров ЯМР низкомолекулярных фукоиданов из *Ascophyllum nodosum* показало, что антикоагулянтная активность связана не только с молекулярной массой и содержанием серы, но более точно — с уровнем 2-О-сульфатирования и 2,3-О-дисульфатирования [37]. Авторы установили, что фукозные единицы в основном сульфатированы по О-2, в меньшей степени по О-3 и незначительно — по О-4 положению, в противоположность ранее опубликованным результатам по фукоиданам из других бурых водорослей. Те же авторы впервые обнаружили 2,3-О дисульфатные остатки. Модель сульфатирования включает  $\alpha$ -(1 → 2) связанный фукозный скелет и большую долю  $\alpha$ -(1 → 4) связей, что свидетельствует о необходимости пересмотра концепции фукоидановой структуры. Антикоагулянтная и антитромботическая активности фракций фукоидана (*A. nodosum*) возрастают с увеличением молекулярной массы и содержания сульфатных групп. Однако сульфатированные фракции, в которых нативная структура не была затронута, обладали большей активностью, чем фракции с эквивалентной молекулярной массой и степенью сульфатирования, в которых эта структура была частично разрушена десульфатированием [58]. Фукоиданы могут способствовать фиб-

ринолизу, усиливая действие активаторов плазминогена [97].

Из морских водорослей *Ecklonia kurome* выделили фукоиданы, проявляющие антитромбиновую активность в диапазоне 130 – 148 ЕД/мг. Для изучения связи степени сульфатирования и антикоагулянтной активности из фукоидана были получены образцы, отличающиеся по степени замещения. Отмечено, что для появления в образцах антикоагулянтной активности необходима степень замещения не ниже 0,3, так как образцы менее сульфатированные и полностью десульфатированные не проявляют эту активность [94].

Фукоиданы из *Fucus spp.* оказывали модулирующий эффект на фактор роста [(TGF)- $\beta$ (1)] по механизму действия, подобному гепарину. Так же, как и нефракционированный гепарин, фукоиданы ингибировали пролиферацию фибробластов в концентрациях от 0,01 до 100 мг/мл [99].

Структурные исследования полисахаридов морских беспозвоночных впервые были предприняты в 1987 году [85]. Были изучены два вида морских беспозвоночных: голотурия *Ludwigothurea grisea* [111] и некоторые виды морских ежей — *Lytechinus variegates*, *Arbacia lixula*, *Strongylocentrotus purpuratus*, *Strongylocentrotus franciscanus*, *Strongylocentrotus droebachhienensis* [16, 17, 64, 88, 123, 124]. В отличие от сложных фукоиданов водорослей, полисахариды, выделенные из иглокожих (желеобразная оболочка яиц морских ежей, стенки тела голотурий), в большинстве своем обладают регулярной структурой, специфичной для данного вида. Они имеют повторяющиеся олигосахаридные звенья, которые различаются главным образом числом и расположением сульфатных групп [124]. Строение таких полисахаридов можно надежно установить с помощью современной техники структурного анализа, где основную роль играет ЯМР-спектроскопия [11]. Высокомолекулярные сульфаты фукана из стенки яиц морских ежей усиливают ингибирование тромбина с помощью антитромбина или кофактора II гепарина [104]. Ингибирование фактора Ха выражено в меньшей степени.

Исследования полисахаридов беспозвоночных позволили частично прояснить связь между структурой полисахаридов и антикоагулянтной активностью. Установлено, что регулярные линейные сульфатированные  $\alpha$ -L-фуканы и сульфатированные  $\alpha$ -L-галактаны проявляют антикоагулянтную активность, которая не является функцией плотности заряда, но зависит от модели сульфатирования и моносахаридного состава [11, 77, 87]. Сульфатированные  $\alpha$ -L-фуканы и фукозилированные хондроитин сульфаты также проявляют антитромботическую активность *in vivo* при моделировании венозного и артериального тромбозов. Эти полисахариды можно рассматривать как потенциальные лекарственные средства, альтернативные гепарину, полезные в проектировании структуры лекарств со



специфической активностью для каждого типа тромбоза и меньшими побочными эффектами [77, 87].

