

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

ПРОТИВОТРОМБОТИЧЕСКАЯ И ГЕМОМРАГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТИ ФУКОИДАНА, ВЫДЕЛЕННОГО ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *Fucus evanescens*

Н. Н. Дрозд¹, Н. Т. Мифтахова¹, Е. Ю. Савчик¹, Т. Б. Калинина¹, В. А. Макаров¹,
Т. И. Имбс², Т. Н. Звягинцева², Т. А. Кузнецова³, Н. Н. Беседнова³

Исследовали антитромботическую и геморрагическую активность фукоидана с молекулярной массой 20 – 40 кДа, выделенного из бурой водоросли *Fucus evanescens*. Антитромбиновая активность фукоидана — 41 ± 9 аПа ЕД/мг, анти-фактор Ха активность — 38 ± 8 аХа ЕД/мг. С увеличением дозы фукоидана от 2,5 до 10 мг/кг при внутривенном введении крысам возрастают антитромбиновая и анти-фактор Ха активность плазмы, противотромботическая активность фукоидана (100 % предотвращение формирования тромба наблюдали при дозе 10 мг/кг), геморрагическая активность (в меньшей степени, чем у нефракционированного гепарина в сравнимых по антитромбиновой активности дозах).

Ключевые слова: фукоидан, антитромбиновая активность, активность против активированного фактора десять, противотромботическая активность, геморрагическая активность

ВВЕДЕНИЕ

Появление фибринового сгустка плазмы крови млекопитающих происходит в результате многоступенчатого ферментативного процесса, в котором участвуют факторы свертывания (сериновые протеазы и другие белки) и конечный субстратный белок — фибриноген. Тромбин (фактор IIa) и активированный фактор десять (фактор Xa) — ключевые ферменты свертывающей системы крови. Для профилактики и лечения тромбозов, возникающих при патологическом развитии процесса свертывания крови у людей, наряду с другими лекарственными средствами используют сульфатированные полисахариды (СП) нативного (нефракционированные гепарины, НФГ — гликозаминогликаны животного происхождения), полусинтетического (низкомолекулярные гепарины — получают деполимеризацией нефракционированных гепаринов) и синтетического (пентасахарид арикстра) происхождения [11]. Эти соединения снижают активность тромбина и фактора Xa посредством активации плазменного ингибитора сериновых протеаз антитромбина (*SERPINC1*). При взаимодействии гепаринов с кофактором гепарина II (*SERPIND1*), нексином I (*SERPINE2*), ингибитором протеина C (*SERPINA5*), ингибитором активатора плазминогена I (*SERPINE1*)

снижается активность тромбина [20]. Однако антикоагулянты прямого действия на основе гликозаминогликанов обладают рядом побочных эффектов, а для нейтрализации противосвертывающего эффекта некоторых из них (почти все известные низкомолекулярные гепарины и арикстра) нет антидота. Риск заболеваний, связанных с прионовыми компонентами материалов из тканей млекопитающих, снижение сырьевой базы НФГ, возможность загрязнения НФГ высокосульфатированным хондроитином (что приводит при внутривенном введении НФГ к снижению кровяного давления вследствие высвобождения калликреина), возрастающие требования к лекарственным средствам, используемым при антикоагулянтной терапии (увеличение специфичности, повышение индекса “эффективность/безопасность”, предсказуемость реакции на дозу, наличие безопасного антидота и т.д.) диктуют необходимость поиска альтернативных источников соединений с антитромботическими свойствами.

Таковыми источниками могут быть СП растительного происхождения, которые выделяют из зеленых, красных и бурых водорослей [3]. СП, выделенные из водорослей, демонстрируют антикоагулянтную, противоопухолевую, антимагистатическую, антиадгезивную, антипролиферативную, иммуномодулирующую, антивирусную, противовоспалительную активность [3, 10, 19]. Широко распространенные в морской среде фукоиданы, которые выделяют из бурых водорослей, — гетерогенные, часто разветвленные, сульфатированные полисахариды, непременно содержащие в своем составе фукозу [19]. Наряду с фукозой они могут содержать галактозу, маннозу, ксилозу, уроновые кислоты, иногда белки и недиализуемые полифенолы [3, 10]. Антикоагулянтная активность фукоиданов зави-

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

² Лаборатория химии ферментов (руководитель — проф. Т. Н. Звягинцева) Тихоокеанский институт биоорганической химии ДВО РАН, Владивосток.

