

УДК 615.273.53; 615.32; 615.076.9

Е.П. Калинин, Д.И. Бояринцев, Н.Н. Буслева, М.А. Ромаданова

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДЕЙСТВУЮЩИХ ВЕЩЕСТВ РАСТИТЕЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ, ОБЛАДАЮЩИХ АНТИКОАГУЛЯНТНОЙ АКТИВНОСТЬЮ

Тромботические состояния, возникающие в результате активации системы гемостаза, остаются одними из основных элементов каскада патологических процессов в развитии многих заболеваний. В частности, ведущее место тромбозов в развитии и осложнении сердечно-сосудистой патологии стимулирует поиск и исследование новых средств для целенаправленного снижения интенсивности свертывания крови. В исследованиях, выполненных в лабораториях Тюменского ГМУ, было установлено, что экстракты ряда растительных объектов демонстрируют противосвертывающее действие. Было показано, что экстракт кошачьей лапки двудомной (*Antennaria dioica*) обладает антикоагулянтной активностью, которая сохраняется как в *in vitro*, так и в *in vivo* тестах. При разделении компонентов исходного экстракта была выделена активная фракция и доказана ее пептидная природа.

Ключевые слова: биологически активные вещества природного происхождения, антикоагулянт, кошачья лапка двудомная.

Нарушения системы гемостаза играют ключевую патогенетическую роль при таких патологических процессах, как инфаркт миокарда, ишемический инсульт, тромбоэмболии различной локализации, воспалительные заболевания, шок. При всех указанных ситуациях именно свертывающая система и клеточный гемостаз в значительной мере обуславливают изменения микроциркуляции в жизненно важных органах и тканях, предопределяя развитие геморрагий, тромбгеморрагий, ишемических изменений в органах, создавая предрасположенность к тромбозам. Эти нарушения являются промежуточным звеном патогенеза многих заболеваний, характеризующихся повреждением внутренней выстилки сосудов, нарушением взаимодействия эндотелия с клетками крови и плазменными ферментными системами, сдвигами реологии крови, водно-электролитного баланса [1]. Современные методы диагностики и приемы разработки средств коррекции гиперкоагуляционных нарушений свертывания крови позволяют не только управлять течением патологического процесса, но и прогнозировать структуру эффективных средств для осуществления подобных вмешательств.

К давно известным и активно используемым средствам – гепарину и его производным, линейке антагонистов витамин-К зависимого образования прокоагулянтных факторов – добавился ряд селективных антикоагулянтов, преимущественно воздействующих на факторы общего этапа плазмокоагуляции. Среди препаратов с такой активностью следует назвать допущенные к клиническому использованию антагонисты фактора Ха (Ривароксабан), прямые ингибиторы тромбина (Дабигатран), селективные антагонисты рецепторов тромбоцитов, препятствующие как адгезии и агрегации кровяных пластинок, так и тормозящие реакцию высвобождения резервированных в гранулах факторов развития коагуляционного ответа. При этом ключевой фактор, на активацию которого нацелена вся прокоагулянтная система плазменных факторов и специализированный рецепторный аппарат тромбоцитов – фактор I, или фибриноген, не является эффективной мишенью корректирующих воздействий. Немногие попытки [2-4] воздействовать на его участие в коагуляционных процессах ограничиваются применением антагонистов гликопротеинов IIb/IIIa мембраны тромбоцитов, выступающих в качестве рецепторов фибриногена и опосредующих процесс агрегации тромбоцитов. Использование этих препаратов (Абциксимаб) ограничено внутриоперационным применением в качестве протекторов, предотвращающих нарушения микроциркуляции. Основой этой группы препаратов являются искусственно сконструированные «химеры» – соединения, не встречающиеся в природе. В литературе описан синтез ДНК-аптамеров, являющихся эффективными ингибиторами тромбина в *in vitro* тестах, но их активность резко снижается после введения в кровоток лабораторным животным [5].

Кроме синтетических эффекторов продолжают исследоваться растения как потенциальные источники препаратов с антикоагулянтными свойствами. При этом в качестве «носителя» антикоагулянтной активности рассматриваются различные химические компоненты растений. Особый интерес представляет изучение гликопептидов, полисахаридов и гликозидов растительного происхождения. Низкая токсичность большинства из них, широкий спектр биологического действия делает их ценными для медицинской практики [6]. Однако следует подчеркнуть, что большинство публикаций на эту

тему носят фрагментарный характер, не позволяющий составить однозначное представление о влиянии тех или иных извлечений из растительного материала на свертывание.

