УДК 612.115.3:615.22

ПРОТИВОСВЕРТЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ГЕПАРИНОИДОВ ИЗ РАЗНЫХ ЧАСТЕЙ КОРНЕЙ ПИОНА *(Paeonia lutea)*

Успенская М.С.[1], Ляпина М.Г.[1], Калугина М.Д.[1], Ляпина Л.А.[1]

ФГОУ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, e-mail: lyapinal@mail.ru

Настоящее исследование посвящено проблемам борьбы с тромбофилиями и тромбозами путем использования новых препаратов – гепариноидов растительного происхождения. Исследованные гепариноиды, полученные из коры и сердцевины корней желтого пиона (Paeonia lutea), обладали уникальным сочетанным действием на все фазы свертывания крови, повышая антикоагулянтные и фибринолитические свойства плазмы крови, а также ингибируя процессы фибринообразования. Разработаны способы получения фракций гепариноидов из коры и сердцевины корней пиона (Paeonia lutea), очищенные от белков. В условиях in vitro они обнаруживали антикоагулянтные свойства (по тестам активированного частичного тромбопластинового, тромбинового и протромбинового времени) и собственную фибриндеполимеризационную активность при их концентрациях в системе от 10^{-4} до 10^{-1} мг/мл. Оба препарата, вводимые крысам пятикратно интраназально, повышали антикоагулянтную активность плазмы с одновременным увеличением фибриндеполимеризационного эффекта. Установлен превалирующий противосвертывающий эффект гепариноидных препаратов из коры корней пиона в условиях in vitro и in vivo, которые в основном действовали по внутреннему и общему механизмам свертывания крови. По антикоагулянтным свойствам препарат из коры корней соответствовал активности низкомолекулярного гепарина. Кроме того, он имел тенденцию к подавлению агрегации тромбоцитов и соответственно не вызывал тромбоцитопению в отличие от препаратов высокомолекулярного гепарина.

Ключевые слова: антикоагулянт, растительный гепариноид, фибринолиз, агрегация тромбоцитов.

ANTIKOAGULANTING PROPERTIES HEPARINOIDS FROM DIFFERENT PARTS OF ROOTS PION *(Paeonia lutea)*

Uspenskaya M.S.[1], Lyapina M.G.[1], Kalugina M.D.[1], Lyapina L.A.[1]

[1]FGOU Moscow State University named after M.V. Lomonosov, Moscow, e-mail: lyapinal@mail.ru

The present study is devoted to problems of struggle with thrombophilia and thrombosis through the use of new drugs of plant origin heparinoids. The studied heparinoids obtained from the bark and core of the yellow peony roots (Paeonia lutea) had a unique combined effect on all phases of blood coagulation, increasing anticoagulant and fibrinolytic properties of blood plasma, as well as inhibiting the processes of fibrin formation. Methods for obtaining fractions of heparinoids from the bark and core of peony roots (Paeonia lutea), purified from proteins, have been developed. In vitro they found anticoagulant properties (in tests of activated partial thromboplastin, thrombin and prothrombin time) and a private fibrindepolymerizing activity when their concentrations in the system from 10^{-4} to 10^{-1} mg/ml. Both drugs were administered to the rats five times intranasally, increased anticoagulant activity of the plasma while increasing fibrindepolymerizing effect. The prevailing anticoagulant effect of heparinoid preparations from the peony root bark in vitro and in vivo, which mainly acted on the internal and general mechanisms of blood coagulation, was established. Anticoagulant properties of the preparation from the roots corresponded to the activity of low molecular weight heparin. In addition, it had a tendency to suppress platelet aggregation and therefore did not cause thrombocytopenia in contrast to the drugs of high-molecular heparin.

Keyword: anticoagulant, plant heparinoid, fibrinolysis, platelet aggregation.

В настоящее время физиологи, клиницисты и фармакологи обращают особое внимание на изучение природных соединений с высокой биологической активностью [1]. Большой интерес вызывают биологически активные соединения растительной природы, которые могут служить антикоагулянтами и фибринолитиками [2, 3]. В ряде растений содержатся компоненты, являющиеся составной частью гепарина и других гликозаминогликанов с положительным воздействием на систему гемостаза как в норме, так

и при некоторых патологических состояниях организма [4, 5].