Показано, что разветвленные фукоиданы бурых водорослей являются прямыми ингибиторами тромбина, в то время как линейные фуканы иглокожих способны ингибировать тромбин только в присутствии анти-тромбина или кофактора II гепарина так же как и гликозаминогликаны млекопитающих [102]. При сопоставлении структуры и антикоагулянтного действия сульфатированных галактанов и сульфатированных фуканов установлено, что 2-О-сульфатированный, 3-связанный  $\alpha$ -L-галактан, а не  $\alpha$ -L-фукан с такой же молекулярной массой является потенциальным ингибитором тромбина, взаимодействуя с антитромбином или кофактором II гепарина. Различия в активности этих двух полисахаридов незначительны при замене тромбина на фактор Ха. Наличие 2,4-ди-О-сульфатированных единиц усиливает ингибиторную активность антитромбина с помощью 3-связанных  $\alpha$ -фуканов по отношению к тромбину. При замене антитромбина на кофактор II гепарина главным-структурным требованием для проявления активности становится только 4-О-сульфатированная фукозная единица. Присутствие 2-О-сульфатированного фукозного остатка обычно снижает антикоагулянтную активность. Авторы делают вывод, что структурные требования для взаимодействия сульфатированных галактанов и фуканов с серпинами и их протеиназами — мишенями стереоспецифичны и не являются результатом только плотности заряда и содержания серы [103].

### Некоторые сульфатированные полимеры

Многие природные полимеры, такие как хитозан, декстран, галактоманнаны сульфатируют для придания им гепариноподобных свойств.

Хитозан, получаемый с помощью деацетилирования хитина, является малотоксичным и легко разлагаемым полимером [69]. Ряд работ посвящен исследованию сульфатов хитозана [2, 3, 13, 50, 65, 66, 72, 89, 124, 125], а также сульфатов декстрана [73, 81].

Так, отмечено увеличение времени свертывания плазмы крови в тестах активированного частичного тромбопластинового времени, тромбинового и протромбинового времени под влиянием ацильных заместителей по аминогруппе и содержащих четвертичный азот в цепи заместителя по гидроксильным группам [65].

В работе [125] хитин из панцирей крабов рисовых полей (*Somanniathelphusa dugasti*) был превращен в хитозан со степенью ацетилирования 0,21 и затем сульфатирован с помощью хлоруксусной кислоты в N,N-диметилформамиде в полугетерогенных условиях с образованием 87 % водорастворимого сульфата хитозана со степенью замещения 2,13. В результате использования гель-проникающей хроматографии были выделены три фракции с молекулярными массами 71,

35 и 19 кД. Полученные сульфаты хитозана показали высокую антикоагулянтную активность с тем же механизмом действия, что и стандартный гепарин.

При исследовании антикоагулянтной активности *in vitro* и *in vivo* образцов сульфатированного хитозана с молекулярной массой 61 – 82 кД и степенью сульфатирования 1,58 – 1,86 антитромбиновая активность составила 30 – 52 ЕД/мг. Активности против активированного фактора Ха не отмечено [50]. Сульфатированные хитозаны ускоряли ингибирование тромбина, создавая эквимольный комплекс с антитромбином; при концентрации антикоагулянта в плазме  $> 1$  аПа ЕД/мл происходила активация кофактора II гепарина [2]. При совместном внутривенном введении в равных весовых соотношениях нефракционированного гепарина и сульфата хитозана отмечалось усиление антитромботической активности гепарина [3]. Изучали антикоагулянтные свойства сульфатированного N-карбоксиметилхитозана с молекулярными массами 39 кД и 80 кД и содержанием серы 11 % [89].

