

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ЗАВИСИМОСТЬ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТИ КРАХМАЛА И ИНУЛИНА ОТ СТЕПЕНИ СУЛЬФАТИРОВАНИЯ

Н. Н. Дрозд¹, М. А. Торлопов², А. А. Кужим¹, В. А. Макаров¹

Исследовали связь между степенью сульфатирования и антикоагулянтной активностью сульфатов крахмала, выделенного из *Solanum tuberosum* (молекулярная масса 25000 – 30000 Д; степень сульфатирования 0,4 – 2,5) и сульфатов инулина, выделенного из *Helianthus tuberosus* (молекулярная масса 7000 – 8000 Д; степень сульфатирования 0,6 – 1,6). Сульфаты крахмала и инулина увеличивают время появления фибринового сгустка плазмы в коагулологических тестах и опосредованно (через антитромбин) снижают скорость гидролиза тромбином хромогенного субстрата. Антитромбиновая (аПa) активность сульфатов крахмала достигает 16,8 – 70 ЕД/мг, активность против фактора Ха (аХа активность) — 2,3 – 16,6 ЕД/мг. Антитромбиновая (аПa) активность сульфатов инулина составляет 5,5 – 11,4 ЕД/мг, активность против фактора Ха (аХа активность) — 0 – 1,4. С увеличением степени сульфатирования сульфатов крахмала антикоагулянтная активность возрастает. Антикоагулянтная активность сульфатов крахмала и сульфата инулина со степенью сульфатирования 1,0 осуществляется при участии плазменного ингибитора сериновых протеаз — антитромбина.

Ключевые слова: сульфат крахмала, сульфат инулина, антитромбиновая активность (аПa активность), анти-фактор Ха активность (аХа активность), тромбин, антитромбин

ВВЕДЕНИЕ

Антикоагулянты (АК) — одна из основных групп средств профилактики и лечения тромбоэмболических нарушений [18]. Эти соединения либо ингибируют активность / генерацию ключевых факторов свертывания крови — тромбина (фактор Пa) и активированного фактора X (фактор Ха), либо активируют плазменные ингибиторы факторов свертывания (серпины — антитромбин, кофактор гепарина II, протеин Z — зависимый ингибитор протеаз), либо ингибируют синтез факторов II, VII, IX и X [16]. Антикоагулянтная активность используемых в клинической практике нативных (гликозаминогликан нефракционированный гепарин, НФГ), полусинтетических (низкомолекулярные гепарины, НМГ — эноксапарин, далтепарин, тинзапарин, бемипарин, цертопарин, надропарин, фраксипарин), синтетических (пентасахариды — фондапаринукс, идрапаринукс, идрабиотопаринукс) активаторов антитромбина, а также синтетических ингибиторов факторов свертывания (парентеральные ингибиторы тромбина — бивалирудин, аргатробан; ингибитор тромбина для приема внутрь — дабигатран; ингибитор фактора Ха для приема внутрь — апиксабан, ривароксабан, эдоксабан, LY-517717, YM-150) зависит от структурных параметров соединений [6, 7, 20].

При добавлении к плазме человека или млекопитающих НФГ (выделяют из тканей свиней/крупного рогатого скота, средняя молекулярная масса 15000 Д) или НМГ (средняя молекулярная масса 4000 – 5500 Д; получают деполимеризацией НФГ) значительно возрастает скорость ингибирования антитромбином активности фактора Ха и тромбина (аХа и аПa активности), но только по отношению к тромбину возрастает скорость ингибирования кофактором гепарина II [14]. Увеличение степени сульфатирования НФГ приводит к возрастанию активности против тромбина; снижение молекулярной массы НФГ — к снижению активности по отношению к тромбину [11].