В корнях некоторых видов пионов обнаружено вещество, подобное гепарину (гепариноид), которое способно предотвращать процессы образования тромбов при введении животным. Установлено, что гепариноиды, полученные из молочноцветкового пиона (*Paeonia lactiflora*), проявляют антитромботические эффекты при повышенной свертываемости крови [6]. В то же время ранее было показано, что один из наиболее распространенных в средней полосе России пионов – *Paeonia lutea* обнаруживает в экстрактах из цельных корней или в спиртовом экстракте из коры антикоагулянтные свойства [7]. В литературе не установлено данных, какая часть корней (первичная кора или центральный осевой цилиндр) этого пиона обладает наивысшей противосвертывающей активностью. Известно, что первичная кора состоит из клеток основной ткани, межклеточного вещества, именно эта часть корня проводит воду и минеральные вещества от корневых волосков корня к его центру. Центральный осевой цилиндр осуществляет транспорт веществ.

Цель исследования

Цель настоящей работы заключалась в получении очищенных от белков антикоагулянтов из разных частей корней (коры или сердцевины) пиона желтого (*Paeonia lutea*), и исследовании антисвертывающих (антикоагулянтных, фибринолитических и антитромбоцитарных) эффектов коагулологическими методами в условиях in vitro и in vivo.

Материал и методы исследования

В работе применялись антикоагулянты из коры и сердцевины корней пиона желтого, выращенного в Ботаническом саду МГУ имени М.В. Ломоносова, и для сравнения – коммерческие препараты низкомолекулярного гепарина (НМГ) фирмы Celsus (США) и высокомолекулярного гепарина (ВМГ) фирмы Spofa (Чехия).

Опыты проводились в условиях *in vitro u in vivo*. Активные фракции выделяли из каждой части (коры или сердцевины) цельного высушенного при 37°С корня пиона. Для этого навеску каждой части (200 мг) измельчали до порошкообразного состояния в фарфоровой ступке, заливали 10 мл дистиллированной воды, переносили в гомогенизатор с 5 объемами 96%-ного этилового спирта (50 мл). Гомогенат сливали в центрифужный стакан, оставляли при комнатной температуре на 30 мин с последующим центрифугированием при 3000 g в течение 30 мин, после чего надосадочную жидкость, содержащую антикоагулянты (проверено коагулологическими тестами по удлинению временных интервалов свертывания крови), высушивали при 37°С. Исследовали водные растворы из коры или сердцевины пиона, в которых практически отсутствовал белок, что показано с помощью биуретового реактива. Амидолитическим методом определяли содержание гепарина в растворах. В

экспериментах in vitro готовили разные концентрации (от 10^{-6} до 10^{-1} мг/мл) растворенных в физиологическом растворе гепариноидов из коры (ГП-1) и сердцевины (ГП-2), которые инкубировали с нормальной плазмой крови крыс в течение 15 мин при 37°С. Контролем служили образцы нормальной плазмы крыс, где вместо препаратов добавляли физиологический раствор.

В экспериментах in vivo было использовано 55 лабораторных беспородных белых крыс-самцов (масса тела 200–220 г, рацион естественный лабораторный). Все эксперименты на животных проведены в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Стокгольм, 15.06.2006). Введение препаратов животным осуществляли неинвазивным способом – интраназальным. Животные были разделены на 5 групп – 2 опытные, получавшие 5-кратно интраназально ГП-1 и ГП-2 в дозах 500 мкг/кг массы тела в объеме 0,15 мл, и 3 контрольные, получавшие в те же сроки и подобным образом вместо гепариноидов 0,5 мг/кг массы тела ВМГ (3-я группа), НМГ (4-я группа) и 0,85%-й раствор NaCl (5-я группа).

Через 20 ч после последнего 5-го введения ГП-1 и ГП-2, а также контрольных веществ у животных натощак брали кровь из яремной вены в количестве 2 мл с использованием в качестве консерванта 3,8%-ного раствора цитрата натрия в соотношении кровь: консервант как 9 : 1. Образцы крови центрифугировали в двух режимах – при 1000 g в течение 5 мин (для получения богатой тромбоцитами плазмы с целью определения агрегации тромбоцитов) и при 3000 g в течение 10–12 мин (для получения бедной тромбоцитами плазмы с целью определения параметров плазменного гемостаза).

В крови определяли биохимические параметры гемостаза: агрегацию тромбоцитов, антикоагулянтную активность по тестам активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), тромбинового времени (ТВ), протромбинового времени (ПВ) на приборе анализатор свертывания крови – АСК-2-01-Астра и фибринолитическую активность по тесту выявления фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) [8].

