

Рекомендована д.м.н., професором А.І.Березняковою

УДК 615.273.5:615.322:615.451.16:582.734.4

ГЕМОСТАТИЧНА ДІЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН ОЖИНИ СИЗОЇ

Л.В.Лук'янова, В.А.Волковой

Національний фармацевтичний університет

У статті викладені результати дослідження впливу пагонів, листя, плодів ожини сизої на систему гемостазу. Було виявлено, що в механізмі гемостатичної дії активний тромбоцитарний компонент відсутній. Тривалий прийом пагонів ожини сизої в дозі, яка в 50 разів перевищує ED_{50} , призводить до гіпокоагуляції. Отримані результати узгоджуються з даними літератури та підтверджують можливість одержання нового гемостатичного засобу.

Багатий хімічний склад робить ожину цінним лікувально-профілактичним засобом [12, 22]. Рослина містить вітаміни С, В, К, органічні кислоти, дубильні речовини, калій, залізо та використовується як кровоспинний засіб, при розладах нервової системи, особливо при істеричних нападах [1, 5, 9, 10, 25].

Мета даної роботи — вивчення впливу ожини сизої на систему гемостазу, виявлення деяких механізмів гемостатичної дії та можливих ускладнень при її передозуванні.

Експериментальна частина

Час кровотечі визначали за методом [2, 13, 14], який полягає в тому, що експериментальній тварині (білі щури) робили надріз хвоста й занурювали в пробірку з певною кількістю підігрітої води, після чого визначали час кровотечі та кількість крові, що втратила тварина. Підрахунок тромбоцитів у периферичній крові робили в камері Горяєва з використанням у якості розчинної та гемолізуючої рідини 1% розчин оксалату амонію [4, 16]. При підрахунку використовували мікроскоп з фазовоконтрастною приставкою. Спонтанну агрегацію тромбоцитів вивчали за допомогою електронної мікроскопії. Оцінку агрегаційної здатності тромбоцитів проводили шляхом підрахунку кількості агрегатів, кількості вибухів і відростків, що характеризують процес активування тромбоцитів. Час зсідання крові досліджували методами [4, 13, 14].

Мікрокоагуляційний тест, що відображає динаміку утворення та інактивації тромбіну, виконували за методикою [3, 17, 18]. З цієї метою 0,1 мл стабілізованої цитратом крові змішували з 2 мл 0,222% розчину кальцію хлориду, у результаті чого утворювалася гемолізат-кальцієва суміш, у

якій починався процес активації протромбіну і перетворення його на тромбін. Цю суміш у різний термін (протягом перших 10 хв досліджували через кожні 2 хв, потім через кожні 10 хв) додавали до рівного об'єму нативної плазми. Тромбін, що міститься в гемолізат-кальцієвій суміші, викликає зсідання цієї плазми тим швидше, чим вище його концентрація.

Гепаринорезистентність плазми визначали за допомогою серійного гепарин-тромбінового тесту [7, 11]. До досліджуваної та контрольної нормальної плазми додавали розчини гепарину, що подовжує тромбіновий час, і шляхом порівняння досліджуваної і нормальної плазми за тромбіновим часом визначали індекси активації антитромбіну та антитромбіновий резерв плазми.

Для вивчення імовірних ускладнень при передозуванні ожини експерименти були поставлені на 30 білих нелінійних щурах обох статей масою 170–190 г, які були розділені на три групи: група 1 — інтактні тварини (контроль); група 2 — тварини, яким вводили внутрішньоочеревино однократно дозу, яка в 50 разів перевищувала ефективну дозу, тобто 350 мг/кг; група 3 — тварини, які одержували щодня 350 мг/кг протягом 30 днів. За поведінкою і станом тварин вели щоденні спостереження. Через добу і через 30 днів по 5 щурів з кожної групи евтаназували під ефірним наркозом; екстирповані органи фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну та потім вивчали гістоморфологічними методами. Встановлено, що при однократному і 2-тижневому введенні препаратів в ефективній дозі (DE_{50} пагонів ожини — 7 мг/кг, листя ожини — 13,2 мг/кг і плодів ожини — 3,8 мг/кг) вони не впливали на вміст тромбоцитів у периферичній крові. Після 30-денного введення препаратів проявлялося статистично значиме підвищення кількості тромбоцитів (табл. 1).

