



Оригинальное исследование
УДК 615.322
<http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2022-4-8>

АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ КАРРАГИНАНОВ ВОДОРОСЛИ *CHONDRUS ARMATUS* И ПРОДУКТОВ ИХ ДЕПОЛИМЕРИЗАЦИИ

Мария Андреевна Бегун

Дальневосточный федеральный университет, Владивосток, Россия, begun.ma@dvfu.ru,
<https://orcid.org/0000-0002-7509-0958>

Аннотация. Патологические процессы системы гемостаза являются одним из основных звеньев патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний. В связи с этим особый интерес представляет поиск веществ, способных оказывать влияние на процессы коагуляции и агрегации. Настоящее исследование посвящено изучению влияния каррагинанов красной водоросли *Chondrus armatus* и их деполимеризованных производных на коагуляционный гемостаз в эксперименте *in vitro*.

Образцы λ - и κ -каррагинанов были выделены из водоросли и деполимеризованы методом гидролиза и ультразвукового разложения. Методами высокоэффективной эксклюзионной хроматографии (ВЭЭХ) и ИК-спектроскопии был проведен структурный анализ. Для проведения *in vitro* исследований плазму крови здоровых добровольцев инкубировали с анализируемыми веществами и проводили определение активированного частичного тромбoplastинного времени (АЧТВ), тромбинового (ТВ) и протромбинового времени (ПВ). В ходе исследования установлено, что изучаемые образцы каррагинанов в экспериментах *in vitro* увеличивают АЧТВ и ТВ, но не оказывают влияния на показатель протромбинового времени. При этом λ -каррагинан и его деполимеризованные производные проявляют большую эффективность по сравнению с κ -каррагинанами. Каррагинаны водоросли *Chondrus armatus* проявляют антикоагулянтный эффект, который носит дозозависимый характер и зависит от особенностей химической структуры образца.

Ключевые слова: сульфатированные полисахариды, каррагинан, биологическая активность, коагуляционный гемостаз

Для цитирования: Бегун М.А. Антикоагулянтная активность каррагинанов водоросли *Chondrus armatus* и продуктов их деполимеризации / М.А. Бегун // Дальневосточный медицинский журнал. – 2022. – № 4. – С. 47-51. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2022-4-8>.

ANTICOAGULANT ACTIVITY OF CHONDRUS ARMATUS ALGAE CARRAGENANES AND THEIR DEPOLYMERIZATION PRODUCTS

Maria A. Begun

Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russia, begun.ma@dvfu.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7509-0958>

Abstract. Pathological processes of the hemostasis system are one of the main links in the pathogenesis of cardiovascular diseases. In this regard, search for substances, which can influence the processes of coagulation and aggregation, has a particular interest. The presented research is devoted to the study of the effect of carrageenans of the red algae *Chondrus armatus* and their depolymerized derivatives on coagulation hemostasis in an *in vivo* and *in vitro* experiment. Samples of λ - and κ -carrageenans were isolated from algae and depolymerized by hydrolysis and ultrasonic decomposition. Structural analysis was carried out using high performance size exclusion chromatography (HPSEC) and IR-spectroscopy methods. For *in vitro* studies, the blood plasma of healthy volunteers was incubated with the analyzed substances and the activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin (TT) and prothrombin time (PT) were determined. It was found that the studied samples of carrageenans increase APTT and TT, but do not affect the prothrombin time. At the same time, λ -carrageenan and its depolymerized derivatives are more effective than κ -ones. Carrageenans from the algae *Chondrus armatus* exhibit an anticoagulant effect, which is dose-dependent and depends on the chemical structure of the sample.

Key words: sulfated polysaccharides, carrageenan, biological activity, coagulation hemostasis

For citation: Begun M.A. Anticoagulant activity of *Chondrus armatus* algae carragenanes and their depolymerization products / M.A. Begun // Far Eastern medical journal. – 2022. – № 4. – P. 47-51. <http://dx.doi.org/10.35177/1994-5191-2022-4-8>.



Согласно статистическим данным, патологии сердечно-сосудистой системы (ССС) занимают ведущее место по распространенности и уровню смертности среди хронических неинфекционных заболеваний в мире [1]. В связи с этим, постоянно ведутся исследования по поиску новых методов для их профилактики и лечения [2, 3]. Особое внимание уделяется разработке эффективных и безопасных лекарственных препаратов, влияющих на систему гемостаза – одно из звеньев, обеспечивающих работу СССР.