Производные декстрана: карбоксиметилдекстран сульфат и карбоксиметилдекстран бензиламид сульфонат/сульфат продемонстрировали гепариноподобные свойства, причем второе производное проявило более высокую антикоагулянтную активность. Это явление, вероятно, связано со стерической ролью ароматического заместителя, введенного в полимер, улучшающего взаимодействие с белками крови. Антикоагулянтная активность существенно зависела от содержания серы. Исследовалась структура полученных производных. Показана способность ингибировать тромбин, создавая с ним комплексы, а также ингибировать генерацию тромбина [73, 81].

Фракция галактоманнана, выделенного из эндосперма семян *Senna-macranthera*, с молекулярной массой 2200 кД обладала сродством к антитромбину и продемонстрировала высокую антикоагулянтную активность [107]. Сульфатирование смеси фосфоманнанов из дрожжей приводит к появлению у них антикоагулянтных свойств. В этом аспекте интересен фосфосульфат маннопентаозы. Молекулы этого вещества в основном состоят из пентоманнанов. Однако присутствуют и ди- и тетрасахариды. Средний молекулярный вес составлял 2,3 кД. Практически во всех коагулологических тестах (протромбиновое время, тромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время, Геп-тест, экариновое время, активированное время свертывания) отмечалось удлинение времени свертывания с ростом концентрации исследуемого вещества. Фосфосульфат маннопентаозы демонстрирует ингибирование фактора Па, но не фактора Ха. При этом незначительную нейтрализацию антикоагулянтного эффекта продемонстрировала гепариноза I, в то время как сульфат протамина и фактор 4 тромбоцитов (PF4) нейтрализовали антикоагулянтную активность значительно. Через 15 мин после внутривенного введения фосфосульфата маннопентаозы приматам отме-

чался пятикратный рост уровня ингибитора пути тканевого фактора (ТЕРІ). При инкубации с культурой эндотелиальных клеток отмечался выброс ингибитора пути тканевого фактора. Эти результаты предполагают наличие у фосфосульфата маннопентаозы ярко выраженных антитромботических и антикоагулянтных свойств [44, 133].

В заключение следует отметить, что все сульфатированные природные и полусинтетические полисахариды животного, растительного или микробного происхождения в той или иной степени обладают антикоагулянтным и антитромботическим свойствами. Фармакологическую активность сульфополисахариды проявляют, как правило, катализируя плазменные ингибиторы сериновых протеиназ свертывающей системы крови — антитромбин и/или кофактор гепарина II, образуя с ними эквимольные комплексы. При этом скорость инактивации некоторых факторов коагуляции увеличивается в сотни и тысячи раз. Кроме того, возможно ингибирование генерации сериновых протеиназ — фактора IIa и фактора Xa, либо усиление выброса в кровоток ингибитора пути тканевого фактора или сульфата гепарана из эндотелиальных клеток сосудистой стенки. В некоторых случаях полусинтетические сульфатированные полисахариды прямо ингибируют тромбин без вовлечения плазменных ингибиторов сериновых протеиназ. Значимого прямого ингибирования фактора Xa не отмечено.