³ Лаборатория иммунологии (руководитель — Т. А. Кузнецова) НИИ эпидемиологии и микробиологии СО РАМН, Владивосток.

сит от молекулярной массы, степени замещения полисахарида сульфатными группами и их положения в остатке фукозы, степени разветвления, положения и состава фрагментов, находящихся в разветвлениях [19]. Структура фукоиданов изменяется в зависимости от вида водорослей, способа экстракции, времени сбора и местных климатических условий [3, 10]. Показано, что фукоиданы, выделенные из морских водорослей или беспозвоночных, предотвращают развитие экспериментальных венозных или артериальных тромбозов [2, 9, 12 – 15].

Целью настоящего исследования явилась оценка антитромботической и геморрагической активности фукоидана, выделенного из бурых морских водорослей Охотского моря *Fucus evanescens*.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фукоидан из бурых водорослей *Fucus evanescens* выделяли по методу [25]. Моносахаридный состав определяли на углеводном анализаторе IC-5000 Biotronik (колонка Shim-pack ISA-07/S2504, 0,4 × 25 см, калий-боратный буфер, скорость элюции 0,6 мл/мин) бидинаминатным методом [22]; интегрирующая система Shimadzu C — R2 AX. Моносахариды (Rha, Rib, Man, Fuc, Gal, Xyl, Glc) использовали как стандарты. Среднюю молекулярную массу фукоидана определяли ВЭЖХ по [1], содержание сульфатных групп — турбидиметрическим методом [6].

Ингибиторную активность фукоидана по отношению к тромбину (антитромбиновая или aIIa активность) и к активированному фактору десять (анти-фактор Ха или aХа активность) оценивали с использованием 5-го Международного стандарта нефракционированного гепарина [4, 24].

Исследование антитромботической активности фукоидана и нефракционированного гепарина проводили на модели венозного стаза по S. Wessler и др. [23] на белых крысах-самцах линии Вистар массой 250 – 350 г. Для наркоза внутрибрюшинно вводили этиминал-натрий в дозе 60 мг/кг по 1 мл на 200 г массы животного. Антикоагулянты в объеме до 1 мл внутривенно вводили в левую яремную вену. В эту же вену, с целью подавления защитной реакции противосвертывающей системы, вводили раствор атропина сульфата в дозе 5 мг/кг. Для моделирования тромбоза через 15 мин после введения антикоагулянтов активировали свертывающую систему крови крыс сывороткой человека. Затем перевязывали нитью участок вены (0,5 – 0,7 см), которая не использовалась для введения веществ. Эффективность антитромботической активности оценивали: 1) в баллах по форме тромба [23], извлеченного из перевязанного участка вены; пересчет системы баллов на процент предотвращения тромбоза проводили по следующей формуле: $[1 - (\Sigma a/4n)]100$, где: a — антитромботический эффект в баллах; n — число экспериментов; 2) по массе влажного тромба на анали-

тических весах; 3) по концентрации белка в гомогенате тромба, измеренного по Лоури; содержание белка в испытуемой пробе устанавливали по калибровочной кривой, построенной заранее по раствору фибриногена (“Behring”, Германия) в концентрациях от 10 до 400 мкг/мл; 4) по размеру в пикселах изображения тромба в электронном формате JPG.

Геморрагическую активность антикоагулянтов определяли на крысах самцах Вистар массой 200 – 250 г [8]. Для внутрибрюшинного наркоза использовали этиминал-натрий в дозе 50 мг/кг. В яремную вену вводили препарат и через 30 с надрезали кожу со спины. Под кожу на глубину 10 см вводили острые концы ножниц, раздвигали бранши на 4 см и в таком положении извлекали ножницы, достигая отсепарирования кожи от подлежащих тканей. Под кожу помещали марлевую салфетку размером 14 × 14 см. Через 30 мин извлекали салфетку и проводили гемолиз эритроцитов, добавляя 10 мл дистиллированной воды. Через 2 ч после полного гемолиза эритроцитов пробы спектрофотометрировали при длине волны 540 нм, определяя в них содержание гемоглобина. Калибровочную кривую строили по гемоглобину кролика фирмы “Sigma”.

