



УДК 615.322:547.458/015.4

В.И.ТОРГАШОВ, Ф.Н.КАПУЦКИЙ, Л.А.АЗАРОВА, В.А.СЯТКОВСКИЙ

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ СУЛЬФАТОВ ПОЛИСАХАРИДОВ, СИНТЕЗИРОВАННЫХ В ГОМОГЕННЫХ СИСТЕМАХ

New methods of sulphatazation of hydroxyl-containing polymers have been worked out, using which it has become possible to obtain a large number of sulphoether-derived compounds based on natural polysaccharides (mannan, starch, dextran, sulphates). The biological activity test of 64 samples allowed to reveal sulpho-polysaccharides characterised by distinct anticoagulant and antiaggregant activity. It was demonstrated that the semisynthetic heparinoids capability to reduce the blood coagulant potential in vitro and in vivo is enhanced by the increasing of the degree of sulphating.

The degree of dependence of the preparation anticoagulant effect on the level of antithrombin III, the main blood anticoagulant was established. The experimental data and the wide range of biological effect of polysaccharide-containing compounds in general are indicative of the possibility of using this group of biopolymers for developing thromboprophylactic drugs.

В качестве самого активного антикоагулянта прямого действия наибольшее клиническое применение имеет гепарин. Как и многие другие полисахариды, он обладает также широким спектром биологического действия на ряд функций и систем организма [3,4,6,7,9,11]. Однако себестоимость гепарина высока, так как его производство связано со значительными затратами. Поэтому в связи с ростом в настоящее время тромбозмболических осложнений как непосредственной причины смертности разработка новых, более доступных, активно влияющих на систему гемостаза препаратов особенно актуальна.

Хотя в абсолютном большинстве случаев полисахариды и не отличаются заметной токсичностью, однако это свойство существенно усиливается при их химической модификации, в частности сульфатировании известными методами [8]. Кроме того, синтез обычно сопряжен с использованием высокотоксичных реагентов (оксиды серы и азота, амины и др.), а модифицированные полисахариды водорастворимы и, будучи ионообменниками, с трудом поддаются очистке. Большинство существующих методик не позволяет проводить равномерное сульфатирование полисахаридов. Неравномерность распределения сульфозэфирных заместителей ведет к появлению высокозамещенных фракций полимера, а также блоков в макромолекулах, что обуславливает повышение токсичности. Острая, и особенно хроническая, токсичность служит основным препятствием к широкому применению сульфополисахаридов в качестве фармакологических средств. Это диктует необходимость разработки новых, технологически приемлемых методов синтеза и очистки аналогов гепарина с улучшенными свойствами.

Целью настоящей работы является выбор оптимальных методов получения наиболее перспективных для применения в клинике гомогенных полусинтетических гепариноидов и скрининговый анализ их биологической активности в качестве антикоагулянтов прямого действия.

### Материал и методика

Сульфозфиры в солевой форме синтезировали исходя из следующих полисахаридов: дрожжевой маннан, декстран (ММ=40000), производимые АО "Белмедпрепараты", сульфитная целлюлоза (СП=560), микрокристаллическая

целлюлоза (МКЦ) марки "ЛТ" (СП=180) фирмы "Lachema", пектин яблочный, свекловичный, цитрусовый, инулин, гидролизированный картофельный крахмал, гидроксиэтилкрахмал, хитозан и др. Согласно разработанному способу, реализуя принцип "аутоиндуцированной химической активации", полиоксиполимеры в гомогенной среде предварительно переводили в соответствующие сложные эфиры азотистой кислоты, а затем, обрабатывая серосодержащими солями, в сульфозэфиры [13]. Средой для гомогенного реагирования служили апротонные диполярные растворители (ДМФА, ДМСО) марки "ч" с добавлением  $N_2O_4$ . Использовали следующие соли марки "чда":  $Na_2SO_3$ ,  $Na_2SO_4$ ,  $Na_2S_2O_7$ ,  $Na_2S_2O_5$ . По истечении заданного времени реакционную смесь разбавляли дистиллированной водой, раствор нейтрализовали  $NaHCO_3$  до  $pH=8$  и очищали методами мембранной технологии [5]. Путем ионного обмена получали калиевые и кальциевые формы сульфозэфиров. Сжиганием образцов в кислородной колбе и последующим количественным определением  $SO_4^{2-}$  устанавливали степень замещения (СЗ) полученных сульфополисахаридов в расчете на моносахаридное звено [13]. Молекулярную массу оценивали по [14]. Данный метод синтеза (№1) оказался малоприменим для полимеров, содержащих аминокруппы, так как протекающие в этом случае такие побочные процессы, как, например, дезаминирование [15], затрудняют сульфатирование полисахаридов подобных хитозану. Указанного недостатка удается избежать при использовании способа (№2) без применения оксидов азота, заключающегося в обработке полимеров пиросульфатом натрия [16]. Рассмотренными методами осуществляется равномерное распределение сульфозэфирных групп в полимерной цепи, о чем свидетельствует практически одинаковое содержание серы в различных фракциях, разделенных ультрафильтрацией образцов.