Работы, выполненные в лаборатории кафедры ботаники Тюменского государственного медицинского университета, свидетельствуют, что многие представители растительного мира могут содержать химические соединения, предотвращающие активацию свертывания крови [7]. О.А. Русаковой было исследовано более 200 видов растений флоры Сибири на предмет выявления в них антикоагулянтов. Исследования проводили *in vitro*, определяя влияния растворов экстрактов растений (концентрация экстрактов – 10 мг/мл) на время рекальцификации и тромбиновое время цитратной донорской плазмы. Оказалось, что 43 исследуемых экстракта более чем в 2 раза увеличивают время свертывания рекальцифицированной плазмы и 19 – тромбиновое время [8].

Кроме этого, было показано, что ряд растений содержат антикоагулянты, эффект которых реализуется на ранних этапах плазмокоагуляции. Подробно были исследованы только представители семейства Бурачниковые, хотя некоторые из экстрактов других семейств также демонстрировали крайне высокую активность.

Материалы и методы исследования

В качестве сырья для получения антикоагулянтов использовали траву кошачьей лапки двудомной (*Antennaria dióica*). Сухое измельченное сырье экстрагировали 0,01 М раствором NH_4OH в соотношении 1:20 на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение часа. Полученный экстракт отфильтровывали, сырье подвергали повторной экстракции в тех же условиях. Порции экстракта объединяли, концентрировали, отдиализовывали, недиализуемую часть высушивали, полученный сухой экстракт использовали для дальнейших исследований.

Оценку чистоты и исследование химической природы экстрагируемых веществ проводили с помощью тонкослойной, гель-проникающей, ионообменной и высокоэффективной жидкостной хроматографии, ставя аналитические реакции с выделенными компонентами. Тонкослойную хроматографию (ТСХ) проводили на предварительно активированных пластинках «Silufol UV 254» в системе растворителей *n*-бутанол: уксусная кислота: вода в соотношении 4:1:5. Гель-фильтрацию проводили, используя в качестве носителя Toyopearl HW-40, Fine (колонка 500X10 мм, элюент 0,25 мМ ацетатно-аммиачный буфер, pH 7,6). В ионообменной хроматографии использовались катионит Sephadex C-50 и анионит Sephadex A-50. Высокоэффективную жидкостную хроматографию проводили на модульном хроматографе Gilson, используя в качестве детектора спектрофотометр с проточной кюветой Gilson-119 (UV/vis, рабочая длина волны – 210 и 254 нм).

Для оценки антикоагулянтной активности *in vitro* растворяли экстракт в Трис-HCl буфере с pH 7,2 и определяли активированное частичное тромбoplastиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ) и тромбиновое время (ТВ) в сравнении с контролем. Определение выполняли в пулированной цитратной плазме крови доноров. Исследования показателей свертывания крови проводили на автоматическом коагулометре «Solar» (Беларусь), с использованием стандартных тест-систем. Для клоттинговых тестов рассчитывали эффективность торможения реакций по формуле:

$$i = 1 - (t_k/t_0),$$

где i – эффективность торможения,

t_k – время, затрачиваемое на фибринообразование в контрольной пробе,

t_0 – время, затрачиваемое на фибринообразование в опытной пробе.

При оценке влияния эффекторов на свертывание крови *in vivo* использовались самцы белых беспородных крыс (возраст 2 мес.) массой 160 ± 20 г. Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными (1996). Влияние раствора антикоагулянта оценивали после его введения в яремную вену наркотизированного животного. Для постановки коагуляционных тестов отбирали кровь из парной яремной вены, стабилизировали её цитратом натрия и центрифугировали для получения плазмы.

Статистический анализ полученных данных выполняли методами вариационной статистики для малых рядов наблюдений. Статистическую значимость оценивали, используя U-критерий Манна-Уитни, значимыми считались отличия при значениях $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Полученный суммарный экстракт демонстрировал антикоагулянтную активность, что выражается в удлинении времени, затрачиваемого на образование фибринового сгустка (рис. 1).

