

УДК 616.155.2-085.322:577.114

**ВЛИЯНИЕ КАРРАГИНАНОВ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ *IN VITRO***О.А. Шокур<sup>1</sup>, Е.В. Хожаенко<sup>2</sup>, Н.Ю. Рукина<sup>3</sup>, А.Б. Простакишина<sup>3</sup><sup>1</sup>Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),<sup>2</sup>Школа биомедицины Дальневосточного федерального университета (690091, г. Владивосток, ул. Суханова, 8),<sup>3</sup>301 Военный клинический госпиталь МО РФ (680028, г. Хабаровск, ул. Серышева, 1)**Ключевые слова:** сульфатированные полисахариды, тромбоциты, уровень агрегации.

Представлены результаты исследования влияния  $\lambda$ -,  $\kappa$ -,  $\iota$ -каррагинанов на агрегационную активность тромбоцитов *in vitro*. Под действием индукторов агрегации  $\lambda$ - и  $\iota$ -каррагинаны проявили высокую антиагрегантную активность, в отличие от  $\kappa$ -формы. Также продемонстрировано существенное усиление спонтанной агрегации под действием исследуемых веществ.

Сердечно-сосудистые заболевания являются основной причиной инвалидизации и смертности населения во всем мире. Последние исследования доказали, что тромбоцитам принадлежит ключевая роль в развитии инфарктов, инсультов и осложнений после шунтирования и ангиопластики [1]. Новые знания физиологии тромбоцитов изменили понимание их роли в формировании тромбов, регуляции воспаления и иммунных процессов [8]. Воздействуя на тромбоциты, можно предупредить образование тромбов, задержать развитие ишемической болезни сердца. По этой причине поиск эффективных и безопасных средств, комплексно воздействующих на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, остается актуальной задачей экспериментальной фармакологии.

Сульфатированные полисахариды обладают широким спектром фармакологических эффектов и, вероятно, могут оказывать влияние на агрегацию тромбоцитов. По своей химической структуре они являются сложными гетерогенными полианионами, образованными из повторяющихся углеводных единиц, и отрицательно заряжены благодаря наличию сульфатных групп [13]. Сульфатированные полисахариды в красных водорослях являются сульфатированными галактанами, в бурых водорослях содержатся сульфатированные фуканы, а в зеленых водорослях чаще встречаются арабино-галактаны и рамноза [4, 12, 14]. Некрахмальные полисахариды красных морских водорослей в экспериментальных моделях проявляют как анти-, так и протромботическую активность [6]. Многие авторы указывают на антикоагулянтное действие этих полисахаридов, в частности, сульфатированных поли-d-галактанов, или каррагинанов [12]. Сравнение трех коммерческих типов каррагинана ( $\lambda$ ,  $\kappa$ ,  $\iota$ ), различающихся по количеству и местоположению сульфатных групп и наличию 3,6-ангидрогалактозной связи, показало, что степень их воздействия на коагуляцию пропорционально количеству сульфатных групп: наивысшей антикоагулянтной активностью обладает  $\lambda$ -каррагинан, как максимально сульфатированный, наименьшей –  $\kappa$ -каррагинан, как наименее сульфатированный в сравниваемой группе

[14]. Интересно оценить воздействие коммерческих типов каррагинанов не только на коагуляционный гемостаз, но и на тромбоцитарное звено.

Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ влияния  $\kappa$ -,  $\iota$ - и  $\lambda$ -каррагинанов на агрегационную активность тромбоцитов *in vitro*.

**Материал и методы.** В работе использовали каррагинаны (Sigma-Aldrich, USA), аденозиндифосфорную кислоту (АДФ), коллаген («Ренам», Россия) и адреналин («Технология-Стандарт», Россия). Плазму крови получали от 36 условно здоровых добровольцев – мужчин в возрасте 18–30 лет. Забор крови проводили утром натощак в 9 мл контейнеры, содержавшие в качестве антикоагулянта 3,8% раствор натрия цитрата. В течение 15 мин после взятия и транспортировки при комнатной температуре кровь центрифугировали 15 мин при 200 g и температуре 20 °C для получения обогащенной тромбоцитами плазмы. Образцы плазмы исследовали в течение двух часов после получения пробы. Процедуры были одобрены этическим комитетом ВГМУ (протокол № 3 от 27.12.2010 г.).