Поиск биологически активных молекул – потенциальных лекарственных веществ – осуществляется не только среди химически синтезированных субстанций, но и среди веществ природного происхождения [4]. Перспективной для использования в терапевтических целях является группа сульфатированных галактанов с иммуномодулирующей,

противоопухолевой, антиагрегантной активностью [5-7]. Одним из представителей этого класса веществ являются каррагинаны – сульфатированные полисахариды красных водорослей, состоящие из чередующихся звеньев галактозы и 3,6-ангидрогалактозы. Различные комбинации таких звеньев, отличающихся друг от друга по химической структуре основного сахара, количества и расположения сульфатных групп, обуславливают разделение каррагинанов на подтипы (μ , λ , κ , θ), которые, в свою очередь, проявляют различные физико-химические и биологические свойства [5].

Целью настоящей работы является изучение влияния каррагинанов водоросли *Chondrus armatus*, а также их производных, полученных различными методами деполимеризации, на коагуляционный гемостаз в экспериментах *in vitro*.

Материалы и методы

Исходным сырьем для получения полисахаридов являлись водоросли *Chondrus armatus* семейства *Gigartineae*, собранные в акватории залива Петра Великого. Выделение каррагинанов проводили методом горячей водной экстракции с последующим высаживанием 95 % спиртом этиловым. Фракционирование полученного полисахарида осуществляли с помощью 4 % раствора KCl, по описанной ранее методике [8]. Уменьшение молекулярно-массового распределения отдельных фракций проводили методами ультразвуковой (УЗ) деполимеризации (λ - и κ -каррагинан), кислотного гидролиза (κ -каррагинан) и автогидролиза (λ -каррагинан).

Для подтверждения химической структуры полисахаридов и их производных проводили анализ ИК-спектров, полученных на ИК-спектрометре с Фурье преобразованием (IRAffinity-1S, Shimadzu, Япония). Анализ молекулярно-массового распределения (ММР) осуществляли методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence при следующих условиях:

колонок – Shodex OHpak SB-804MHQ (8 мм × 300 мм, лимит эксклюзии 1×10^6 г/Моль, размер частиц 10 μ м), подвижная фаза – 0,1 М раствор NaNO₃, скорость потока – 0,8 мл/мин, детектор – рефрактометрический.

Для изучения влияния исследуемых образцов на коагуляционный гемостаз у 10 здоровых добровольцев утром, натощак проводили забор крови из локтевой вены в пластиковые пробирки (стабилизатор 3,8 % раствор натрия цитрата в соотношении 1:9). Полученные образцы цельной крови центрифугировали в течение 15 минут при 1200 g и 4° С, после чего собирали плазму. Затем к 900 мкл плазмы крови добавляли 100 мкл раствора каррагинана, инкубировали в течение 5 минут и определяли показатели активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), протромбинового времени (ПВ) и тромбинового времени (ТВ). Измерения проводили на полуавтоматическом коагулометре Humaclot duo plus (Human GmbH, Германия) с использованием стандартных наборов реактивов производства «Технология стандарт» (Барнаул, Россия).

Результаты и обсуждение

В результате экстракции из водоросли *Chondrus armatus* была получена фракция суммарного каррагинана, которую подвергали разделению 4 % солевым раствором KCl на отличающиеся по химической структуре λ - и κ -фракции. Методом ИК-спектроскопии было подтверждено соответствие выделенных образцов ранее установленной химической структуре λ - и κ -каррагинанов [9]. Так, спектры κ -каррагинана содержали полосы поглощения при 1070 см⁻¹, 930 см⁻¹ характерные для 3,6-ангидрогалактозы, а также при 849 см⁻¹ – относящиеся ко вторичной аксиальной сульфатной группе при C-4 ангидрогалактозного остатка (рис. 1). Согласно рисунку 2 на спектрах образцов λ -каррагинанов присутствовали пики при 815 и 830 см⁻¹, характерные для сульфатных групп остатка галактозы при C-6 и C-2 соответственно [9, 10].