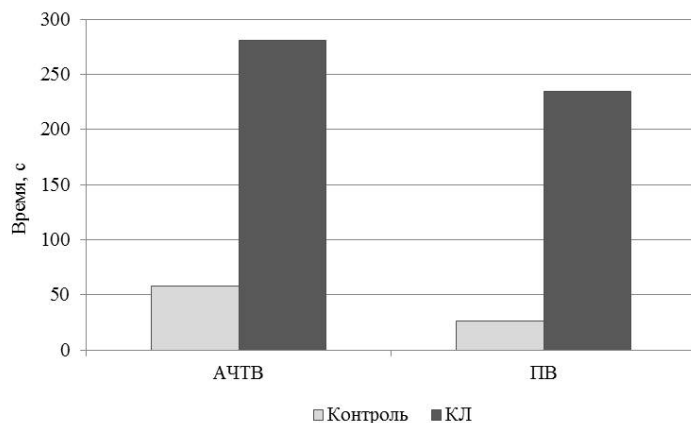


Рис. 1. Влияние нативного экстракта кошачьей лапки (КЛ) на коагуляционные показатели (концентрация сухого экстракта 10 мг/мл)

Так, АЧТВ в присутствии раствора экстракта с конечной концентрацией 1 мг/мл удлинялось ($i = 0,44$). При разведении экстракта буфером наблюдали кратное снижение эффективности торможения фибринообразования (рис. 2).

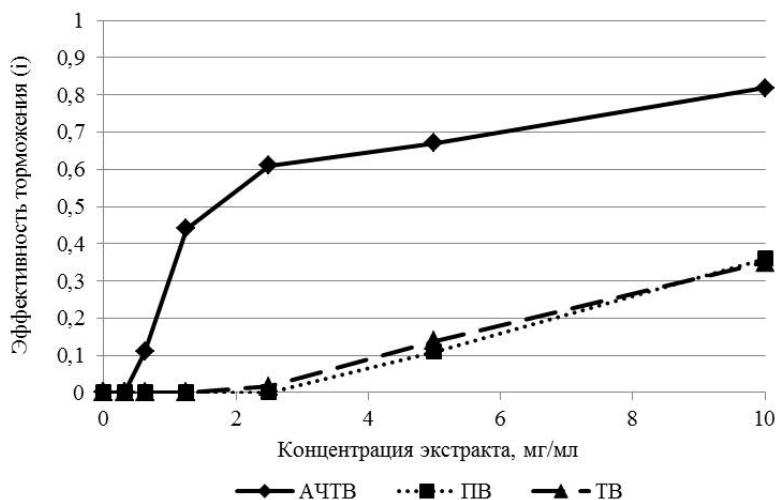


Рис. 2. Зависимость эффективности торможения плазмокоагуляции от концентрации экстракта *Antennaria dioica*

Идентификацию компонентов экстракта осуществляли методом тонкослойной хроматографии на пластинах «Silufol» в системах, обеспечивающих разделение химических соединений, потенциально присутствующих в растительных экстрактах. В результате разделения и проведения групповых реакций идентифицированы флавоноиды, полифенолы и нингидрин-положительные соединения. Для идентификации компонента смеси, обеспечивающего антикоагулянтную активность, мы провели ее разделение гель-проникающей хроматографией (рис. 3).

Удалось разделить экстракт кошачьей лапки на 9 фракций. Антикоагулянтную активность сохраняла фракция 1 экстракта (выраженно тормозит АЧТВ, менее выраженно – ПВ и ТВ) (рис. 4). В дальнейших тестах использовалась первая фракция экстракта.

Поскольку ранее было показано наличие в растительных тканях соединений пептидной природы, обеспечивающих антикоагулянтную активность, а положительную реакцию с нингидрином могут давать многие соединения. Для подтверждения пептидной природы активного компонента экстракта

мы прибегли к кислотному гидролизу первой фракции (среда 6 М HCl, 110 °С, 24 часа). Образовавшиеся продукты распада разделяли с помощью ТСХ в присутствии стандартных образцов аминокислот и визуализировали компоненты гидролизата окрашиванием нингидрином. В продуктах гидролиза обнаружен ряд нингидрин-положительных соединений (5 индивидуальных окрашенных пятен), совпадающих по величине удерживания и окраске со стандартными образцами.

