

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

СВЯЗЬ МЕЖДУ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ СУЛЬФАТИРОВАННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИСАХАРИДОВ И РАЗМЕРОМ ОБЛАСТИ ИХ ПРЕЦИПИТАЦИИ С ПОЛИКАТИОНАМИ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ БИСПЕЦИФИЧНОГО ЭЛЕКТРОФОРЕЗА

А. А. Кужим¹, Н. Н. Дрозд¹, М. А. Торлопов², А. В. Ильина³

При проведении горизонтального биоспецифического электрофореза полианионы (в количественном диапазоне 1,5–6 мкг) — сульфаты целлюлозы, полученные на основе полисахарида, выделенного из *Gossypiumhirsutum L.*, сульфаты инулина, полученные на основе полисахарида, выделенного из *Helianthus tuberosus*, сульфаты пектина, полученные на основе полисахарида, выделенного из *Abies sibirica Ledeb.*, образуют пики преципитации с поликатионом сульфатом протамина. Только сульфаты целлюлозы (в количественном диапазоне 0,38–6 мкг) образуют пики преципитации с поликатионом хитозаном (мол. масса 10 кДа, степень дезацетилирования 85%). Увеличение антикоагулянтной активности сульфатов целлюлозы и сульфатов инулина и сульфатов пектина приводит к увеличению высоты области преципитации с сульфатом протамина (в количественном диапазоне 1,5–6 мкг). Размеры области преципитации с хитозаном снижаются с увеличением антитромбиновой активности сульфатов целлюлозы.

Ключевые слова: сульфаты целлюлозы; сульфаты инулина; сульфаты пектина; биоспецифический электрофорез; антикоагулянтная активность

ВВЕДЕНИЕ

Нефракционированный гепарин (НФГ) — высокомолекулярный (5–40 кДа) гликозаминогликан (относится к сульфатированным полисахаридам, СП) обладает сильными кислотными свойствами. В клинической практике известен как антикоагулянт (АК) прямого действия с равной ингибиторной активностью по отношению к ключевым ферментам свертывания — тромбину и фактору Ха [14]. Введение НФГ используют для профилактики и лечения тромбозов. Его основной побочный эффект — кровотечения, которые можно контролировать либо отменной, либо медленным внутривенным введением сульфата протамина (СПТ) — смеси основных полипептидов, получаемой из молоки лосося [10]. Остатки аргинина (67%) придают молекулам положительный заряд, за счет которого СПТ прочно связывается с анионными центрами гепарина и “разбивает” комплексы гепарин — антиромбин.

НФГ и СПТ обладают рядом побочных эффектов [10, 14]. В настоящее время проводится поиск как АК из ряда СП растительного происхождения [7, 15], так и антидотов к ним среди таких катионных полисахаридов как декстран или гидроксипропилцеллюлоза [9]. С анионными группами НФГ связывается и полисахарид хитозан

[1, 11], который получают из панцирей красноногих крабов и из низших грибов путём удаления у ацетильных групп хитина. За счет большого количества свободных аминогрупп хитозан при растворении в кислой области рН проявляет свойства поликатиона.

Цель работы — анализ связи между антикоагулянтной активностью сульфатов целлюлозы (СЦ), полученной на основе целлюлозы из *Gossypiumhirsutum L.*, сульфатов инулина (СИ), синтезированного на основе полисахарида из *Helianthus tuberosus*, сульфатов пектина (СПКТ), полученных сульфатированием выделенного из *Abies sibirica L.* пектина, и размерами пиков преципитации с сульфатом протамина или хитозаном при биоспецифическом электрофорезе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходные полисахариды: целлюлоза из хлопка (ГОСТ 595–79 марка 35, Ферганский химический завод, Узбекистан). На этапе подготовки к синтезу отбелена и частично гидролизована разбавленной соляной кислотой для снижения молекулярной массы в лаборатории химии растительных полимеров Института химии Коми НЦ. Инулин (MP Biomedicals, LLS), мол. масса $5 \cdot 10^3$ Да, использовали без очистки. Пектин выделен из хвои пихты сибирской методом водной экстракции; для подготовки к синтезу декатионирован и очищен методом диализа, после чего лиофильно высушен в лаборатории химии растительных полимеров Института химии Коми НЦ. Методы синтеза: СЦ получали по методу, подробно описанному в работе [5]. ИК (KBr) см^{-1} : 3400 ν_{ac} (ОН), 1240 ν_{ac} sp (S=O); 810 ν_{ac} (C-OS); ЯМР ^{13}C (D_2O), δ , м.д. (I, Гц): 100,8; 79,2; 78,1; 75,1 и 73,3; 66,7. СИ получали этерификацией инулина комплексом пиридин- SO_3 в ДМФА