Для изучения влияния значений молекулярной массы на биологическую активность для обеих фракций были получены деполимеризованные образцы. Возможные изменения в основных химических структурах (положение сульфатных групп, степень сульфатирования), происходящие под действием деполимеризующих агентов, отслеживали с помощью ИК-спектроскопии (рис. 1 и 2). Согласно данным полученных спектров в результате гидролиза и УЗ воздействия образцы λ - и κ -каррагинанов сохраняли основные структурные характеристики. Эффективность деполимеризации оценивали по значениям ММР на основании результатов высокоэффективной эксклюзионной хроматографии. Установлено, что используемые в исследовании методы позволяют снизить молекулярные массы образцов (таблица). Однако, полученные в результате кислотного и автогидролиза



образцы были обладали широким распределением молекулярных масс, в то время как деполимеризованные УЗ вещества отличались более гомогенным по молекулярным массам составом. Это может являться важным фактором на следующих этапах исследования в случае проведения работ по получению стандартизированной субстанции с целью использования в фармацевтической промышленности.

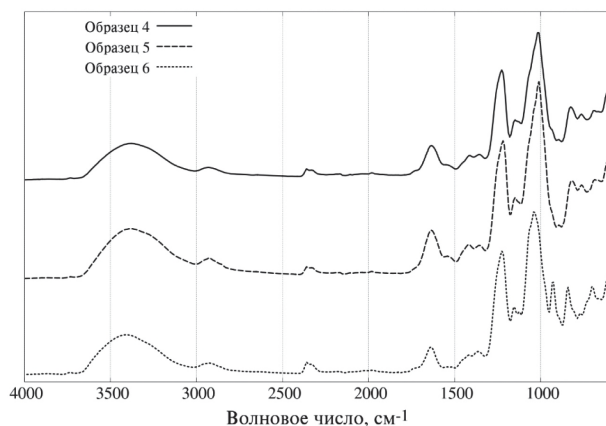


Рис 1. ИК-спектры κ-каррагинана и их деполимеризованных производных. Образец 1 – κ-каррагинан с Mw 500,207 кДа; образец 2 – κ-каррагинан с Mw 235,032 кДа; образец 3 – κ-каррагинан с Mw 21,835 кДа

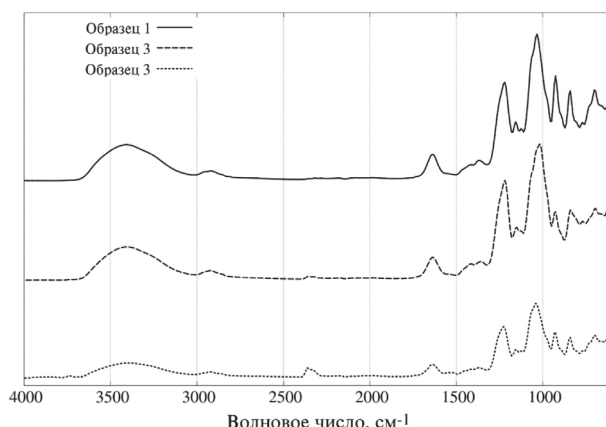
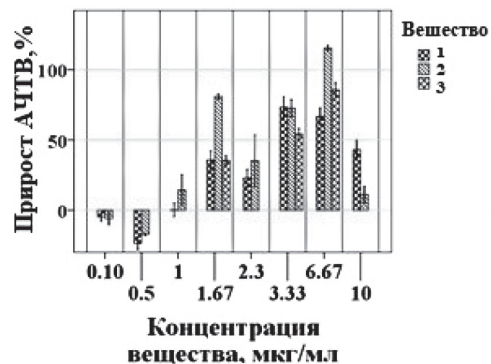


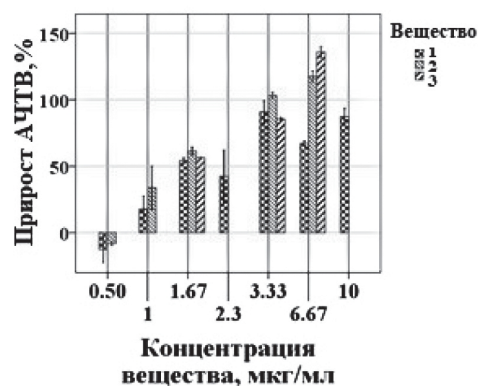
Рис 2. ИК-спектры λ-каррагинана и деполимеризованных производных. Образец 4 – λ-каррагинан с Mw 498,623 кДа; образец 5 – λ-каррагинан с Mw 387,050 кДа; образец 6 – λ-каррагинан с Mw 45,380 кДа