Агрегацию тромбоцитов исследовали на двухканальном лазерном анализаторе 230LA (НПФ «Биола», Россия) на основании как световой агрегатометрии, так и анализа флуктуаций светового потока [3, 8]. Образование агрегатов большого размера (свыше 100 клеток) оценивали методом световой агрегатометрии по Борну в ответ на высокие дозы индукторов, таких как адреналин (10 мкг/мл), коллаген (2 мг/мл) и АДФ (0,1 мМ). Образцы каррагинанов добавляли в объеме 15 мкл, в качестве растворителя использовали дистиллированную воду. Образец предварительно нагревали при 37 °C в течение 2 мин, и затем реакцию активировали добавлением 15 мкл индуктора. Процесс образования агрегатов визуализировали графически. Уровень агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. Способность тромбоцитов к образованию агрегатов малого размера (менее 100 клеток) изучали на основе анализа кривой спонтанной агрегации. Процесс образования агрегатов инициировали перемешиванием. Агрегацию тромбоцитов выражали в условных единицах.

Готовили 0,05, 0,1 и 0,25% растворы, конечные концентрации которых составили 0,5, 1 и 2,5 мг/мл соответственно. Микробиологическую чистоту образцов оценивали путем посева на сахарный бульон. При статистической обработке данных применяли непараметрический критерий Вилкоксона для парных выборок.

**Результаты исследования.** Внесение 0,5 мг/мл раствора  $\lambda$ -каррагинана не вызывало статистически значимых изменений степени агрегации тромбоцитов. При добавлении в плазму 1 мг/мл  $\lambda$ -каррагинана наблюдали достоверное снижение агрегационной активности, вызванной 5 мкМ АДФ, выраженность ингибирования составила 67,7%. При увеличении дозы до 2,5 мг/мл понижение агрегационной активности составило 94,4%. Добавление 0,5 мг/мл раствора  $\lambda$ -каррагинана за 5 мин до введения индуктора (коллагена) вызвало достоверное снижение агрегационной активности тромбоцитов на 27,8% по сравнению с контролем. При внесении в плазму 1 мг/мл  $\lambda$ -каррагинана наблюдали снижение интенсивности коллагениндуцированной агрегации на 74,2%, при добавлении 2,5 мг/мл полисахарида – на 98,1%. Под действием адреналина  $\lambda$ -каррагинан в дозе 0,5 мг/мл статистически значимых отличий в агрегационной активности тромбоцитов не вызывал.  $\lambda$ -каррагинан в дозе 1 мг/мл снижал выраженность адреналининдуцированной агрегации на 63,3%, а при увеличении дозы в 2,5 раза – на 94,5% (табл. 1).  $\lambda$ -каррагинан удлинял латентную фазу коллагениндуцированной агрегации тромбоцитов в 1,5 раза (рис. 1).

При внесении 0,5 мг/мл  $\iota$ -каррагинана в обогащенную тромбоцитами плазму агрегационная активность тромбоцитов под действием индуктора (АДФ) снижалась на 37,6%, при повышении концентрации полисахарида в 2 раза наблюдали достоверное снижение активности АДФ-индуцированной агрегации на 72,9%, при увеличении концентрации полисахарида еще в 2,5 раза степень ингибирования составила 95,8%. Этот каррагинан в концентрации 0,5 мг/мл снижал интенсивность светопропускания коллагениндуцированной агрегации на 25,4%, в дозе 1 мг/мл – на 80,7%, при добавлении 2,5 мг/мл  $\iota$ -каррагинана регистрировали снижение агрегации на 94,5%. Добавление 0,5 мг/мл  $\iota$ -каррагинана ослабляло адреналининдуцированную агрегацию до 19,3%,  $\iota$ -каррагинан в концентрации 1 мг/мл снижал степень агрегации на 61,4%. При внесении 2,5 мг/мл  $\iota$ -каррагинана наблюдали достоверное снижение выраженности агрегации тромбоцитов, вызванной адреналином, на 91,2% (табл. 2).

$\lambda$ - и  $\iota$ -каррагинаны в малой концентрации преимущественно подавляли вторую, а с увеличением концентрации – и первую фазу АДФ-индуцированной агрегации (рис. 2).

При внесении растворов  $\kappa$ -каррагинана во всех исследуемых концентрациях не выявлено достоверного различия в выраженности индуцированной агрегации тромбоцитов.

Спонтанная агрегация дозозависимо менялась: регистрировалось ее усиление для всех видов сульфатированных полисахаридов (рис. 3). При введении полисахаридов в дозе 0,5 мг/мл она увеличивалась в 2–13 раз. С повышением дозировки более 0,1% образовывались крупные агрегаты, состоявшие более чем из 100 клеток.

