

УДК 615.32

**ИЗУЧЕНИЕ АНТИКОАГУЛЯНТНО-ФИБРИНОЛИТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
ПРЕПАРАТА ИЗ КОРНЕЙ ПИОНА МОЛОЧНОЦВЕТКОВОГО****Ляпина М.Г., Успенская М.С.***Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва,
e-mail: lyapinarita@gmail.com*

В работе представлены экспериментальные данные по исследованию препарата антикоагулянта, выделенного из корней пиона молочноцветкового (*P. lactiflora*). Установлено, что при внутривенном введении в кровотоки растительный препарат повышает антикоагулянтную и суммарную фибринолитическую активность как ферментативной, так и неферментативной природы в плазме крови на протяжении 3 ч после введения. Показано, что неферментативный фибринолиз обусловлен способностью препарата из пиона вызывать деполимеризацию фибрина, а ферментативный – вследствие выделения в кровотоки из эндотелия сосудов тканевого активатора плазминогена. Препарат из пиона относится к нетоксичным антикоагулянтам, сочетающим ферментативный фибринолитический и фибриндеполимеризационный эффекты при поступлении в организм. Следовательно, исследованный нами препарат из корней пиона позволяет отнести его к антитромботическим средствам.

Ключевые слова: антикоагулянт из пиона, деполимеризация фибрина, тканевой активатор плазминогена**THE STUDY OF ANTICOAGULANT-FIBRINOLYTIC PROPERTIES
OF THE DRUG FROM THE ROOTS OF PAEONIA LACTIFLORA****Lyapina M.G., Uspenskaya M.S.***Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow, e-mail: lyapinarita@gmail.com*

The paper presents experimental data on the study drug, anticoagulant, isolated from the roots of *Paeonia lactiflora*. Found that when administered intravenously into the bloodstream the plant drug increases the anticoagulant and total fibrinolytic activity of enzymatic and non-enzymatic nature in blood plasma for 3 h after injection. It is shown that non-enzymatic fibrinolysis is due to the ability of the drug from the peony to cause depolymerization of fibrin, and the enzymatic – due to the selection into the circulation from vascular endothelial tissue plasminogen activator. The preparation of the peony refers to non-toxic anticoagulants, combining enzymatic fibrinolytic and fibrinolytic effects when intake. Therefore, we investigated the preparation from the roots of *Paeonia* allows. take it to antithrombotic drugs.

Keywords: anticoagulant of peony, depolymerization of fibrin, tissue plasminogen activator

Проблема использования растений, способных оказывать разнообразное воздействие на организм, разрабатывается как за рубежом, так и у нас в стране.

Многие растения оказывают влияние на систему свертывания крови, так как содержат вещества или повышающие свертывание, или снижающие его [1]. Противосвертывающее действие некоторых растений связано с наличием в их составе полисахаридных компонентов [2], например, в таволге вязолистной [3], в цветках календулы [1], гвоздики [8]. В морских растениях (ламинарии японской) [9] выявлены компоненты, снижающие концентрацию фибриногена и агрегацию тромбоцитов крови, усиливающие активность антитромбина III, гепариновое время свертывания крови, а также повышающие фибринолиз по тесту времени лизиса эуглобулинов.

Особый интерес представляют экологически чистые растения, широко распространенные в мире и используемые в медицинской практике. К ним относится семейство пионов. Известен водный на-

стой корня пиона уклоняющегося (Марьин корень – *Paeonia anomala* L.), используемый в медицинской практике как успокаивающее, противосудорожное, противоспазмолитическое и обезболивающее средство. В корнях этого пиона помимо эфирных масел (1,1–1,59%), крахмала (80%), сахаров (10%) содержатся также пеонол, салициловая кислота [6], которая может приводить к снижению агрегации тромбоцитов крови. Установлены антитромботические эффекты в экстрактах корней этого пиона [7]. Менее изучен другой вид пиона – молочноцветковый (*P. lactiflora*), в корнях которого также найдена салициловая кислота [6].

Цель нашего исследования – показать влияние биологически активных компонентов, выделенных из корней молочноцветкового пиона (*P. lactiflora*), на параметры свертывающей и противосвертывающей систем крови при внутривенном введении в организм животных и сравнить его эффекты с коммерческим низкомолекулярным гепарином.

