

АНТИАГРЕГАЦИОННАЯ И АНТИКОАГУЛЯНТНАЯ АКТИВНОСТЬ СУБСТАНЦИИ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ ПЕПТИДОВ, ЭКСТРАГИРОВАННОЙ ИЗ ЛИСТЬЕВ TARAXACUM MONGOLICUM, В ЭКСПЕРИМЕНТЕ IN VIVO

¹ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси»,

²ГНУ «Институт экспериментальной ботаники им. В. Ф. Купревича НАН Беларуси»

Актуальным направлением в создании средств для профилактики сердечно-сосудистых заболеваний является разработка антитромботических средств на основе активных соединений, выделенных из растительных экстрактов, с выраженной эффективностью, но с меньшими побочными эффектами. Цель работы состоит в экспериментальном исследовании антиагрегационной и антикоагуляционной активности экстракта листьев *Taraxacum mongolicum*, приготовленного оригинальным способом. Показано, что в экстракте листьев *Taraxacum mongolicum* содержится белок с молекулярной массой 1,4 кДа, который показал ингибиторную активность *in vitro*. При пероральном введении исследуемого вещества крысам SHR в диапазоне доз 0,1–0,6 мг/кг в течение 30 дней наблюдалась пролонгация, снижение скорости АДФ-индуцированной агрегации. У этих животных наблюдалось снижение АПТВ в плазме и концентрации фибриногена в крови крыс. Антиагрегационная и антикоагулянтная активность экстракта *Taraxacum mongolicum* в исследуемом диапазоне доз сравнима с эффективностью ацетилсалициловой кислоты (13 мг/кг). Исследуемая субстанция не оказывала ulcerогенного действия на слизистую желудков крыс.

Ключевые слова: *Taraxacum mongolicum*, антиагрегант, антикоагулянт.

T. P. Krasnenkova¹, O. A. Ivanov², V. I. Domash²

THE ANTIAGGREGATORY AND ANTICOAGULANT ACTIVITY OF THE SUBSTANCE OF LOW-MOLECULAR PEPTIDES, EXTRACTED FROM THE TARAXACUM MONGOLICUM LEAVES IN THE EXPERIMENT IN VIVO

The actual way in the development of substances for the prevention of cardiovascular diseases is the formulation of antithrombotic medicines on the basis of bioactive compounds extracting from plant. These substances have to be possessed of high efficiency and manifested the least side effect. The objective of this research to investigate the antiaggregatory and anticoagulant activity of the extract *Taraxacum mongolicum* leaves. It was shown, that the extract of *Taraxacum mongolicum* leaves contains the albumin with the molecular weight 1,4 kDa. This fraction was demonstrated the inhibitory activity *in vitro*. There were the prolongation and decreasing of a rate of the ADF-induced aggregation after treating per os of the rats SHR by the investigated substance in dosage range 0,1–0,6 mg/kg during 30 days. The plasma APTT and blood level of fibrinogen was decreased. The antiaggregatory and anticoagulant activity of the extract *Taraxacum mongolicum* leaves is similar to the effectivity of the acetylsalicylic acid (13 mg/kg). The investigated substance was not possessed ulcerogenic action to a stomach mucous of the rats.

Key words: *Taraxacum mongolicum*, antiaggregant, anticoagulant.

Сердечно-сосудистые заболевания на данный момент являются ведущей причиной смертности в индустриальных странах, а к 2020 году, как ожидается, они станут также и ведущей причиной смертности в развивающихся странах. Основными нозологическими формами, определяющими структуру смертности от сердечно-сосудистых заболеваний, являются ишемическая болезнь сердца (ИБС) и цереброваскулярная болезнь (ЦВБ). Одним из патогенетических механизмов данных нозологий является артериальное тромбообразование, ключевую роль в котором

играют активированные тромбоциты. Поэтому антиромботическая терапия является основным видом лечения, первичной и вторичной профилактики этих заболеваний. В качестве основного препарата антиагрегантной терапии рекомендуется ацетилсалициловая кислота (АСК) [4, 5]. Существует ряд схем профилактики и терапии сердечно-сосудистых заболеваний при воздействии на показатели гемостаза. В последние годы благодаря данным многоцентровых клинических исследований сложилась устойчивая доказательная база о необходимости двойной антиагре-

□ Оригинальные научные публикации

гантной терапии с применением аспирина и клопидогреля у пациентов высокого риска неблагоприятных исходов, что позволяет снизить на 34% проявление сердечно-сосудистых событий, инфаркта миокарда (ИМ), инсульта и эпизодов рефрактерной ишемии [8]. Однако при наблюдении за пациентами, принимающими как клопидогрель, так и аспирин, в ряде случаев было установлено развитие резистентности к препаратам, что приводило к снижению эффективности проводимой терапии. Кроме того, применение указанных выше антиагрегантных средств сопровождается развитием геморрагических осложнений, которые являются одними из наиболее частых побочных действий лекарственной терапии и ведут к опасным желудочно-кишечным кровотечениям с возможным фатальным исходом [1].

Таким образом, актуальным является поиск таких препаратов, которые обладают эффективностью, сравнимой с традиционными антиагрегантными средствами, и высоким уровнем безопасности при применении. К известным лекарственным средствам с антиагрегантным действием, изготовленным на основе растительного экстракта, относится Билобил, изготовленный из *Ginkgo Biloba* [7], Саливертин, являющийся комбинированным препаратом ацетилсалициловой кислоты и диквертина биологически активного соединения экстракта коры ливистенницы сибирской [3].