При определении антитромботической и геморрагической активности в качестве препарата сравнения использовали нефракционированный гепарин (ОАО “Белмедпрепарат”) со средней молекулярной массой 15 кДа и антитромбиновой активностью 160 ЕД/мг.

Корреляционный анализ и оценку значимости различий двух средних арифметических, принадлежащих рядам экспериментальных данных, осуществляли с использованием программы Biostat.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Моносахаридный состав исследованного фукоидана, средняя молекулярная масса и отношение сульфатных групп представлены в табл. 1. Антитромбиновая активность фукоидана составила 41 ± 9 aIIa ЕД/мг, активность против фактора Ха — 38 ± 8 aХа ЕД/мг.

Снижение формы тромба в баллах ($с 3,9 \pm 0,1$ до 0), массы влажного тромба ($с 3,3 \pm 1,2$ до 0), размера тромба в пикселах ($с 578 \pm 42$ до 0) и концентрации белка в гомогенате тромба ($с 61 \pm 5,5$ до $2 \pm 0,6$) свидетельствуют об увеличении антитромботической активности фукоидана при возрастании дозы с 0 до 10 мг/кг (рис. 1, табл. 2) при внутривенном введении крысам с моделированным венозным тромбозом. Доза, при ко-

Таблица 1. Структурные характеристики фукоидана, выделенного из бурой водоросли *Fucus evanescens*

Полисахарид	Fuc: SO ₄ ²⁻ , моль/моль	Молекулярная масса, кДа	Нейтральные моносахариды, мол %				
			Fuc	Gal	Man	Xyl	Glc
Фукоидан	1:0,8	20 – 40	90	3	2	0	5

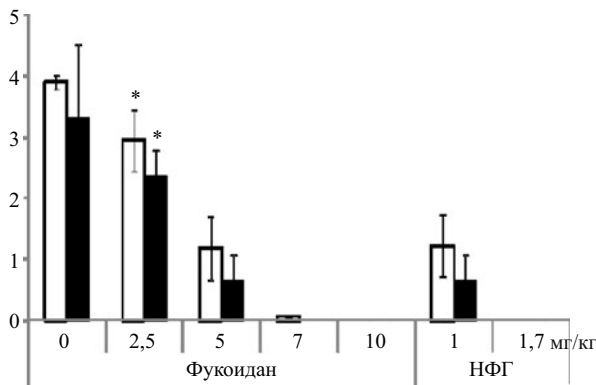


Рис. 1. Уменьшение формы и массы тромба с увеличением дозы фукоидана при внутривенном введении крысам с моделированным тромбозом.

Светлые столбики — форма тромба, балл, темные — масса тромба, мг. Здесь и на рис. 2: * — $p < 0,05$, достоверность различий с данными при введении физиологического раствора (доза 0 мг/кг); результаты представлены как средние арифметические со стандартной ошибкой средней арифметической; $n = 10 - 15$.

торой наблюдали противотромботический эффект в 80 % (ED_{80}), составила 5 – 7 мг/кг, ED_{100} – 10 мг/кг. Коэффициенты корреляции между определениями размера тромба в баллах и показаниями массы влажного тромба, размера электронного снимка тромба и концентрации белка в гомогенате тромба составили 0,9956 ($p = 0$), 0,9955 ($p = 0$), 0,9857 ($p = 0,002$). Нефракционированный гепарин достигает антитромботического эффекта в 100 % при дозе 250 аПа ЕД/кг, что соответствует массовой дозе 1,7 мг/кг.