Таблица 1

Максимальная степень агрегации тромбоцитов под влиянием растворов  $\lambda$ -каррагинана (медиана и интерквартильный размах)

Группа	Степень агрегации, %		
	АДФ	коллаген	адреналин
Контроль	50,2 (42,0–57,2)	55,3 (40,6–59,4)	40,3 (36,1–53,0)
0,05% p-p	52,0 (56,9–49,2)	41,6 (37,2–45,2)*	45,9 (40,9–51,6)
0,1% p-p	16,2 (13,8–20,9)*	14,3 (10,4–17,1)*	14,8 (13,3–17,9)*
0,25% p-p	2,8 (2,4–3,2)*	1,08 (1,0–1,6)*	2,2 (1,8–2,9)*

\* Здесь и в табл. 2: разница с контролем статистически значима.

Таблица 2

Максимальная степень агрегации тромбоцитов под влиянием растворов  $\iota$ -каррагинана (медиана и интерквартильный размах)

Группа	Степень агрегации, %		
	АДФ	коллаген	адреналин
Контроль	51,6 (44,3–58,1)	47,4 (31,9–60,3)	41,4 (30,4–45,3)
0,05% p-p	32,2 (27,8–37,8)*	35,4 (31,6–41,6)*	33,4 (25,7–36,9)*
0,1% p-p	14,0 (10,5–22,7)*	9,2 (1,1–17,7)*	16,0 (11,8–19,7)*
0,25% p-p	2,2 (1,7–4,1)*	2,6 (2,2–4,9)*	3,6 (2,7–7,5)*

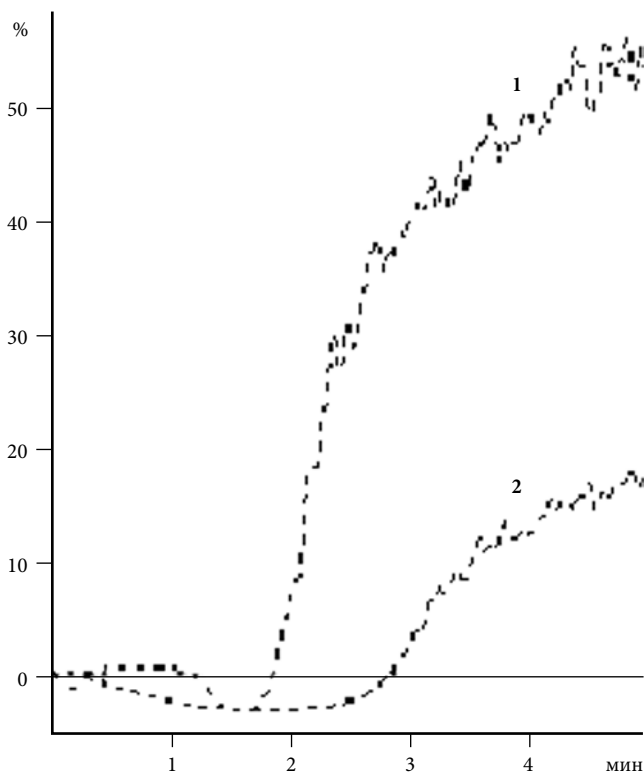


Рис. 1. Кривые антитромбоцитарного влияния полисахаридов на коллагениндуцированную агрегацию тромбоцитов обогащенной тромбоцитами плазмы. Максимальная агрегация выражена в процентах от 100% светопропускания.

Нормальная агрегация тромбоцитов (1) под действием коллагена характеризуется достаточно выраженной латентной фазой. Кривая агрегации тромбоцитов после введения раствора  $\lambda$ -каррагинана в дозировке 0,5 мг/мл (2) характеризуется удлинением лаг-фазы по сравнению с контролем.

