

ВИВЧЕННЯ МЕХАНІЗМУ ГЕМОСТАТИЧНОЇ ДІЇ ОЖИНИ СИЗОЇ

Л.В.Лук'янова, В.А.Волковой

Національний фармацевтичний університет

Ключові слова: ожина сиза; гемостатична дія; плазмін; плазміноген

Практична медицина відчуває певний дефіцит фармакологічних засобів, які активно впливають на систему зсідання крові. Пошук біологічно активних сполук рослинного походження становить науковий та практичний інтерес через те, що цим сполукам притаманний широкий спектр фармакологічної дії та низька токсичність. У зв'язку з цим пошук і подальше фармакологічне вивчення лікарських засобів рослинного походження є перспективним. У результаті дослідження було встановлено, що механізм антифібринолітичної дії сухого екстракту з пагонів ожини сизої має антиферментний характер: блокуючи у дослідах *in vitro* активатори профібринолізину (плазміногену) — стрептокіназу та урокіназу — та пригнічуючи дію фібринолізину (плазміну), препарат чинить специфічну кровоспинну дію. Одночасно спостерігали тенденцію до зниження початкових фаз коагуляції. Сухий екстракт з пагонів ожини сизої сповільнює фібринолітичну активність крові інтактних тварин при порушенні фібринолізу, спричиненому прямою і непрямою активацією плазміногену.

Практична медицина відчуває певний дефіцит фармакологічних засобів, які активно впливають на систему зсідання крові. Виникає безліч нових проблем при зупинці капіляро-паренхіматозних кровотеч, незважаючи на широкий вибір гемостатичних препаратів [2, 5, 8]. З існуючих препаратів коагулотропної дії найбільш ефективними є фармакологічні речовини тваринного походження (фактори зсідання крові, фібриноген та ін.). Висока вартість сировини створює певні труднощі для адекватного задоволення потреб охорони здоров'я. Обмежено вибір як гемостатичних, так і антифібринолітичних препаратів. За даними вітчизняної літератури [7, 9] з-поміж синтетичних антифібринолітичних препаратів для зупинки капіляро-паренхіматозних кровотеч найчастіше використовується лише ε-амінокапронова кислота. Все це зумовлює необхідність подальшого пошуку нових гемостатиків, що дозволить поліпшити якість лікування завдяки впливу на різні етапи зсідання крові.

Л.В.Лук'янова — аспірант кафедри фізіології Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

Пошук біологічно активних сполук рослинного походження становить науковий та практичний інтерес через те, що цим сполукам притаманний широкий спектр фармакологічної дії та низька токсичність. У зв'язку з цим пошук і подальше фармакологічне вивчення лікарських засобів рослинного походження, на нашу думку, є перспективним. У Національному фармацевтичному університеті на кафедрі фармакогнозії під керівництвом проф. Ковальова В.М. було розроблено сухий екстракт з пагонів ожини сизої, що має гемостатичну дію. Ожина сиза (*Rubus ceasius*) родини розоцвітих (*Rosaceae*) — відома дикоросла і культурна плодово-ягідна рослина, досить поширена в Україні. Багатий хімічний склад робить ожину цінним лікувально-профілактичним засобом [3, 9, 17, 20]. Раніше було встановлено, що саме він впливає на фібринолітичну активність крові як її інгібітор, аналогічний дії ε-амінокапронової кислоти.

Метою нашої роботи було вивчення механізму антифібринолі-

тичної дії сухого екстракту з пагонів ожини сизої.

Матеріали та методи

Вивчення механізму антифібринолітичної дії сухого екстракту з пагонів ожини сизої проводили на 8 кролях-самцях масою 2,3–2,6 кг. З даних літератури відомо про різноспрямовану дію інгібіторів фібринолізу, які можна поділити на антиактиватори, що перешкоджають процесу активації плазміногену, тобто утворенню активного протеолітичного ферменту, та антиплазміни, які блокують протеолітичну дію плазміну відносно фібриногену та інших білків [10, 14, 19]. У зв'язку з цим ми модулювали порушення фібринолізу введенням прямого і непрямого активаторів фібринолізу — урокінази та стрептокінази *in vitro*.

