

УДК 612.115.3:612.115.064

О МЕХАНИЗМЕ АНТИКОАГУЛЯНТНОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ КОРНЕЙ ПИОНА МОЛОЧНОЦВЕТКОВОГО

Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С.

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,

e-mail: lyapinarita@gmail.com

Разработан метод получения эффективного антикоагулянтного экстракта из корней пиона молочнoцветкового (*Paeonia lactiflora*). По данным нескольких коагулологических методов исследования (тромбоэластографического, активированного частичного тромбопластинового времени, тромбинового и протромбинового времени) экстракт из пиона обнаруживал высокие антикоагулянтные свойства. Расшифрован механизм противосвертывающего действия активного экстракта из пиона, который заключается в ингибировании активности фермента тромбина, фактора Ха и конечного этапа процесса свертывания крови – образования фибринового сгустка. Отмечено, что экстракт из пиона удлиняет тотальную константу свертывания и влияет на эластичность сгустка, отражающую его плотность. В перспективе экстракт может применяться как нетоксичный антикоагулянтный препарат, не вызывающий побочного геморрагического действия на организм. Гепариноподобные низкомолекулярные компоненты экстракта из пиона молочнoцветкового идентичны низкомолекулярному гепарину животного происхождения.

Ключевые слова: антикоагулянт, кровь, корни пиона молочнoцветкового, механизм действия

ON THE MECHANISM OF THE ANTICOAGULANT EFFECT OF THE EXTRACT FROM THE ROOTS OF PAEONIA LACTIFLORA

Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Maystrenko E.S.

Moscow state University named after M.V. Lomonosov, Moscow, e-mail: lyapinarita@gmail.com

Developed a method of obtaining the effective anticoagulant extract from the roots of *Paeonia lactiflora*. According to multiple koagulologicescoe research methods (thromboelastography, activated partial thromboplastin time, thrombin and prothrombin time), extract of peony have exhibited a high anticoagulant effects. Deciphered the mechanism of anticoagulant action of the active principle of the extract of peony, which is the inhibition of the enzyme activity of thrombin, factor Xa and the final stage of the process of blood clotting – formation of fibrin clot. It is noted that the extract from the peony extends the total constant coagulation and affects the elasticity of a clot, reflecting its density. In the future, the extract can be used as anticoagulant the drug is non-toxic, non-hemorrhagic adverse action on organism. Heparin low molecular weight components of the extract of peony milk-flowering are identical molecular weight heparins of animal origin.

Keywords: anticoagulant, blood, roots of *Paeonia lactiflora*, mechanism of action

Пион молочнoцветковый (*Paeonia lactiflora*), белоцветковый или китайский произрастает в Монголии, Китае, Приморье, Забайкалье по склонам сопок, по берегам рек, в зарослях дуба монгольского. Наибольшее количество травянистых пионов произошло от молочнoцветкового. В отличие от других дикорастущих травянистых пионов *P.lactiflora* стоит на одном из первых мест по устойчивости к засухе, морозам и серой гнили. Он широко используется в озеленении, а настои корневищ широко применяют в китайской медицине в качестве болеутоляющего, противосудорожного, спазмолитического, противовоспалительного и нормализующего кровяное давление средства [1,6]. Ранее было показано, что в корнях пионов содержится гепариноподобный компонент с низкой молекулярной массой (до 6 кДа) [2,4]. Известно, что стандартный гепарин, полученный из тканей животных, замедляет процессы фибринообразования за счет присущего ему антикоагулянтного действия [7,8]. В клинической практике применяются высоко- или низкомолеку-

лярные гепарины в основном животного происхождения. Однако, высокомолекулярный гепарин при передозировке имеет побочное действие в виде тромбоцитопений, «рикошетных эффектов» или геморрагий [5]. Низкомолекулярные формы гепаринов практически не имеют указанных отрицательных последствий на организм, но они в основном иностранного производства. До сих пор продолжается поиск безопасных отечественных антикоагулянтов без побочных отрицательных воздействий на организм. К таким антикоагулянтам могут относиться вещества растительной природы. Поэтому проблема изучения антикоагулянтов растительного происхождения и исследование механизма их действия на свертывание крови актуальны и в настоящее время.

Цель работы заключалась в разработке оптимального способа получения экстракта из корней пиона молочнoцветкового (*Paeonia lactiflora*), исследовании его влияния на различные звенья гемостаза и расшифровке возможных механизмов его антикоагулянтного действия.