Результати експериментів піддавали математичній обробці з використанням критеріїв непараметричної статистики і коефіцієнта Стьюдента [6].

Результати та їх обговорення

При вивченні агрегаційної здатності тромбоцитів було виявлено, що при однократному, 10- і 20-денному введенні ожини в ефективній дозі не

Таблиця 1

Кількість тромбоцитів у периферичній крові щурів при тривалому введенні ожини сизої

Строки дослідження	Контрольна група	Експериментальна група
Вихідні дані	531,0±16,7	543,0±12,6
Однократне введення		
Пагони ожини	544,0±14,9	549,0±11,8
Листя ожини	542,0±14,0	549,0±10,2
Плоди ожини	542,0±16,4	551,0±8,4
Через 7 днів		
Пагони ожини	537,2±12,0	544,8±9,6
Листя ожини	535,8±10,9	540,4±8,2
Плоди ожини	536,6±10,8	542,2±9,4
Через 15 днів		
Пагони ожини	544,4±11,6	560,1±11,6
Листя ожини	552,2±10,8	558,0±10,2
Плоди ожини	548,6±9,9	562,2±8,8
Через 30 днів		
Пагони ожини	548,7±12,2	558,2±9,4*
Листя ожини	546,2±12,0	556,6±7,2*
Плоди ожини	544,5±13,8	560,4±8,8*

Примітка: n = 10; * p < 0,05.

виникає практично значимого впливу на процес агрегації тромбоцитів (p>0,35 стосовно контрольної групи тварин). Після 30-денного застосування досліджуваних речовин поряд з підвищенням вмі-

Таблиця 2

Вплив пагонів, листя та плодів ожини сизої на агрегаційну здатність тромбоцитів (% тромбоцитів, що входять до складу агрегатів)

Строки дослідження	Контрольна група	Експериментальна група
Вихідні дані	11,0±1,6	10,0±1,7
Однократне введення		
Пагони ожини	13,0±2,8	11,0±2,9
Листя ожини	11,0±2,2	10,0±2,0
Плоди ожини	12,0±3,4	10,0±4,4
Через 7 днів		
Пагони ожини	12,0±2,6	14,0±3,0
Листя ожини	10,0±2,2	12,0±1,9
Плоди ожини	11,0±6,4	13,0±1,8
Через 15 днів		
Пагони ожини	14,0±3,6	16,0±4,6
Листя ожини	12,0±1,2	15,0±6,8
Плоди ожини	13,0±8,8	15,0±4,9
Через 30 днів		
Пагони ожини	11,0±3,4	19,0±2,2*
Листя ожини	10,0±2,2	17,0±2,0*
Плоди ожини	10,0±6,8	18,0±4,8*

Примітка: * p < 0,05.

Таблиця 3

Вплив пагонів ожини сизої на динаміку утворення та інактивації тромбіну по мікрокоагуляційному тесту

Час інкубації, хв	Зсідаюча активність, %		
	контрольна група	пагони ожини сизої	ε-АКК
5	51,0±2,9	64,0±3,8*	56,0±4,6
10	94,0±4,2	110,0±4,4*	106,0±2,2*
30	73,0±4,0	89,0±3,2*	81,0±3,4
50	53,0±3,8	70,0±4,8*	61,0±4,6

Примітка: n = 10; * p < 0,05.

сту тромбоцитів у периферичній крові щурів спостерігали статистично значиме збільшення агрегаційної здатності тромбоцитів у порівнянні з контрольною групою тварин (табл. 2).

Таким чином, результати вивчення дії БАР ожини сизої на вміст тромбоцитів у периферичній крові та агрегаційну здатність тромбоцитів дозволяють зробити висновок про відсутність активного тромбоцитарного компонента в механізмі гемостатичної дії ожини сизої як при однократному, так і при 20-денному внутрішньоочеревинному введенні в ефективній дозі.

