

УДК 615.322

3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия

DOI: 10.37903/vsgma.2022.4.29 EDN: YURPGD

**ИССЛЕДОВАНИЕ АГРЕГАЦИОННОЙ СПОСОБНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ КАРРАГИНАНОВ КРАСНОЙ ВОДОРОСЛИ *CHONDRUS ARMATUS***

© Бегун М.А.

*Дальневосточный федеральный университет, Россия, 690922, Приморский край, г. Владивосток, о. Русский, п. Аякс, 10**Резюме*

**Цель.** Исследование влияния  $\lambda$ - и  $\kappa$ -каррагинанов, выделенных из красной водоросли *Chondrus armatus*, и их деполимеризованных производных на индуцированную аденозиндифосфатом (АДФ) агрегацию тромбоцитов в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

**Методика.** Для проведения экспериментов *in vitro* обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП), полученную из цельной крови здоровых добровольцев, инкубировали с анализируемыми образцами полисахаридов (в концентрациях 0,05; 0,5; 1; 2 мг/мл) в течение 5 минут при 37 °С. Полученную смесь помещали в кювету агрегометра «Биола» (Россия) и через 10 секунд после запуска измерения вносили индуктор (АДФ, конечная концентрация 5 мкг/мл). Степень агрегации оценивали по кривой светопоглощения (в %). При проведении *in vivo* исследований беспородным мышам самцам в течение 7 дней перорально вводили растворы анализируемых полисахаридов и препарата сравнения (ацетилсалициловая кислота). На 8 день проводили забор крови пункцией сердца, получали ОТП, для которой проводили измерение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов по описанной ранее методике.

**Результаты.** Исследуемые образцы каррагинанов в концентрациях более 0,5 мг/мл уменьшали степень агрегации тромбоцитов. Фракция  $\kappa$ -каррагинана вызывала изменение уровня агрегации более чем на 50% только в нативном виде в концентрации 2 мг/мл. В то время как  $\lambda$ -каррагинан и его гидролизованное производное уменьшали степень агрегации тромбоцитов более чем на 60% в концентрации 0,5 мг/мл. Отмечен дозозависимый характер проявляемого эффекта. В экспериментах *in vivo* достоверное изменение агрегации тромбоцитов глагол при применении деполимеризованной формы  $\lambda$ -каррагинана ( $p < 0,05$ ), однако проявляемое действие не превосходило эффект положительного контроля.

**Заключение.** Способность каррагинанов, выделенных из водоросли *C. armatus*, и их деполимеризованных производных изменять функциональную активность тромбоцитов определяется структурными особенностями молекулы. Более выраженное антиагрегантное действие проявляет  $\lambda$ -каррагинан и его деполимеризованное производное – образцы с большей степенью сульфатирования, в сравнении с  $\kappa$ -фракцией. Функциональную активность тромбоцитов при пероральном введении уменьшает только деполимеризованный  $\lambda$ -каррагинан.

**Ключевые слова:** сульфатированные полисахариды, каррагинан, биологическая активность, агрегация тромбоцитов

**STUDY OF THE PLATELET AGGREGATION UNDER THE INFLUENCE OF CARRAGEENANS OF THE RED ALGAE *CHONDRUS ARMATUS***

Begun M.A.

*Far Eastern Federal University, 10, p. Ajax, 690922, Vladivostok, Russia**Abstract*

**Objective.** Study of the effect of  $\lambda$ - and  $\kappa$ -carrageenans isolated from the red alga *Chondrus armatus* and their depolymerized derivatives on adenosine diphosphate (ADP)-induced platelet aggregation in experiments *in vitro* and *in vivo*.

**Methods.** For *in vitro* experiments, platelet-rich plasma (PRP) obtained from the whole blood of healthy volunteers was incubated with analyzed polysaccharide samples (at concentrations of 0.05; 0.5; 1; 2 mg/ml) for 5 minutes at 37 °C. The resulting mixture was placed in a cuvette of a Biola aggregometer

(Russia), and an inductor (ADP, final concentration 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) was added 10 seconds after the start of the measurement. The degree of aggregation was estimated from the light absorption curve (in %). When conducting *in vivo* studies, outbred male mice were orally administered solutions of the analyzed polysaccharides and the reference drug (acetylsalicylic acid) for 7 days. On day 8, blood was taken by heart puncture, PRP was obtained, for which ADP-induced platelet aggregation was measured according to the previously described method.