Таблица – Характеристика исследуемых образцов

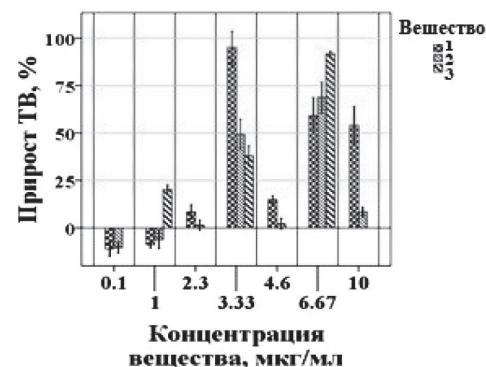
	Тип каррагинана	Метод деполимеризации	Среднемолекулярная масса (Mw), кДа	Среднечисловая масса (Mn), кДа	Полидисперсность, Mw/Mn
Образец 1	κ	-	500,207	178,645	2,8
Образец 2	κ	Кислотный гидролиз	235,032	60,264	3,9
Образец 3	κ	УЗ разложение	21,835	13,647	1,6
Образец 4	λ	-	498,623	113,323	4,4
Образец 5	λ	Автогидролиз	387,050	90,011	3,6
Образец 6	λ	УЗ разложение	45,380	25,211	1,8



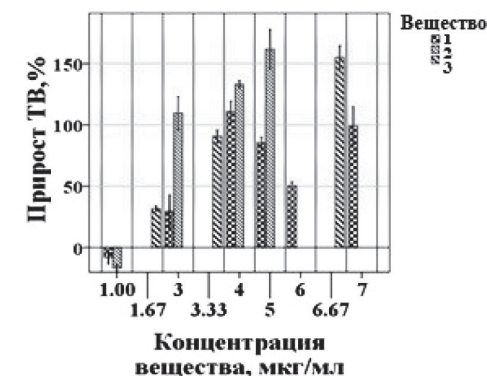
3А



3В



3Б



3Г

Рис 3. Влияние κ- и λ-каррагинанов и их деполимеризованных производных на показатели АЧТВ и ТВ. 3А и 3Б: вещество 1 – κ-каррагинан с Mw 500,207 кДа; 2 – κ-каррагинан с Mw 235,032 кДа; 3 – κ-каррагинан с Mw 21,835; 3В и 3Г: вещество 1 – λ-каррагинан с Mw 498,623; 2 – λ-каррагинан с Mw 387,050; 3 – λ-каррагинан с Mw 45,380



В настоящем исследовании было изучено влияние полученных образцов каррагинанов на конечный этап свертывания крови, активность внутреннего и внешнего звеньев гемостаза, для чего были проведены тесты на определение активированного частичного тромбопластинового времени, тромбинового и протромбинового времени.

В экспериментах *in vitro* было установлено, что в концентрации до 1 мкг/мл к-каррагинан и его производные не оказывали влияния на величину АЧТВ и ТВ. Полученные данные представлены на рис. 3а, 3б. Так, образец 1 в концентрации 2,50 мкг/мл увеличивал АЧТВ на 23 %, ТВ на 15 %, а в концентрации 6,67 мкг/мл на 65 % и 57 % соответственно. к-каррагинан с Mw 235,032 кДа в концентрации 6,67 мкг/мл удлинял АЧТВ более чем в 2 раза, а ТВ в 1,5 раза. к-каррагинан с Mw 21,835 (6,67 мкг/мл) в 1,8 раза увеличивал АЧТВ и ТВ.

Согласно представленным на рисунке 3В и 3Г данным, высокомолекулярный образец λ-каррагинана *in vitro* индуцировал удлинение АЧТВ в 1,5 раза в концентрации 1,67 мкг/мл и ТВ – 1,3 раза в концентрации 2,3 мкг/мл, но не оказывал влияния на ПВ (данные не представлены). λ-каррагинан с Mw 424,05 увеличивал АЧТВ и ТВ в концентрации 3,33 мкг/мл в 2 раза, а в концентрации 10 мкг/мл в 2,2 и 2,3 раза соответственно. λ-каррагинан с Mw 45,380 удлинял АЧТВ в 2,4, а ТВ в 2,6 раз (концентрация 6,67 мкг/мл).