Материалы и методы исследования

В работе использовали свежие корни пиона молочнокветкового (КПМ), выращенного в Ботаническом саду МГУ имени Ломоносова. Мы разработали наиболее оптимальный способ получения антикоагулянтного экстракта из КПМ, для чего корни промывали водопроводной водой, высушивали при 37°C в течение 24 часов, освобождали от коры, а сухую сердцевину растирали в фарфоровой ступке не менее 20–30 мин. Далее взвешивали препарат и для получения его начального 5%-го раствора использовали 0,85%-й раствор NaCl. Через 20–24 ч стояния раствора пиона при 37°C его подвергали центрифугированию в течение 10 мин при 3000 об./мин. Супернатант (экстракт) использовали в дальнейших экспериментах.

Исследовали влияние полученного экстракта из пиона (ЭП) на гемостазиологические параметры [3] в условиях *in vitro*, для чего к крови или к плазме добавляли ЭП из расчета на 0,3 мл крови или плазмы 0,02 мл ЭП. Инкубировали эти растворы в течение не менее 3-5 мин и записывали следующие параметры тромбозластографии (ТЭГ) на приборе Hellige (Германия) – «R» (фаза тромбопластино- и тромбинообразования), «K» («фаза фибринообразования»), «ma» (максимальная амплитуда, свидетельствующая об изменении /повышении или снижении/ концентрации фибриногена), «t» (при удлинении свидетельствует об активации антикоагулянтной активности), «S» (константа синерезиса = $R + t$, свидетельствует об уплотнении сгустка), «T» (тотальная константа свертывания), «E» (эластичность сгустка, отражающая плотность сгустка). Кроме того, на приборе анализатор свертывания крови АСКА-2-01 АСТРА (Россия) определяли протромбиновое время (ПВ), тромбиновое время (ТВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) [3] для характеристики внешнего, внутреннего и общего путей свертывания крови. В экспериментах использовали лабораторных белых крыс-самцов массой тела 180–200 г, из *v.jugularis* которых брали кровь с использованием в качестве консерванта 3,8%-ный лимоннокислый натрий в соотношении 9:1 (для тромбозластографического метода), которую затем подвергали центрифугированию при 2000 *q* в течение 10–12 мин для получения бестромбоцитарной плазмы. Эта плазма использовалась для определения АЧТВ, ПВ, ТВ.

Статистическая обработка данных проведена согласно методу Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Установлено, что ЭП в начальной концентрации 5% по всем тестам обнаруживает значительную антикоагулянтную активность, превышающую контрольные значения в 1.8-2.6 раза. По данным ТЭГ выявлено по сравнению с контролем, что показатель «R» удлиняется в 1.8 раза, что свидетельствует об ингибирующем действии ЭП в процессах образования тромбина и фактора Ха, показатель «K» при этом удлиняется в 2.6 раза, что, во-первых, указывает на возникновение гипокоагуляции, обусловленной антитромбиновым потенциалом крови, во-вторых, на участие ЭП в предотвращении образования фибринового сгустка. Показатель «K», как известно, зависит от концентрации образующегося тромбина, концентрации и функциональной полноценности фибриногена и факторов протромбинового комплекса, которые, судя по полученному результату, значительно снижены. Показатель «T» ТЭГ в опытных пробах удлиняется в 2.27 раза, что указывает на активацию антикоагулянтной активности крови под влиянием ЭП. Константа синерезиса, показатель «S» ТЭГ, в опыте превышает контрольный уровень в 2.3 раза, т.е. процесс уплотнения сгустка в опыте происходит значительно медленнее контроля за счет антикоагулянтного действия ЭП (таблица).

Гемостазиологические параметры после инкубации экстракта из пиона молочнокветкового с кровью крыс (средние данные из 7 проб в каждой группе) ($M \pm m$)

Параметры гемостаза	Контроль (0.85%-ный NaCl)	Опыт (5%-й экстракт из корней <i>P.lactiflora</i>)
«R» ТЭГ, мин	1.56 ± 0.4	2.85 ± 0.3**
«K» ТЭГ, мин	7.5 ± 0.9	19.5 ± 1.2**
«ma» ТЭГ, см	2.2 ± 0.2	2.0 ± 0.1
«t» ТЭГ, мин	3.0 ± 0.5	5.4 ± 0.9*
«T» ТЭГ, мин	12.0 ± 1.3	27.3 ± 1.5**
«S» ТЭГ, мин	10.5 ± 1.1	24.9 ± 2.2**
ПВ, сек	36.7 ± 2.3	63.3 ± 1.0**
АЧТВ, с	39.0 ± 1.1	55.4 ± 0.9**
ТВ разведенное, с	43.5 ± 2.8	88.2 ± 2.6**

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля. Обозначения: ** $p < 0.01$; * $p < 0.05$.