Результати впливу сухого екстракту з пагонів ожини сизої на фібриноліз, який був ферментативно активований, реєстрували методом тромбоеластографії, що дозволяє графічно записувати процес зсідання в цілому — від появи перших ниток фібрину до кінцевої фази (фібринолізу) [1, 12, 13]. Принцип дії тромбоеластографа ґрунтуються на вимірюван-

Таблиця

Результати тромбоеластографічних досліджень антифібринолітичної активності сухого екстракту з пагонів ожини сизої і ϵ -амінокапронової кислоти, $x \pm S$

№ серії	Умови досліду	Показники тромбоеластограм				Фібриноген, мг
		R, мл	MA, мл	L, мл	індекс інгібіції, відн. од.	
1	0,2 мл цитратної крові; 0,05 мл вероналового буфера; 0,1 мл 1,29%-го розчину хлориду кальцію (інтактний контроль)	48,4 \pm 3,40	53,6 \pm 1,2	Не визна- чається	-	1,90 \pm 0,10
2	0,2 мл цитратної крові; 0,5 мл розчину сухого екстракту з пагонів ожини сизої; 0,1 мл розчину хлориду кальцію (контроль із сухим екстрактом із пагонів ожини сизої)	20,6 \pm 1,40*	64,2 \pm 1,5*	Не визна- чається	-	2,00 \pm 0,07
3	0,2 мл цитратної крові; 0,05 мл розчину ϵ -АКК; 0,5 мл розчину хлориду кальцію (контроль із ϵ -амінокапроновою кислотою)	15,6 \pm 1,00*	75,2 \pm 0,9*	Не визна- чається	-	2,10 \pm 0,05
4	0,2 мл цитратної крові; 0,05 мл розчину стрептокінази; 0,1 мл розчину хлориду кальцію (стрептокіназний контроль)	69,80 \pm 3,70	20,4 \pm 1,20	387,5 \pm 2,30	-	-
5	0,2 мл цитратної крові; 0,05 мл розчину урокінази; 0,1 мл розчину хлориду кальцію (урокіназний контроль)	70,8 \pm 4,90	19,6 \pm 0,70	293,9 \pm 4,80	-	-
6	0,2 мл цитратної крові; 0,05 мл суміші: 0,1 мл розчину стрептокінази; 0,1 мл розчину сухого екстракту з пагонів ожини сизої; 0,1 мл розчину хлориду кальцію	51,4 \pm 3,4**	55,4 \pm 0,9**	Не визна- чається	10	2,0 \pm 0,10
7	0,2 мл цитратної крові; 0,05 мл суміші: 0,1 мл розчину стрептокінази; 0,1 мл розчину ϵ -АКК; 0,1 мл розчину хлориду кальцію	38,8 \pm 2,9**	58,6 \pm 1,05**	Не визна- чається	10	2,00 \pm 0,03
8	0,2 мл цитратної крові; 0,05 мл суміші: 0,1 мл розчину урокінази; 0,1 мл розчину сухого екстракту ожини сизої	19,8 \pm 4,7**	32,4 \pm 0,52**	Не визна- чається	10	2,00 \pm 0,05
9	0,2 мл цитратної крові; 0,05 мл суміші: 0,1 мл розчину урокінази; 0,1 мл розчину ϵ -АКК	20,4 \pm 3,8**	40,8 \pm 0,7**	Не визна- чається	10	2,00 \pm 0,03

Примітки:

- 1) n = 8 — кількість тварин у кожній групі;
- 2) * — Р<0,05 порівняно з інтактним контролем;
- 3) ** — Р<0,05 порівняно з контролем зі стрептокіназою та урокіназою.

ні в'язкості крові, що змінюється в процесі зсідання. Для реєстрації коливань використовують фотосвітловий запис.

Враховуючи односпрямованість дії, для порівняння використовували ϵ -амінокапронову кислоту (ϵ -АКК) ("Кислота амінокапронова", р-н д/і 5%, фл., 100 мл, "Біолік" (Харків)). Встановлено, що кількість сухого екстракту з пагонів ожини сизої в 0,1 мл крові при його введенні тваринам ефективною дозою є 0,005 мг, а доза ϵ -АКК в аналогічному об'ємі

крові — 0,01 мг, які розраховували за допомогою методу однокамерної моделі та даних фармакокінетики про максимальну концентрацію нового препарату та ϵ -АКК у крові [1].

