

УДК 615.322:582.272.462+615.273.53

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ФУКОИДАНА ИЗ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ *SACCHARINA JAPONICA IN VIVO*

© 2013 О.А. Шокур¹, Н.В. Сергеева², К.Е. Макарова¹

¹ Институт биологии моря им. А. В. Жирмунского ДВО РАН, г. Владивосток

² Медицинское объединение ДВО РАН, г. Владивосток

Поступила в редакцию 29.09.2013

В экспериментах на крысах оценивали антикоагулянтную, антиагрегантную активность фукоидана, выделенного из бурой водоросли *Saccharina japonica*. Фукоидан вводили внутривенно в дозах 0,31, 1,25 и 2,5 мг/кг за 15-20 мин до забора крови. В плазме крови определяли активированное частичное тромбопластиновое время, протромбиновое время, тромбиновое время и количество фибриногена, агрегацию и количество тромбоцитов. Фукоидан оказывал дозозависимый антикоагулянтный эффект. Наиболее чувствительными оказались тесты по тромбиновому времени и активированному частичному тромбопластиновому времени. В концентрации фукоидана 1,25 мг/кг тест тромбинового времени увеличивался в 1,74 раза, а тест по активированному частичному тромбопластиновому времени – в 3,24 раза по сравнению с контролем ($p < 0.05$). Фукоидан в дозе 1,25 мг/кг снижал агрегацию тромбоцитов на 14,4%, а времени наступления дезагрегации на 11,2%, в дозе 2,5 мг/кг – на 27,3% и 29%, соответственно ($p < 0,05$).

Ключевые слова: *бурые водоросли, сульфатированные полисахариды, гемостаз, агрегация, коагуляция, тромбоциты*

Загрязнение окружающей среды считается основным фактором в развитии сердечно-сосудистых заболеваний [3]. На фоне экологического неблагополучия отмечается тенденция к увеличению частоты сердечно-сосудистых нарушений. Возрастающая потребность в антитромботической терапии указывает на необходимость поиска новых источников антикоагулянтных и антиагрегантных веществ. Перспективными соединениями для исследований в этой области являются фукоиданы, представляющие собой гетерогенный класс фукозосодержащих сульфатированных полисахаридов, локализованных во внеклеточном матриксе бурых водорослей, в яичевых оболочках морских ежей и стенке тела кукумарий [7]. Фукоиданы оказывают разнообразные биологические эффекты, включающие противовоспалительную [7], антиоксидантную [10], противоопухолевую [7], противовирусную [8], антикоагулянтную и антитромботическую [10, 11] активности, а также гастропротективные, гепатопротективные [6] и нефропротективные свойства [9]. Показано, что фукоиданы влияют на агрегацию тромбоцитов, процесс, который вовлечен в тромбообразование [2]. В настоящей работе мы исследовали эффекты фукоидана из бурой морской водоросли *Saccharina japonica* на гемостаз крови крыс.

Материал и методика. Бурю морскую водоросль *Saccharina japonica* (*Laminaria japonica*) собирали в б. Восток зал. Петра Великого (Японское море) в 2010 г. Фукоидан выделяли методом, в основе которого лежала экстракция раствором соляной кислоты [2]. Эксперименты выполняли на 60 крысах-самцах, массой 300-350 гр., получавших стандартную виварную диету. Перед введением исследуемых препаратов крыс наркотизировали золептилом (11.4 мг/кг) и ксилазином гидрохлоридом (9,1 мг/кг). Фукоидан вводили внутривенно в дозах 0,31, 1,25 и 2,5 мг/кг, а в качестве препаратов сравнения использовали антиагрегант диклофенак («Nemofarm», Сербия) в дозах 1,25, 2,5 мг/кг и прямой антикоагулянт гепарин («Московский эндокринный завод», Россия) в дозах 0,67, 1,15, 2,4 и 4,8 мг/кг. Контрольным животным вводили изотонический раствор натрия хлорида.