¹ Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза (зав. — проф. В. А. Макаров) ФГБУ Гематологический научный центр МЗ РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4.

² Лаборатория химии растительных полимеров (зав. — Е. В. Удоргина) ФГБУ Институт химии Коми научного центра УрО РАН, 167982, Сыктывкар, ул. Первомайская, 48.

³ Лаборатория инженерии ферментов (зав. — проф. В. П. Варламов) ФГБУ Центр “Биоинженерия” РАН, 117312, Москва, пр-т 60-летия Октября, 7/1.

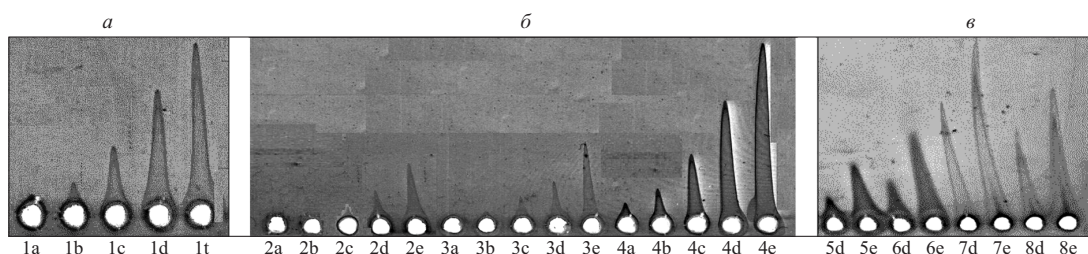


Рис. 1. Области преципитации сульфатов полисахаридов с сульфатом протамина (*a* — нефракционированный гепарин; *b* — сульфаты целлюлозы; *v* — сульфаты инулина и сульфаты пектина).

1 — НФГ; 2 — СЦ1; 3 — СЦ2; 4 — СЦ3; 5 — СИ1; 6 — СИ2; 7 — СПКТ2; 8 — СПКТ1.

Количество вносимых в лунки геля агарозы сульфатов полисахаридов: *a* — 0,38 мкг; *b* — 0,75 мкг; *c* — 1,5 мкг; *d* — 3 мкг; *e* — 6 мкг

(N,N-диметилформамид) при 25 °С. Полученный полимер осаждали ацетоном, обрабатывали 4 % раствором NaOH и очищали многократным промыванием водным этиловым спиртом. Для окончательной очистки переосаждали из воды и сушили в вакууме при 60 °С до постоянной массы. ИК (KBr) см^{-1} : 3404 ν_{ac} (OH), 2096 $\nu(\text{CH}_2)$; 1165 (S=O); 817 ν_{ac} (C-OS). ЯМР ^{13}C (D_2O) δ , м.д. (I, Гц) 103,84; 81,70; 77,73; 75,02; 61,66 [4]. СПКТ синтезировали действием ClSO_3H в ДМФА. Пектин выдерживали в течение ночи в ДМФА, затем к набухшему полимеру при охлаждении и перемешивании прибавляли предварительно приготовленный раствор ClSO_3H в ДМФА. Полученный раствор выдерживали 60 мин при 25 °С, затем осаждали ацетоном, обрабатывали 4 % раствором NaOH и очищали многократным промыванием водным этиловым спиртом. ИК (KBr) см^{-1} : 3404 ν_{ac} (OH), 1676 ν (COO^-); 1242 ν_{ac} (S=O); 812 ν_{ac} (C-OS). ЯМР ^{13}C (D_2O) δ , м.д. (I, Гц) 169,82; 106,21; 98,53; 85,56; 81,44; 77,36; 72,78; 66,92; 58,11; 54,24; 17,60.