При разработке новых лекарственных препаратов с высокой биологической активностью исключительно важны сведения об их токсичности, так как без оценки этого показателя невозможно оптимизировать получение гепариноидов, пригодных для клинической практики. Острую токсичность полусинтетических аналогов гепарина изучали на белых мышах массой 18–20 г при внутрибрюшинном введении веществ в дозе 40 мг на животное,  $LD_{50}$  определяли по методу Кербера.

Оценку биологической активности проводили по методикам [1,2]; активированное время рекальцификации (АВР) и протромбиновое время – по Куичу, тромбиновое время – по Сирмаи, уровень фибриногена – по Р.А.Рутберг, время рекальцификации (ВР) – по Бергерхофу и Рока, антитромбин III-АТ-III – по Лолигеру, тромбоэластография (ТЭГ) с использованием прибора ГКГМ 4-02 (СССР), эуглобулиновый фибринолиз – по Ниверовскому. При изучении функциональной активности тромбоцитов использовали фотометрический метод определения агрегации с графической регистрацией процесса, по Борну. В качестве агрегирующего агента применяли АДФ ("Реанал", Венгрия) в конечной концентрации 5,10–6М. Количество тромбоцитов подсчитывали в камере Горяева фазово-контрастным методом.

В опытах *in vitro* кровь доноров до получения плазмы инкубировали с растворами изучаемых соединений в конечных концентрациях 0,008, 0,04 и 0,08 мг/кг в течение 5 мин. В опытах *in vivo* соединения вводили животным (кролики породы Шиншила, массой 2000–2500 г) в краевую вену уха в дозе 2,5 мл 0,08% и 0,4%-го растворов.

В качестве фармакологического стандарта использовали коммерческий препарат гепарина в порошковой и жидкой формах (АО "Белмедпрепараты", Минск). Контролем в опытах *in vitro* и *in vivo* служил 0,9%-ный раствор натрия хлорида.

### Результаты и их обсуждение

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что синтез соединений по первому способу, а особенно по второму, в основном позволяет получить образцы, мало отличающиеся токсичностью от гепарина. Действительно,  $LD_{50}$ , определенная по методу Кербера, составила у сульфатов маннана, пектина, инулина всего лишь от 1450 до 5000 мг/кг (таблица).

### Острая токсичность некоторых гепариноидов

Соединение	Метод синтеза	Сера, %	Молекулярная масса	Токсичность при внутрибрюшном введении LD <sub>50</sub> , мг/кг
Гепарин-порошок	—	16,0	15000	>2000
Гепарин-раствор	—	—	—	—
Na-CX*	2	9,6	19000	>1450
Na-CИ	2	4,5	5000	5000
Na-CМ	2	9,8	20000	3000
Ca-CМ	2	10,5	19600	3000
K-CМ	2	10,5	19000	3000
Na-CП	1	15,5	17000	1450
Na-CП	2	15,0	15000	>2000
Na-CП	1	9,0	20000	>2000
Na-CП	2	8,5	15000	>3500

Примечание: \* – обозначения CX, CИ, CМ, CП соответствуют макроанионам сульфопроизводных хитозана, инулина, маннана, пектина, входящим в состав солевых форм.