**Results.** The studied samples of carrageenans at concentrations of more than 0.5 mg/ml reduced the degree of platelet aggregation. The fraction of  $\kappa$ -carrageenan caused a change in the level of aggregation by more than 50% only in the native form at a concentration of 2 mg/ml. While  $\lambda$ -carrageenan and its hydrolyzed derivative reduced the degree of platelet aggregation by more than 60% at a concentration of 0.5 mg/ml. The dose-dependent nature of the effect was noted. In experiments *in vivo*, there was a significant change in platelet aggregation when using the depolymerized form of  $\lambda$ -carrageenan ( $p < 0.05$ ), but the effect shown did not exceed the effect of the positive control.

**Conclusion.** The ability of carrageenans isolated from the algae *C. armatus* and their depolymerized derivatives to change the functional activity of platelets is determined by the structural features of the molecule. A more pronounced antiaggregant effect is exhibited by  $\lambda$ -carrageenan and its depolymerized derivative - samples with a higher degree of sulfation, in comparison with the  $\kappa$ -fraction. The functional activity of platelets upon oral administration is reduced only by depolymerized  $\lambda$ -carrageenan.

*Keywords:* sulfated polysaccharides, carrageenan, biological activity, platelet aggregation

## Введение

Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, тромбоз по-прежнему остается одной из ведущих причин инвалидизации и смертности по всему миру [21]. Повышение функциональной активности тромбоцитов встречается не только как самостоятельная патология, но и может возникать как осложнение различных инфекционных и неинфекционных заболеваний [5]. В связи с чем в современной клинической практике значительное распространение получили антиагрегантные препараты. Современные антиагрегантные средства отличаются по химическому строению, имеют различные «мишени» и механизмы действия. Однако, зачастую применение описанных препаратов ограничено рядом факторов: побочными эффектами, индивидуальной непереносимостью, возникновением резистентности [4], что обуславливает необходимость поиска новых веществ природного и синтетического происхождения, способных проявлять антиагрегантное действие.

Сульфатированные полисахариды - группа биополимеров, проявляющих широкий спектр биологической активности, в том числе в отношении системы гемостаза [9, 16, 22], и характеризующихся низким уровнем токсичности [3, 14]. К числу сульфатированных галактанов природного происхождения относятся хитозан, альгинаты, фукоиданы, каррагинан. Согласно данным литературы, их различные производные способны изменять функциональную активность тромбоцитов. В ряде исследований сообщается об антиагрегантных свойствах фукоидана бурых водорослей [8, 11, 23], хитозана краба [6]. Интерес представляют и полисахариды красных водорослей – каррагинаны, характеризующиеся широким структурным разнообразием [16].

Целью работы явилось изучение влияния  $\lambda$ - и  $\kappa$ -каррагинанов водоросли *Chondrus armatus* и их деполимеризованных производных на агрегацию тромбоцитов.

## Методика

В работе использованы образцы  $\lambda$ - и  $\kappa$ -каррагинанов, выделенных из красной водоросли *Chondrus armatus*, а также их деполимеризованные производные, полученные по методике, описанной ранее [12]. Влияние каррагинанов на агрегацию тромбоцитов изучали на двухканальном лазерном полуавтоматическом анализаторе агрегации «Биола» (Россия) по методу Борна в модификации Габбасова З.А. [1] В качестве индуктора агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в конечной концентрации – 5 мкг/мл.

Для проведения исследований *in vitro* 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).

Для анализа влияния исследуемых веществ на агрегацию тромбоцитов образцы цельной крови центрифугировали в течение 7 минут при 300 g и 4°C, после чего собирали обогащенную тромбоцитами плазму (ОТП). Перед проведением исследования ОТП инкубировали с анализируемыми образцами каррагинанов (в концентрациях 0,05; 0,5; 1; 2 мг/мл) в течение 5 минут при постоянном перемешивании. Степень агрегации оценивали по кривой светопоглощения (в %).

Исследования *in vivo* проводили на самцах черных беспородных мышей массой 20-25 г. Работы, связанные с лабораторными мышами, осуществлялись в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которые используются в экспериментальных и других научных целях (Страсбург, 18.03.1986 г.). Животных содержали в клетках в стандартных условиях окружающей среды при постоянном доступе к воде и корму при температуре 22±2°C. В течение недели животным перорально через зонд вводили раствор исследуемого образца (25 мг/кг) или препарата сравнения (ацетилсалициловая кислота – 19,73 мг/кг). На 8 день эксперимента животных наркотизировали, проводили забор крови пункцией сердца. Образцы крови стабилизировали 3,8% раствором натрия цитрата в соотношении 1:9. Анализ функциональной активности тромбоцитов проводили в течение 2 ч. после взятия биоматериала (образцы хранили при температуре 4°C). Для получения обогащенной тромбоцитами плазмы образцы цельной крови центрифугировали в течение 7 мин. при 300 g и 4°C и проводили измерение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов (концентрация индуктора 5 мкг/мл). Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью программы SPSS Statistics с использованием непараметрического метода сравнения независимых групп по критерию Манна-Уитни [2,15].