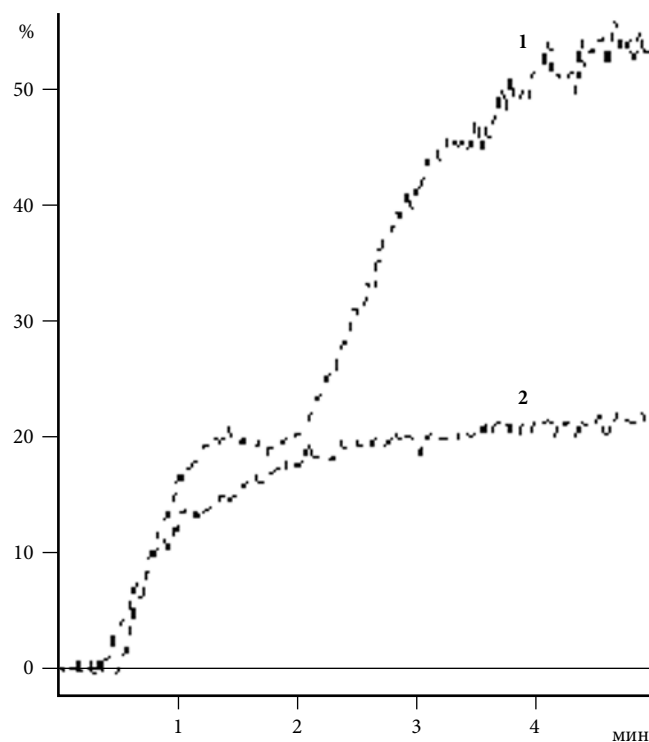


Рис. 2. Кривые АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов под действием сульфатированных полисахаридов, полученные по методу Борна. Максимальная агрегация выражена в процентах от 100% светопропускания.

Нормальная агрегация тромбоцитов (1) характеризуется первой волной, индуцированной АДФ, за которой следует вторая волна, в результате выброса тромбоцитарного пула. Кривая агрегации тромбоцитов после внесения раствора *l*-каррагинана в дозировке 0,5 мг/мл (2) характеризуется только первой волной, индуцированной АДФ, который не вызывал вторую волну агрегации тромбоцитов.

**Обсуждение полученных данных.** Проведенные эксперименты показали, что активность агрегации тромбоцитов снижается под действием полисахаридов дозозависимо. Способностью подавлять агрегацию тромбоцитов обладают высокосульфатированные полисахариды ( $\lambda$ - и *l*-каррагинан), в то время как *k*-форма с минимальной степенью этерификации не влияет на агрегацию тромбоцитов.  $\lambda$ - и *l*-каррагинаны увеличивают длительность латентной фазы коллаген-индуцированной агрегации, что может быть связано с подавлением активации фосфолипазы С [15].  $\lambda$ - и *l*-каррагинаны в низкой концентрации подавляют вторую фазу индуцированной агрегации. Высокие концентрации каррагинанов ингибируют обе фазы АДФ-индуцированной агрегации. Для всех исследуемых высокомолекулярных полисахаридов характерно усиление спонтанной агрегации.

Как видно из представленных данных, под действием индукторов АДФ и коллагена происходят наиболее значимые изменения в показателях агрегатограмм, свидетельствующие о понижении агрегационной активности тромбоцитов. При этом в группе с *l*-каррагинаном отмечается наибольшее количество статистически достоверных изменений, выявляемых индукторами АДФ и коллагеном по сравнению с адреналином. Эти данные могут свидетельствовать о том, что исследуемые

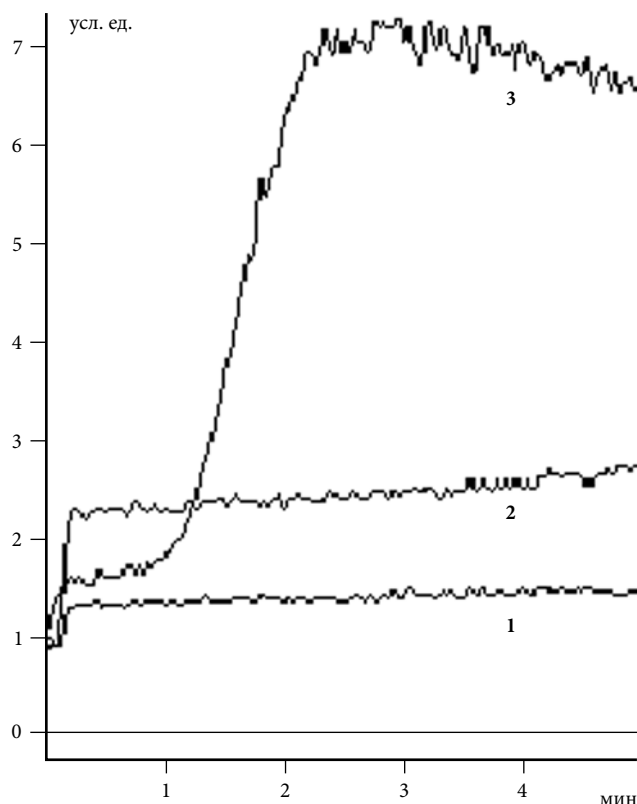


Рис. 3. Кривые спонтанной агрегации тромбоцитов. Анализ агрегации тромбоцитов был выполнен на основании анализа флуктуаций светового потока [6]. Агрегация выражена в условных единицах.