При внутривенном введении физиологического раствора в плазме крыс не наблюдали антикоагулянтной активности (аПа = аХа = 0 ЕД/мл). Антитромбиновая / анти-фактор Ха активности плазмы экспериментальных животных увеличиваются с $0,23 \pm 0,04$ ЕД/мл / $0,09 \pm 0,02$ ЕД/мл до $2 \pm 0,5$ ЕД/мл / $0,15 \pm 0,03$ ЕД/мл при введении фукоидана в дозах 2,5 – 10 мг/кг (рис 2). Коэффициенты линейной корреляции между размером тромбов в баллах, массой тромбов, размером электронного изображения тромбов в пикселах и концен-

Таблица 2. Противотромботическая активность фукоидана из *Fucus evanescens* при внутривенном введении крысам ($M \pm m$, $n = 10 - 15$)

Доза, мг/кг	Размер тромба, пкс	Концентрация белка в гомогенате тромба, мкг/мл
0	578 ± 42	$61,0 \pm 5,5$
2,5	$444 \pm 25^*$	$46,0 \pm 5,1$
5,0	$119 \pm 19^*$	$270 \pm 3,9^*$
7,0	0	$13,0 \pm 2,2^*$
10,0	0	$2,0 \pm 0,6$

Примечание. * — $p < 0,05$, достоверность различий с данными при введении физиологического раствора (доза 0 мг/кг); пкс — пиксел (каждое электронное растровое изображение содержит фиксированное количество пикселей, чем может быть определен и размер электронного изображения, в нашем случае — тромба).

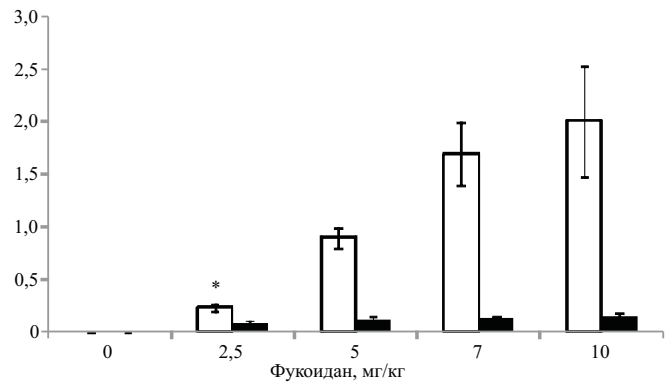


Рис. 2. Изменение антикоагулянтной активности плазмы с увеличением дозы фукоидана при внутривенном введении крысам.

Светлые столбики — аПа активность плазмы, ЕД/мл, темные — аХа активность плазмы, ЕД/мл. Остальные обозначения те же, что на рис. 1.

трацией белка в гомогенате тромба, с одной стороны, и антитромбиновой / анти-фактор Ха активностями плазмы крыс, с другой, составили: $-0,9727$ ($p=0,005$) / $-0,9323$ ($p = 0,021$), $-0,9487$ ($p = 0,013$) / $-0,9423$ ($p = 0,017$), $-0,9520$ ($p = 0,012$) / $-0,9280$ ($p = 0,023$), $-0,9847$ ($p = 0,002$) / $-0,9321$ ($p = 0,021$), соответственно. То есть, отмечали тесную отрицательную связь между аПа / аХа активностью плазмы и размерами характеристик тромбов.

В используемом диапазоне доз фукоидана аХа активность плазмы не достигла 0,35 ЕД/мл. Антитромбиновая активность плазмы крыс от минимальной к максимальной дозе возрастала в 8,7 раз, в то время, как аХа активность — только в 1,7 раз.

Исследовали влияние фукоидана и нефракционированного гепарина на изменение концентрации гемоглобина в гемолизатах крови, полученной через 15 мин после внутривенного введения в дозах 150, 300, 420 и 600 аПа ЕД/кг. Величины концентраций гемоглобина в гемолизатах крови после введения фукоидана или НФГ составили $0,75 \pm 0,06 - 1,24 \pm 0,07$ г/л и $0,99 \pm 0,08 - 1,55 \pm 0,1$ г/л, соответственно (рис. 3). Диапазон достоверностей различий этих показаний от показаний в контроле (после введения физиологического раствора — $0,44 \pm 0,05$ г/л) составляет 0,0010 – 0,0034. Различия между уровнями концентрации гемоглобина в гемолизатах, полученных после введения фукоидана и НФГ в дозах 150, 420 и 600 ЕД/кг, достоверны ($p < 0,023 - 0,044$).