## Результаты исследования

Для проведения исследования были использованы каррагинаны  $\lambda$ - и  $\kappa$ - подтипов, полученные из водоросли *Chondrus armatus*, а также продукты их гидролиза. Структура полученных образцов была описана ранее [12]. Характеристики веществ, использованных в данной работе, приведены в табл. 1.

Таблица 1. Характеристика молекулярно-массового распределения  $\kappa$ - и  $\lambda$ - каррагинанов и их производных

Вещество	Средневесовая масса, Да	Среднечисловая масса, Да	$K_d$
Недеполимеризованный $\kappa$ -каррагинан	500207	178645	2,8
Гидролизированный $\kappa$ -каррагинан	235032	60264	3,9
Недеполимеризованный $\lambda$ -каррагинан	498623	113323	4,4
Гидролизированный $\lambda$ -каррагинан	387050	90011	3,6

Изменения в функциональной активности тромбоцитов под влиянием каррагинанов определяли турбидиметрическим методом [1]. При анализе графиков оценивали максимальную амплитуду агрегатограмм. Результаты *in vitro* исследований приведены в табл. 2.

Таблица 2. Влияние  $\lambda$ - и  $\kappa$ -каррагинанов красной водоросли *Chondrus armatus* на АДФ индуцированную агрегацию тромбоцитов в эксперименте *in vitro*

Вещество	Изменение агрегации тромбоцитов, $\Delta$ %			
	0,05 мг/мл	0,5 мг/мл	1 мг/мл	2 мг/мл
Недеполимеризованный $\kappa$ -каррагинан	17,85±10,61	30,87±7,52	45,78±10,54*	70,58±15,93*
Гидролизированный $\kappa$ -каррагинан	26,66±8,78	32,28±6,73*	35,97±8,27*	36,49±7,99*
Недеполимеризованный $\lambda$ -каррагинан	29,08±7,62	64,49±11,46*	77,03±13,06*	86,69±10,32*
Гидролизированный $\lambda$ -каррагинан	34,59±10,16	62,13±11,59*	75,37±11,94*	88,69±9,48*

Примечание: \* – данные достоверны контролю

Как видно из табл. 2, в концентрации 0,5 мг/мл недеполимеризованный  $\lambda$ -каррагинан уменьшает степень агрегации тромбоцитов в 2,81 раза ( $p < 0,05$ ), а в дозе 1 мг/мл – в 4,4 раза ( $p < 0,05$ ). Гидролизированный  $\lambda$ -каррагинан уменьшает степень агрегации в 2,64 и 4,06 раза в концентрациях 0,5 мг/мл и 1 мг/мл соответственно. В то же время достоверное изменение уровня агрегации более

чем на 50% вызывал только высокомолекулярный κ-каррагинан (2 мг/мл), при этом деполимеризованный κ-каррагинан влияния на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов не оказал.

В исследованиях *in vivo* было установлено, что только деполимеризованные образцы λ-каррагинана при пероральном введении мышам в дозе 25 мг/кг массы мыши вызывали достоверное снижение уровня АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов в 1,3 раза (табл. 3). Однако проявляемый антиагрегантный эффект был меньше по сравнению с группой положительного контроля (аспирин). Достоверных различий в изменении уровня агрегации тромбоцитов в других исследуемых группах зафиксировано не было.

Таблица 3. Влияние λ- и κ-каррагинанов красной водоросли *Chondrus armatus* на АДФ индуцированную агрегацию тромбоцитов в эксперименте *in vivo*

Изменение агрегации тромбоцитов	Вещество				
	Недеполимеризованный κ-каррагинан	Гидролизованый κ-каррагинан	Недеполимеризованный λ-каррагинан	Гидролизованый λ-каррагинан	Аспирин
Δ %	9.14±0.56	2.70±0.17	8.99±0.52	22.02±1.38*	73.80±4.88*

Примечание: \* – данные достоверны контролю

### Обсуждение результатов исследования

Известно, что сульфатированные полисахариды проявляют широкий спектр биологической активности [9, 14, 16], в том числе они оказывают влияние на систему коагуляционного и тромбоцитарного гемостаза [8, 11, 22, 23].