Кривые спонтанной агрегации тромбоцитов в норме (1), при внесении раствора *l*-каррагинана в дозе 0,5 мг/мл (2), при внесении раствора *l*-каррагинана в концентрации 0,1 мг/мл (3).

вещества в наибольшей степени влияют на активность гликопротеиновых рецепторов Ia–IIa и рецепторов пуринагического класса GPCR, на мембране тромбоцитов [2]. В целом изменения агрегационных свойств тромбоцитов под влиянием каррагинанов недостаточно ассоциированы с конкретной группой рецепторов. Однако для  $\lambda$ -каррагинана по сравнению с *l*-каррагинаном отличия проявляются в большей степени.

Ранее было обнаружено, что каррагинаны усиливают агрегацию, вызванную АДФ, и подавляют тромбининдуцированную агрегацию, при этом самым эффективным являлся  $\lambda$ -каррагинан [11]. Действие АДФ на агрегацию тромбоцитов, предварительно обработанных каррагинанами, было выявлено Güven et al. (1991). Эти авторы также считают, что ристоцетининдуцированная агрегация подавляется всеми исследуемыми каррагинанами [9]. Ключевая роль в развитии данного агрегационного эффекта приписывается рецепторам GP IIb/IIIa, рецепторам фактора фон Виллебранда или фибриногеновым рецепторам на мембране тромбоцита [4, 9, 10].

Подобная активация агрегации тромбоцитов была описана для *d*-галактанов красной водоросли *Bytriodia occidentalis* и некоторых фракций из водорослей *Codium fragile* и *C. Vermilara* [4, 5]. Предполагалось, что данные свойства проявляются благодаря тому,

что исследуемые полисахариды сами выступают в качестве индукторов [5]. Возможно, под влиянием сульфатированных полисахаридов спонтанная агрегация усиливается за счет увеличения концентрации кальция в клетке [15], но нельзя исключить возможности активации альтернативного пути компонента комплемента в клетке на введение полисахаридов [11], а также прямого механического воздействия на тромбоциты, в связи с высоким молекулярным весом и сложной структурой веществ.

#### Литература

1. Белушкина Н.Н., Дегтярева О.Г., Махлай А.А. и др. Рецепторы тромбоцитов – мишень для антиагрегационной терапии // Молекулярная медицина. 2011. № 3. С. 10–17.
2. Воронина Е. Н., Филипенко М.Л., Сергеевичев Д.С., Пикалов И.В. Мембранные рецепторы тромбоцитов: функции и полиморфизм // Вестник ВОГиС. 2006. Т. 10, № 3. С. 553–564.
3. Born G.V.R. Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets // The Journal of Physiology. 1962. Vol. 162. P. 67–68.
4. Ciancia M., Quintana I., Vizcarguenaga M. I. et al. Polysaccharides from the green seaweeds *Codium fragile* and *C. vermiliera* with controversial effects on hemostasis // International Journal of Biological Macromolecules. 2007. Vol. 41. P. 641–649.
5. Farias W.R.L., Nazareth R.A., Mourão A.P.S. Dual effects of sulfated D-galactans from the Red Algae *Botryocladia occidentalis* preventing thrombosis and inducing platelet aggregation // Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2001. Vol. 86. P. 1540–1546.
6. Fonseca R.J.C., Oliveira S.N., Melo M.R.S. et al. Slight differences in sulfatation of algal galactans account for differences in their anticoagulant and venous antithrombotic activities // Thrombosis and Haemostasis. 2008. Vol. 99, No. 3. P. 539–545.
7. Gabbasov Z.A., Popov E.G., Gavrillov I.Yu., Posin E.Ya. Platelet aggregation: the use of optical density fluctuations to study microaggregate formation in platelet suspension // Thrombosis Research. 1989. Vol. 54, No. 3. P. 215–223.
8. Gawaz M., Langer H., May A.E. Platelets in inflammation and atherogenesis // Journal of Clinical Investigation. 2005. Vol. 115, No. 12. P. 3378–3384.
9. Güven K.C., Ozsoy Y., Ulutin O.N. Anticoagulant, fibrinolytic and antiaggregant activity of carrageenans and alginic acid // Botanica marina. 1991. Vol. 34. P. 429–432.
10. Han F., Yao W., Yang X. et al. Experimental study on anticoagulant and antiplatelet aggregation activity of a chemically sulfated marine polysaccharide YCP // International Journal of Biological Macromolecules. 2005. Vol. 36. P. 201–207.
11. Kindness G., Long W.F., Williamson F.B., Boyd J. Effects of carrageenans on the aggregation of human blood platelets // Thrombosis Research. 1979. Vol. 15. P. 3–15.
12. Pereira M.G., Benevides N.M.B., Melo M.R.S. et al. Structure and anticoagulant activity of a sulfated galactan from the red alga, *Gelidium crinale*. Is there a specific structural requirement for the anticoagulant action? // Carbohydrate Research. 2005. Vol. 340, No. 12. P.2015–2023.
13. Rodrigues J. A.G., Araujo I.W.F., Paula G.A. et al. Isolation, fractionation and anticoagulant activity of iota-carrageenans from *Solieria filiformis* // Ciencia Rural. 2010. Vol. 40, No. 11. P. 2310–2316.
14. Silva F.R.F., Dore C.M.P.G., Marques C.T. et al. Anticoagulant activity, paw edema and pleurisy induced carrageenan: action of major types of commercial carrageenans // Carbohydrate Polymers. 2010. Vol. 79. No. 1. P. 26–33.
15. Yeh H.I., Chen I.J., Teng Ch.M. Cyclooxygenase-independent pathway of phospholipase activation in carrageenan-induced platelet aggregation // Thrombosis Research. 1987. Vol. 45. P. 39–49.