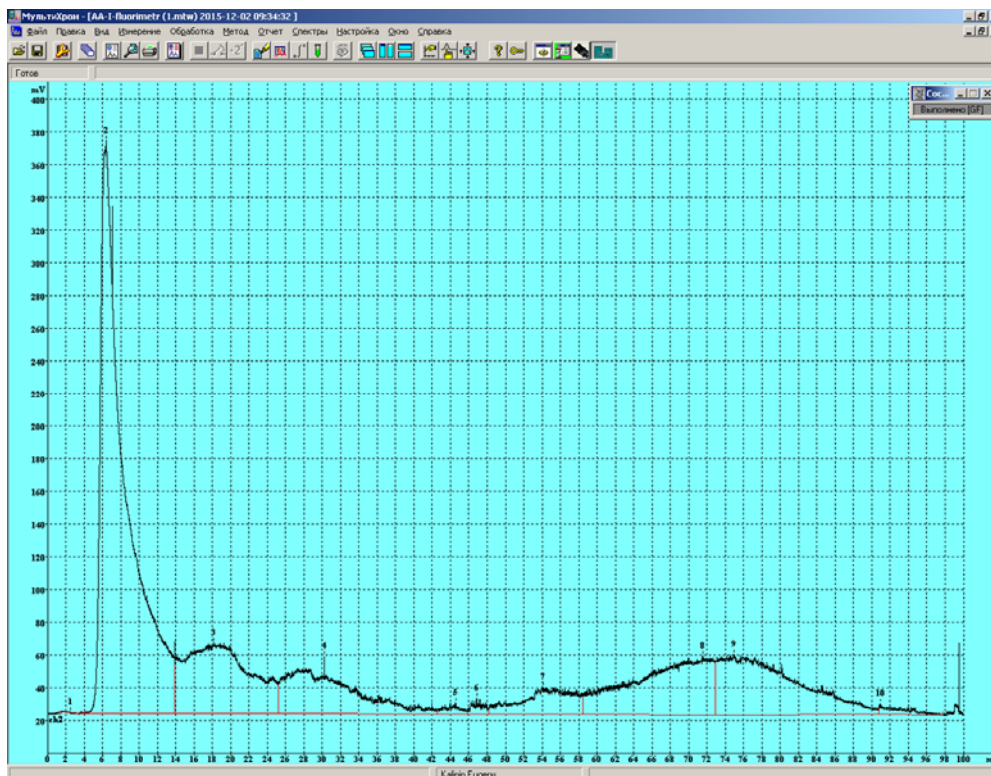


Рис. 3. Профиль элюции компонентов экстракта кошачьей лапки. Условия элюирования описаны в разделе «Материалы и методы»

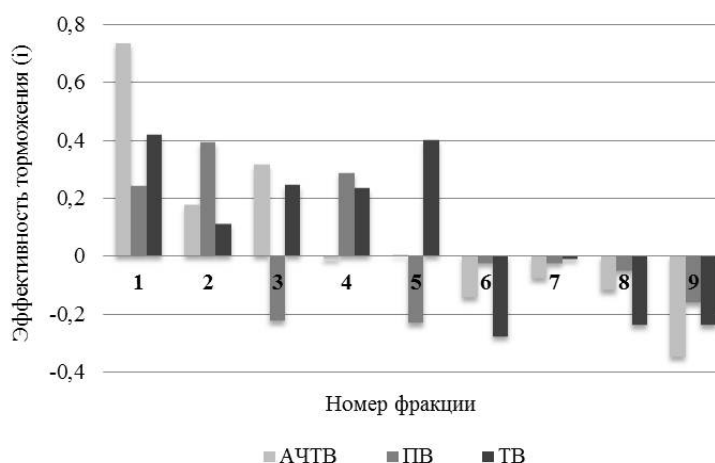


Рис. 4. Противосвертывающая активность фракций экстракта кошачьей лапки

Для того, чтобы убедиться в пептидной природе эффектора, нами активная фракция экстракта подвергнута ферментативной обработке. После инкубации с папаином (37 °С, 24 часа, pH6,8) убыль антикоагулянтной активности в сравнении с контрольным образцом составила 14,8 % для АЧТВ, 21,9 % для ПВ и 16,02 % для ТВ. Частичная потеря активности может быть обусловлена неполным гидролизом эффектора, а неравномерность убыли активности – разной чувствительностью тестов к его действию.