Согласно полученным нами в экспериментах *in vitro* результатам, каррагинаны, выделенные из красной водоросли *C. armatus*, и их гидролизованные производные способны снижать функциональную активность тромбоцитов. При этом λ-фракция показала более высокую эффективность в сравнении с κ-формой, что даёт основания предположить наличие взаимосвязи структура-действие. Известно, что каррагинаны представляют собой полимеры, состоящие из дисахаридных повторяющихся звеньев, которые имеют разную степень сульфатирования [9]. Так, λ-фракция каррагинана водоросли *C. armatus* содержит три сульфатных группы на дисахаридное звено, в то время как κ-каррагинан – одну [22]. Таким образом, увеличение количества сульфатных групп в химической структуре каррагинана повышает его антиагрегантную активность. Наличие аналогичной зависимости между степенью сульфатирования и антиагрегантным действием было отмечено и для других полисахаридов [8, 13]. В исследованиях F. Nan сообщается об увеличении влияния сульфатированных полисахаридов гриба *Keissleriella sp.* на гемостаз также при снижении средневесовой молекулярной массы [13]. Однако, в результате проведенного нами эксперимента *in vitro* не установлена взаимосвязь между молекулярно-массовым распределением и функциональной активностью тромбоцитов, что, вероятно, вызвано низкой эффективностью проведенной деполимеризации.

Согласно результатам проведенных нами *in vitro* исследований влияние λ-каррагинана и его гидролизованного производного на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов носит дозозависимый характер. При этом эффективность ингибирующего влияния возрастает с увеличением концентрации исследуемого образца полисахарида. Прямо пропорциональная зависимость доза-эффект была отмечена также в исследованиях биологической активности сульфатированных полисахаридов выделенных из других источников, например красной водоросли *Gelidiella acerosa* [10], красной водоросли *Grateloopia livida* [19] бурой водоросли *Laminaria japonica* [23], бурой водоросли *Spatoglossum asperum* [18].

Системные эффекты веществ при пероральном применении существенно зависят от их способности всасываться в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Согласно литературным данным, эффективность абсорбции сульфатированных полисахаридов в ЖКТ обусловлена конформационными особенностями молекулы, молекулярной массой, а также наличием связи полисахаридов с катионами [17, 20]. Таким образом, слабая выраженность антиагрегантного эффекта в эксперименте *in vivo* может быть связана с недостаточной абсорбцией тестируемых образцов каррагинанов в ЖКТ в связи с высокими значениями средневесовых молекулярных масс.

## Заключение

В результате исследования установлено, что каррагинаны, выделенные из водоросли *S. armatus*, и их деполимеризованные производные в экспериментах *in vitro* снижают функциональную активность тромбоцитов. Эффективность проявляемого действия зависит от структурных особенностей, а именно степени сульфатирования молекулы. Фракция  $\lambda$ -каррагинана и его деполимеризованное производное в экспериментах *in vitro* проявляют более выраженное антиагрегантное действие (по сравнению с  $\kappa$ -производными), которое характеризуется наличием взаимосвязи доза-эффект. В исследованиях *in vivo* влияние на функциональную активность тромбоцитов оказали только деполимеризованные образцы  $\lambda$ -каррагинана. Однако проявляемый антиагрегантный эффект был меньше по сравнению с группой положительного контроля (аспирин).