Для порівняльної характеристики отриманих результатів по-передньо були зняті п'ять тромбоеластографічних контролів: 1-й — інтактний; 2-й — стрептокіназний; 3-й — урокіназний; 4-й — із сухим екстрактом з пагонів ожини сизої; 5-й — із препаратом порівняння.

Для отримання інтактного контролю в прогрітому при 37°C кювету поміщали 0,2 мл цитратної крові, 0,05 мл вероналового буфера (рН=7,4) і 0,1 мл 1,29%-го розчину хлориду кальцію та реєстрували нормограму. Для активації фібринолізу використовували робочі розчини стрептокінази та урокінази, які викликають лізис фібринового згустка протягом 40 і 30 хв відповідно. При тромбоеластографічній реєстрації процесу зсідання контрольної суміші, яка містила 0,2 мл цитратної крові, 0,05 мл

стрептокінази (урокінази) у веро-наловому буфері, під дією 0,1 мл 1,29%-го розчину хлориду кальцію відбувалася нейтралізація стабілізатора і послідовна активація процесу коагуляції. Під впливом активаторів плазміногену — стрептокінази та урокінази — здійснився процес непрямої (прямої) активації фібринолізу. Активний фермент плазмін, що утворився, протеолітично розщепив фібриновий згусток і фібриноген на розчинні пептиди. При графічному записі внаслідок швидкої дією фібринового згустка, який утворився, реєстрували характерні вкорочені веретеноподібні криві, що свідчить про повне розчинення згустка. Після записування фібриноген і фібрин у кюветі не були встановлені.

Подальшим етапом була графічна реєстрація процесу зсідання суміші, які містять стрептокіназу і сухий екстракт з пагонів ожини сизої, урокіназу і сухий екстракт із пагонів ожини сизої.

При вивчені тромбоеластографічних кривих враховували характер запису і такі показники:

- R — час реакції (відображає швидкість утворення тромбокінази і тромбіну і залежить від активності тромбокінази і характеризує I і II фази процесу зсідання крові);
- MA — максимальна амплітуда тромбоеластограми, яка характеризує щільність, еластичність і величину фібринового згустка, що утворився (залежить від концентрації та повноцінності утворених ниток);
- L — час лізису, за допомогою якого визначають час від моменту появи фібринових ниток до повного їхнього розчинення;
- n = Lo / Lk — індекс інгібіції фібринолізу (відносн. од.) (ха-

рактеризує антифібринолітичну ефективність досліджуваного препарату),

де: Lo — час лізису фібринового згустка суцільної крові при активації фібринолізу за допомогою додавання стрептокінази та урокінази у присутності препарату; Lk — час лізису фібринового згустка суцільної крові при стрептокіназній (урокіназній) активації фібринолізу.

Індекс інгібіції, який складає 1,5 і більше, свідчить про наявність антиактиваторних властивостей досліджуваної речовини; 10 і більше — про повну нейтралізацію фібринолітичної дії стрептокінази (урокінази) [11, 12, 15, 16].

Результати та їх обговорення

Аналіз даних тромбоеластографічних досліджень, наведений в таблиці, свідчить про те, що в контролі без додавання активаторів фібринолізу сухий екстракт із пагонів ожини сизої і ε-АКК відповідно в 2,3 і 3,1 рази підвищували активність початкових фаз гемокоагуляції. При введенні активаторів фібринолізу ці параметри порівняно з даними контрольної групи свідчили про розвиток фібринолізису: час реакції збільшувався при додаванні до крові стрептокінази в 1,4 рази; урокінази — у 1,5 разів; концентрація і швидкість формування фібринових ниток помітно знижувалися в 2,6 і 2,7 разів відповідно, відмічалося розчинення фібринового згустка, що підтверджує дані літератури відносно фібринолітичної дії стрептокінази та урокінази [3, 18]. При додаванні до цитратної крові суміші стрептокінази і сухого екстракту з пагонів ожини сизої відбувалося повне гальмування процесу

стрептокіназної активації фібринолізу, утворення повноцінного фібринового згустка і збереження динамічних властивостей фібринових ниток, які формуються. Аналогічні результати спостерігалися при додаванні до крові суміші стрептокінази і ε-АКК, що узгоджується з даними літератури про те, що амінокапронова кислота є інгібітором фібринолітичної активності крові [8]. Дослідження з урокіназною активацією фібринолізу свідчили про ту ж спрямованість дії сухого екстракту з пагонів ожини сизої і препарату порівняння, але з менш вираженим інгібуючим ефектом.