Спектры ЯМР ^{13}C записаны на приборе Bruker Avance II 300 (рабочая частота 75 МГц) в D_2O . ИК спектры образцов записаны на спектрометре Prestige-21, в таблетках KBr в области 700 – 4000 см^{-1} . Элементный анализ образцов (определение серы) осуществляли на приборе EA-1110 фирмы “CEInstruments” после сжигания образца в токе кислорода с хроматографической регистрацией продуктов. Степень сульфатированности (СС) в препаратах находили по уравнению:
$$\text{СС} = \frac{k\omega_s}{3200 - \omega_s \cdot 102}$$
 где k — моле-

кулярная масса элементарного звена полисахарида, ω_s — содержание серы в образце (масс. %). Молекулярную массу образцов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для анализа использовали хроматографическую систему “Shimadzu” (Япония): насос LC-20AD, термостат СТО-10AS, рефрактометр RID-10A, колонка ShodexOHpacSB804 HG (8 мм × 30 см). Элюирование проводили 0,15 М NaCl при 40 °С со скоростью потока 0,3 $\text{см}^3/\text{мин}$. Для калибровки колонки использовали стандарты пулуллана (Fluka) с ММ в диапазоне 1,3 – 200 · 10³ Да.

Для определения АК активности образцов СЦ, СИ и СПКТ применяли бедную тромбоцитами плазму человека. В качестве препарата сравнения брали НФГ (“Белмед-препарат” аПа = 160 ЕД/мл; аХа = 148 ЕД/мл). Для расчета антитромбиновой (аПа) [12] и анти-фактор Ха (аХа)

[13] активностей исследуемых полианионов использовали калибровочные кривые 5-го Международного стандарта НФГ и тесты НПО “Ренам” (Россия), активированное частичное тромбопластиновое время и РеаКлот — Гепарин. Фибриновые сгустки плазмы фиксировали на коагулометре Минилаб 701-М.

Биоспецифический электрофорез комплексов исследованных АК полианионов с поликатионами (хитозан с мол. массой 10 кДа, степенью дезацелирования 85 %, полученный в лаборатории инженерии ферментов Центра “Биоинженерия” РАН ферментативным гидролизом по методу [2] из высокомолекулярного крабового хитозана, (ЗАО “Биопрогресс”, Россия) и СПТ (“Sigma”) проводили на стеклянных пластинках, покрытых слоем 1 % агарозы в 0,1 М натрий фосфатном буфере рН 6,8 толщиной 1 мм, содержащем один из поликатионов [1]. Пробирку с агарозой и буфером помещали в водяную баню, доводили до кипения. После растворения агарозы добавляли в пробирку СПТ или хитозан в концентрации 1 мг/мл. В застывшем геле водоструйным насосом и пробойником вырезали лунки. При помощи шприца Hamilton (“Bonaduz”, Швейцария) заполняли лунки растворами полисахаридов (0,125 – 2 мг/мл) в объеме 3 мкл. Стеклопластины с гелем помещали в камеру для горизонтального электрофореза (“ДНК-технология”, Москва). Электрофорез проводили, поместив смоченную буфером фильтровальную бумагу (8 × 8 см) одним концом на край геля, а другим в буфер. Включив водяное охлаждение (приставка-змеевик от камеры для электрофореза, ЛКВ, Швеция) под камерой и источник питания Эльф 4 (“ДНК-технология”, Мо-

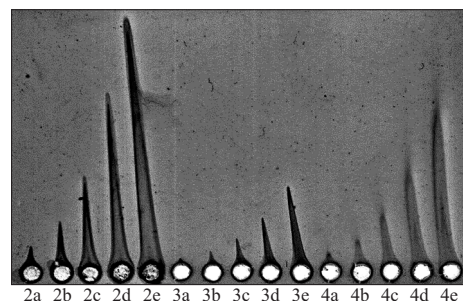


Рис. 2. Области преципитации сульфатов целлюлозы с хитозаном.