Таким образом, исследуемые образцы в экспериментах *in vitro* проявляют антикоагулянтный эффект, путем увеличения активированного частичного тромбопластинового времени и тромбинового времени.

Эффективность исследуемых образцов каррагинанов зависит от структурных особенностей молекулы. Так, λ-каррагинан и его деполимеризованные производные, содержащие по три сульфатных группы на дисахаридный остаток, проявляли большую эффективность по сравнению с образцами к-каррагинана, являющихся моноэфирами (рис. 3). Это позволяет предположить, что активным центром молекулы каррагинана, ответственным за влияние на систему коагуляции, являются сульфатные группы, которые обеспечивают взаимодействие каррагинанов с факторами каскада свертывания. Одним из путей реализации антикоагулянтного эффекта может быть связывание каррагинанами ионов кальция – фактора IV, который необходим для активации многих протеинов коагуляционного гемостаза. Полученные данные находят подтверждение в исследованиях других авторов [11-13]. Также была отмечена более высокая эффективность молекул с меньшим значением средневесовой молекулярной массы, что должно благоприятно отразиться на всасываемости исследуемых веществ в *in vivo* экспериментах при пероральном введении.

Таким образом, λ- и к-каррагинаны, выделенные из водоросли *Chondrus armatus*, и их низкомолекулярные производные, в эксперименте *in vitro* проявляли антикоагулянтное действие. λ-каррагинан с Mw 45,380 оказывал наиболее выраженный эффект, вызывая увеличение активированного частичного тромбопластинового времени и тромбинового времени в 2,5 раза в концентрации 6,67 мкг/мл. Активность образцов λ-каррагинана носит прямой дозозависимый характер.

Список источников

1. Панина Ю.Н., Яковлев А.П. Заболевания сердечно-сосудистой системы: анализ, методы профилактики // Ученые записки орловского государственного университета. Серия: естественные, технические и медицинские науки. – 2011. – № 5. – С. 80-82.
2. Мжаванадзе Н.Д., Бозо И.Я., Калинин Р.Е., Деев Р.В. Реалии и перспективы применения генной терапии в сердечно-сосудистой хирургии // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Том VII, № 2. – С. 58-62.
3. Оганов Р.Г., Герасименко Н.Ф., Погосова Г.В., Колтунов И.Е. Профилактика сердечно-сосудистых заболеваний: пути развития // КВТиП. – 2011. – № 3. – С. 5-7.
4. Wijesekara I., Pangestutia R., Kima S.-K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae // Carbohydrate Polymers. – 2011. – № 84. – P. 14-21.
5. Campo V.L., Kawano D.F., da Silva Jr. D.B., Carvalho I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis // Carbohydrate Polymers. – 2009. – № 77. – P. 167-180.
6. Bondu S., Deslandes E., Fabre M. S., Berthou C., Guangli Y. Carrageenan from *Solieria chordalis* (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions // Carbohydrate Polymers. – 2010. – № 81. – P. 448-460.
7. Bouhlal R., Haslin C., Chermann J.-C., Collic-Jouault S., Sinquin C., Simon G., Cerantola S., Riadi H., Bourgougnon N. Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from *Sphaerococcus coronopifolius* (Rhodophyta, Gigartinales) and *Boergeseniella thuyoides* (Rhodophyta, Ceramiales) // Mar. Drugs. – 2011. – № 9. – P. 1187-1209.
8. Cicinskas E., Begun M.A., Vikhareva V.V., Karetin Yu.A., Kalitnik A.A. Immunological effects of *Chondrus armatus* carrageenans and their low molecular weight degradation products // Journal of biomedical materials research. – 2020. – P. 1-11.
9. Yermak I.M., et al. Chemical structure and gel properties of carrageenan from algae belonging to the Gigartinales and Rhodophyta, collected from the Russian Pacific coast // J. Appl. Phycol. – 1999. – Vol. 11. – P. 41-48.