Каталитическое действие сульфатированных полисахаридов осуществляется двумя механизмами: аллостерическое изменение молекул серпинов (активация) или матричный механизм (гликановая цепь СП может действовать как “мост”, объединяющий протеазу и серпин) [19]. Полученный из бурой водоросли *Fucus evanescens* фукоидан одинаково ингибирует активность тромбина и фактора Ха, специфические АК активности не различаются ($p > 0,05$); величины активностей в 3 – 4 раза меньше, чем у нефракционирован-

ных гепаринов [11, 19]. Скорее всего, это связано с неспецифическим взаимодействием отрицательно заряженных участков молекул СП растительного происхождения с положительно заряженными участками плазменных ингибиторов сериновых протеаз свертывающей системы крови [3], в отличие от высокоспецифичной активации серпинов гепаринами [11, 20].

Исследованный фукоидан препятствует развитию экспериментального венозного тромбоза у крыс при активации свертывания по внутреннему пути (рис. 1, табл. 2). Противотромботическая активность фукоидана возрастает с увеличением дозы и достигает максимума при 10 мг/кг. Это укладывается в диапазон доз, наблюдаемых для сульфатированного галактана, выделенного из красных водорослей *Botryocladia occidentalis* [15]. Авторы отмечают антитромботический эффект сульфатированного галактана при внутривенном введении экспериментальным животным на модели венозного тромбоза при дозах 5 – 16 мг/кг. Противотромботическая активность фукана с ММ 21 кДа (состоит из фукозы, не имеет специфической АК активности), выделенного из бурой водоросли *Spatoglossum schröderi* (Dictyotaceae), достигает максимума через 16 ч после внутривенного введения крысам в дозе 20 мг/кг [2]. Авторы предполагают, что фукан, как НФГ, стимулирует выброс сульфата гепарана из эндотелиальных клеток.

Для достижения одинакового антитромботического эффекта в массовых единицах доз фукоидана требуется в 4 – 5 раз больше, чем НФГ, что ожидаемо, так как специфические АК активности фукоидана меньше, чем у НФГ. Показано, что фукоидан, выделенный из бурой водоросли *Ascophyllum nodosum*, ингибирует на 80 % формирование венозного тромба в весовой дозе, в 18 раз большей, чем НФГ (ED_{80} для НФГ = 0,1 мг/кг) [14]. Для достижения одинакового антитромботического эффекта в аПа единицах доз фукоидана требуется всего в 1,3 – 1,5 раза меньше, чем НФГ. Последний факт связан с меньшей, чем у НФГ, аХа активностью фукоидана.

С целью поиска наиболее оптимального способа оценки антитромботической активности сравнивали показания базового метода определения (по форме тромба [23]) с результатами измерений другими способами (табл. 2). Фиксировать массу влажного или сухого тромба достаточно проблематично, для этого может потребоваться большое количество животных, так как иногда велика ошибка средней величины. Определение размера электронного изображения тромба представляется наиболее перспективным, так как коэффициент корреляции с базовым методом составляет 0,99 ($p = 0,002$) и меньше ошибка средней величины.

С антитромботической активностью коррелируют аПа и аХа активности плазмы крыс. Подобная связь для антикоагулянтов прямого действия на основе СП разного происхождения известна [17]. Однако следует

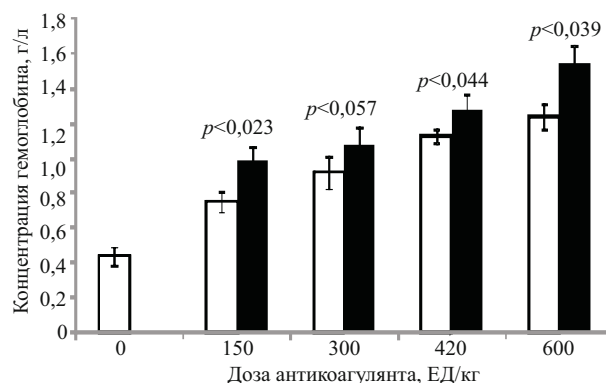


Рис. 3. Сравнение геморрагической активности фукоидана из водоросли *Fucus evanscens* (светлые столбики) и НФГ (ОАО “Белмедпрепарат”) (темные).

Показания между физиологическим раствором и антикоагулянтами достоверно различаются ($0,01 < p < 0,039$); различия достоверны между показаниями фукоидана и НФГ, представлены на рисунке; $n = 7 - 10$.