2 — СЦ1; 3 — СЦ2; 4 — СЦ3.

Количество вносимых в лунки геля агарозы сульфатов полисахаридов: *a* — 0,38 мкг; *b* — 0,75 мкг; *c* — 1,5 мкг; *d* — 3 мкг; *e* — 6 мкг.

сква) в течение 66 мин при мощности 300 В, силе тока 70 мА проводили электрофорез. Преципитаты поликатион — полианион окрашивали 0,1 % раствором альцианового синего в 3 % уксусной кислоте. Избыток красителя смывали 3 % уксусной кислотой. Пластины с высохшим гелем сканировали, переводили изображение в формат JPG, оценивали высоту и площадь пиков преципитации с помощью программы Photo M 1,31.

Для расчета стандартных ошибок средних величин (по 4 – 10 независимым определениям) и достоверности различий в сравниваемых рядах данных использовали программу StagraphicsPlus 6.0 и критерий Колмогорова — Смирнова.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Структурные параметры и АК активность исследуемых соединений приведены в табл. 1. Показано, что АК полианионы, перемещаясь при электрофорезе, образуют пики преципитации с добавленными в гель СПТ (рис. 1, а, б, в) или хитозаном (рис. 2).

При добавлении антикоагулянтов в лунки агарозы в количестве 0,38 мкг пики преципитации с СПТ в форме “ракеток” наблюдали только для НФГ и СЦ3. При добавлении в количестве 0,75 мкг пики преципитации не наблюдали для СЦ1 (табл. 2). С увеличением количества АК в лунке от 1,5 до 6 мкг для всех исследованных соединений отмечали возрастание высоты пиков преципитации с СПТ (рис. 1, табл. 2). Диапазон аПа активностей образцов СЦ составил 45,4 – 122,7 ЕД/мг, аХа активности были в 2 – 12 раз меньше (табл. 1). С увеличением количества СЦ1 (с наименьшей АК активностью) в лунках от 1,5 до 6 мкг высота пиков преципитации возрастала от $1,73 \pm 0,44$ до $14,25 \pm 0,75$ мм (табл. 2) и была достоверно ниже по сравнению с НФГ ($p = 0,0032 - 0,037$). Добавление образцов СЦ2 и СЦ3 (с большими аПа активностями) в таком же количестве приводило к пикам преципитации с высотой от $4 \pm 0,89$ до $36,1 \pm 4,12$ мм. Для СЦ2 (1,5 и 6 мкг) и СЦ3 (0,38, 0,75, 3 и 6 мкг) не обнаружили достоверных различий с высотой пиков преципитации для НФГ ($p = 0,11$ и $0,5$; $p = 0,12 - 0,43$, соответственно). Однако наблюдали достоверное снижение размеров области преципитации для СЦ2 (0,75; 3 мкг) и СЦ3

(1,5 мкг), в сравнении с НФГ ($p = 0,028$ и $0,041$; $p = 0,026$).

Высота пиков преципитации с увеличением количества СИ1 и СИ2 (с аПа активностью $5,5 \pm 1,4$ и $8,2 \pm 1,2$ ЕД/мг; табл. 1) от 0,75 до 6 мкг достоверно не различалась и составила $0,57 \pm 0,3 - 13,87 - 2,22$ мм и $0,75 \pm 0,23 - 18 \pm 3,64$ мм, соответственно (табл. 2). Для СИ1 в диапазоне 0,75 – 6 мкг, а для СИ2 в количестве 0,75; 1,5 и 6 мкг высота пиков преципитации была достоверно ниже, чем таковая при добавлении НФГ ($p = 0,0068 - 0,047$; $p = 0,0068 - 0,037$, соответственно). Размеры пиков преципитации образцов СПКТ1 и СПКТ2 (аПа активность $29,3 \pm 1,9$ и $38,7 \pm 2,5$ ЕД/мг, соответственно) при добавлении в количестве 0,75 – 6 мкг составили $1,2 \pm 0,2 - 13,25 \pm 0,48$ мм и $1,92 \pm 0,27 - 19,4 \pm 0,81$ мм, соответственно (табл. 2). При добавлении в количественном диапазоне 1,5 – 6 мкг наблюдали достоверные различия ($p = 0,005 - 0,037$) между размерами пиков преципитации. Высота пиков преципитации СПКТ1 была достоверно ниже, чем таковая для НФГ ($p = 0,0068 - 0,028$), а высота пиков преципитации СПКТ2 не отличалась от показаний для НФГ ($p = 0,07 - 0,18$).