Все данные обработаны статистически с помощью непараметрического критерия Вилкоксона (программа STATISTICA 6.0).

Результаты исследования и их обсуждение

В высушенных растительных антикоагулянтах по данным амидолитического метода выявлено наличие гепаринов в коре (ГП-1) и сердцевине (ГП-2), уровень которых составлял 2,3 мг% и 2,05 мг% соответственно.

Как видно из таблицы 1, в условиях in vitro в опытных образцах ГП-1 при всех исследованных концентрациях (от 10^{-6} до 10^{-1} мг/мл) установлена высокая антикоагулянтная активность по тестам АЧТВ, которая была максимально повышенной в 1,3 раза при

концентрациях гепариноида 10^{-2} мг/мл и несколько снижалась, показывая увеличение только в 1,16 раз, начиная с концентрации ГП-1 в системе 10^{-5} мг/мл. По данным ТВ в ГП-1 также выявлено достоверное увеличение антикоагулянтных свойств плазмы. Так, при концентрациях ГП-1 в системе от 10^{-1} до 10^{-3} мг/мл наблюдалось значительное (почти в 1,7 раза) увеличение антикоагулянтной активности, которая затем уменьшалась при использовании концентрации ГП-1 от 10^{-4} до 10^{-6} мг/мл. ПВ при исследовании ГП-1 было повышенным лишь при его концентрациях 10^{-1}–10^{-2} мг/мл. Таким образом, наибольшие антикоагулянтные эффекты ГП-1 обеспечиваются общим и внутренним механизмом свертывания крови.

При исследовании антикоагулянтной активности в препаратах ГП-2 обнаружена подобная же тенденция, но по данным АЧТВ и ТВ в меньшей степени, чем в препаратах ГП-1, а именно АЧТВ при концентрациях препарата ГП-2 в системе от 10^{-1} до 10^{-3} мг/мл увеличивалось в 1,27 раза по сравнению с контрольными образцами. С концентрации ГП-2 от 10^{-4} мг/мл в системе АЧТВ снижалось, но еще не достигало контрольных значений. ТВ после добавления к плазме ГП-2 было достоверно увеличено при его концентрациях в системе от 10^{-1} до 10^{-3} мг/мл. ПВ было достоверно увеличено при использовании концентраций ГП-2 от 10^{-1} до 10^{-4} мг/мл. Следует отметить более значительное удлинение (в 1,25 раза) ПВ при использовании ГП-2 в концентрации 10^{-2} мг/мл, в то время как ГП-1 в этих условиях удлинял ПВ в 1,14 раза (табл. 1).

Таблица 1

Концентрационная зависимость антикоагулянтной (по тестам АЧТВ – активированного частичного тромбопластинового времени, ТВ – тромбинового времени, ПВ – протромбинового времени) и фибриндеполимеризационной (ФДПА) активности плазмы здоровых крыс после добавления гепариноидов из коры (ГП-1) и сердцевины (ГП-2) корней P. lutea (M±m)

Концентрации (мг/мл)	ГП 1	ГП 2	Контроль (0,85%-й NaCl)
	АЧТВ, с		
10^{-6}	42,0 ± 2,5	41,0 ± 0,8	40.8 ± 2.9
10^{-5}	47,0 ± 1,6*	41,3 ± 1,4	
10^{-4}	51,8 ± 2,0**	43,0 ± 1,9	
10^{-3}	52,0 ± 3,1**	48,8 ± 1,5**	
10^{-2}	53,1 ± 3,7**	50,0 ± 2,0**	
10^{-1}	52,2 ± 1,7**	50,2 ± 1,3**	
	ТВ, с		
10^{-6}	25,0 ± 1,3	24,8 ± 1,6	24.2 ± 0.9
10^{-5}	28,1 ± 1,1*	24,6 ± 2,0	
10^{-4}	30,4 ± 4,1*	25,1 ± 2,4	