В силу того, что гепарины демонстрируют ряд побочных эффектов [9], внимание исследователей привлекают родственные в структурном отношении соединения — сульфатированные полисахариды (СП). Величина антикоагулянтной активности сульфатов полисахаридов растительного/животного происхождения (фукоиданы, сульфаты галактоманнанов, каррагенанов, галактанов, целлюлозы, пектинов, хитозана) модулируется молекулярной массой, количеством и расположением O-сульфатных или свободных карбоксильных групп, видами моно-(ди-)сахаридов, входящих в состав молекулы полимера, числом и местом ответвлений (в случае нелинейного полисахарида) [10, 13, 15].

Цель настоящей работы — исследование влияния степени сульфатирования на антикоагулянтную активность сульфатов крахмала (СК) и сульфатов инулина (СИ).

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исходные полисахариды. Инулин (MP Biomedicals, LLS) молекулярная масса (ММ) = $5 \cdot 10^3$ использовали

¹ Лаборатория патологии и фармакологии гемостаза (руководитель — проф. В. А. Макаров) Федеральное государственное бюджетное учреждение “Гематологический научный центр” Министерства здравоохранения и социального развития РФ, 125167, Москва, Новый Зыковский проезд, 4.

² Лаборатория химии растительных полимеров (руководитель — Е. В. Удоратина) Институт химии Коми научного центра УрО РАН, Республика Коми, Сыктывкар.

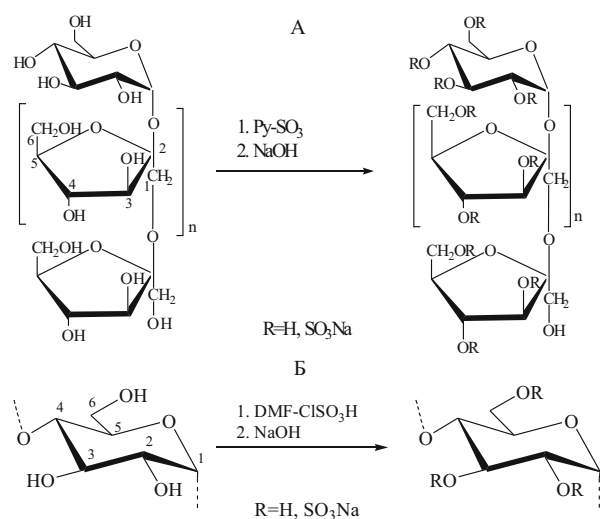


Рис. 1. Схема синтеза сульфатированных полисахаридов.

А — схема синтеза сульфата инулина. Б — схема синтеза сульфата крахмала.

без очистки; покупной крахмал, ГОСТ 7699–78 перед использованием промывали холодным раствором соляной кислоты $C = 0,1$ н, затем холодной водой до нейтральной реакции, экстрагировали 90 % этиловым спиртом в аппарате Сокслета. Нумерация атомов углерода на рис 1. приведена для удобства чтения спектральных данных.

Методы синтеза. Сульфат инулина (СИ) получали этерификацией инулина комплексом пиридин-SO₃ в ДМФА (диметилформамид) при 25 °С. Полученный полимер осаждали ацетоном, обрабатывали 4 % раствором NaOH и очищали многократным промыванием водным раствором этилового спирта. Для окончательной очистки пересаждали из воды и сушили в вакууме при 60 °С до постоянной массы. Молекулярная масса образцов

$M_n = 7 - 8 \cdot 10^3$. ИК (KBr) см^{-1} : 3404 ($\nu_{\text{ac OH}}$), 2096 (ν_{CH_2}); 1165 (ν_{SO_2}); 817 ($\nu_{\text{ac-O-S}}$). ЯМР ¹³C (D₂O) δ , м.д. (I, Гц) 61,66, 75,02, 77,73, 81,70, 103,84 [1].