## ЛИТЕРАТУРА

- З. С. Баркаган, *Очерки антитромботической фармакопрофилактики и терапии*, Ньюдиамед, Москва (2000).
- Н. Н. Дрозд, Г. В. Башков, В. А. Макаров и др., *Вопр. мед. хим.*, **38**(5), 12 – 14 (1992).
- Н. Н. Дрозд, В. А. Макаров, Г. В. Башков и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **59**(1), 30 – 33 (1996).
- И. М. Ермак, Т. Ф. Соловьева, *Сборник инвестиционных предложений I Международного инвестиционного конгресса "Новейшие технологии в системе интегральных процессов территорий стран АТР"*, Владивосток (2000).
- Т. А. Кузнецова, Н. Н. Беседнова, А. Н. Мамаев и др., *Бюл. экспер. биол.*, **136**(5), 471 – 473 (2003).
- А. В. Максименко, Е. Г. Тищенко, В. Л. Голубых, *Вопр. мед. хим.*, **45**(6), 20 – 25 (1999).
- И. В. Назаров, Н. М. Шевченко, Б. М. Ковалев, Ю. С. Ходимченко, *Биология моря*, **24**(1), 50 – 53 (1998).
- С. М. Струкова, *Тромбозы, кровоточивость и болезни сосудов*, № 2, 21 – 26 (2002).
- А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман, *Основы биохимии*, Мир, Москва (1981).
- А. И. Усов, Г. П. Смирнова, М. И. Билан, А. С. Шашков, *Биорг. химия*, **24**(6), 437 – 445 (1998).
- А. И. Усов, *Материалы II Всероссийской конференции "Химия и технология растительных веществ"*, 91, Казань (2002).
- G. Abatangelo, R. Barbucci, P. Bran, and S. Lamponi, *Biomaterials*, **18**(21), 1411 – 1415 (1997).
- S. Alban, W. Jeske, D. Weize, et al., *Thromb. Res.*, **78**(3), 201 – 210 (1995).
- E. Alberdi, C. S. Hyde, and S. P. Becerra, *Biochemistry*, **37**(30), 10643 – 10652 (1998).
- I. R. Albuquerque, K. C. Queiroz, L. G., Alves, et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **37**(2), 167 – 171 (2004).
- A. P. Alves, B. Mulloy, J. A. Diniz, and P. A. S. Mourao, *J. Biol. Chem.*, **272**(11), 6965 – 6971 (1997).
- A. P. Alves, B. Mulloy, G. W. Moy, et al., *Glycobiology*, **8**(9), 939 – 946 (1998).
- J. Amiral, J. C. Lormeau, A. Marfaing-Koka, et al., *Blood Coagul Fibrinolysis*, **8**(2), 114 – 117 (1997).
- M. Barbanti, F. Calanni, E. Marchi, et al., *Thrombosis Haemost.*, **73**(2), 287 – 290 (1995).
- R. Barbucci, A. Magnani, S. Lamponi, and A. Albanese, *Polym Adv Techn.*, **7**, 675 – 685 (19).
- R. Barbucci, S. Lamponi, A. Magnani, and D. Renier, *Biomaterials*, **19**(7–8), 801 – 806 (1998).
- P. Bendayan, H. Boccalon, D. Dupouy, and B. Boneu, *Thromb Haemost.*, **71**(5), 576 – 580 (1994).
- O. Berteau and B. Mulloy, *Glycobiology*, **13**(6), 29R – 40R (2003).