Поступила в редакцию 10.01.2013.

#### INFLUENCE OF CARRAGEENANS ON PLATELET AGGREGATION IN VITRO

O.A. Shokur<sup>1</sup>, E.V. Khozhaenko<sup>2</sup>, N.U. Rukina<sup>3</sup>, A.B. Prostackishina<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pacific State Medical University (2 Ostryakova Av. Vladivostok 690950 Russian Federation), <sup>2</sup>School of Biomedicine of the Far Eastern Federal University (8 Sukhanova St. Vladivostok 690091 Russian Federation), <sup>3</sup>301 Military Clinical Hospital (1 Serisheva St. Khabarovsk 680028 Russian Federation)

**Summary** – The results of studies of the effect  $\lambda$ -,  $\kappa$ -,  $\iota$ -carrageenan on platelet aggregation in vitro are described in this article. In contrast to  $\kappa$ -forms  $\lambda$ - and  $\iota$ -carrageenans demonstrated a high antiplatelet activity under the influence of used aggregation inducers. The effect on spontaneous aggregation was also investigated; a significant increase of spontaneous aggregation under the influence of these substances was shown.

**Key words:** sulfated polysaccharides, thrombocytes, aggregant activity.

Pacific Medical Journal, 2013, No. 2, p. 25–28.

УДК 615.073:574.94:535.243

## СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НЕКОТОРЫХ АЛКАЛОИДОВ

П.С. Зориков, В.М. Колдаев

Горнотаежная станция им. В.Л. Комарова Дальневосточного отделения Российской академии наук (692533, Приморский край, Уссурийский район, с. Горнотаежное, ул. Солнечная, 26)

**Ключевые слова:** алкалоиды из растительного сырья, абсорбционные оптические спектры, полоса поглощения.

Изучены дополнительные спектрофотометрические параметры (точки перегиба, ширина полосы пропускания, ступеньки и их крутизна оптических спектров поглощения) девяти алкалоидов, часто используемых в лечебной практике. Совокупность всех изученных параметров составляет «спектрофотометрический портрет» алкалоидов, что можно использовать для тестирования и контроля их качества.

Алкалоиды – азотосодержащие органические соединения, чаще всего растительного происхождения, широко применяются в медицине как вегетотропные и другие лекарственные препараты [1]. Одним из методов оценки качества и анализа алкалоидов в фармакопее служит абсорбционная спектрофотометрия [2, 3]. Однако при этом, как правило, используются только координаты максимумов поглощения, а другие характерные точки спектрограмм не учитываются. Спектрофотометрические параметры алкалоидов изучены недостаточно полно,

Колдаев Владимир Михайлович – д-р биол. наук, профессор, в.н.с. лаборатории лекарственных растений Горнотаежной станции ДВО РАН; e-mail: koldayev@vsgmu.ru