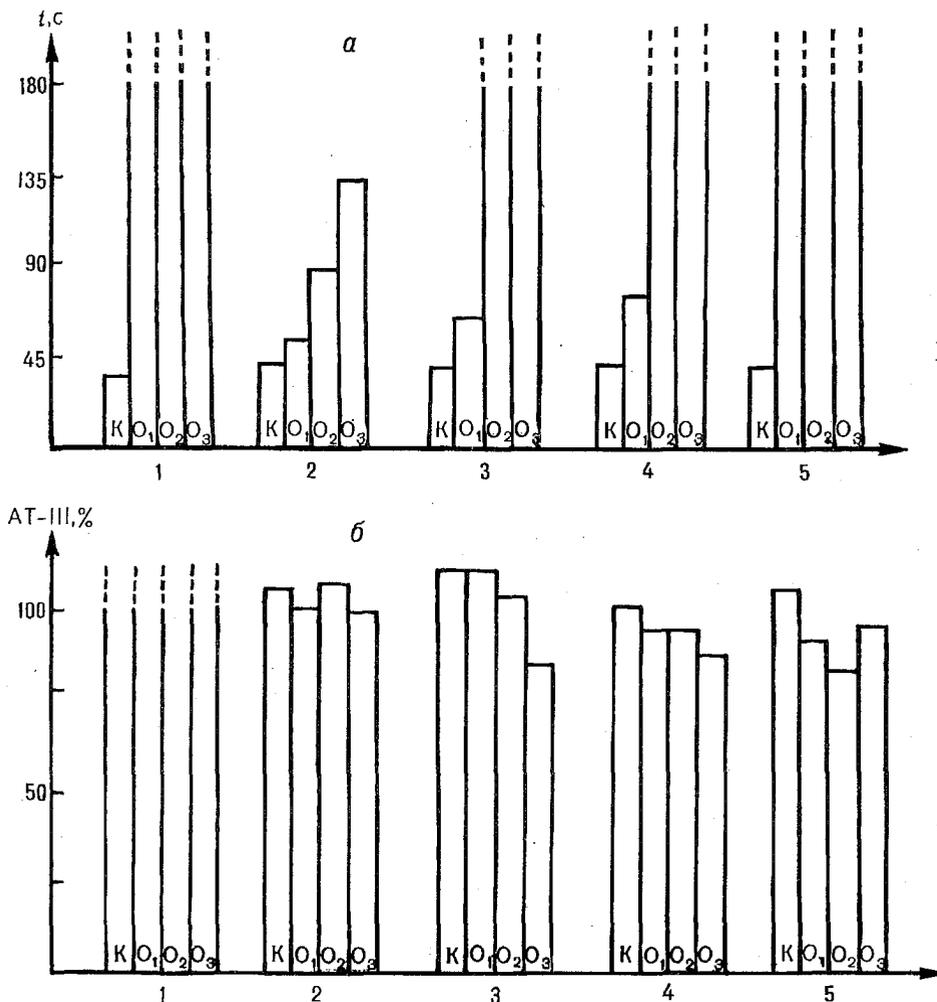
При изучении влияния полусинтетических гепариноидов на систему гемокоагуляции *in vitro* и *in vivo* у 30 из 64 соединений была выявлена антикоагулянтная активность. Наиболее выраженной способностью снижать коагуляционный потенциал крови обладали сульфатированные пектины (яблочный, свекловичный, цитрусовый), синтезированные первым способом, маннаны, декстраны, крахмалы, целлюлозы, сульфатированные по второму способу. Указанные соединения в зависимости от концентрации удлинляли ВР, АВР в 1,5–4,5 раза ( $p < 0,05–0,01$ ). Сульфат пектина, крахмала (первый способ), маннана, гидроксиэтилкрахмала (второй способ) в концентрации 0,008 мг/мл, а сульфаты декстрана и льняной камеди (натриевая соль) в концентрации 0,04 мг/мл вызывали снижение протромбинового индекса в 1,2 раза ( $p < 0,05–0,001$ ). С увеличением концентрации данных соединений антикоагуляционный эффект возрастал. Значительный интерес представляют результаты исследований антитромбиновой активности полусинтетических гепариноидов. Препараты на основе пектина, крахмала, маннана, льняной камеди, модифицированных первым способом, сульфаты маннана ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  – соли), декстрана ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  – соли), гидроксиэтилкрахмала и хитозана ( $\text{Na}^+$  – соль), полученные вторым способом, уже в минимальной концентрации (0,008 мг/мл) вызывали статистически достоверное увеличение тромбинового времени. Причем сульфаты декстрана, гидроксиэтилкрахмала оказывали сопоставимое с гепарином влияние на конечную фазу свертывания крови. Вместе с тем сульфаты крахмала, маннана, декстрана, синтезированные обоими способами, не вызывали сопоставимого с повышением тромбинового времени изменения уровня АТ-III, реализуя, возможно, свой антикоагуляционный потенциал, в отличие от гепарина, не через АТ-III (рисунок). Аналогичные данные получены при изучении антикоагулянтных свойств пентозана полисульфата – низкомолекулярного полисахарида и кислых мукополисахаридов из *Stichopus Saponicus Selenca* [10,12].

