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

УДК 615.273.5:615.322:615.451.16:582.734.4

ВИВЧЕННЯ ВПЛИВУ СУХОГО ЕКСТРАКТУ З ПАГОНІВ ОЖИНИ СИЗОЇ НА ФІБРИНОЛІТИЧНУ СИСТЕМУ КРОВІ

Л.В.Лук'янова, В.А.Волковой

Національний фармацевтичний університет

Стаття представляє результати дослідження механізмів гемостатичної дії сухого екстракту з пагонів ожини сизої, а саме, вивчення його впливу на фібринолітичну систему крові. Було встановлено, що реалізація гемостатичного ефекту сухого екстракту з пагонів ожини сизої здійснюється переважно за рахунок інтенсивного пригнічення фібринолітичної активності крові тварин. Отримані результати узгоджуються з даними літератури та підтверджують можливість одержання нового гемостатичного засобу рослинного походження.

Широке розповсюдження захворювань, які характеризуються порушенням рівноваги систем зсідання та антизсідання крові (кровотечі шлунково-кишкового тракту, акушерсько-гінекологічна та хірургічна патологія), вимагає своєчасного застосування засобів, які регулюють процеси коагуляції та фібринолізу. Проте характерною особливістю препаратів, які використовуються при гострих та масивних кровотечах, є їх висока собівартість, що ускладнює і обмежує їх використання. Загальним недоліком рослинних гемостатичних засобів, які використовуються для зупинки і профілактики помірних та тривалих кровотеч, є низька комплаєнтність пацієнтів до них. І в більшості своїй галенові препарати містять етанол, що теж суттєво обмежує їх використання [6, 7]. У зв'язку з цим нашу увагу привернули рослинні біологічно активні речовини, які на відміну від синтетичних лікарських засобів добре переносяться і практично не викликають побічних ефектів. На кафедрі НФаУ під керівництвом проф. В.М.Ковальова було створено сухий екстракт з пагонів ожини сизої і вивчено його фітохімічний склад. Даний екстракт містить: дубильні речовини, флавоноїди, гідроксикоричні і гідроксибензойні кислоти, комплекс вітамінів (С, Р, Е, F) [2, 15, 17]. Це дало можливість обгрунтовано передбачити наявність гемостатичної активності у даного екстракту і провести поглиблене вивчення його впливу на процеси гемостазу.

Мета даної роботи — розкриття механізмів гемостатичної дії сухого екстракту з пагонів ожини сизої, а саме, вивчення його впливу на фібринолітичну систему крові.

Експериментальна частина

Фібринолітичну систему крові вивчали за методом Є.Бідвелл, що полягає у визначенні різниці концентрації фібрину в пробах до і після інкубації досліджуваної плазми, під час якої йде деградація фібрину ферментом плазміном, що міститься у плазмі [3, 12, 14, 16].

Концентрацію фібриногену визначали фотометрично. Розрахунок фібринолітичної активності проводили за формулою:

$$\text{Фібринолітична активність (\%)} = \frac{А - Б}{А} \cdot 100,$$

де: А — кількість фібриногену через 60 хв інкубації; Б — кількість фібриногену через 3 год (при дослідженні плазми щурів) і 24 год (при дослідженні плазми кролів) інкубації.

Про фібринолітичну активність крові можна судити також за вмістом у ній продуктів деградації фібриногену/фібрину (ПДФ), що визначали неімунологічним методом по С.З.Габітову і співавт. [1, 4, 13]. Після додавання до сироватки крові 1% розчину протаміну сульфату, який має здатність осаджувати ранні ПДФ, спостерігали за утворенням осаду. Підвищення рівня ПДФ розглядається як одна з основних лабораторних ознак гіперфібринолізу.

Фібринолітичну активність прийнято досліджувати в еуглобуліновій фракції плазми, в процесі отримання якої фібриновий згусток відокремлюють від інгібіторів фібринолізу [18]. В еуглобуліновій фракції залишаються плазміноген і його активатори, але відсутні (за умовами обробки плазми) інгібітори фібринолітичної системи антиплазміни [19, 23]. Час лізису еуглобулінових згустків досліджували уніфікованим методом Коваржика-Булука [4]. Принцип методу — вимірювання часу спонтанного лізису згустка, який отримують з еуглобулінової фракції безтромбоцитарної плазми, що містить фактори зсідання і фібринолізу,

Таблиця 1

Вплив сухого екстракту з пагонів ожини сизої і ε-амінокапронової кислоти на фібринолітичну активність крові щурів (n=6)

Показники	Контроль	Екстракт ожини, 7 мг/кг	ε-АКК, 6 мг/кг
Фібринолітична активність, %	21,77±0,68	11,07±0,03*/**	13,90±2,83*
Продукти деградації фібрину	0	0	0

Примітки: * — вірогідність результатів щодо контролю, p<0,05;
** — вірогідність щодо препарату порівняння — ε-АКК, p<0,05.