- N. R. Bijsterveld, A. H. Moons, S. M. Boekholdt, et al., *Circulation*, **106**(20), 2550 – 2554 (2002).
- M. I. Bilan, A. A. Grachev, N. E. Ustuzhanina, et al., *Carbohydr. Res.*, **337**(8), 719 – 730 (2002).
- A. Bisio, S. Guglieri, M. Frigerio, et al., *Carbohydr Polym.*, **55**(1), 101 – 112 (2004).
- M. Black M, *Proc R Soc Med.*, **47**(4), 245 – 249 (1954).
- C. Blondin, F. Chaubet, A. Nardella, et al., *Biomaterials*, **17**(6), 597 – 603 (1996).
- C. Boisson-Vidal, F. Haroun-Bouhedja, M. Ellouali, et al., *Drugs of the Future*, № 20, 1237 – 1249 (1995).
- B. Boneu, J. Necciari, R. Cariou, et al., *Thromb Haemost.*, **74**(6), 1468 – 1473 (1995).
- A. A. Bray, *Tram R Soc Lond B Biol Sci.*, 309(1138), 289 – 322 (1985).
- M. R. Buchanan, S. J. Bliester, and F. Ofosu, *Wien. Klin. Wochenschr.*, **105**(11), 309 – 313 (1993).
- M. R. Buchanan, P. Liao, L. J. Smith, and F. Ofosu, *Thromb. Res.*, **74**(5), 463 – 475 (1994).
- G. C. Calabrese, M. F. Alberto, R. Tubio, et al., *Thromb. Res.*, **113**(3–4), 243 – 250 (2004).
- D. Chabut, A.-M. Fischer, S. Collic-Jouault, et al., *Mol. Pharmacol.*, **64**(3), 696 – 702 (2003).
- S. F. Chavante, E. A. Santos, F. W. Oliveira, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **27**(1), 49 – 57 (2000).
- L. Chevolot, A. Foucault, F. Chaubet, et al., *Carbohydr. Res.*, **319**(1–4), 154 – 165 (1999).
- E. Cofrancesco, M. Colombi, F. Gianese, and M. Cortellaro, *Thromb Res.*, **57**(3), 405 – 414 (1990).
- S. Collic, C. Boisson-Vidal, and J. Jozefonvicz, *Phytochemistry*, **35**(3), 697 – 700 (1994).
- M. Colucci, L. Sardella, M. Barbanti, et al., *Thromb. Res.*, **87**(5), 441 – 446 (1997).
- N. S. Colwell, M. J. Grupe, and D. M. Tollefsen, *Biochim Biophys Acta*, **1431**(1), 148 – 156 (1995).
- A. N. Daud, A. Ahsan, O. Iqbal, et al., *Clin. Appl Thromb. Hemost.*, **7**(1), 58 – 64 (2001).
- M. A. Delorme, L. Xu, L. Berry, et al., *Thromb. Res.*, **90**(4), 147 – 153 (1998).
- M. Demir, O. Iqbal, and D. A. Hoppensteadt, *Clin Appl Thromb Hemost.*, **7**(2), 131 – 140 (2001).
- A. Denuziere, M. Taverna, D. Ferrier, and A. Domard, *Electrophoresis*, **18**(5), 745 – 750 (1997).
- U. R. Desai, *Med Res. Rev.*, **24**(24), 151 – 181 (2004).
- J.-F. Deux, A. Meddahi-Pelle, A. F. Le Blanche, et al., *Letourneur Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, **22**(10), 1604 – 1609 (2002).
- S. Dimitru (eds.), *Polymeric biomaterials*, Marcel Dekker, New York (1994).