Таблица 1. Структурные характеристики сульфатов инулина и крахмала

№ п.п.	Шифр образцов	Степень сульфатирования (СС)	Средняя молекулярная масса (ММ), дальтон (Д)	Источник растительного полисахарида
1	СИ-1	1,6	7000 – 8000	<i>Helianthus tuberosus</i> (семейство сложноцветных: топинамбур, земляная груша)
2	СИ-2	1,0		
3	СИ-3	0,6		
4	СК-1	2,0	25000 – 30000	<i>Solanum tuberosum</i> (семейство пасленовых: картофель)
5	СК-2	1,5		
6	СК-3	1,0		
7	СК-4	0,4		
8	СК-5	2,5		
9	СК-6	1,9		
10	СК-7	1,7		

Сульфат крахмала (СК). Предварительно очищенный крахмал оставляли на ночь в ДМФА для активации, после чего к набухшему полимеру прибавляли отдельно приготовленный раствор хлорсульфоновой кислоты в ДМФА. По истечении 2 ч продукт осаждали ацетоном, обрабатывали раствором NaOH и очищали многократным промыванием водным раствором этилового спирта. Для окончательной очистки пересаждали из воды и сушили в вакууме при 60 °С до постоянной массы. Молекулярная масса образцов $M_n = 25 \div 30 \cdot 10^3$. ИК (KBr, ν_{max} , см^{-1}): 3439 ($\nu_{\text{ac OH}}$), 2020 ($\nu_{\text{CH}_3, \text{CH}_2}$), 1635 ($\nu_{\text{C=O}}$), 1251 (ν_{SO_2}); 1043 ($\nu_{\text{C-O-C}}$), 939 ($\nu_{\text{C-O}}$), 819 ($\nu_{\text{ac, C-O-S}}$).

ЯМР ¹³C (D₂O) δ , м.д. (I, Гц) 57,67, 66,56, 68,77, 71,01, 73,38, 77,15, 96,65.

Спектры ЯМР ¹³C записаны на приборе “Bruker Avance II 300” (рабочая частота 75 МГц) в D₂O. ИК спектры образцов записаны на спектрометре “Prestige-21”, в таблетках KBr в области 700 – 4000 см^{-1} . Элементный анализ образцов (определение серы) в образцах СП осуществляли на приборе EA-1110 фирмы “CE instruments” после сжигания образца в токе кислорода с хроматографической регистрацией продуктов. Степень сульфатирования ($C3_S$) в препаратах СП находили по уравнению:

$$C3_S = \frac{k \cdot \omega_S}{3200 - \omega_S \cdot 102}$$

где k — молекулярная масса элементарного звена полисахарида, ω_S — содержание серы в образце (масс. %). Молекулярную массу (M_n) образцов СП определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для анализа использовали хроматографическую систему “Shimadzu” (Япония): насос LC-20AD, термостат CTO-10AS, рефрактометр RID-10A, колонка Shodex OHpac SB804 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 образцы сульфатированных пулуланов с ММ в диапазоне 1,3 – 800 · 10³. Структурные характеристики полисахаридов представлены в табл. 1.

Определение антикоагулянтной (АК) активности. Анализ АК активности образцов СК и СИ *in vitro* проводили с использованием бедной тромбоцитами плазмы человека. Для этого кровь донора смешивали с 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали 20 мин при 1400g и 4 °С (исследования проводили на пуле плазмы от 10 доноров). Влияние СК и СИ на свертывание цитратной плазмы человека при активации тромбопластином оценивали в тесте протромбинового времени (ПВ) при активации 0,025 М раствором хлорида кальция в присутствии смеси эллаговой кислоты и фосфолипидов сои определяли в тесте активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), при активации раствором 0,035 М хлорида кальция в присутствии фактора Ха (субстратная плазма — источник антитромбина, фибриногена и фактора V) определяли в тесте РеаКлот — гепарин (аналог HepTest) [5]. Время появления фибринового сгустка плазмы фиксировали на программируемом оптико-механическом коагулометре Минилаб 701. Для оценки действия полученных соединений определяли концентрации 2ПВ, 2АЧТВ, 2РеаКлот, так назы-

ваемые эффективные концентрации, при которых время свертывания увеличивалось в два раза, в сравнении с контролем (без добавления антикоагулянтов). Для работы использовали наборы реактивов НПО “Ренам”. Специфические АК активности СК и СИ в тестах АЧТВ и РеаКлот-гепарин определяли по описаниям в работах [4, 22], сравнивая показания с 5-м Международным стандартом НФГ.