при додаванні до неї розчину хлориду кальцію. Головним компонентом еуглобулінової фракції є плазміноген, також у ній міститься близько 25% фібриногену, протромбін та інші фактори системи зсідання крові [20-22]. Отриманий осад еуглобулінів розчиняється, а фібриноген перетворюється на фібрин. Час від моменту утворення згустка фібрину до його розчинення виражає фібринолітичну активність крові. Еуглобуліновий лізис значно прискорюється активаторами фібринолізу. У пробірку наливали 8 мл дистильованої води, 0,15 мл 1% розчину оцтової кислоти і 0,5 мл досліджуваної плазми. Перемішували вміст і ставили у холодильник (4°С) на 30 хв. Суміш центрифугували протягом 5 хв при 1500 об/хв, зливали надосадову рідину і видаляли залишки рідини перекиданням пробірки на фільтрувальний папір. Вводили у пробірку 0,5 мл боратного буфера рН 9,0 і, обережно помішуючи паличкою, розчиняли осад еуглобулінів. Дві проби по 0,2 мл переносили в 2 інші пробірки, ставили їх на водяну баню і додавали у кожну пробірку по 0,2 мл 0,025 М розчину хлориду кальцію. Через кілька хвилин у пробірках утворювалися згустки, і з цього моменту починали відлік часу розчинення згустків.

Було проведено 3 серії дослідів, в яких тварин розділили на три групи (по 6 тварин у кожній): 1-а група — контрольна, коли тваринам вводили внутрішньошлунково еквівалентну їхній масі кількість води; 2-а група — тварини, яким вводили внутрішньошлунково сухий екстракт з пагонів ожини сизої у його ефективній дозі 7 мг/кг для щурів, для кролів — 6,52 мг/кг; 3-я група — тварини, яким вводили внутрішньошлунково препарат порівняння ε-амінокапронову кислоту ("Кислота амінокапронова", порошок per os 1 г, ФФ "Здоров'я" (Харків)) в умовно ефективних дозах, які були перераховані з добової дози для людини з використанням коефіцієнта видової стійкості по Ю.П.Риболовлєву [8]: 6 мг/кг для щурів, для кролів — 5,6 мг/кг. Через 30 хв після введення речовин у тварин брали кров для дослідження.

Результати досліджень оброблені статистично з використанням пакету прикладних програм "STATISTICA" на комп'ютері з програмним забезпеченням "Excel", методів варіаційної статистики і кореляційного аналізу [5, 10, 11]. Вірогідність даних оцінювали, використовуючи критерій Стьюдента t [9]. Аналіз результатів і оцінку їх вірогідності здійснювали шляхом порівняння з контрольними даними.

Результати та їх обговорення

Аналіз отриманих результатів при вивченні впливу сухого екстракту з пагонів ожини сизої на фібринолітичну систему крові щурів свідчить про те, що сухий екстракт з пагонів ожини сизої чинить виражений гальмівний вплив на фібринолітичну активність крові щурів, пригнічуючи фібриноліз в 1,97 рази у порівнянні з контрольними тваринами і в 1,26 рази перевищує дію ε-амінокапронової кислоти. Препарат порівняння також здійснює гальмівний вплив на фібринолітичну активність крові щурів, пригнічуючи фібриноліз в 1,57 рази у порівнянні з контрольною групою тварин. Проба на виявлення ПДФ була негативною у всіх експериментальних групах тварин (табл. 1).

Оскільки сухий екстракт з пагонів ожини сизої виявив виразну антифібринолітичну дію на систему крові щурів, було вивчено його вплив на природний лізис фібринового згустка у дослідах на кролях.

Час лізису еуглобулінових згустків вивчали уніфікованим методом Коваржика-Булука. Результати дослідження наведені у табл. 2.

Як показали досліди, під дією сухого екстракту з пагонів ожини сизої лізис еуглобулінового згустка відбувається у 2,59 рази повільніше порівняно з контролем, що відповідало дії ε-амінокапроно-

Таблиця 2

Визначення часу звичайного лізису фібринового згустка у кролів після внутрішньошлункового введення досліджуваних засобів (n=6)

Показник	Контроль	Екстракт ожини, 6,5 мг/кг	ε-АКК, 5,6 мг/кг
Фібринолітична активність, хв	64,56±3,77	167,14±3,91*	157,82±3,49*

Примітка. * — вірогідність результатів щодо контролю, p<0,05.

вої кислоти, яка уповільнювала лізис еуглобулінового згустка у 2,44 рази порівняно з контрольними тваринами.

ВИСНОВКИ

1. Сухий екстракт з пагонів ожини сизої виявляє виражений гальмівний вплив на фібринолітичну активність крові щурів в 1,97 рази порівняно з контрольною групою і в 1,26 рази перевищує дію ε-амінокапронової кислоти, яка пригнічує фібриноліз в 1,57 рази.

2. Проба на виявлення ПДФ дала негативний результат у всіх експериментальних групах тварин. Лізис еуглобулінового згустка уповільнюється у 2,59 рази порівняно з контролем.