10. Tojo E., Pradob J. Chemical composition of carrageenan blends determined by IR spectroscopy combined with a PLS multivariate calibration method // Carbohydrate Research. – 2003. – № 338. – P. 1309-1312.
11. A. de Araújo C., Nosedá M.D., Cipriani T.R., Gonçalves A.G., Duarte M.E.R., Ducatti D.R.B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties// Carbohydrate Polymers. 2013. – Vol. 91, № 2. – P. 483-491.
12. Anderson W., Duncan G.C., Harthill J.E. The anticoagulant activity of carrageenan// Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 1965. – Vol. 17, № 10. – P. 647-654.
13. Pereira M.S., Melo F.R., Mourao P.A.S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? // Glycobiology. – 2002. – № 12. – P. 573-580.

References

1. Panina Yu.N., Yakovlev A.P. Diseases of the cardiovascular system: analysis, methods of prevention // Scientific notes of the Oryol State University. Series: natural, technical and medical sciences. – 2011. – № 5. – P. 80-82.
2. Mzhavanadze N.D., Bozo I.Ya., Kalinin R.E., Deev R.V. Realities and prospects for the use of gene therapy in cardiovascular surgery // Cell Transplantation and Tissue Engineering. – 2012. – Vol. VII, № 2. – P. 58-62.
3. Oganov R.G., Gerasimenko N.F., Pogossova G.V., Koltunov I.E. Prevention of cardiovascular diseases: ways of development // Cardiovascular Therapy and Prevention. – 2011. – № 3. – P. 5-7.
4. Wijesekara I., Pangestutia R., Kima S.-K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae // Carbohydrate Polymers. – 2011. – № 84. – P. 14-21.
5. Campo V.L., Kawano D.F., da Silva Jr. D.B., Carvalho I. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis // Carbohydrate Polymers. – 2009. – № 77. – P. 167-180.
6. Bondu S., Deslandes E., Fabre M. S., Berthou C., Guangli Y. Carrageenan from Solieria chordalis (Gigartinales): Structural analysis and immunological activities of the low molecular weight fractions // Carbohydrate Polymers. – 2010. – № 81. – P. 448-460.
7. Bouhlal R., Haslin C., Chermann J.-C., Collic-Jouault S., Sinquin C., Simon G., Cerantola S., Riadi H., Bourgougnon N. Antiviral Activities of Sulfated Polysaccharides Isolated from Sphaerococcus coronopifolius (Rhodophyta, Gigartinales) and Boergeseniella thuyoides (Rhodophyta, Ceramiales) // Mar. Drugs. – 2011. – № 9. – P. 1187-1209.
8. Cicinskas E., Begun M.A., Vikhareva V.V., Karetin Yu.A., Kalitnik A.A. Immunological effects of Chondrus armatus carrageenans and their low molecular weight degradation products // Journal of biomedical materials research. – 2020. – P. 1-11.
9. Yermak I.M., et al. Chemical structure and gel properties of carrageenan from algae belonging to the Gigartinales and Tichocarpales, collected from the Russian Pacific coast // J. Appl. Phycol. – 1999. – Vol. 11. – P. 41-48.
10. Tojo E., Pradob J. Chemical composition of carrageenan blends determined by IR spectroscopy combined with a PLS multivariate calibration method // Carbohydrate Research. – 2003. – № 338. – P. 1309-1312.
11. A. de Araújo C., Nosedá M.D., Cipriani T.R., Gonçalves A.G., Duarte M.E.R., Ducatti D.R.B. Selective sulfation of carrageenans and the influence of sulfate regiochemistry on anticoagulant properties// Carbohydrate Polymers. 2013. – Vol. 91, № 2. – P. 483-491.
12. Anderson W., Duncan G.C., Harthill J.E. The anticoagulant activity of carrageenan// Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 1965. – Vol. 17, № 10. – P. 647-654.
13. Pereira M.S., Melo F.R., Mourao P.A.S. Is there a correlation between structure and anticoagulant action of sulfated galactans and sulfated fucans? // Glycobiology. – 2002. – № 12. – P. 573-580.

Вклад авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Contribution of the authors: the authors contributed equally to this article.

The authors declare no conflicts of interests.

Статья принята к публикации 10.10.2022.

The article was accepted for publication 10.10.2022.