Влияние СК и СИ в присутствии или без антитромбина (АТ, “Sigma”), на амидолитическую активность тромбина (Т, “Sigma”) оценивали по методу А. Теиен и соавт. [19]. В качестве растворителя для реактивов использовали 0,05 М трис-НСl буфер с 0,0075 М Na₂ — ЭДТА, 0,175 М NaCl, 2 мг/мл бычьего альбумина, рН 8,4. Определяли эффективные концентрации СК или СИ ([1/2 ΔА 405/мин] мкг/мл), при которых изменение оптической плотности инкубационной смеси за минуту при длине волны на спектрофотометре 405 нм (ΔА 405/мин) снижалось в 2 раза в сравнении с контролем.

Результаты исследования представлены как средние арифметические со стандартными ошибками средних арифметических. Достоверность результатов оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Для определения связи между двумя признаками в рядах экспериментальных данных проводили корреляционный анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ Biostat, SSPS, StagraphicsPlus.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовали влияние на время свертывания плазмы человека в коагулологических тестах АЧТВ, ПВ и РеаКлот сульфатов инулина (СИ, средняя молекулярная масса

7000 – 8000 Да, степень сульфатирования 0,6 – 1,6) и крахмала (СК, средняя молекулярная масса 25000 – 30000 Да, степень сульфатирования 0,6 – 1,6), выделенных из многолетних клубненосных травянистых растений рода сложноцветных (*Helianthus tuberosus*) и пасленовых (*Solanum tuberosum*), соответственно (табл. 1).

Добавление в плазму человека образцов СК (концентрация 10 – 600 мкг/мл плазмы) приводило к удлинению времени появления фибринового сгустка при активации свертывания тканевым фактором (тромбопластином; тест ПВ). Диапазон эффективных концентраций образцов СК составил 32,2 ± 2,1 – 311 ± 17 мкг/мл плазмы. И только для одного образца СИ установили 2ПВ концентрацию, равную 1907 ± 79 мкг/мл плазмы (табл. 2).

С увеличением концентрации в плазме человека образцов СК (0,1 – 10 мкг/мл) и СИ (0,1 – 150 мкг/мл) время свертывания в тесте, проводимом с активацией фактора XII (АЧТВ) возрастало. Диапазон эффективных концентраций СК составил 1,5 ± 0,14 – 7 ± 0,18 мкг/мл плазмы, СИ — 37,1 ± 10,6 – 126,4 ± 87,3 мкг/мл плазмы (табл. 2). Антитромбиновая активность образцов СК достигала 16,8 – 70 ЕД/мг; аIIa активность образцов СИ достоверно не различалась (5,5 ± 2,4 – 11,4 ± 4,9 ЕД/мг).

Время свертывания плазмы в тесте с использованием набора РеаКлот-гепарин при увеличении концентрации образцов СК (1,44 – 30 мкг/мл) и СИ (1,44 – 2000 мкг/мл) возрастало. Эффективные концентрации составили для СК 2,34 ± 0,45 – 20,89 ± 3,3 мкг/мл плазмы, а для двух СИ со степенью сульфатирования более 1 – 447 ± 41 и 1813 ± 365 мкг/мл плазмы. Диапазон аХа активностей

Таблица 2. Специфическая антикоагулянтная активность образцов сульфатированного крахмала и инулина в коагулологических и амидолитическом тестах