Для оценки антикоагулянтного действия очищенного экстракта при введении лабораторным животным растворяли антикоагулянт, полученный при гель-фильтрации, в изотоническом растворе натрия хлорида, создавая концентрацию эффектора 10 мг/мл. Тестирование проводили на двух группах самцов нелинейных белых крыс. В экспериментальных группах (три группы по 10 животных) крысам, находящимся под наркозом, вводили раствор антикоагулянта из расчета 5 мг на 100 г массы тела. В контрольных группах (три группы по 7 животных) вводили изотонический раствор натрия хлорида. Через 5 мин, 1 час или 2 часа после введения отбирали кровь, стабилизировали ее цитратом натрия и получали бестромбоцитную плазму, в которой определяли тромбиновое и протромбиновое время и АЧТВ. При этом активность антикоагулянта из кошачьей лапки равномерно снижалась (с $i = 0,8$ через 5 мин после введения, до $i = 0,3$ по АЧТВ через 2 часа). Очищенный экстракт выраженно подавлял свертывание крови, а его действие сохранялось не менее 2-х часов (рис. 5). Явного токсического действия не проявлял. В пользу этого свидетельствует восстановление двигательной активности, пищевого и исследовательского поведения в сопоставимое время с животными контрольной группы.

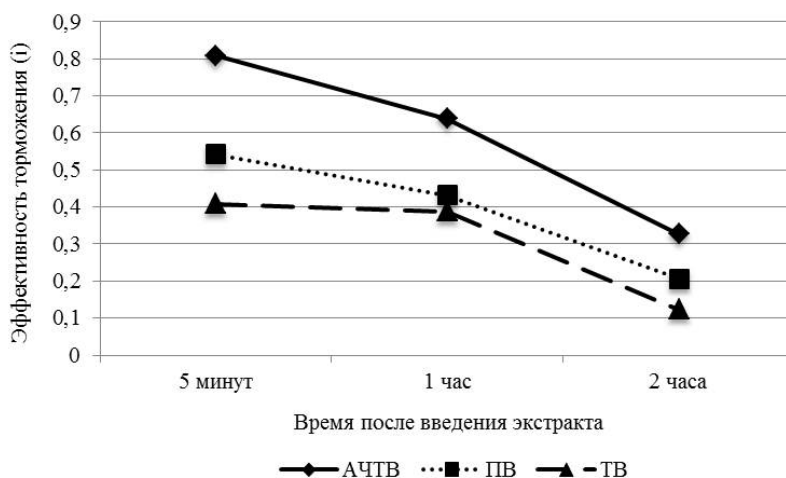


Рис. 5. Противосвертывающая активность очищенного экстракта кошачьей лапки *in vivo*

Выводы

1. Полученный экстракт кошачьей лапки двудомной (*Antennária dioica*) обладает антикоагулянтной активностью, проявляющейся в торможении реакций как внешнего, так и внутреннего пути плазмокоагуляции.

2. Экстракт сохраняет противосвертывающую активность при введении лабораторным животным (продолжительность действия превышает 2 часа) и не обладает явным токсическим действием.

3. При разделении компонентов исходного экстракта можно выделить активную фракцию, содержащую соединения белково-пептидной природы.

4. Снижение антикоагулянтной активности очищенного экстракта после обработки протеазой и небольшое число продуктов кислотного гидролиза доказывает пептидную природу эффектора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Role of coagulation factors in cerebral venous sinus and cerebral microvascular thrombosis / M. Nagai et al. // *Neurosurgery*. 2010. Vol. 66, N 3. P. 560-565.
2. Бышевский А.Ш., Чиряев Е.А. Ингибитор самосборки фибрина // *Укр. биохим. журн.* 1983. Т. 55, № 3. С. 260-265.
3. Miraglia C., Greenberg C. Measurement of blood coagulation factor XIIIa formation in plasma containing Gly-Pro-Arg-Pro // *Anal. Biochem.* 1985. N 1. P. 165-171.
4. Чипенс Г.И. Дизайн лекарственных препаратов на базе пептидов // *Перспективы биоорганической химии в создании новых лекарственных препаратов: Сб. тр. Рига: Изд-во ун-та, 1992. С. 7-9.*
5. Characteristics of a new DNA aptamer, direct inhibitor of thrombin / A.B Dobrovolskiy et al. // *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2011. Vol. 4 (150). P. 422-425.
6. Дементьева И.А. Защитное действие недиализующейся фракции экстракта медуницы при угрозе тромбоза // *Обмен веществ в норме и патологии. Тюмень: ТГМИ, 1992. С. 30.*

7. Русакова О.А. Растения флоры Сибири, как источники антикоагулянтов прямого действия // Обмен веществ в норме и патологии. Тюмень: ТГМИ, 1992. С. 84.
8. Русакова О.А. Антикоагулянты растительного происхождения: природа и механизм действия: дис. ... канд. биол. наук. Тюмень, 1993. 142 с.