отметить, что аПа активность достигает величин, превосходящих терапевтические, а аХа активность перекрывает только профилактические величины (0,15 – 0,3 ЕД/мл) и ниже антитромбиновой в 13 раз (при эффективных дозах фукоидана 7 и 10 мг/кг). По всей вероятности, в механизме антитромботического действия фукоидана основную роль играет аПа активность. Относительное снижение аХа активности плазмы крыс после введения фукоидана можно объяснить видовой специфичностью, в частности, константы связывания между плазменным ингибитором сериновых протеаз — антитромбином, выделенным из плазмы кроликов/человека, и гепарином различаются [5].

Применение в клинической практике антикоагулянтов прямого действия может быть осложнено кровотечениями. Оценивая геморрагическую активность антикоагулянтов, выявляют их склонность к осложнениям в виде кровотечений. Есть несколько способов определения этой активности с использованием экспериментальных животных: по концентрации гемоглобина в истекшей крови, по количеству истекшей крови, по времени остановки кровотечения из надреза [18]. У разрабатываемых АК прямого действия определяют геморрагическую активность. Так, сульфатированный глюкан из лишайника *Parmotrema mantiqueirense* Hale (со степенью замещения по сульфатным группам 1,95 демонстрирует 100 % ингибирование формирования тромбоза при внутривенном введении в дозе 0,5 мг/кг) [12] и галактоглюкоманнан из лишайника *Cladonia ibitipocae* увеличивают время кровотечения с увеличением дозы [13]. Геморрагическая активность исследованного фукоидана при внутривенном введении крысам была достоверно ниже, чем у НФГ, при одинаковых дозах в единицах антитромбиновой активности (рис. 3). Это свидетельствует о том, что фукоидан в меньшей степени, чем НФГ способствует развитию кровотечений, что можно объяснить большей аХа активностью НФГ. Отмечено, что геморрагическая активность низкомолекулярного фу-

коидана ниже, чем у низкомолекулярного гепарина — дельтагепарина [16]. Позднее такая закономерность подтвердилась исследованиями [21] и [7]. Низкую геморрагическую активность фукоидана из бурой водоросли *Spatoglossum schröderi* (*Dictyotaceae*) авторы связывают с отсутствием у этого соединения ингибиторной активности по отношению к тромбину и фактору Ха [2].

ВЫВОДЫ

1. При внутривенном введении экспериментальным животным фукоидана со средней молекулярной массой 20–40 кДа, выделенного из бурой водоросли *Fucus evanescens*, с увеличением дозы возрастают антитромбиновая (достигая величин в несколько раз больших, чем терапевтические) и анти-фактор Ха активности плазмы.

2. Противотромботическая активность фукоидана (измеренная по торможению развития венозного тромбоза на экспериментальной модели у крыс при внутривенном введении) увеличивается с увеличением дозы.

3. Для определения размеров тромбов в программе Photom можно использовать их электронное изображение в формате JPG.

4. Геморрагическая активность фукоидана возрастает с увеличением дозы, но в меньшей степени, чем у нефракционированных гепаринов в сопоставимых по антитромбиновой активности дозах.

Данная статья подготовлена при поддержке грантов РФФИ № 09-04-00761 и ДВО и Программы РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. И. Имбс, Н. М. Шевченко, С. В. Суховерхов и др., *Химия природн. соед.*, № 6, 661–665 (2009).
2. E. M. Barroso, L. S. Costa, V. P. Medeiros, et al., *Planta Med.*, **74**(7), 712–718 (2008).
3. L. S. Costa, G. P. Fidelis, S. L. Cordeiro, et al., *Biomed Pharmacother.*, **64**(1), 21–28 (2010).