Шифр	Ингибирование свертывания плазмы человека				Ингибирование амидолитической активности тромбина антитромбином в присутствии образцов СК или СИ	
	АЧТВ		РеаКлот		2 ПВ, мкг/мл плазмы	
	2 АЧТВ, мкг/мл плазмы	aIIa, ЕД/мг	2 РеаКлот, мкг/мл плазмы	aХа ЕД/мг		[1/2 ΔА 405/мин], мкг/мл
СИ-1	37,1 ± 10,6	8,2 ± 2,2	1813 ± 365	0,4 ± 0,07	> 2000	> 500
СИ-2	40,3 ± 15,6	11,4 ± 4,9	447 ± 41	1,4 ± 0,03	1907 ± 79	3,1 ± 0,7
СИ-3	126,4 ± 87,3	5,5 ± 2,4	> 2000	0	> 2000	> 500
СК-1	2,80 ± 0,24	33,8 ± 5,1	3,39 ± 0,11	8,45 ± 2,0	48,2 ± 3,3	0,049 ± 0,011
СК-2	2,80 ± 0,03	30,3 ± 2,1	3,31 ± 0,08	9,00 ± 1,0	52,4 ± 4,8	0,033 ± 0,015
СК-3	4,90 ± 0,03	24,4 ± 1,8	8,58 ± 1,00	4,10 ± 0,5	48,1 ± 4,5	0,032 ± 0,012
СК-4	7,00 ± 0,18	16,8 ± 2,04	20,89 ± 3,31	2,29 ± 0,5	311 ± 17	0,56 ± 0,08
СК-5	2,70 ± 0,10	35,7 ± 3,3	2,34 ± 0,45	16,60 ± 1,50	38,7 ± 1,9	0,014 ± 0,007
СК-6	2,80 ± 0,19	34,5 ± 3,6	3,09 ± 0,52	12,30 ± 1,60	32,2 ± 2,1	0,015 ± 0,009
СК-7	1,50 ± 0,14	70,0 ± 6,8	4,17 ± 0,46	8,00 ± 1,00	49,8 ± 4,2	0,013 ± 0,004
НФГ ст.	0,30 ± 0,02	203,1	0,10 ± 0,06	220,00	12,7 ± 1,8	0,002 ± 0,001

Примечание. СП — сульфат полисахарида; СИ — сульфат инулина, СК — сульфат крахмала; АЧТВ — активированное частичное тромбопластиновое время; РеаКлот — гепарин — тест с использованием фактора Ха и субстратной плазмы; ПВ — протромбиновое время; 2АЧТВ, 2РеаКлот, 2ПВ — концентрация, при которой время свертывания плазмы возрастает в 2 раза, в сравнении с контролем; [1/2 ΔА 405/мин] мкг/мл — концентрация СК или СИ, при которой скорость гидролиза хромогенного субстрата снижается в 2 раза в сравнении с контролем.

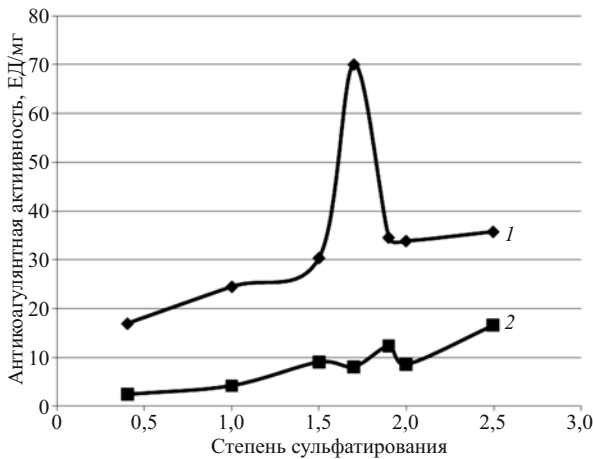


Рис. 2. Зависимость антитромбиновой и анти-фактор Ха активности крахмала от степени сульфатирования.

По оси абсцисс — степень сульфатирования, по оси ординат: 1 — анти-тромбиновая (аПа) и 2 — анти-фактор Ха (аХа) активности сульфатов крахмала (в ЕД/мг).

СК составил $2,3 - 16,6$ ЕД/мг, СИ — $0,4 \pm 0,07$ и $1,4 \pm 0,03$ ЕД/мг (табл. 2).