Между показаниями для исследованных соединений с антитромбиновой активностью ниже 70 ЕД/мг (СЦ1, СИ и СПКТ) и НФГ, при сравнении в равных количествах, наблюдали достоверное снижение высоты пиков преципитации с СПТ ($p < 0,05$), табл. 2. При добавлении в лунки геля агарозы СЦ3 (аПа > 70 ЕД/мг, степень сульфатирования 2,4), размеры пиков преципитации либо не отличались, либо были достоверно больше, чем таковые для НФГ ($p < 0,05$). Однако размеры пиков преципитации с СЦ2 (аПа > 70 ЕД/мг, степень сульфатирования 1,5) были достоверно ниже, чем для НФГ.

С увеличением количества в лунке СЦ наблюдали возрастание высоты пиков преципитации с хитозаном ($p = 0,037$), рис. 2, табл. 3. Высота пиков преципитации для СЦ1 и СЦ3 в количествах 0,38; 1,5; 3 и 6 мкг не различались и составили $4,38 \pm 0,85 - 58,75 \pm 4,13$ мм и $4,13 \pm 0,66 - 46 \pm 2,16$ мм, соответственно (табл. 3). Наименьшие размеры пиков преципитации были у самого АК

Таблица 1. Структурные характеристики и антикоагулянтная активность гепарина, сульфатов целлюлозы, инулина и пектина

Соединение	Шифр	Исходный полисахарид	Степень сульфатирования	Мол. масса, кДа	Антикоагулянтная активность, ЕД/мг	
					аПа	аХа
Сульфат целлюлозы	СЦ1	МКЦ, хлопчатник (<i>Gossypium hirsutum</i> L.)	0,8	22	$45,4 \pm 1,5$	$21,9 \pm 1,8$
	СЦ2		1,5		$122,7 \pm 2,4$	$12,7 \pm 2,5$
	СЦ3		2,4		$87,9 \pm 24,5$	$7,4 \pm 1,6$
Сульфат инулина	СИ1	Инулин, топинамбур (<i>Helianthus tuberosus</i>)	0,6	8	$5,5 \pm 1,4$	0
	СИ2		1,6		$8,2 \pm 1,2$	$0,4 \pm 0,1$
Сульфат пектина	СПКТ1	Пектин, пихта сибирская (<i>Abies sibirica</i> L.)	0,8	24	$29,3 \pm 1,9$	$9,8 \pm 0,5$
	СПКТ2		1,1		$38,7 \pm 2,5$	$13,3 \pm 1,5$
НФГ	НФГ	Гликозаминогликан, легкие КРС	1,8	15	160	148

Примечание. МКЦ — микрокристаллическая целлюлоза; НФГ — нефракционированный гепарин; КРС — крупный рогатый скот.

активного СЦ2 (высота пиков преципитации $0,88 \pm 0,13 - 27,05 \pm 2,54$ мм).

Структура молекулы целлюлозы представлена длинно-цепочечным полисахаридом, состоящим из остатков глюкозы, связанных между собой 1,4-β-гликозидными связями [6]. Макромолекула инулина построена из 30 – 35 остатков D-фруктозы в фуранозной форме, соединённых β(2 → 1) связями и содержит остаток глюкозы на редуцирующем конце макромолекулы [6, 11]. Пектин, выделенный из пихты сибирской представляет нерегулярный гетерополисахарид, основная цепь которого состоит из частично этерифицированной полигалактуроновой кислоты, а также включает арабинофуранозу, галактопиранозу и другие моносахариды в виде дополнительных моносахаридных звеньев основной цепи и боковых цепочек [3].