49. F. Dol, C. Caranobe, D. Dupouy, et al., *Thromb Res*, **52**(2), 153 – 164 (1988).
50. N. N. Drozd, A. I. Sher, V. A. Makarov, et al., *Tromb. Res.*, **102**(5), 445 – 455 (2001).
51. I. Elalamy, C. Lecraibier, F. Potevin, et al., *Thromb Haemost.*, **74**(5), 1384 – 1385 (1995).
52. M. D. Eriksson, K. A. Bauer, M. R. Lassen, and A. G. Turpie, *Engl. J. Med.*, **345**(18), 1982 – 1304 (2001).
53. M. D. Eriksson, K. A. Bauer, M. R. Lassen, and A. G. Turpie, *Engl. J. Med.*, **345**(18), 1340 – 1342 (2001).
54. W. R. L. Farias, A.-P. Valente, M. S. Pereira, P. A. S. Mourao, *J. Biol. Chem.*, **275**(38), 29299 – 29307 (2000).
55. J. L. Giraux, J. Tapon-Brethaudiere, S. Matou, and A. M. Fischer, *Thromb Haemost.*, **80**(4), 692 – 695 (1998).
56. V. Grauffel, B. Kloareg, S. Mabeau, et al., *Biomaterials*, **10**(6), 363 – 368 (1989).
57. N. S. Gunay and R. J. Linhardt, *Planta Med.*, **65**(4), 301 – 306 (1999).
58. F. Haroun-Bouhedja, E. Mostafa, C. Siquin, and C. Boisson-Vidal, *Thrombosis Research*, **100**(5), 453 – 459 (2000).
59. Y. Hayakawa, T. Hayashi, and J. Lee, *Biochim. Biophys. Acta*, **1543**(1), 86 – 94 (2000).
60. J. P. Hérault, F. Bono, C. Avril, et al., *Biochem Pharmacol.*, **57**(6), 603 – 610 (1999).
61. J. P. Hérault, M. Cappelle, A. Beraat, et al., *Thromb Haem*, **1**(9), 1959 – 1965 (2003).
62. J. M. Herbert, J. P. Hérault, A. Bernatm, et al., *Blood*, **91**(11), 4197 – 4205 (1998).
63. R. G. Holzheimer, *Eur. J. Med. Res.*, **9**(4), 225 – 239 (2004).
64. S. Horstadius, I. J. Lorch, and E. Chargaff, *Exp Cell Res.*, **6**(2), 440 – 452 (1954).
65. R. Huang, Y. Du, J. Yang, and L. Fan, *Carbohydr Res.*, **338**(6), 483 – 489 (2003).
66. K. J. Janes, M. P. Fresneau, A. Marazuela, et al., *J. Cont Rel.*, **73**(2 – 3), 255 – 267 (2001).
67. B. Kloareg and R. S. Quatrano, *Oceanography and Marine Biology*, № 26, 259 – 315 (1988).
68. A. Koenig, K. Norgard-Sumnicht, R. Linhardt, and A. Varki, *J. Clin. Invest.*, **101**(4), 877 – 889 (1998).
69. M. N. V. R. Kumar, *React Fund Polym*, **46**(1), 20 – 27 (2000).
70. M. Kyogashima, J. Onaya, S. Miyauchi, et al., *Thromb. Res.*, **96**(6), 459 – 465 (1999).
71. M. R. Lassen, K. A. Bauer, and B. I. Eriksson, and A. G. G. Turpie, *Lancet*, **359**(9319), 1715 – 1720 (2002).
72. J. Y. Lee, S. H. Nam, S. Y. Im, et al., *J. Cont Rel.*, **78**(1 – 3), 187 – 197 (2002).
73. D. Logeart-Avramoglou, J. Josefowicz, *J. Biomed. Mater. Res.*, **48**(4), 578 – 590.
74. R. Maaroufi, M. Jozefowicz, J. Tapon-Brethaudiere, et al., *Biomaterials*, **18**(4), 359 – 366 (1997).
75. A. Magnani, A. Albanese, S. Lamponi, and R. Barbucci, *Thrombosis Res*, **81**(3), 383 – 395 (1996).
76. G. Mascellani, L. Liversani, B. Parma, et al., *Thromb. Res.*, **84**(1), 21 – 32 (1996).
77. K. H. Masuda, M. Kyogashima, and T. Ishii, *Carbohydr. Res.*, **339**(7), 1339 – 1346 (2004).
78. S. E. Matthiasson, B. Lindblad, U. Stjernquist, and D. Bergqvist, *Haemostasis*, **25**(5), 203 – 211 (1995).
79. C. Mattsson, M. Palm, K. Soderberg, and E. Holmer, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **556**, 323 – 332 (1989).
80. S. Mauray, C. Sternberg, J. Theveniaux, et al., *Thromb. Haemostasis*, **74**(5), 1280 – 1285 (1995).
81. S. Mauray, E. De Raucourt, F. Chaubet, et al., *J. Biomater Sci Polym Ed.*, **9**(4), 373 – 387 (1998).
82. M. P. McGee, H. Teuschler, N. Parthasarathy, and W. D. Wagner, *J. Biological Chemistry*, **270**(44), 26109 – 26115 (1995).