Кровь для исследования получали пункцией сердца через 15-20 мин после внутривенного введения исследуемых веществ, стабилизировав 3% раствором цитрата натрия в соотношении антикоагулянта и крови 1:9 [1], и центрифугировали при 200 g в течение 20 мин. для получения богатой тромбоцитами плазмы. Верхний слой плазмы аккуратно отбирали, оставшуюся часть пробы центрифугировали при 3000 об/мин. в течение 15 мин. для получения бестромбоцитарной плазмы. Агрегацию тромбоцитов изучали турбометрическим методом по Борну (Born G.V.R. 1962) на двухканальном лазерном анализаторе агрегации 230LA (НПФ «БИОЛА») [4]. В качестве индуктора агрегации использовали раствор АДФ в конечной концентрации 5 мкМ. Уровень агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы и времени наступления дезагрегации. О коагуляционном звене гемостаза судили по

Шокур Ольга Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории фармакологии. E-mail: olga_shokur@list.ru
Сергеева Наталья Владимировна, заведующая отделением лабораторной диагностики. E-mail: natvladserg@mail.ru

Макарова Ксения Евгеньевна, младший научный сотрудник лаборатории фармакологии. E-mail: k.e.makarova@gmail.com

активированному частичному тромбопластиновому времени (АЧТВ), протромбиновому времени (ПВ), тромбиновому времени (ТВ) и концентрации фибриногена. Количество тромбоцитов подсчитывали микроскопическим методом в камере Горяева. Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Данные представлены в виде медианы (Me) и значений квартильного диапазона (25%; 75%). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Фукоидан оказывал достоверный дозозависимый антикоагулянтный эффект. Фукоидан в концентрации 0,31 мг/кг удлинял АЧТВ в 1,66 раза по сравнению с контролем, в концентрации 1,25 мг/кг – в 3,24 раза, а в дозе 2,5 мг/кг – в 3,6 раз ($p < 0,05$). Фукоидан в концентрации 1,25 мг/кг увеличивал тест тромбинового времени в 1,74 раза, а в дозе 2,5 мг/кг не вызывал свертываемости плазмы. Концентрация фибриногена в плазме не изменялась при всех исследуемых дозах (табл. 1).

Таблица 1. Влияние фукоидана, выделенного из бурой водоросли *Saccharina japonica*, и препаратов сравнения на коагуляцию крови у крыс

Вещество, концентрация мг/кг	ПВ, с	АЧТВ, с	ТВ, с	Фибриноген, мг/л
физраствор (контроль)	20,51 (18,23; 24,25)	17,05 (15,98; 18,98)	40,3 (38,65; 42,78)	1,4 (1,1; 1,74)
фукоидан, 0,31	22,7 (22,1; 23,3)	28,30* (26,6; 29,9)	40,0 (34; 54,2)	1,74 (1,4; 1,76)
фукоидан, 1,25	27,7 (16,9; 29,6)	55,30* (25,8; 92,5)	70,3* (57,45; 100)	1,49 (0,96; 2,74)
фукоидан, 2,5	>100*	60,95* (21,63; 100)	>100*	1,2 (1,1; 2,76)
гепарин, 0,67	15,7* (15,3; 17)	14,5* (14,2; 14,7)	39,4 (38,9; 39,8)	0,52 (0,5; 0,55)*
гепарин, 1,15	25,7 (19,75; 30,33)	58,9* (17,3; 100)	>100*	0*
гепарин, 2,4	13,4* (12,9; 13,9)	>100*	>100*	0*
гепарин, 4,8	>100*	>100*	>100*	0*
диклофенак, 1,25	21,0 (20,2; 21,7)	17,50 (17,1; 17,9)	45,4* (43,4; 47,4)	1,02 (0,72; 1,71)
диклофенак, 2,5	19,75 (15,18; 22,25)	16,05 (15,38; 19,05)	38,60 (36,25; 44,25)	1,28 (0,98; 1,64)

Примечание: >100 – отсутствие свертываемости плазмы более 100 сек; *- достоверное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Данные представлены в виде медианы (Me) и значений квартильного диапазона (25%; 75%).