10^{-3}	41,0 ± 2,3**	39,4 ± 1,6**	
10^{-2}	41,5 ± 3,0**	40,5 ± 1,9**	
10^{-1}	41,2 ± 1,5**	40,1 ± 1,7**	
	ПВ, с		
10^{-6}	20,4 ± 1,7	20,6 ± 0,7	20,5 ± 1,1
10^{-5}	22,4 ± 1,7	22,4 ± 0,8	
10^{-4}	23,0 ± 2,6	24,7 ± 1,0**	
10^{-3}	23,6 ± 1,1*	24,8 ± 0,9**	
10^{-2}	24,4 ± 0,7**	25,6 ± 0,7**	
10^{-1}	27,0 ± 0,9**	27,7 ± 0,7**	
	ФДПА, мм^2		
10^{-6}	18,0 ± 3,2**	18,7 ± 2,4**	0,8 ± 0,1
10^{-5}	18,8 ± 1,1**	18,8 ± 1,7**	
10^{-4}	20,1 ± 0,8**	19,4 ± 2,2**	
10^{-3}	24,5 ± 1,3**	20,3 ± 2,2**	
10^{-2}	25,0 ± 0,9**	20,4 ± 2,1**	
10^{-1}	26,1 ± 1,1**	22,5 ± 1,7**	

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятого за 100%. Достоверность различий: * p <0,05; ** p <0,01.

Что касается исследования ФДПА каждого из гепариноидов, то доказано наличие этой активности при применении обоих гепариноидов, что указывает на комплексную гепариновую природу исследуемых ГП-1 и ГП-2, как это было установлено в других исследованиях с другими гепариновыми препаратами [9, 10].

В экспериментах на животных после интраназального многократного в течение 5 суток через каждые 24 ч применения каждого из гепариноидов было установлено, что спустя 20 ч после последнего введения у крыс в плазме крови повышались антикоагулянтные свойства. Об этом свидетельствовало увеличение АЧТВ, ТВ и ПВ в 1,8, 2,0 и 1,4 раза соответственно после применения ГП-1. Использование ГП-2 приводило к удлинению АЧТВ, ТВ и ПВ в 1,7, 2,0 и 1,3 раза. При этом в плазме крови крыс после применения ГП-1 и ГП-2 выявлена высокая степень неферментативной фибринолитической активности по тесту ФДПА (зоны лизиса на нестабилизированном фибрине составляли от 32 до 44 мм^2 в отличие от контрольных проб, где ФДПА достигал лишь 12–15 мм^2). Кроме того, препараты из коры пиона не вызывали повышения агрегации тромбоцитов, а напротив, способствовали ее подавлению (табл. 2).

Таблица 2

Антикоагулянтная (по тестам АЧТВ – активированного частичного тромбопластинового времени, ТВ – тромбинового времени, ПВ – протромбинового времени), фибриндеполимеризационная (ФДПА) активности, агрегация тромбоцитов плазмы здоровых

крыс через 20 ч после интраназального 5-кратного введения крысам гепариноидов из коры (ГП-1) и сердцевины (ГП-2) корней P.lutea, НМГ фирмы Celsus и ВМГ фирмы Spofa в дозах 0,5 мг/кг массы тела (M±m)

Исследуемые препараты	АЧТВ, с (%)	ТВ, с (%)	ПВ, с (%)	ФДПА, мм^2(%)	Агрегация тромбоцитов, %
Контроль (NaCl)	41,8 ± 6,3 (100%)	24,2 ± 3,1 (100%)	20,3 ± 1,1 (100%)	60,0 ± 4,8 (100%)	100
ГП 1	53,6 ± 5,0** (128%)	57,7 ± 6,0** (238%)	25,5 ± 0,7** (154%)	230,0 ± 5,03 (383%)	93,7
ГП 2	53,0 ± 3,6** (127%)	57,4 ± 4,5** (237%)	39,0 ± 1,6** (142%)	175,0 ± 9,7 (291%)	98,5
ВМГ	более 60 мин**	более 60 мин-**	–	4,0 ± 0,3	118*
НМГ	51,1 (122%)	48,5 ± 1,1** (200%0	–	5,9 ± 0,5	99

Примечание. Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятого за 100%. Достоверность различий :* p <0,05; ** p <0,01.