Полученные результаты показали, что при одинаковой мол. массе (22 кДа) образцов СЦ1 и СЦ2 с увеличением степени сульфатирования почти в 2 раза АК активность достоверно увеличивается в 2,7 раза, а высота пиков преципитации с СПТ возрастает в 1,4 – 2,3 раза (в количественном диапазоне 1,5 – 6 мкг). Ранее установлено увеличение антикоагулянтной активности СЦ (мол. масса 11 – 35 кДа), полученной на основе микрокристаллической целлюлозы, с увеличением степени сульфатирования в диапазоне 1,1 – 1,7 [15]. Увеличение количества серы в диапазоне 12 – 16,8 %, приводящее к возрастанию аХа активности сульфатов хитозана (мол. масса 9 – 56 кДа) и размеров их пиков преципитации с СПТ, продемонстрировано [8]. Дальнейшее увеличение у СЦ3 степени сульфатирования в 1,6 раз и мол. массы более чем в 2 раза, в сравнении с СЦ2, приводит к снижению аПа активности, но достоверному увеличению высоты пиков преципитации до 2,5 – 5,6 раз (в количественном

диапазоне 1,5 – 6 мкг), что свидетельствует о сложной связи между АК активностью образцов СЦ и размером пиков преципитации с СПТ в исследуемом количественном диапазоне.

Размеры пиков преципитации СПКТ с одинаковой мол. массой (24 кДа) и достоверно различающейся в 1,3 раза аПа активностью (в диапазоне 30 – 40 ЕД/мг), возрастающей с увеличением СС в 1,4 раза, достоверно увеличивались (при внесении в количестве 1,5 – 6 мкг) в 1,4 – 2,3 раза. Наличие АК активности у сульфата пектина цитрусовых со степенью сульфатирования 0,15 также показали [7]. Для образцов СИ1 и СИ2 с одинаковой мол. массой (8 кДа) и низкой АК активностью (< 10 ЕД/мг) достоверное увеличение высоты пиков преципитации с увеличением степени сульфатирования в 2,7 раза не обнаружили. Однако для последующего анализа влияния исследованных сульфатов полисахаридов на величину пиков преципитации с СПТ потребуется дополнить и расширить группы соединений, как минимум 5 – 7 образцами с различающимися мол. массами.

При анализе высоты пиков преципитации с СПТ между НФГ и наиболее активными образцами СЦ (с аХа активностью в 10 – 20 раз меньшей, чем у НФГ) следует отметить, что при сравнимой (с НФГ) аПа активности взаимодействие СЦ с СПТ может оказаться преимущественным при последующем анализе нейтрализации АК эффекта. В некоторых случаях достоверное увеличение размера “ракеток” с СЦ3, в сравнении с НФГ, вероятно, можно объяснить большей (в 3 раза) мол. массой.

Так как гепарины с мол. массой 3 – 14 кДа и сульфаты хитозана с мол. массой 9 – 56 кДа формируют пики преципитации и с хитозаном (мол. масса 6 – 21 кДа; СД 61 – 93 %) [8], мы исследовали подвижность образцов СЦ, СИ и СПКТ при проведении биоспецифичного элек-

Таблица 2. Высота (в мм) области преципитации сульфатов полисахаридов с сульфатом протамина