Фукоидан уменьшал АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов дозозависимо. В концентрации фукоидана 1,25 мг/кг агрегация тромбоцитов снижалась на 14,4%, а в концентрации 2,5 мг/кг – на 27,3%. Фукоидан в дозе 1,25 и 2,5 мг/кг сокращал время наступления дезагрегации на 11,2 и 29%, соответственно. Антиагрегантный эффект полисахарида был сопоставим с активностью

диклофенака (табл. 2). В группе животных, которым вводили фукоидан в дозе 2,5 мг/кг, количество тромбоцитов периферической крови уменьшилось на 23% по сравнению с контрольной группой ($p = 0,0428$). Однако изменение данного показателя в группе фукоидана было меньше, чем в группе животных, которым вводили гепарин (рис. 1).

Таблица 2. Влияние фукоидана, выделенного из бурой водоросли *Saccharina japonica*, и препаратов сравнения на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов у крыс

Препарат, доза	Время наступления дезагрегации, с	Максимальная степень агрегации, %
физ. раствор (контроль)	241 (217; 322)	44 (38,6; 47,55)
фукоидан 1,25 мг/кг	214 (167,5; 223)*	37,65 (30,08; 40,35)*
фукоидан 2,5 мг/кг	171 (150; 192)*	32 (28,8; 35,9)*
диклофенак 2,4 мг/кг	204,5 (181,5; 225,8)*	38,6 (28; 40,5)*
гепарин 2,4 мг/кг	275 (199; 311)	36,2 (30,25; 41,8)

Примечание: *- достоверное отличие ($p < 0,05$) по сравнению с контролем. Данные представлены в виде медианы (Me) и значений квартильного диапазона (25%; 75%)

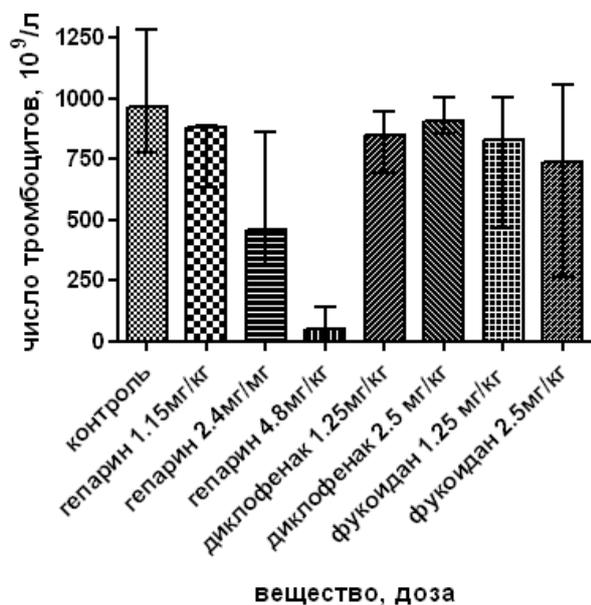


Рис. 1. Влияние исследуемых веществ на количество тромбоцитов в периферической крови крыс