Без добавления антитромбина образцы СК и СИ не ингибировали скорость гидролиза тромбином хромогенного субстрата. При добавлении образцов СК и СИ-2 в диапазоне концентраций $0,001 - 4$ мкг/мл к инкубационной смеси с антитромбином снижалась скорость гидролиза тромбином хромогенного субстрата. Диапазон эффективных концентраций [$1/2 \Delta A$ 405/мин] для наиболее активных СК составил $0,013 \pm 0,004 - 0,049 \pm 0,011$ мкг/мл, для СИ-2 — $3,1 \pm 0,7$ мкг/мл (табл. 2).

Макромолекула инулина построена из 30 – 35 остатков D-фруктозы в фуранозной форме, соединённых $\beta(2 \rightarrow 1)$ связями, и содержит остаток глюкозы на редуцирующем конце макромолекулы [2, 17]. Крахмал представляет смесь линейного (амилоза) и разветвленного (амилопектин) полисахаридов. Амилоза построена главным образом из остатков α -D-глюкопиранозы с $1,4$ — связями; молекулы амилопектина сильно разветвлены и состоят из фрагментов амилозы (около 20 моносахаридных остатков), связанных между собой α -1,6-связями [2].

Интересом к СК в качестве АК средства может служить тот факт, что C. Fenger-Eriksen и соавт. [8] использовали оксиэтил крахмала при необходимости замещения плазмы для восполнения объема циркулирующей крови. При этом авторы не обнаружили влияния на такие показатели гемостаза, как время свертывания плазмы, уровень фибриногена, уровень антитромбина и агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ. Инулин обладает сравнительно низкой молекулярной массой, легко усваивается организмом человека, в связи с чем применяется в медицине как заменитель крахмала и сахара при сахарном диабете.

С увеличением концентрации в плазме человека или экспериментальных животных гепаринов или других АК увеличивается время свертывания в тестах ПВ, АЧТВ и РеаКлот — гепарин [9, 10, 13, 15, 21]. В клинической

практике для оценки эффективности антикоагулянтной терапии у людей используют такой показатель, как удвоение времени свертывания плазмы человека в коагулологических тестах в сравнении с контролем, то есть до введения лекарственного средства [12]. В лабораторной практике, построив кривую зависимости концентрации АК — время свертывания *in vitro* в коагулологических тестах, можно найти эффективные концентрации АК (2АЧТВ, 2ПВ, 2 РеаКлот-гепарин концентрации), при которых время свертывания плазмы увеличивается в два раза в сравнении с контролем [3]. В настоящей работе при добавлении в плазму человека разных концентраций образцов СК или СИ определили эффективные концентрации СК и СИ в тестах ПВ, АЧТВ и РеаКлот-гепарин. Между степенью сульфатирования (СС) и 2ПВ концентрациями СК наблюдали достоверную отрицательную связь ($r = -0,77$; $p = 0,04$). Образца с наименьшей СС 0,4 для достижения эффективной концентрации требовалось в 6 – 9,7 раз больше, чем других образцов. Для достижения в тесте ПВ равного с НФГ эффекта СК требовалось в 2,5 – 24 раза больше в зависимости от степени сульфатирования. Исследованные соединения были эффективнее в тесте при активации свертывания $0,025$ М раствором хлорида кальция в присутствии активаторов фактора XII (эллаговой кислоты и фосфолипидов сои), чем в тесте при активации свертывания тканевым фактором (тромбопластином), так как для увеличения времени свертывания плазмы в тесте АЧТВ сульфатов крахмала требовалось в 11,5 – 33 раза и СИ-2 в 47 раз меньше, чем для такого же удлинения в тесте ПВ; НФГ потребовалось в 42 раза меньше, чем в тесте ПВ.