Шифр соединений	Количество сульфатов полисахаридов, мкг				
	0,38	0,75	1,5	3	6
НФГ	$1,14 \pm 0,26$	$2,9 \pm 0,4$	$6,83 \pm 0,92$	$15,39 \pm 1,63$	$24,75 \pm 2,13$
СЦ1	0	0	$1,73 \pm 0,44$	$4,4 \pm 0,51$	$14,25 \pm 0,75$
СЦ2	0	$1,48 \pm 1,24$	$4,0 \pm 0,89$	$9,0 \pm 7,8$	$20,4 \pm 1,51$
СЦ3	$2,4 \pm 0,58$	$4,33 \pm 0,75$	$9,75 \pm 1,17$	$21,8 \pm 2,63$	$36,1 \pm 4,12$
СИ1	0	$0,57 \pm 0,3$	$2,08 \pm 0,52$	$7,33 \pm 0,96$	$13,87 \pm 2,22$
СИ2	0	$0,75 \pm 0,23$	$2,44 \pm 0,59$	$8,19 \pm 2,03$	$18,0 \pm 3,64$
СПКТ1	0	$1,2 \pm 0,2$	$2,17 \pm 0,4$	$7,25 \pm 0,86$	$13,25 \pm 0,48$
СПКТ2	0	$1,92 \pm 0,27$	$5,0 \pm 0,51$	$10,0 \pm 0,41$	$19,4 \pm 0,81$

Примечание. * — $p < 0,05$, достоверность различий с показаниями для НФГ; $n = 4 - 10$.

Таблица 3. Высота (в мм) области преципитации сульфатов целлюлозы с хитозаном

Шифр соединения	Количество сульфатов полисахаридов, мкг				
	0,38	0,75	1,5	3	6
СЦ1	$4,38 \pm 0,85$	$10,3 \pm 0,63$	$20,25 \pm 1,03$	$38,13 \pm 2,64$	$58,75 \pm 4,13$
СЦ2	$0,88 \pm 0,13^*$	$2,38 \pm 0,25^*$	$6,0 \pm 0,71^*$	$12,25 \pm 1,03^*$	$27,05 \pm 2,54^*$
СЦ3	$4,13 \pm 0,66$	$7,75 \pm 0,63^*$	$17,75 \pm 1,65$	$31,75 \pm 2,69$	$46,0 \pm 2,16$

трофореза с поликатионом хитозаном. При постановке электрофореза с хитозаном в условиях, идентичных проведению электрофореза с СПТ, наблюдали пики преципитации только с СЦ, так как пики преципитации с НФГ, СИ и СПКТ выходили за пределы стекла и возможности их охарактеризовать не представилось. Оказалось, что при одинаковой мол. массе (СЦ1 и СЦ2) с увеличением СС и АК активности размеры пиков преципитации достоверно уменьшались в 2,2 – 5 раз ($p < 0,05$). Дальнейшее увеличение мол. массы и СС (образец СЦ3) приводило к снижению АК активности и возрастанию высоты “ракеток”. По всей вероятности, различия в зависимости размеров пиков преципитации от АК активности образцов СЦ можно объяснить различными физико-химическими характеристиками гелей с хитозаном и СПТ, связанными со структурными отличиями поликатионов. Обращает на себя внимание тот факт, что для появления пиков преципитации с хитозаном минимальное количество сульфата целлюлозы СЦ1 в 4 раза меньше, чем требуется для преципитации с СПТ. Несмотря на различия, влияющие на передвижение преципитатов СЦ-СПТ/хитозан в геле при электрофорезе, наличие связывания между этими соединениями позволит использовать в последующих наших работах СПТ и хитозан для оценки нейтрализации АК активности СЦ *in vitro* и *ex vivo*.

ВЫВОДЫ

1. Исследованные антикоагулянты полианионы — сульфаты целлюлозы, сульфаты инулина и сульфаты пектина — образуют пики преципитации с сульфатом протамина при проведении электрофореза. В идентичных условиях проведения электрофореза с хитозаном оценить размеры пиков преципитации можно только с сульфатами целлюлозы.

2. С увеличением антикоагулянтной активности сульфатов целлюлозы и сульфатов пектина высота области преципитации с сульфатом протамина увеличивается при анализе в количественных диапазонах полианионов 1,5 – 6 мкг.

3. Размеры области преципитации с хитозаном (мол. масса 10 кДа, степень деацетилирования 85 %) снижаются с увеличением антитромбиновой активности сульфатов целлюлозы.

Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 12-П-3-1027.