З вивчених потенційних гемостатиків найбільший інтерес представляють пагони ожини сизої, і оскільки раніше нами був вивчений їх вплив на показники зовнішніх механізмів зсідання крові, ми продовжили дослідження такого впливу на протизсідаючі і внутрішні й механізми крові.

З метою з'ясування можливої дії пагонів ожини сизої на внутрішні механізми зсідання крові був проведений мікрокоагуляційний тест, що відтворює динаміку утворення та інактивації тромбіну під впливом препарату, що вводять щурам в DE₅₀ (7 мг/кг) [19-21]. Аналіз даних — результатів досліджень, представлених у табл. 3, свідчить про те, що під впливом БАР пагонів ожини сизої скорочується час активації протромбіну і його переходу у тромбін, що підтверджується підвищенням зсідання нативної нормальної плазми при додаванні гемолізат-кальцієвої суміші тваринам дослідної групи на 5-й і 10-й хв інкубації в порівнянні з контрольною групою. Крім того, під впливом БАР пагонів ожини сизої збільшувався час інактивації тромбіну на 30-й і 50-й хв інкубації гемолізат-кальцієвої суміші, при цьому отриманий ефект перевищував такий у ε-амінокапронової кислоти (див. табл. 3).

У результаті аналізу макро- і мікроскопічного вивчення органів тварин, що одержували ожину сизу однократно в дозі, яка перевищує в 50 разів ефективну, встановлено, що препарат не викликає патологічних змін. При щоденному внутрішньоочеревинному введенні дози 350 мг/кг тварини на 10-ту добу починали втрачати апетит, не набирали вагу, у деяких з'являлася діарея [23, 24].

При вивченні експериментального матеріалу даної групи тварин встановлено, що основні морфологічні зміни стосувалися розладів кровообігу, які проявлялися у вигляді кровонаповнення судин, діapedезу еритроцитів і діapedезних крововиливів. Найбільш виражений характер ці зміни мали в міокарді, нирках, легенях.

ВИСНОВКИ

1. У механізмі гемостатичної дії пагонів, лисття і плодів ожини сизої відсутній позитивний тромбоцитарний компонент.

2. Однократне і 20-денне введення пагонів, листя і плодів ожини сизої в ефективних дозах не викликає значного впливу на процес агрегації тромбоцитів. 30-денне застосування препаратів збільшує агрегаційну здатність тромбоцитів, що

варто враховувати при лікуванні хворих, схильних до ДВС-синдрому.

3. Пагони ожини сизої скорочують час активації протромбіну і його переходу в тромбін і не впливають на гепаринорезистентність плазми. Реалізація гемостатичного ефекту здійснюється переважно за рахунок інтенсивного пригнічення фібринолітичної активності сироватки крові експериментальних тварин.