Поступила в редакцию 07.07.17

E.P. Kalinin, D.I. Boyarintsev, N.N. Buslaeva, M.A. Romadanova

IDENTIFICATION OF ACTIVE SUBSTANCES FROM PLANT EXTRACTS WITH ANTICOAGULANT ACTIVITY

Thrombosis as a result of hemostasis activation is one of the main elements in pathological cascades of many diseases. In particular, the leading place of thrombosis in the development and complication of cardiovascular pathology stimulates investigation and searching of new effectors for the purposeful reduction of blood coagulation intensity. During the studies performed in laboratories of the Tyumen State Medical University it was established that extracts from a number of plant objects demonstrate an anticoagulant effect. Thus, it was shown that extract of *Antennaria dioica* has anticoagulant activity, which persists in both *in vitro* and *in vivo* tests. Components of the initial extract were separated, an active fraction was isolated and its peptide nature was proved.

Keywords: biologically active substances of plant origin, anticoagulant, *Antennaria dioica*.

REFERENCE

1. Nagai M, Yilmaz C.E., Kirchofer D., Esmon C.T., Mackman N. and Granger D.N. [Role of coagulation factors in cerebral venous sinus and cerebral microvascular thrombosis], in *Neurosurgery*, 2010, vol. 66, no. 3, pp. 560-565.
2. Byshevskiy A.Sh. and Chiryatiev E.A. [Fibrin self-assembly inhibitor], in *Ukr. biokhim. zhurn.* 1983, vol. 55, no. 3, pp. 260-265 (in Russ.).
3. Miraglia C. and Greenberg C. [Measurement of blood coagulation factor XIIIa formation in plasma containing Gly-Pro-Arg-Pro], in *Analytical Biochemistry*, 1985, vol. 144, no. 1, pp. 165-171.
4. Chipens G.I. [Design of medicines based on peptides], in *Sborn. nauch. tr. "Perspektivy bioorganicheskoy khimii v sozdanii novykh lekarstvennykh preparatov"*, Riga, 1992, pp. 7-9 (in Russ.).
5. Mazurov A.V., Titaeva E.V., Khaspekova S.G., Storojilova A.N., Spiridonova V.A., Kopylov A.M. and Dobrovolsky A.B. [Characteristics of a new DNA aptamer, direct inhibitor of thrombin], in *Bulletin of experimental biology and medicine*, 2011, vol. 4, no. 150, pp. 422-425
6. Demytyeva I.A. [Protective effect of the non-dialyzing fraction of the extract of the lungwort with thrombosis threat], in *Sborn. nauch. tr. "Obmen veshchestv v norme i patologii"*, Tyumen, 1992, p. 30 (in Russ.).
7. Rusakova O.A. [Plants of the flora of Siberia as sources of direct anticoagulants], in *Sborn. nauch. tr. "Obmen veshchestv v norme i patologii"*, Tyumen, 1992, p. 84 (in Russ.).
8. Rusakova O.A. [Anticoagulants of plant origin: the nature and mechanism of action], Cand. Biol. sci. diss., Tyumen, 1993, 142 p. (in Russ.).

Калинин Евгений Павлович,
кандидат биологических наук, доцент,
заведующий кафедрой биологической химии
E-mail: kalininer@tyumsmu.ru

Бояринцев Даниэль Игоревич, аспирант
E-mail: bdy0710@yandex.ru

Буслаева Наталья Николаевна, студентка
E-mail: natalie.buslaeva@gmail.com

Ромаданова Мария Андреевна, студентка
E-mail: masshok_rma@mail.ru

ФГБОУ ВО Тюменский ГМУ Минздрава России
625023, Россия, г. Тюмень, ул. Одесская, 54

Kalinin E.P.,
Candidate of Biology, Associate Professor,
Head of Department of biological chemistry
E-mail: kalininer@tyumsmu.ru

Boyarintsev D.I., postgraduate student
E-mail: bdy0710@yandex.ru

Buslaeva N.N., student of Medical Faculty
E-mail: natalie.buslaeva@gmail.com

Romadanova M.A., student of Pharmacy Faculty
E-mail: masshok_rma@mail.ru

Tyumen State Medical University
Odesskaya st., 54, Tyumen, Russia, 625023