Материалы и методы исследования

Биологически активные антикоагулянтные компоненты получали экстракцией измельченных до порошкообразного состояния корней пиона, экстракт освобождали от белков [5]. Высушенный препарат растворяли в 0,85%-ном NaCl. Содержание гепарина в препарате определяли амидолитическим методом. В качестве препарата сравнения использовали коммерческий низкомолекулярный гепарин (НМГ) фирмы «Celsus». За 1 условную единицу (усл.ед.) гепарина принято 10 мкг определяемого гепарина, которые вызывают заметное повышение антикоагулянтной активности по тесту активированного частичного тромбoplastинового времени (АЧТВ). Выявляли действие различных концентраций (по уровню или активности определяемого гепарина) двух препаратов – биологически активных компонентов из корней исследуемого пиона (КП) и препарата НМГ на внутренний путь свертывания крови в тесте АЧТВ.

В экспериментах на животных использовали стандартизованную дозу препарата КП, составляющую 37,5 усл.ед. гепарина в 0,5 мл 0,85%-ного раствора NaCl. Опыты проводили на 40 белых лабораторных крысах-самцах массой тела 180–200 г в соответствии с этическими принципами Хельсинкской декларации. Животные были разделены на три группы: первой группе (опыт 1, n = 12) вводили КП, второй группе (опыт 2, n = 8) – раствор НМГ в той же дозе и в том же объеме и третьей (контрольной, n = 12) – физиологический раствор (0,85%-ный NaCl) в том же объеме. Введение препаратов и взятие крови осуществляли через яремную вену. Кровь на анализы брали при соотношении кровь: консервант как 9:1 спустя 10 и 180 мин после введения. В качестве консерванта использовали 3,8%-ный раствор цитрата натрия. Кровь центрифугировали в течение 12 мин при 2000g. Получали бедную тромбоцитами плазму крови, в которой определяли антикоагулянтную активность по тестам АЧТВ, протромбинового времени (ПВ), тромбинового времени (ТВ), неферментативную фибринолитическую или фибриндеполимеризационную активность (ФДПА) на нестабилизированном фибрине и активность тканевого активатора плазминогена (ААП) на стандартном фибрине [4].

Результаты исследования и их обсуждение

В условиях *in vitro* была установлена практически одинаковая дозозависимость антикоагулянтных эффектов (в тесте АЧТВ) как биологически активных компонентов из КП, так и препарата сравнения – НМГ, которые содержали одинаковое количество определяемого нами гепарина (табл. 1).

Как показали эксперименты, через 10 мин после внутривенного введения КП (опыт 1) резко увеличивается антикоагулянтная активность плазмы крови за счет удлинения АЧТВ и ПВ на 90–100% соответственно, при этом ТВ практически не меняется, в опыте 2 при этом также повышается антикоагулянтная активность плазмы крови вследствие увеличения АЧТВ на 101% и ПВ – на 100%. В этот период времени в плазме крови крыс (опыт 1) обнаруживается значитель-

ное увеличение ФДПА на 110% и повышение ААП на 45%, в то время как в опыте 2 ФДПА увеличивается лишь на 23%, а ААП, как и в опыте 1 – на 45% (табл. 2).

Эти результаты показали, что содержащиеся в КП биологически активные гепариноподобные компоненты влияют на внутривенный механизм свертывания, подавляя активность факторов свертывания, в том числе фактора Ха. Подобные эффекты установлены и после действия препарата сравнения (опыт 2). В то же время удлинение ПВ под влиянием обоих препаратов свидетельствует об ингибции каждым из них факторов протромбинового комплекса, в том числе фактора Ха. Через 180 мин после введения КП (опыт 1) или препарата сравнения НМГ (опыт 2) в плазме крови крыс сохранялся повышенный фон антикоагулянтной активности за счет удлинения АЧТВ на 74 и 72,5% и ПВ на 60 и 55% соответственно, при этом ТВ оставалось в пределах нормы в обоих случаях (опыт 1 и опыт 2). Одновременно в этот период времени наблюдалось достоверное повышение ФДПА только в опыте 1 (КП) на 77% и ААП (и в опыте 1, и в опыте 2) – на 53–45% соответственно (табл. 2). Эти данные указывали на значительное влияние КП и препарата сравнения на факторы как внутреннего, так и внешнего путей свертывания крови, и особенно на общий для этих путей свертывания фактор Ха. Следует отметить, что в отличие от препарата сравнения, КП способствовал усилению как неферментативной, так и ферментативной фибринолитической активности плазмы крыс. Неферментативный фибринолиз проявлялся через деполимеризацию фибрина, а ферментативный – путем повышения активности тканевого активатора плазминогена. Таким образом, биологически активные гепариноподобные компоненты КП оказывали в крови крыс ингибирующее действие на активность фактора Ха, а также препятствовали превращению фибриногена в фибрин или же в случае образования фибриновых сгустков осуществляли их быстрое растворение. У коммерческого препарата сравнения НМГ выявлена слабая ФДПА в отличие от исследуемого КП.