Следовательно, гепариноиды из коры или сердцевины корней пиона желтого по сравнению с контролем (введение NaCl) оказывали значительный антикоагулянтный и ингибиторный по отношению к факторам свертывания крови эффект. Максимальное их действие проявлялось в отношении процесса общего механизма свертывания крови и образования тромбина. По тестам АЧТВ и ТВ препараты ГП-1, ГП-2 и НМГ имели умеренный антисвертывающий эффект и не могли вызвать отрицательное геморрагическое действие в организме в отличие от препаратов ВМГ. В отличие от ГП-1 и ГП-2 препараты НМГ и ВМГ практически не ингибировали полимеризацию фибрина. Результаты исследования всех антисвертывающих препаратов подтверждают данные других авторов [11, 12] об ингибировании ими активности фактора X а и тромбина. По-видимому, в коре вследствие более высокого содержания гепарина и биологически активных соединений обнаруживаются и наивысшие антикоагулянтные и фибринолитические эффекты. Очевидно, что различия в составе гепариноидов из коры и сердцевины корней пиона обусловливают определенный характер их функций – гепариноид из коры в основном влияет на внутренний механизм свертывания крови, в то время как гепариноид из сердцевины – на внешний механизм. Выявлена отчетливая тенденция: поступление в кровь растительных компонентов, подобных гепарину, способствовало предотвращению процессов образования фибрина и тромбина. Максимальным антисвертывающим эффектом обладали препараты из коры корней пионов. Полученные данные указывают на потенциальные возможности растительных антисвертывающих компонентов растений влиять на процессы гемостаза,

регулируя их и поддерживая нормальный баланс гемостаза. Следует отметить, что по данным определения функции первичного гемостаза в отличие от обычного ВМГ [12] препараты из коры корней пиона, как и миметик протеогликана, включающего гепарин [13], не вызывают тромбоцитопению.

Заключение

В настоящей работе использован специальный подход для выявления влияния биологически активных соединений эндогенного происхождения – растительных компонентов, подобных гепарину, из разных частей растений. В наших исследованиях был доказан факт блокады активности тромбина и внутреннего механизма свертывания крови препаратами из пионов. Впервые показано, что интраназальное многократное введение в организм животных гепариноидов из коры или сердцевины корней желтого пиона приводит к антикоагулянтным эффектам с одновременным проявлением фибриндеполимеризационной активности в кровотоке. Препараты из сердцевины этого же корня оказывали противосвертывающее действие в основном по внешнему механизму свертывания крови. Препараты из коры корней пиона показали максимальную антисвертывающую активность по внутреннему и общему механизмам свертывания крови и способность не вызывать повышения агрегации тромбоцитов.

Список литературы

1. Кричевский Л.А. Низкомолекулярные гепарины в современной системе управления свертываемостью крови // Анестезиология и реаниматология. Медицинская реабилитация. 2015. Т.116 (15) Т.117 (16). С. 42-48.
2. Криштанов 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. №1. С. 212-221.
3. Arslan R., Bektas N., Bor Z., Sener E. Evaluation of the antithrombotic effects of Crataegus monogyna and Crataegus davisii in the carrageenan-induced tail thrombosis model. Pharm Biol. 2015. vol. 53. no. 2. P. 275-279.
4. Крыжановский С.П., Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н. Биологическая активность сульфатированных полисахаридов морских водорослей // Атеросклероз. 2013. Т.9. №1. С.77-98.
5. Pawlaczyk I., Czerchawski L., Kuliczkowski W., Karolko B., Pilecki W., Witkiewicz W.,

Gancarz R. Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant Erigeron canadensis L. Thromb. Res. 2011. vol. 127. no 4. P. 328-340.

6. Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С. О механизме антикоагулянтного действия экстракта из корней пиона молочноцветкового // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016. № 11(6). С.1091-1093.

7. Пасторова В.Е., Ляпина Л.А., Успенская М.С., Зиадетдинова Г.А. Сравнительные исследования влияния водных и спиртовых экстрактов из коры корней пионов P.lutea на гемостатические показатели крови // Бюллетень эксперим. биол. и мед. 1999. № 5. С. 533-535.

8. 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.

9. 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. vol. 146. P. 59-68.

10. Colliec-Jouault S., Bavington C., Delbarre-Ladrat C. Heparin-like entities from marine organisms Handb. Exp. Pharmacol., 2012. vol. 207. P. 423-449.

11. Van Montfoort M.L., Meijers J.C. Anticoagulation beyond direct thrombin and factor Xa inhibitors: indications for targeting the intrinsic pathway. Thromb. Haemost. 2013. vol. 110. № 2. P. 223-232.

12. Casu B., Naggi A., Torri G. Re-visiting the structure of heparin. Carbohydr Res. 2015. vol. 403. P. 460-465.

13. Chen J., Verni C.C., Jouppila A., Lassila R., Diamond S.L. Dual antiplatelet and anticoagulant (APAC) heparin proteoglycan mimetic with shear-dependent effects on platelet-collagen binding and thrombin generation. Thromb. Res. 2018. vol. 25. № 169. P. 143-151.