Выводы: фукоидан, выделенный из бурой морской водоросли *Saccharina japonica*, влияет на гемостаз крови крыс. В низких дозах фукоидан ингибирует внутренний путь свертывания крови, а при увеличении вводимой дозы ингибирует и внешний, и внутренний пути гемостаза. Удлинение теста тромбинового времени под действием фукоидана свидетельствует о способности полисахарида влиять на завершающий этап процесса свертывания. Проведенные исследования показали, что степень антикоагулянтной активности фукоидана может быть сопоставима с таковой у гепарина. В то же время фукоидан, в отличие от гепарина, лишен такого побочного эффекта, как тромбоцитопения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Закревская, А.Л. Тромбоциты крыс как модель исследования ингибиторов агрегации // Патологическая физиология системы гемостаза / под ред. Н.Н. Петрищева. – Л.: 1990. С. 46-54.
2. Шокур, О.А. Влияние фукоидана, выделенного из бурой морской водоросли *Saccharina japonica*, на агрегацию тромбоцитов *in vitro* / О.А. Шокур, Ю.С. Хотимченко // Биология моря. 2013. Т. 39. № 5. С. 380-383.
3. Bhatnagar, A. Environmental cardiology: studying mechanistic links between pollution and heart disease // Circ Res. 2006. V. 99(7). P. 692-705.
4. Born, G.V.R. Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets // J. Physiol. 1962. Vol. 162. P. 67-68.
5. Cumashi, A. A comparative study of the antiinflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds / A. Cumashi, N.A. Ushakova, M.E.A. Preobrazhenskaya // Glycobiology. 2007. V. 17 P. 541-552.
6. Hayakawa, K. Effect of fucoidan on the biotinidase kinetics in human hepatocellular carcinoma / K. Hayakawa, T. Nagamine // Anticancer Res. 2009. V. 4. P. 1211-1217.
7. Khotimchenko, Y.S. Antitumor properties of nonstarch polysaccharides: Fucoidans and chitosans // Russ. J. Mar. Biol. 2010. V. 36. P. 321-330.
8. Makarenkova, I.D. Antiviral activity of sulfated polysaccharide from the brown algae *Laminaria japonica* against avian influenza A (H5N1) virus infection in the cultured cells / I.D. Makarenkova, P.G. Deriabin, D.K. L'vov et al. // Vopr. Virusol. 2010. V. 55. P. 41-45.
9. Veena, C.K. Renal peroxidative changes mediated by oxalate: The protective role of fucoidan / C.K. Veena, A. Josephine, S.P. Preetha et al. / Life Sci. 2006. V. 79. P. 1789-1795.
10. Wang, J. Potential antioxidant and anticoagulant capacity of low molecular weight fucoidan fractions extracted from *Laminaria japonica* / J. Wang, Q.B. Zhang, Z.S. Zhang // Int. J. Biol. Macromol. 2010. V. 46. P. 6-12.
11. Zhu, Z. Higher specificity of the activity of low molecular weight fucoidan for thrombin-induced platelet aggregation / Z. Zhu, Q. Zhang, L. Chen et al. // Thrombosis Research. 2010. V. 125 P. 419-426.

THE ANTICOAGULANT ACTIVITY OF FUCOIDAN FROM THE BROWN ALGA *SACCHARINA JAPONICA* *IN VIVO*

© 2013 O.A. Shokur¹, N.V. Sergeeva², K.E. Makarova¹

¹ Institute of Marine Biology named after A.V. Zhirmunskiy FEB RAS, Vladivostok

² Medical Association of FEB RAS, Vladivostok

In experiments on rats anticoagulant, antiplatelet activity of fucoidan extracted from brown algae *Saccharina japonica* was evaluated. Fucoidan was administered intravenously in doses of 0,31, 1,25 and 2,5 mg/kg, 15-20 minutes before blood sampling. In the blood plasma was determined activated partial thromboplastin time (APTT), prothrombin time (PT), thrombin time (TT) and the amount of fibrinogen and platelet aggregation and its amount. Fucoidan has provided dose-dependent anticoagulant effect. The most sensitive tests were TV and APTT. In fucoidan concentration 1.25 mg/kg thrombin time test was increased in 1.74 times, while the APTT test – in 3.24 times as compared with control ($p < 0.05$). Fucoidan 1.25 mg/kg reduced the platelet aggregation on 14.4%, and the occurrence of disaggregation time – on 11.2%, at 2.5 mg/kg – on 27.3% and 29%, respectively ($p < 0.05$).

Key words: brown seaweed sulfated polysaccharides, hemostasis, aggregation, coagulation, platelets

Olga Shokur, Minor Research Fellow at the Pharmacology Laboratory. E-mail: olga_shokur@list.ru; Nataliya Sergeeva, Chief of the Laboratory Diagnostics Department. E-mail: natvladserg@mail.ru; Kseniya Makarova, Minor Research Fellow at the Pharmacology Laboratory. E-mail: k.e.makarova@gmail.com