## Литература (references)

1. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю. и др. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов // Лабораторное дело. – 1989. – № 10. – С. 15-18. [Gabbasov Z. A., Popov E. G., Gavrilov I. YU., Pozin E. YA., Markosyan R. A. i dr. *Laboratornoe delo*. Laboratory business. – 1989. – N. 10. – P. 15-18. (in Russian)]
2. Гублер Е. В., Генкин А. А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. // Ленинград: Медицина. – 1973. – с. 141 [Gubler E.V., Genkin A.A. *Leningrad*. Leningrad. – 1973. – P. 141.]
3. Евченко И.А., Конвай В.Д. Каррагинан как пищевая добавка к молочным продуктам // Биотехнологии в сельском хозяйстве, промышленности и медицине. – 2017. – С. 44-47. [Evchenko I.A., Konvaj V.D. i dr. *Biotehnologii v sel'skom hozyajstve, promyshlennosti i medicine*. Biotechnologies in agriculture, industry and medicine. – 2017. – P. 44-47. (in Russian)]
4. Марцевич С.Ю., Кутишенко Н.П., Гинзбург М.Л. и др. Антиагрегантная терапия у больных с высоким риском развития тромботических осложнений: проблема эффективности, безопасности и приверженности // Клиницист. – 2011. – Т.2. – С.72-79. [Marceovich S.YU., Kutishenko N.P., Ginzburg M.L., Malysheva A.M., Polyanskaya YU.N. i dr. *Klinicist*. Clinician. – 2011. – V.2. – P.72-79. (in Russian)]
5. Попова Л.В., Бокарев И.Н. Применение антиагрегантов в клинической практике // Практическая медицина. – 2014. – №6. – С.22-28. [Popova L.V., Bokarev I.N. *Prakticheskaya medicina*. Practical medicine. – 2014. – N.6. – P.22-28. (in Russian)]
6. Сонин Д.Л. Гемосовместимость  $n$ -карбоксияцильных производных хитозана // Трансляционная медицина. – 2016. – Т.3, №2. – С. 80-88. [Sonin D.L. *Translyacionnaya medicina*. Translational medicine. – 2016. – V.3, N.2. – P. 80-88. (in Russian)]
7. Шокур О.А., Сергеева Н.В., Макарова К.Е. Антикоагулянтная активность фукоидана из бурой водоросли *Saccharina japonica* *in vivo* // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2013. – Т.3, №6. – С. 2024-2026. [SHokur O.A., Sergeeva N.V., Makarova K.E. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo centra Rossijskoj akademii nauk*. Proceedings of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences. – 2013. – V.3. – P. 2024-2026. (in Russian)]
8. Шокур О.А., Хожаенко Е.В., Рукина Н.Ю. и др. Влияние каррагинанов на агрегацию тромбоцитов *in vitro* // Тихоокеанский медицинский журнал. – 2013. – Т.2. – С. 25-28. [SHokur O.A., Hozhaenko E.V., Rukina N.YU., Prostakishina A.B. *Tihookeanskij medicinskij zhurnal*. Pacific Medical Journal. – 2013. – V.2. – P. 25-28. (in Russian)]
9. Campo V. L. Carrageenans: Biological properties, chemical modifications and structural analysis – A review // Carbohydrate Polymers. – 2009. – V.77. – P. 167-180.
10. Chagas F., Lima G., Santos V. Sulfated polysaccharide from the red algae *Gelidiella acerosa*: Anticoagulant, antiplatelet and antithrombotic effects // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V.159. – P. 415-421.
11. Chen A., Zhang F., Shi J. et al. Study on antithrombotic and antiplatelet activities of low molecular weight fucoidan from *Laminaria japonica* // Journal of Ocean University of China. – 2012. – V.11. – P. 236-240.
12. Cicinskas E., Begun M.A., Vikhareva V.V. et al. Immunological effects of *Chondrus armatus* carrageenans and their low molecular weight degradation products // Journal of biomedical materials research. 2020. – V.109. – P. 1-11.
13. Hana 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. – V.36. – P. 201-207.

14. Imeson A. Food Stabilisers, Thickeners and Gelling Agents // FMC BioPolymer. – 2010. – P. 73-94.
15. Mann H. B., Whitney D. R. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. // Annals of Mathematical Statistics. – 1947. – № 18. – P. 50-60.
16. Necas, J., Bartosikova, L. Carrageenan: A Review // Veterinarni Medicina. – 2013. – IV.58. – P. 187-205.
17. Nicklin S., Miller K. Intestinal uptake and immunological effects of carrageenan-current concepts // Food Additives & Contaminants. – 1988. – V.6. – P. 425-436.
18. Palanisamy S., Vinosha M., Marudhupandi T. et al. In vitro antioxidant and antibacterial activity of sulfated polysaccharides isolated from *Spatoglossum asperum*, // Carbohydrate Polymers. – 2017. – V.170 – P. 296-304.
19. Silva M., Nednaldo D., Dayanne L. et al. Biological activities of the sulfated polysaccharide from the vascular plant *Halodule wrightii* // Revista Brasileira de Farmacognosia. – 2012 – V.22 – P. 94-101.
20. Tang L., Chen Y., Jiang Z., et al. Purification, partial characterization and bioactivity of sulfated polysaccharides from *Grateloupia livida* // International Journal of Biological Macromolecules– 2017. – V.94. – P. 642-652.
21. World health statistics 2022: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
22. Yermak I.M., Barabanova A.O., Aminin D.L. et al. Effects of structural peculiarities of carrageenans on their immunomodulatory and anticoagulant activities // Carbohydrate Polymers. – 2012 – V.87 – P.713-720.
23. Zhu Z., Zhang Q., Chen L. et al. Higher specificity of the activity of low molecular weight fucoidan for thrombin-induced platelet aggregation // Thrombosis Research. – 2010 – V.125 – P. 419-426.

### **Информация об авторе**

*Бегун Мария Андреевна* - старший преподаватель департамента фармации и фармакологии Института наук о жизни и биомедицины Дальневосточного федерального университета. E-mail: begun.ma@dvfu.ru

**Конфликт интересов:** автор заявляет об отсутствии конфликта интересов.