ЛИТЕРАТУРА

1. Н. Н. Дрозд, А. С. Толстенков, В. А. Макаров и др., Патент РФ № 2006141290 (2008), Бюллетень № 15.
2. А. В. Ильина, Ю. В. Ткачева, В. П. Варламов, *Прикладная биохимия и микробиология*, **38**(2), 132 – 135 (2002).
3. Е. Н. Макарова, Е. Г. Шахматов, *Хим. раст. сырья*, № 3, 59 – 64 (2011).
4. Д. В. Тарабукин, М. А. Торлопов, В. В. Володин, *Вестн. биотехнол.*, **7**(2), 32 – 38 (2011).
5. М. А. Торлопов, *Химия в интер. устойчивого развития*, **19**(5), 555 – 559 (2011).
6. Л. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит и др., *Основы биохимии*, Мир, Москва (1981).
7. I. Bae, Y. Joe, H. Rha, et al., *Food Hydrocolloids*, **23**(7), 1980 – 1983 (2009).
8. N. Drozd, V. Makarov, A. Tolstenkov, et al., (ed.: V. Varlamov, S. Bratskaya, I. Yakovleva, S. Senel), *Advance in chitin science*, Volume XI, (2011), 76 – 81.
9. K. Kamiński, M. Płonka, J. Ciejka, et al., *J. Med. Chem.*, **54**(19), 6586 – 6596 (2011).
10. M. Pai, M. Crowther, *Handb Exp Pharmacol*, **207**, 265 – 277 (2012).
11. C. Stevens, A. Meriggi, K. Booten, *Biomacromolecules*, **2**(1), 1 – 16 (2001).
12. A. Teien, M. Lie, *Thromb. Res.*, **10**(3), 399 – 410 (1977).
13. A. Teien, M. Lie, U. Abildgaard, *Thromb. Res.*, **8**(3), 413 – 416 (1976).
14. C. Tripathi, J. Banga, V. Mishra, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **94**(2), 307 – 321 (2012).
15. Z. Wang, L. Li, B. Zheng, N. Normakhamatov, *Int. J. Biol. Macromol.*, **41**(4), 376 – 382 (2007).

Поступила 12.03.13

RELATIONSHIP BETWEEN THE ANTICOAGULANT ACTIVITY OF SULFATED PLANT POLYSACCHARIDES AND THE AREA OF THEIR PRECIPITATION WITH POLYCATIONS DURING BIOSPECIFIC ELECTROPHORESIS

A. A. Kuzhim¹, N. N. Drozd¹, M. A. Torlopov², and A. V. Il'ina³

¹ Scientific Hematological Center, Russian Academy of Medical Sciences, Novo-Zykovskii proezd 4a, Moscow, 125167, Russia.

² Institute of Chemistry, Komi Scientific Center, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, ul. Pervomaiskaya 48, Syktyvkar, Komi Republic, 167982, Russia.

³ Centre for Bioengineering, Russian Academy of Sciences, Prospekt 60-Letiya Oktyabrya 7/1, Moscow, 117312, Russia

Polyanions (in an amount within 1.5 – 6.0 mg), including cellulose sulfates (excreted from *Gossypium hirsutum* L., molecular weight 22.0 kDa, degree of sulfation within 0.8 – 1.8), inulin sulfates (excreted from *Helianthus tuberosus*, molecular weight 8,0 kDa, degree of sulfation within 0.6 – 1.6), pectin sulfates (excreted from *Abies sibirica* L., molecular weight 24.0 kDa, degree of sulfation within 0.8 – 1.1), give rise to peaks of precipitation with polycations of protamine sulfate. Only cellulose sulfates (in amount within 0.38 – 6.00 mg) give the peaks of precipitation with chitosan polycations (molecular weight 10 kDa, degree of deacetylation 85%) during horizontal biospecific electrophoresis. The height of the peak of precipitation with protamin sulfate was found to grow with increasing antithrombin activity of cellulose sulfates and pectin sulfate (for polyanions in an amount within 1.5 – 6 mg). The size of the area of precipitation with chitosan was found to decrease with increasing antithrombin activity of cellulose sulfates.

Keywords: cellulose sulfate; inulin sulphate; pectin sulphate; biospecific electrophoresis; anticoagulant activity