У большинства изученных полусинтетических гепариноидов антиагрегационные свойства *in vitro* выявлены не были. С увеличением дозы, также как и у гепарина, начинал проявляться агрегационный эффект, в большей степени выраженный при концентрациях 0,04 и 0,08 мг/кг сульфатов маннана ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$  – соли), декстрана ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  – соли), гидроксиэтилкрахмала. Однако сульфат инулина во всех концентрациях и сульфат карбоксиметилцеллюлозы в минимальной концентрации оказывали достаточно выраженный антиагрегационный эффект, снижая АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в 1,3–2,0 раза.

Сульфаты пектина (первый способ) во всех изученных концентрациях, а сульфаты декстрана и хитозана (второй способ) в минимальной концентрации вызывали статистически достоверное активирующее влияние на фибринолитическую активность *in vitro*. Остальные соединения практически не изменяли времени лизиса сгустка эуплобулинов по сравнению с контролем.

В опытах *in vivo* введение 2,5 мл 0,08%-ного раствора сульфата яблочного пектина (первый способ) сопровождалось через 5 мин удлинением показателей  $g$  и  $k$  на ТЭГ, снижением индекса гиперкоагуляции (Сi). Вместе с тем изменения

качественной структуры сгустка (максимальная амплитуда (МА) и индекс эластичности (Е)) были выражены незначительно. Введение 2,5 мл 0,4%-ного раствора сульфата яблочного пектина усилило изменения основных показателей ТЭГ. Гипокоагуляционный эффект сульфата свекловичного пектина (первый способ) в тех же концентрациях был значительно сильнее, чем у сульфата яблочного пектина. Способность других полусинтетических гепариноидов снижать коагуляционный потенциал крови *in vivo* проявлялась в гораздо меньшей степени. Причем при наличии антикоагулянтной активности у кальциевой соли сульфата маннана *in vitro* отмечалось отсутствие таковой в опытах *in vivo*.



Антитромбиновая активность полусинтетических гепариноидов по данным тромбинового времени (а) и АТ-III (б).  
 1 – гепарин; 2 – натриевая соль сульфата крахмала; 3 – натриевая соль сульфата маннана; 4 – кальциевая соль сульфата маннана;  
 5 – натриевая соль сульфата декстрана.  
 К – контроль; O<sub>1</sub> – 0,008 мг/кг; O<sub>2</sub> – 0,04 мг/кг; O<sub>3</sub> – 0,08 мг/кг

Изменения количества тромбоцитов практически не наблюдали. Внутривенное введение кроликам протаминсульфата (ПС) в качестве нейтрализующего средства в дозе 0,25 мг/кг практически нормализовало основные показатели ТЭГ.

В целом, сравнимая полусинтетические гепариноиды по биологической активности с фармакологическим стандартом – гепарином, можно констатировать, что сульфаты свекловичного пектина и крахмала сопоставимы с ним в плане влияния на свертывание крови.

Из сказанного следует, что антикоагулянтная активность и токсичность сульфатированных полисахаридов определяются не только способом получения и степенью сульфатирования, но и природой исходной полимерной матрицы, видом катиона в готовой солевой форме, молекулярной массой, наличием других функциональных групп (COOH-, NH<sub>2</sub>-).

Так, большому количеству сульфозфирных групп в макромолекуле соответствует и повышенная антикоагулянтная активность, проявляющаяся в большинстве исследованных производных скачкообразно, начиная со степени замещения по сульфогруппам – примерно 0,45–0,5 (%S=6,9–7,5 в Na-соли). У несульфатированных полисахаридов гепариноподобный эффект отсутствует. Натриевые соли сульфополисахаридов более активны, чем соответствующие кальциевые и калиевые соли. Среди группы сульфополисахаридов была выявлена и антиагрегантная активность у производных инулина и карбоксиметилцеллюлозы.