83. F. R. Melo, M. S. Pereira, D. Foguel, and P. A. Mourao, *J. Biol. Chem.*, **279**(20), 20824 – 20835 (2004).
84. R. Minix and V. Doctor, *Thromb. Res.*, **87**(1), 419 – 429 (1997).
85. P. A. S. Mourao and I. G. Bastos, *Eur. J. Biochem.*, **166**(3), 639 – 645 (1987).
86. P. A. S. Mourao and M. S. Pereira, *Trends Cardiovasc. Med.*, № 9, 225 – 232 (1999).
87. P. A. S. Mourao, *Curr. Pharm. Des.*, **10**(9), 967 – 981 (2004).
88. B. Mulloy, A. C. Ribeiro, A. P. Alves, et al., *J. Biol. Chem.*, **269**(35), 22113 – 11123 (1994).
89. R. A. A. Muzzarelli, F. Tanfani, M. Emanuelli, and D. P. Pace, *Carbohydr. Res.*, **126**(2), 225 – 231 (1984).
90. H. B. Nader, M. A. Pinhal, E. C. Bau, et al., *Braz. J. Med. Biol. Res.*, **34**(6), 699 – 709 (2001).
91. H. B. Nader, C. C. Lopes, H. A. Rocha, and E. A. Santos, *Curr. Pharm. Des.*, **10**(9), 951 – 966 (2004).
92. A. Nardella, F. Chaubet, C. Boisson-Vidal, et al., *Carbohydr Res.*, **289**(2), 201 – 208 (1996).
93. T. Nishino, G. Yokoyama, K. Dobash, et al., *Carbohydr. Res.*, **186**(1), 119 – 129 (1989).
94. T. Nishino, H. Kiyohara, H. Yamada, and T. Nagumo, *Phytochemistry*, **30**(2), 535 – 539 (1991).
95. T. Nishino, Y. Kamiguchi, H. Taten, et al., *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi.*, **46**(2), 95 – 101 (1994).
96. T. Nishino, A. Fukuda, T. Nagumo, et al., *Thromb Res.*, **96**(1), 37 – 49 (1999).
97. T. Nishino, T. Yamauchi, M. Horie, et al., *Thromb Res.*, **99**(6), 623 – 634 (2000).
98. A. Ofosu and E. Gray, *Sem Thromb Haem*, **14**(1), 9 – 15 (1988).
99. R. O'Leary and M. Rerek, *J. Biol Pharm Bull.*, **27**(2), 266 – 270 (2004).
100. M. S. Pavao, P. A. Mourao, B. Mulloy, and D. M. Tollefsen, *J. Biol. Chem.*, **270**(52), 31027 – 31036 (1995).
101. M. S. Pavao, K. R. Aiello, C. C. Werneck, et al., *J. Biol. Chem.*, **273**(43), 27848 – 27857 (1998).
102. M. S. Pereira, B. Mulloy, and P. A. S. Mourao, *J. Biol. Chem.*, **274**(43), 7656 – 7667 (1999).
103. M. S. Pereira, F. R. Melo, and P. A. Mourao, *Glycobiology*, **12**(10), 573 – 580 (2002).
104. M. S. Pereira, A. C. Vilela-Silva, A. P. Valente, and P. A. Mourao, *Carbohydr Res.*, **337**(21 – 23), 2231 – 2238 (2002).
105. M. Petitou, J. C. Lormeau, B. Perly, et al., *J. Biol. Chem.*, **263**(18), 8685 – 8690 (1988).
106. M. Petitou, J. P. Hérault, A. Bernat, et al., *Nature*, **398**(6726), 417 – 422 (1999).
107. L. Pires, P. A. J. Gorin, F. Reicher, and M.-R. Sierakowski, *Carbohydr. Polym.*, **46**, 165 – 169 (2001).
108. L. Poller and J. M. Thomson (eds.), *Thrombosis and its management*, Churchill Livingstone, New York and Tokyo (1993).
109. N. M. Ponce, C. A. Pujol, E. B. Damonte, et al., *Carbohydrate Res.*, **338**(2), 153 – 165 (2003).
110. N. Rao, K. V. Sastry, and E. V. Rao, *Phytochemistry*, **23**(11), 2531 – 2533 (1984).
111. A. C. Ribeiro, R. P. Viera, P. A. S. Mourao, and B. A. Mulloy, *Carbohydrate Res.*, **255**(2), 225 – 240 (1994).
112. H. A. O. Rocha, C. R. C. Franco, E. S. Trindade, et al., *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **34**(5), 621 – 626 (2001).
113. D. N. Ross, *Br. Heart J.*, **13**(1), 56 – 60 (1951).
114. M. F. Scully, V. Ellis, N. Seno, and V. V. Kakkar, *Bioch J.*, **254**(2), 547 – 551 (1988).
115. M. F. Scully, V. Ellis, N. Shah, and V. V. Kakkar, *Bioch J.*, **262**(2), 651 – 658 (1989).
116. A. K. Singla and M. Chawla, *J. Pharm. Pharmacol.*, **53**(8), 1047 – 1067 (2001).