3. Результати проведених досліджень дозволили констатувати, що реалізація гемостатичного ефекту сухого екстракту з пагонів ожини сизої здійснюється переважно за рахунок інтенсивного пригнічення фібринолітичної активності крові тварин.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Габитов С.З., Воронина И.Е., Литвинов Р.И. // Лаб. дело. — 1982. — №6. — С. 354-356.*
2. *Гісцева О.А., Ковальов В.М., Краснікова Т.О. Якісний склад та кількісний вміст сухого екстракту з пагонів ожини сизої / Матер. VI Нац. з'їзду фармацевтів України "Досягнення та перспективи розвитку фармацевтичної галузі України". — Х., 2005. — С. 690.*
3. *Иванов Г.К., Градовский С.А., Оленин В.В. // Казанский мед. журн. — 1999. — Т. 80, №2. — С. 143-144.*
4. *Козинец Г.Н. Исследование системы крови в клинической практике. — М.: Триада, 1997. — 480 с.*
5. *Лапач С.М., Чубенко А.В., Бабіч П.М. Статистичні методи в медико-біологічних дослідженнях із застосуванням Excel. — К.: Моріон, 2001. — 408 с.*
6. *Мамчур Ф.І. Довідник з фітотерапії — К.: Здоров'я, 1986. — 280 с.*
7. *Пронченко Г.Е. Лекарственные растительные средства / Под ред. А.П.Арзамасцева, И.А.Самылиной. — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2002. — С. 67.*
8. *Рыболовлев Ю.П., Сигляров Д.П., Афонин Н.И. Сборник: Токсикологические аспекты безопасности ГЛФ. — М., 1981. — С. 1715.*
9. *Сергиенко В.И., Бондаренко И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. — М.: ГЭОТАР Медицина, 2000. — 256 с.*
10. *Стентон Г. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 2000. — 459 с.*
11. *Юрченко Л.Н., Мазуров А.Д., Терешин П.И. // Лабораторное дело. — 1991. — №7. — С. 19-21.*
12. *Bidwell E. // Biochem. — 1953. — Vol. 55. — P. 497-498.*
13. *Bowie E.J.W., Thompson J.H., Didisheim P. et al. Mayo clinical laboratory manual of hemostasis. — W.B. Saunders company, 1971. — P. 29-33.*
14. *Cho W. // Biochim. Biophys. Acta. — 2000. — Vol. 1488 (12). — P. 48-58.*
15. *Ferguson L.R. // Mutation Res. — 2001. — №475. — P. 89-111.*
16. *Fiumelli H., Jabaudon D., Magistretti P.J. et al. // Eur. J. Neurosci. — 1999. — Vol. 11 (5). — P. 163-166.*
17. *Hansteen B., Lebensmittel Z. // Untersuchung und Forschung. — 1980. — Vol. 170, №1. — P. 36-41.*
18. *Hocking D.C., Sottile J., Reho T. et al. // J. Biol. Chea. — 1999. — Vol. 274 (38). — P. 27257-27264.*
19. *Kang H.M., Choi K.S., Kassam G. et al. // Trends Cardiovasc. Med. — 1999. — Vol. 9 (34). — P. 92-102.*
20. *Krasnikova T.L., Parfyonova Y., Alexeeva I.A. et al. // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. — 1999. — Vol. 26 (4). — P. 354-357.*
21. *Kuhn D.B., Nelson E.L., Alvord W.G. et al. // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167 (5). — P. 2869-2878.*
22. *Shimizu M., Hara A., Okuno M. et al. // Hepatol. — 2001. — Vol. 33 (3). — P. 569-576.*
23. *Syrovets T., Jendrach M., Rohwedder A. et al. // Blood. — 2001. — Vol. 97 (12). — P. 3941-3950.*

УДК 615.273.5:615.322:615.451.16:582.734.4

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ПОБЕГОВ ЕЖЕВИКИ СИЗОЙ НА ФИБРИНОЛИТИЧЕСКУЮ СИСТЕМУ КРОВИ

Л.В.Лукьянова, В.А.Волковой

Статья представляет результаты исследования механизмов гемостатического действия сухого экстракта из побегов ежевики сизой на систему гемостаза. Было установлено, что реализации гемостатического эффекта сухого экстракта из побегов ежевики сизой осуществляется преимущественно за счет интенсивного ингибирования фибринолитической активности крови животных. Полученные результаты согласуются с данными литературы и подтверждают возможность получения нового гемостатического средства растительного происхождения.

UDC 615.273.5:615.322:615.451.16:582.734.4

THE STUDY OF THE INFLUENCE OF A DRY EXTRACT FROM RUBUS CAESIUS SHOOTS ON THE BLOOD FIBRINOLYTIC SYSTEM

L.V.Lukyanova, V.A.Volkovoy

The article presents the research results of the haemostatic action mechanisms of a dry extract from Rubus Caesius shoots on the hemostasis system. It has been found that the haemostatic effect of a dry extract from the Rubus Caesius shoots is realised mainly due to the intensive inhibition of the blood fibrinolytic activity of animals. The results obtained conform to the literature data and confirm the possibility of obtaining a new haemostatic medicine of a plant origin.