При анализе полученных данных необходимо отметить, что в корнях пионов содержится низкомолекулярный гепариноподобный компонент, представляющий собой соединение гепарина с пептидом (гликопептид) [3, 6]. Этот компонент по своим свойствам подобен НМГ животного происхождения. Как известно, НМГ ингибирует активность фактора Ха, но не ингибирует активность тромбина. По результатам наших исследований активный компонент, со-

держась в КП, также ингибирует фактор Ха, не влияя на активность тромбина. Наряду с этим этот активный компонент КП проявлял в организме фибринолитическое действие неферментативной и ферментативной природы и способствовал экспрессии из эндотелия сосудов тканевого активатора плазминогена.

Таким образом, внутривенное введение крысам гепариноподобных биологически активных компонентов КП, как и препарата сравнения НМГ, вызывает с первых минут после однократного введения гипокоагуляцию, которая сохраняется на протяжении 3 ч. Кроме того, антикоагулянт из КП в отличие от НМГ тормозит коагуляционные превращения фибриногена, замедляя процесс самосборки фибрина, о чем свидетельствует его значительная фибриндеполимеризационная активность, подобно фукозилирован-

ным гликозаминогликанам [10]. Процесс самосборки фибрина реализуется за счет электростатических взаимодействий биологически активных компонентов КП с фибрин-мономерами, а также фибрин-полимерами разной степени зрелости. Наиболее значительным оказывается взаимодействие КП с ранними стадиями самосборки фибрина. Наряду с этим нами показано, что в ответ на появление в кровотоке активного антикоагулянта из КП, как и препарата сравнения НМГ, происходит выделение в кровоток из сосудистого эндотелия тканевого активатора плазминогена, участвующего в повышении ферментативной фибринолитической активности плазмы крови. Эти факты указывают на необходимость детального исследования взаимодействия антикоагулянта из КП с компонентами, участвующими в процессах превращения фибриногена в фибрин.

Таблица 1

Антикоагулянтные эффекты по тесту АЧТВ (с) гепариновых компонентов из корней пиона *P. lactiflora* (КП) и коммерческого НМГ (НМГ) в зависимости от концентраций содержащегося в них гепарина ($M \pm m$)

Образцы	мкг/мл	АЧТВ,с	мкг/мл	АЧТВ, с	мкг/мл	АЧТВ, с	мкг/мл	АЧТВ, с
КП	0 – нет препарата	31,5 ± 1,6	1,0	37,0 ± 1,8*	10,0	48,0 ± 2,3**	50,0	67,2 ± 3.3**
НМГ	0 – нет препарата	31,6 ± 1,6	1,0	36,8 ± 2.8	10,0	44,3 ± 2,5**	50,0	60,3 ± 3.9**

Примечание. Достоверность различий ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем (отсутствие препаратов).

Таблица 2

Антикоагулянтная (с, %) и фибринолитическая (mm^2 , %) активность плазмы крови крыс после внутривенного введения биологически активных компонентов из корней пиона *P. lactiflora* (опыт 1) и коммерческого НМГ (опыт 2) в дозе 37,5 усл.ед /200 г массы тела в динамике (через 10 и 180 мин) ($M \pm m$)

Условия опыта	Антикоагулянтная активность, с (%)			Фибринолиз, mm^2 (%)	
	АЧТВ	ПВ	ТВ	ФДПА	ААП
Норма. n = 8	34,1 ± 1,3 (103%)	28,3 ± 2,2 (102%)	15,4 ± 0,7 (105%)	5,8 ± 0,8 (92%)	25,0 ± 1,1 (98%)
Контроль (n = 12) – через 10 мин	32,9 ± 0,9 (100%)	27,7 ± 1,0 (100%)	14,5 ± 0,8 (100%)	6,3 ± 1,2 (100%)	28,1 ± 1,3 (100%)
Контроль через 180 мин	32,0 ± 1,4 (100%)	29,7 ± 0,7 (100%)	15,5 ± 1,8 (100%)	7,3 ± 2,2 (100%)	26,4 ± 1,5 (100%)
Опыт 1 (n=12) – через 10 мин	62,2 ± 3,5** (190%)	55,2 ± 1,3** (200%)	16,5 ± 2,1 (113%)	13,5 ± 1,7** (210%)	41,1 ± 2,4** (145%)
Опыт 1 – через 180 мин	58,2 ± 2,4** (174%)	47,2 ± 2,3** (160%)	14,8 ± 2,2 (108%)	13,0 ± 2,4* (177%)	34,4 ± 2,8* (153%)
Опыт 2 (n=8) – через 10 мин	66,1 ± 4,9** (201%)	55,2 ± 1,0** (200%)	14,9 ± 2,0 (103%)	7,8 ± 1,7 (123%)	41,0 ± 2,4 (145%)
Опыт 2 – через 180 мин	56,7 ± 2,5** (172.5%)	46,0 ± 3,4 (155%)	16,5 ± 3,3 (107%)	7,4 ± 0,9 (100%)	41,0 ± 1,0 (145%)