117. D. M. Tollefsen, D. W. Majeris, and M. K. Blank, *J. Biol. Chem.*, **257**(5), 2162 – 2169 (1982).
118. D. M. Tollefsen, M. E. Peacock, and W. J. Monafu, *J. Biol. Chem.*, **261**(19), 8854 – 8858 (1986).
119. F. Trento, F. Cattaneo, R. Pescador, et al., *Thromb. Res.*, **102**(5), 457 – 465 (2001).
120. A. G. G. Turpie, M. N. Levine, J. Hirsh, et al., *Lancet*, **1**(8535), 522 – 526 (1987).
121. A. G. G. Turpie, K. Bauer, B. I. Eriksson, and M. R. Lassen, *Lancet*, **360**(9339), 1721 – 1726 (2002).
122. A. G. G. Turpie, K. Bauer, B. I. Eriksson, and M. R. Lassen, *Arch Intern Med.*, **162**(16), 1833 – 1840(2002).
123. A. C. Vilela-Silva, A. P. Alves, and A. P. Valente, *Glycobiology*, **9**(9), 927 – 933 (1999).
124. A. C. Vilela-Silva, M. O. Castro, A. P. Valente, et al., *Journal of Biological Chemistry*, **277**(1), 379 – 387 (2002).
125. P. Vongchan, W. Sajomsang, and D. Subyen, P. Kongtawelert, *Carbohydr. Res.*, **337**(13), 1233 – 1236 (2002).
126. K. A. Vyas, H. V. Patel, A. A. Vyas, and W. Wu, *Biochemistry*, **37**(13), 4527 – 4534 (1998).
127. J. Walenga, M. Koza, B. Lewis, and R. Pifarre, *Clin Appl Thromb Hemost.*, **2** (suppl 1), S21 (1996).
128. J. Walenga, W. Jeske, L. Bara, et al., *Thromb Res.*, **86**(1), 1 – 36 (1997).
129. J. Walenga, W. Jeske, D. Hoppensteadt, and J. Fareed, *Current Opinion in investigational Drugs*, **4**(3), 272 – 281 (2003).
130. D. Wall, S. Douglas, V. Ferro, et al., *Thromb Res.*, **103**(4), 325 – 335 (2001).
131. H. C. Whinna, M. A. Blinder, M. Szewczyk, et al., *J. Biol. Chem.*, **266**(13), 8129 – 8135(1991).
132. P. N. Walsh, *J. Thromb. Haem.*, **1**(10), 2081 – 2086 (2003).
133. G. Yu, N. S. Gunay, R. T. Linhardt, et al., *Eur. J. Med. Chem.*, **37**(10), 783 – 791 (2002).

Поступила 18.03.05

## ANTICOAGULANT ACTIVITY OF SULFATED POLYSACCHARIDES

N. N. Drozd<sup>1</sup>, G. E. Bannikova<sup>1</sup>, V. A. Makarov<sup>1</sup>, and V. P. Varlamov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Laboratory of Hemostasis Pathology and Pharmacology, Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Novo-Zykovskii proezd 4a, Moscow, 125167, Russia

<sup>2</sup> Laboratory of Enzyme Engineering, Bioengineering Research Center, Russian Academy of Sciences, pr. 60-Letiya Oktyabrya 7/1, Moscow, 117312, Russia

The paper reviews published data on the chemical structure of sulfated polysaccharides of animal, plant, and microbial origin as well as synthetic or semi-synthetic derivatives, and on the anticoagulant activity of these compounds *in vitro* and *in vivo*. The influence of sulfated polysaccharides on the plasma and cell hemostasis links is considered. Relationships between the structure and activity and the mechanisms of action are discussed.