4. E. Coyne, in.: *Chemistry and biology of heparin*, R. Lundblad, W. Brown, K. Mann, H. Roberts (eds), Elsevier / North-Holland, Ch. I. New-York, 9–17 (1981).
5. U. R. Desai, *Med. Res. Rev.*, **24**(2), 151–181 (2004).
6. K. S. Dodgson, *Biochem J.*, **78**(2), 312–319 (1961).
7. E. D. Durand, D. Helley, A. Al Haj Zen, et al., *J. Vasc Res.*, **45**(6), 529–537 (2008).
8. P. Hobbelen, G. Vogel, D. Meuleman, *Thromb Res.*, **48**(5), 549–558 (1978).
9. W. Khan, U. P. Rayirath, S. Subramanian, et al., *J. Plant Growth Regul.*, **28**(4), 386–399 (2009).
10. M. I. Kusaykin, I. Yu. Bakunina, V. V. Sova, et al., *J. Biotechnol.*, № 3, 904–915 (2008).
11. T. N. Laremore, F. Zhang, J. S. Dordick, et al., *Curr. Opin Chem Biol.*, **13**(5–6), 633–640 (2009).
12. J. Martinichen-Herrero, E. Carbonero, P. Gorin, et al., *Carbohydr Polym.*, **60**(1), 7–13 (2005).
13. J. Martinichen-Herrero, E. Carbonero, G. Sasaki, et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, **35**(1–2), 97–102 (2005).
14. S. Mauray, C. Sternberg, J. Theveniaux, et al., *Thromb Haemost.*, **74**(5), 1280–1285 (1995).
15. F. Melo F, P. Mourão, *Thromb Haemost.*, **99**(3), 531–538 (2008).
16. J. Millet, S. Jouault, S. Mauray, et al., *Thromb Haemost.*, **81**(3), 391–395 (1999).
17. A. E. Myziński, M. F. Lutz, M. A. Smythe, *Pharmacotherapy*, **30**(3), 324–329 (2010).
18. H. B. Nader, C. C. Lopes, H. A. Rocha, et al., *Curr Pharm Des.*, **10**(9), 951–966 (2004).
19. V. H. Pomin, *Biopolymers*, **91**(8), 601–609 (2009).
20. J. C. Rau, L. M. Beaulieu, J. A. Huntington, F. C. Church, *J. Thromb. Haemost.*, **5**(1), 102–115 (2007).
21. H. Rocha, F. Moraes, E. Trindade, et al., *J. Biol. Chem.*, **280**(50), 41278–41288 (2005).
22. S. Waffenschmidt, L. Jaenicke, *Anal Biochem.*, **165**(2), 337–340 (1987).
23. S. Wessler, S. Reimer, M. Sheps, *J. Appl. Physiol.*, № 14, 943–946 (1959).
24. E. Yin, S. Wessler, J. Butler, *J. Lab. Clin. Med.*, **81**(2), 298–310 (1973).
25. T. N. Zvyagintseva, N. M. Shevchenko, E. L. Nazarenko, *J. Exp. Marine. Biol. Ecol.*, **320**, 123–131 (2005).

Поступила 17.11.10

ANTITHROMBOTIC AND HEMORRHAGIC ACTIVITIES OF FUCOIDAN ISOLATED FROM *FUCUS EVANESCENS* BROWN ALGAE

N. N. Drozd¹, N. T. Miftakhova¹, E. Yu. Savchik¹, T. B. Kalinina¹, V. A. Makarov¹, T. I. Imbs², T. N. Zvyagintseva², T. A. Kuznetsova³, and N. N. Besednova³

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

² Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far East Branch., Russian Academy of Sciences, prosp. 100-Letiya Vladivostoka 159, Vladivostok, 690022, Russia;

³ Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Far East Branch., Russian Academy of Medical Sciences, ul. Selskaya 1, Vladivostok, 690087, Russia

The antithrombotic and hemorrhagic activities of fucoidan with molecular weight within 20–40 kD isolation from *Fucus evanescens* seaweed have been investigated. The antithrombin activity of fucoidan is 41 ± 9 aIU/mg and the anti-factor Xa activity is 38 ± 8 aIU/mg. The antithrombin and anti-factor Xa activities of plasma, antithrombotic activity (100% prevention of formation of a blood clot observed at a dose of 10 mg/kg), and hemorrhagic activity (to a lesser degree, than that of unfractionated heparin in comparable antithrombotic activity doses) increase as the doses of fucoidan increases from 2.5 to 10 mg/kg at intravenous injection in rats.

Key words: Fucoidan, antithrombin activity, anti-factor Xa activity, antithrombotic activity, hemorrhagic activity