4. Однократне введення сухого екстракту пагонів ожини сизої в дозі 350 мг/кг маси тварин (доза, яка в 50 разів перевищує DE₅₀) не викликає патологічних змін морфологічної структури органів. Тривале введення (на протязі 30 днів) призводить до гіпокоагуляції та викликає ефект, протилежний початковому.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.Г. *Основы диагностики нарушений гемостаза.* — М.: Ньюдиамед АО, 1999. — 224 с.
2. *Біохімічні і клінічні методи дослідження / Під ред. В.В.Меньшикова.* — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
3. Глазкова Т.Ю., Березнякова М.Е., Тищенко І.Ю. *Лекарства — человеку.* — Х., 2001. — Т. XV, №1-2. — С. 131-134.
4. Гублер Л.Н., Генкин А.А. *Применение критериев непараметрической статистики в медико-биологических исследованиях.* — Л., 1966. — 57 с.
5. Дегтярь Н.И. *Фармакология и токсикология перекисного окисления липидов, гемостаза и иммуногенеза.* — П., 1992. — С. 67-68.
6. *Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекоменд. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В. Стефанова.* — К., 2001. — С. 284-291.
7. Иванов Е.П. *Диагностика нарушений гемостаза.* — М., 1983. — 222 с.
8. Пелькис П.С., Шевченко Д.И., Лозинский М.О. и др. *Синтетические ингибиторы фибринолиза.* — К.: Наукова думка, 1986. — 172 с.
9. Сернов Л.Н., Гацура В.В. *Элементы экспериментальной фармакологии.* — М., 2000. — С. 317-323.
10. Файнштейн Ф.Э., Козинец Г.И., Бархамов С.М. и др. *Болезни системы крови.* — Т.: Медицина, 1987. — 670 с.
11. Breddin K. *Die Thrombozytenfunktion bei hamorrhagischen Diathesen, Trombosen und Gefasskrankheiten.* — F.K.Schauttauer-Verlag, Stuttgart — New York, 1968. — 438 p.
12. Buiyng P.Y. // *Physiol. Reviews.* — 1994. — Vol. 74, №1. — P. 139-162.
13. Caen J., Larrieu M.J., Samama M. *L'hemostase. Methodes d'exploration et diagnostic pratique.* — Paris, 1968. — P. 58-59.
14. Ferguson L.R. // *Mutation Res.* — 2001. — №475. — P. 89-111.
15. Hatano T., Yasunara T. // *Chem. Pharm. Bull.* — 1990. — №38(5). — P. 1224-1229.
16. Hayes A.W. *Principles and Methods of Toxicology.* — New-York: Raven Press, 1989. — 899 p.
17. *Human blood coagulation, haemostasis and Thrombosis // Ed. R.M. Biggs.* — Oxford, 1976. — 738 p.
18. Ingram G.I.H., Brozovic M., Slater N.G.P. *Bleeding disorders: Investigation and management.* — Oxford: Blackwell, 1982. — 413 p.
19. Lee P.I., White P. // *Am. J. Med. Sci.* — 1913. — Vol. VCCXZV, №4. — P. 495-503.
20. Livingston A.I. // *J. Assoc. Anal. Chem.* — 1986. — Vol. 69, №6. — P. 1017-1019.
21. Olintscu A., Hristescu S., Roman S. // *Arch. Roum. Patol. Rap. and microbiol.* — 1987. — Vol. 46, №4. — P. 311-319.
22. Porter S.N., Howard G.S., Butler R.N. // *Eur. J. of Pharmacol.* — 2000. — №397. — P. 1-9.
23. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. // *Pharmacol.* — 1999. — №5. — P. 100.
24. Rodak J., Grygiowski R.J. // *Pol. J. Pharmacol.* — 1996. — №48 (6). — P. 555-564.
25. Symmington F.W. // *Mol. Immunol.* — 1984. — №21. — P. 877.

УДК 615.273.5:615.322:615.451.16:582.734.4
ГЕМОСТАТИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ ЕЖЕВИКИ СИЗОЙ

Л.В.Лукьянова, В.А.Волковой

Статья представляет результаты исследования влияния побегов, листьев, плодов ежевики сизої на систему гемостаза. Было выявлено, что в механизме гемостатического действия активный тромбоцитарный компонент отсутствует. Продолжительный прием побегов ежевики сизої в дозе, в 50 раз превышающей ED₅₀, приводит к гипоккоагуляции. Полученные результаты согласуются с данными литературы и подтверждают возможность получения нового гемостатического средства.

UDC 615.273.5:615.322:615.451.16:582.734.4
THE HAEMOSTATIC EFFECT OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF RUBUS CAESIUS

L.V.Lukyanova, V.A.Volkovoy

The paper presents the results of investigations dealing with the effects of shoots, leaves, fruits of *Rubus caesius* on the hemostatic system. The active platelet component has been found to be absent in the mechanism of the hemostatic action. A prolonged administration *Rubus caesius* shoots in the dose that is 50 times higher than the DE₅₀ causes hypocoagulation. The results obtained correlate with the literature data and confirm the opportunity of obtaining a new haemostatic agent.