График зависимости аПа активности образцов СК от СС представлен на рис. 2. В публикации [21] отмечена нелинейная зависимость между СС 0,52 – 2,95 целлюлозы из сахарного тростника в диапазоне концентраций $0,3 - 0,9$ мкг/мл и временем свертывания плазмы человека в тестах тромбинового времени. В настоящей работе между СС и 2АЧТВ концентрациями СК отмечали значительную отрицательную связь ($r = -0,83$; $p = 0,02$) и слабую недостоверную связь между СС и аПа активностью ($r = 0,46$; $p = 0,3$). Подобное может свидетельствовать о том, что для расчета аПа необходимо использовать внутренний стандарт СК, а не стандарт НФГ. Активность против фактора Ха образцов СК с увеличением СС достоверно возрастает ($r = 0,937$; $p = 0,002$). Сульфат инулина с СС 1,0 показал наибольшую аПа активность 11,4 ЕД/мг; какой либо связи АК активности СИ с СС от 0,6 до 1,6 в диапазоне ММ 7000 – 8000 Д нет.

При одинаковых степенях сульфатирования СК и СИ активность последних меньше в два раза. Можно предположить, что это может быть связано с меньшей в 3,7 раз молекулярной массой СИ и различием в моносахаридном составе инулина и крахмала [2].

Антикоагулянтная активность гепаринов, фукоиданов, сульфатов целлюлозы осуществляется за счет активации плазменного ингибитора тромбина и фактора Ха — анти-тромбина [9 – 11, 13 – 15]. Исследованные сульфаты крахмала усиливали действие анти-тромбина при анализе ингибирования амидолитической активности тромбина с расщеплением хромогенного субстрата. Ни один из ис-

следованных образцов не снижал амидолитическую активность тромбина в отсутствие антитромбина. Для снижения в два раза скорости гидролиза хромогенного субстрата тромбином в присутствии антитромбина и сульфата крахмала с наименьшей СС 0,4 последнего потребовалось в 11–43 раза больше, чем других СК. В свою очередь для наиболее активных образцов СК потребовалось в 6,5–24,5 раза больше, чем НФГ. Только один образец СИ со СС 1,0 снижал скорость гидролиза тромбином хромогенного субстрата в присутствии антитромбина. Его требовалось в 6–238 раз больше, чем образцов СК и в 1550 раз больше, чем НФГ.

Меньшую, чем у НФГ антикоагулянтную активность нативных и полусинтетических полисахаридов животного и растительного происхождения, зависящую от степени сульфатирования, зафиксировал ряд авторов [10, 13, 15, 21].

ВЫВОДЫ

1. Антитромбиновая активность сульфатов крахмала с молекулярной массой 25000–30000 Д и степенью сульфатирования 0,4–2,5 составляет 16,8–70 ЕД/мг (аХа активность в 2–8 раз ниже).

2. С увеличением степени сульфатирования крахмала, выделенного из *Solanum tuberosum*, антикоагулянтная активность возрастает.

3. Антитромбиновая активность сульфатов инулина с молекулярной массой 7000–8000 Д и степенью сульфатирования 0,6–1,6 составляет 5,5–11,4 ЕД/мг (аХа активность менее 2 ЕД/мг).

4. Антикоагулянтная активность сульфатов крахмала и сульфата инулина со степенью сульфатирования 1,0 осуществляется при участии плазменного ингибитора сериновых протеаз — антитромбина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации гос. контракт № 16.512.11.2012.