Таким чином, встановлено, що механізм антифібринолітичної дії сухого екстракту з пагонів ожини сизої має антиферментний характер: блокуючи у дослідах *in vitro* активатори профібринолізину (плазміногену) стрептокіназу та урокіназу та пригнічуючи дію фібринолізину (плазміну), препарат чинить специфічну кровоспинну дію. Одночасно спостерігали тенденцію до зниження початкових фаз коагуляції.

ВИСНОВКИ

1. Сухий екстракт із пагонів ожини сизої сповільнює фібринолітичну активність крові інтактних тварин при порушенні фібринолізу, спричиненому прямою і непрямою активацією плазміногену.

2. Механізм антифібринолітичної дії сухого екстракту з пагонів ожини сизої носить антиферментний характер, який проявляється у блокуванні активаторів профібринолізину (стрептокінази та урокінази) і пригніченні дії фібринолізину в дослідах *in vitro*, що спричиняє специфічну кровоспинну дію.

ЛІТЕРАТУРА

1. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед, 2001. — 286 с.
2. Беленький В.М. //Воен.-мед. журн. — 1995. — №1. — С. 32-34.
3. Вакулина О.П., Попкова Е.В., Исаченков В.А. //Вопр. мед. химии. — 1988. — Т. 34, вып. 4. — С. 32-36.

4. Виговська Я.І. Геморагічні захворювання. — Львів: ВАТ “Бильбос”, 1999. — 235 с.
5. Виговська Я.І., Руденко В.П., Новак В.Л. Діагностика і лікування спадкових коагулопатій: Метод. рекоменд. — Львів: Укр. центр мед. інформації та патентно-ліцензійної роботи, 1997. — 15 с.
6. Лікарські рослини: Енцикл. довід. / За ред. акад. АН УРСР А.М.Гродзинського. — К.: Голов. ред. УРЕ ім. М.П.Бажана, 1991. — 334 с.
7. Пелькис П.С., Шевченко Л.А., Лозинскис М.Ф. Синтетические ингибиторы фибринолиза. — К.: Наук. думка, 1986. — 170 с.
8. Черних В.П., Березнякова А.І., Бризницька О.А. та ін. //Клін. фармація. — 2000. — Т. 4, №1. — С. 64-67.
9. Buyng P.Y. //Physiol. Rev. — 1994. — Vol. 74, №1. — P. 139-162.
10. Ferguson L.R. //Mutation Res. — 2001. — №475. — P. 89-111.
11. Hatano T., Yasunara T. //Chem. Pharm. Bull. — 1990. — №38 (5). — P. 1224-1229.
12. Hayes A.W. Principles and Methods of Toxicology. — New-York: Raven Press, 1989. — 899 p.
13. Human blood coagulation, haemostasis and Thrombosis / Ed. R.M.Biggs. — Oxford, 1976. — 738 p.
14. Ingram G.I.H., Brozovic M., Slater N.G.P. Bleeding disorders: Investigation and management. — Oxford: Blackwell, 1982. — 413 p.
15. Livington A.I. //J. Assoc. Anal. Chem. — 1986. — Vol. 69, №6. — P. 1017-1019.
16. Olintscu A., Hristescu S., Roman S. //Arch. Roum. Pathol. Rap. and Microbiol. — 1987. — Vol. 46, №4. — P. 311-319.
17. Porter S.N., Howard G.S., Butler R.N. //Eur. J. of Pharmacology. — 2000. — №397. — P. 1-9.
18. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M. //Pharmacology. — 1999. — №5. — P.100.
19. Rodak J., Grygiewski R.J. //Pol. J. Pharmacol. — 1996. — №48 (6). — P. 555-564.
20. Symmington F.W. //Mol. Immunol. — 1984. — №21. — P. 877.

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (057) 706-30-73.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 12.10.2006 р.