Нами установлено, что показатель ПВ, характеризующий внешний путь свертывания и отражающий чувствительность к дефициту факторов протромбинового комплекса (VII, X, V, II) в опытных пробах (ЭП) превышал контрольные значения в 1.7 раза. Эти данные свидетельствуют, что механизм антикоагулянтного действия ЭП обусловлен его ингибированием факторов протромбинового комплекса – тромбина, фактора Ха, в меньшей степени факторов V и VII. Дополнительный тест по влиянию ЭП на изменение АЧТВ, характеризующий внутренний путь свертывания, показал удлинение АЧТВ в опыте по сравнению с контролем в 1.4 раза. Это указывает на влияние ЭП на начальный этап внутреннего механизма свертывания и показывает дефицит всех плазменных факторов свертывания, кроме фактора VII. Установлено также, что ТВ в опыте удлиняется в 2.0 раза по сравнению с контролем, что подтверждает полученные нами данные ТЭГ по ингибированию активности фермента тромбина под влиянием ЭП. Таким образом, антикоагулянтные эффекты ЭП связаны в основном с ингибированием активности тромбина, фактора Ха и других факторов свертывания крови, участвующих в образовании фибрина. Кроме того, это обусловлено и блокадой других факторов внутреннего механизма свертывания крови, но уже в меньшей степени.

Поскольку известно, что низкомолекулярные формы гепариноподобных компонентов присутствуют в корнях пионов [2], а в клинике для борьбы с тромботическими осложнениями без проявления побочного действия используется низкомолекулярный гепарин, но только животного происхождения, то весьма перспективными могут быть исследования растительных гепариноподобных препаратов с антикоагулянтной активностью.

Заключение

Разработан эффективный метод получения антикоагулянтного экстракта из корней пиона молочноцветкового. Метод предусма-

тривает термостатирование (37°C) при высушивании корней и получении экстракта. Установлено наличие в экстрактах высокой антикоагулянтной активности в условиях *in vitro*, что доказано различными коагулологическими методами (тромбоэластографическим, тестами АЧТВ, ПВ, ТВ). На основании полученных данных раскрыт возможный механизм антикоагулянтного действия экстракта, который заключается в ингибировании всех фаз процесса свертывания крови – образования протромбинового комплекса, в том числе фактора Ха, тромбина, а также процессов фибринообразования. Таким образом, действие антикоагулянтного растительного экстракта начинается уже с первых стадий процесса свертывания крови и протекает до конечного этапа – стадии фибринообразования, что указывает на его высокий антитромботический эффект. Это его действие соответствует эффектам низкомолекулярных форм гепарина животного происхождения.

Список литературы

1. Гриневич М.А. Информационный поиск перспективных лекарственных растений. – Л., 1990. – С. 25–28.
2. Ляпина Л.А., Аммосова Я.М., Новиков В.С., Смолина Т.Ю., Пасторова В.Е., Успенская М.С. К вопросу о природе антикоагулянта, полученного из корней пионов средней полосы России // Известия РАН, сер. биологическая. – 1997. – № 2. – С. 235–237.
3. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. – М.: Адвансес Солюшнз, 2012. – 160 с.
4. Ляпина Л.А., Кондашевская М.В., Пасторова В.Е., Успенская М.С., Новиков В.С. Противотромботические эффекты экстракта из корней пиона молочноцветкового // Тромбоз, гемостаз и реология. – 2000. – № 2 (2). – С. 37–39.
5. Регистр лекарственных средств РЛС. Энциклопедия лекарств – 19-й вып. / Под ред. Г.Л. Вышковский. – М. «РЛС-Медиа». – 2010. – 1368 с.
6. Успенская М.С., Мурашев В.В., Криницина А. Древоидные пионы в Ботаническом саду МГУ / Под ред. Мурашева В.В. – М.: Лесная страна, 2016. – 104 с.
7. Rabenstein D.L. Heparin and heparin sulfate: structure and function // Nat. Prod. Rep. – 2002. – Vol.19. – P. 312–331.
8. Stief T.W. Inhibition of thrombin in plasma by heparin or arginine // Clin. Appl. thromg. hemost. – 2007. – Vol. 13. – № 2. – С. 146–153.