ЛИТЕРАТУРА

1. Д. В. Тарабукин, М. А. Торлопов, В. В. Володин, *Вестн. биотехнол.*, **7**(2), 32–38 (2011).
2. Л. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман, *Основы биохимии*, Мир, Москва (1981).
3. S. Alban, G. Franz, *Thromb. Res.*, **99**(4), 377–388 (2000).
4. T. W. Barrowcliffe, E. A. Johnson, S. A. Eggleton, D. P. Thomas, *Thromb. Res.*, **12**(1), 27–36 (1978).
5. S. M. Bates, J. I. Weitz, *Circulation*, **112**(4), 53–60 (2005).
6. C. Becattini, A. Lignani, G. Agnelli, *Drug Design Development and Therapy*, **25**(4), 49–60 (2010).
7. J. Fareed, C. Adiguzel, I. Thethi, *Thrombosis Journal*, **9**(5), 1–10 (2011).
8. C. Fenger-Eriksen, T. M. Jensen, B. S. Kristensen, et al., *J. Thromb. Haemost.*, **7**(5), 795–802 (2009).
9. J. Hirsh, R. Raschke, *Chest*, **126**(Suppl 3), 188S–203S (2004).
10. P. Laurienzo, *Mar. Drugs*, **8**(9), 2435–2465 (2010).
11. R. Linhardt, *J. Med. Chem.*, **46**(13), 2551–2564 (2003).
12. V. L. Ng, *Clin Lab Med*, **29**(2), 283–304 (2009).
13. I. Pawlaczyk, L. Czerchawski, W. Kuliczowski, et al., *Thromb Res.*, **127**(4), 328–340 (2011).
14. J. C. Rau, L. M. Beaulieu, J. A. Huntington, F. C. Church, *J. Thromb. Haemost.*, **5**(Suppl. 1), 102–115 (2007).
15. A. Rek, E. Krenn, A. Kungl, *Brit J of Pharm*, **157**(15), 686–694 (2009).
16. R. Sakhuja, R. W. Yeh, D. L. Bhatt, *Curr. Probl. Cardiol.*, **36**(4), 127–68 (2011).
17. C. Stevens, A. Meriggi, K. Booten, *Biomacromolecules*, **2**(1), 1–16 (2001).
18. M. B. Streiff, P. L. Bockenstedt, S. R. Cataland, et al., *J. Nat. Comprehensive Cancer Network*, **9**(7), 714–777 (2011).
19. A. Teien, M. Lie, *Thromb. Res.*, **10**(3), 399–410 (1977).
20. F. W. A. Verheugt, *Netherlands Heart Journal*, **18**(6), 314–318 (2010).
21. Z. M. Wang, L. Lin, K.-J. Xiao, J.-Y. Wu, *Bioresource Technology*, **100**(10), 1687–1690 (2009).
22. E. T. Yin, S. Wessler, J. V. Buthler, *J. Lab. Clin. Med.*, **81**(2), 298–310 (1973).

Поступила 02.12.11

DEPENDENCE OF THE ANTICOAGULANT ACTIVITY OF STARCH AND INULIN ON THEIR DEGREE OF SULFONATION

N. N. Drozd¹, M. A. Torlopov², A. A. Kuzhim¹, and V. A. Makarov¹

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, 167982, Russia

We have studied a relationship between the degree of sulfonation and anticoagulant activity of starch from *Solanum tuberosum* (molecular weight, 25000–30000 Da; sulfonation degree, 0.4–2.5) and inulin from *Helianthus tuberosus* (molecular weight, 7000–8000 Da; sulfonation degree, 0.6–1.6). Starch and inulin sulfates (i) increased the time of appearance of fibrin clots in plasma in coagulometric tests and (ii) reduced (via antithrombin) the rate of thrombin-induced hydrolysis of a chromogen substrate. The antithrombin (aIIa) activity of starch sulfates reached 16.8–70.0 IU/mg and the activity against factor Xa (aXa activity) was 2.3–16.6 IU/mg. The antithrombin activity of inulin sulfates was within 5.5–11.4 IU/mg and the activity against factor Xa (aXa activity) was within 0–1.4 IU/mg. An increase in the degree of sulfonation led to a growth in the anticoagulant activity of starch sulfates. The anticoagulant activity of starch sulfates and inulin sulfate with sulfonation degree 1.0 is mediated by antithrombin, which is the plasma inhibitor of serine proteases.

Key words: Starch sulfate, inulin sulfate, antithrombin (aIIa) activity, anti-factor-Xa (aXa) activity, thrombin, antithrombin