Таким образом, разработанные методы химической модификации полисахаридов (устранение агрессивных реагентов, получение равномерно замещенных соединений с оптимальным содержанием серы – 10–12%, глубокая очистка продуктов синтеза, учет влияния катиона) позволяют получать препараты, сочетающие низкую токсичность с выраженными антикоагулянтными свойствами, перспективные для применения в качестве новых фармакологических средств.

Принимая во внимание иммуномодулирующее действие ряда полисахаридов, можно полагать, что введение сульфогрупп в состав макромолекулы должно способствовать усилению этого эффекта, так как благодаря проявлению антикоагулянтных и антиагрегантных свойств улучшается кровоснабжение иммунокомпетентных клеток [17]. Кроме того, сульфополисахариды характеризуются способностью связывать ионы стронция [14]. Перечисленные свойства сульфатов полисахаридов свидетельствуют о перспективности их медицинского применения для минимизации последствий аварии на ЧАЭС для здоровья населения.

1. Андреев Г. В., Карабасова М. А., Лютова Л. В. и др. Методы исследования фибринолитической системы крови. М., 1981.
2. Балуда В. П., Баркаган З. С., Гольдберг В. Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза. Томск, 1980.
3. Енгальцева Е. Н., Рожкова В. Н., Ладыгина Е. Я. // Фармация. 1982. №2. С.37.
4. Жукова Н. А., Паныга Г. Ф., Максименко А. А. // Фармакология и токсикология. 1984. №6. С.90.
5. Капуцкий Ф. Н., Бильдюкевич А. В., Торгашов В. И., Тюрин В. И. Результаты и перспективы исследований микробных полисахаридов: Тез. докл. 2-й Всесоюз. науч. конф. Л., 1984. С.99.
6. Маслаков Д. А., Эйсмонт К. А. Биологическая активность некоторых полисахаридов и их клиническое применение. Мн., 1977.
7. Сергеева А. В., Ревазова Е. С., Денисова С. И. и др. // Бюл. эксперимент. биологии и медицины. 1985. №12. С.741.
8. Вирник А. Д. // Успехи химии. Т. XLII. Вып. 3. 1973. С.547.
9. Burgalata C., Jolge D. // Cancer. Res. 1977. Vol. 37. P.1739.
10. Dominique P., Guerd C., Korsenly F. // Clin. Pharmacol and Ther. 1985. Vol.38. №2. P.171.
11. Kher A., Bara L., Samama M. // Pathol. biol. 1986. Vol.34. №1. P.61.
12. Li Sio Leng, Bao Chengxin, Chen Guen et al. // Acta pharmacol sin. 1985. Vol.6. №2. P.107.
13. Torgaschov W.I., Gert E.W., Bildjukewitsch A.W., Kaputskii F.N. // Die Angewandte Makromolekulare Chemie. 1996. Vol.234. S.31.
14. Капуцкий Ф. Н., Старобинец Г. Л., Сидерко В. М., Торгашов В. И. Весті АН Беларусі. Сер. хім. навук. 1992. №3–4. С.46.
15. Феофилова Е. П. Клеточная стенка грибов. М., 1983.
16. Воротынская С. Л., Витовская Г. А., Ананьева Е. П., Торгашов В. И. и др. // Хим.-фарм. журн. 1995. №6. С.30.
17. Потапнев М. П., Гапанович В. Н., Петров П. Т. и др. // Тез. докл. Междунар. конф. "Наука и медицина – Чернобылю". Мн., 10–13 ноября 1993. С.110.

Поступила в редакцию 26.08.97.

УДК 595.773.19

Е. С. ШАЛАПЕНКО, Т. Г. ЯКОВЛЕВА

## МАТЕРИАЛЫ К ФАУНЕ СИРФИД (Diptera, Syrphidae) УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЙ ЗАПАДА БЕЛАРУСИ

On the basis of own collections of 1993–1994 species composition of syrphids of the urban territories of Grodno and its neighbourhoods is analysed. The list and quantity characteristic of 28 species of syrphids is given.