Примечание. Достоверность различий ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем (введен 0,85%-ный NaCl), АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время, ПВ – протромбиновое время, ТВ – тромбиновое время, ФДПА – фибриндеполимеризационная активность, ААП – активность тканевого активатора плазминогена.

Представленные данные свидетельствуют о перспективности изучения антикоагулянта из пиона молочнокветкового в качестве средства фармакологической коррекции повышенного уровня свертывания крови.

Заключение

На основании полученных в настоящей статье результатов можно заключить, что выделенный нами очищенный от белка препарат антикоагулянта из пиона молочнокветкового, подобно низкомолекулярному гепарину коммерческого производства, выделенному из тканей животных, при внутривенном введении в кровотоки проявляет антикоагулянтную активность и способствует усилению ферментативных фибринолитических свойств плазмы крови за счет выброса в кровотоки из эндотелия сосудов тканевого активатора плазминогена. В отличие от препарата сравнения НМГ низкомолекулярные гепариноподобные компоненты из корней пиона дополнительно оказывают значительную фибриндеполимеризационную активность в плазме крови. Итак, сходство двух препаратов заключается в практически одинаковой дозозависимости (по уровню гепарина) антикоагулянтного эффекта, в проявлении антифакторной Ха активности, отсутствии влияния на активность тромбина и в увеличении активности тканевого активатора плазминогена в крови. Различие двух препаратов заключается в том, что лишь активные компоненты из корней пиона проявляют заметную фибриндеполимеризационную активность в плазме крови. Полученный нами препарат из корней пиона может служить перспек-

тивным безопасным, экологически чистым антикоагулянтом с высоким фибриндеполимеризационным эффектом.

Список литературы

1. Гринкевич Н.И. Лекарственные растения. Справочное пособие. – М.: Высшая школа, 1991. – 398 с.
2. Криштанова Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц., Павлова Е.Д., Саканян Е.И. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств // Вестник ВГУ, сер. биология, химия, фармация. – 2005. – Т. 1. – С. 212–221.
3. Кудряшов Б.А., Ляпина Л.А., Кондашевская М.В., Ковальчук Г.А. Антикоагулянт из таволги вязолистной, его антитромботический и тромболитический эффекты // Вестн. Моск.ун-та. Сер.16. Биология. – 1990. – № 1. – С. 15–18.
4. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. – М.: Адвансед Солюшнз, 2012. – 160 с.
5. Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С. О механизме антикоагулянтного действия экстракта из корней пиона молочнокветкового // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 11–6. – С. 1091–1093.
6. Успенская М.С., Мурашев В.В., Криницина А. Древовидные пионы в Ботаническом саду МГУ. Под ред. Мурашева В.В. – М.: Лесная страна, 2016. – 104 с.
7. Kondachevskaya M.V., Lyapina L.A., Smolina T.Y. Antithrombotic and thrombolytic effects of root's extract paeonia anomala // Haemostasis. – 1996. – V. 26. № 3. – P. 584–585.
8. Lee J.I., Lee H.S., Jun W.J., Yu K.W., Shin D.H., Hong B.S., Cho H.Y., Yang H.C. Purification and characterization of antithrombotics from *Syzygium aromaticum* (L.) // Biol. Pharm. Bull. – 2001. – V. 24. № 2. – P. 181–187.
9. Sokolova E.V., Byankina A.O., Kalitnik A.A., Kim Y.H., Bogdanovich L.N., Solov'eva T.F., Yermak I.M. Influence of red algal sulfated polysaccharides on blood coagulation and platelets activation in vitro // J. Biomed. Mater. Res. – 2014. – V. 102, № 5. – P. 1431–1438.
10. Xiao C., Lian W., Zhou L., Gao N., Xu L., Chen J., Wu M., Peng W., Zhao J. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors. // Thromb Res. – 2016. – V. 146. – P. 59–68.