Такие флавоноиды, как кемпферол, кемпферол, миритетин, содержащиеся в *Echinaceae purpureae*, *Polygonum aviculare* L. *Allium sativum* и др., являются эффективными ингибиторами агрегации тромбоцитов [2, 9]. Одна из белковых фракций экстракта *Taraxacum platycarpum* обладает выраженными антикоагулянтными свойствами [10].

Цель исследования состояла в экспериментальном исследовании антиагрегационной и антикоагулянтной активности субстанции низкомолекулярных пептидов, экстрагированной из листьев *Taraxacum mongolicum*, приготовленным оригинальным способом.

Материалы и методы

Предварительно высушенные до воздушно-сухого состояния листья *Taraxacum mongolicum* измельчали на лабораторной мельнице в муку и экстрагировали 0,2 М NaCl в течение 6 часов. Смесь затем центрифугировали при 5000 g 30 минут. Супернатант отделяли и высаливали из него суммарный белок при помощи $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ при 90% насыщении. Осадок белка после осаждения центрифугировали при 8000 g 30 мин, собирали, растворяли в дистиллированной воде и проводили гель-хроматографию на колонке с акрилексом Р-30, уравновешенной той же дистиллированной водой. Полученная низкомолекулярная фракция пептидов менее 2 кДа обладает ингибиторной активностью в отношении трипсина и тромбина. Далее выполняли диализ собранной фракции против дистиллированной воды и получали обессоленный раствор, который подвергали лиофильной сушке до порошкообразного состояния. Этот порошок и являлся субстанцией для проведения дальнейших экспериментальных исследований на животных.

В исследовании были использованы крысы самки с генетически детерминированной гипертензией (SHR) (n=25) в возрасте 20 недель. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к еде и питью. Раствор полученной субстанции низкомолекулярных пептидов из листьев *Taraxacum mongolicum* вводился перорально (р. о.) в течение 30 дней с помощью желудочного зонда в дозах 0,6 (группа 1, n=5), 0,2 (группа 2, n=5), 0,1 (группа 3, n=5) мг/кг массы тела, крысам группы 4 (n=5) вводили раствор ацетилсалициловой кислоты (АК) в дозе 13 мг/кг, крысам контрольной группы (плацебо) вводили

в эквивалентном объеме раствор крахмала. Забор крови у крыс линии SHR производился из сонной артерии под уретановым наркозом (10 г/кг массы тела i. p.) в пробирки с раствором цитрата натрия (1:9). Регистрацию процесса агрегации, индуцированной АДФ (5мкМ), в обогащенной тромбоцитами плазме (ОТП) производили на люмиагрегометре Хроно-Лог (США). Основными показателями агрегации были амплитуда (степень светопропускания раствора), период инициации (время пролонгации агрегационного процесса), скорость процесса агрегации. Регистрация коагуляционного процесса проводилась на коагулометре Солар (Беларусь). Показателями коагуляционного процесса являлись активированное парциальное тромбопластиновое время (АПТВ), концентрация фибриногена.

Для исследования состояния слизистой желудка, желудок крысы под наркозом иссекался, разрезался по внутренней границе, выворачивался, промывался под проточной водой и визуальным образом исследовался на наличие геморрагий, эрозий, изъязвлений слизистой.

Для статистического анализа данных использовали однофакторный метод ANOVA. Данные в таблицах представлены в виде среднего значения с указанием стандартного отклонения, на рисунках с указанием доверительного интервала. Различия считались достоверными при уровне значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Методом гель-хроматографии были выделены низкомолекулярные фракции белковой смеси, активные в отношении трипсина. Полученные фракции показали антитромбиновую активность *in vitro*. При анализе этих фракций методом электрофореза был выявлен белок с молекулярной массой 1,4 кДа, который, по всей вероятности, обладает ингибиторной активностью.

Исследования проводились с раствором лиофилизированной субстанции низкомолекулярных пептидов листьев *Taraxacum mongolicum*. Показано, что пероральное введение раствора исследуемой субстанции крысам линии SHR в течение 30 суток, способствует достоверному снижению скорости процесса АДФ – индуцированной агрегации в группах 1 и 3 на 60 %, в группе 2 на 50% по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$) (табл. 1). Данные показатели сравнимы с эффектом, наблюдаемым в группе, крысам которой вводили раствор ацетилсалициловой кислоты. Отмечено достоверное увеличение периода инициации АДФ–индуцированной агрегации тромбоцитов у крыс, которым вводили субстанцию низкомолекулярных пептидов из листьев *Taraxacum mongolicum* в диапазоне доз 0,1–0,6 мг/кг, по сравнению с группой плацебо-контроля (табл. 1). Регистрируемая длительность пролонгации процесса достоверно не отличается от показателя, наблюдаемого в группе 4, крысам которой вводили раствор ацетилсалициловой кислоты.

При анализе параметров коагуляции установлено, что значение АПТВ, определяемого в плазме крови крыс группы 1, которым вводили раствор средства в максимальной дозе (0,6 мг/кг), сравнимо с данным показателем, полученным у крыс группы 4 (АК) ($22,7 \pm 1,6$ по сравнению с $22,2 \pm 0,8$, $p = 0,6$), и статистически значимо отличается от показаний контрольной группы, в среднем, на 20% ($22,7 \pm 1,6$ по сравнению с $18,4 \pm 1$, $p = 0,02$). Следует отметить, что концентрация фибриногена во всех трех группах, животным которых вводили раствор исследуемой субстанции, и у крыс, которым вводили раствор АК, статистически значимо ниже, чем в контрольной группе (рис. 1).

У крыс всех исследуемых групп состояние слизистой желудка соответствовало норме, за исключением 3 же-

Таблица 1. Параметры агрегации тромбоцитов плазмы крови крыс самок линии SHR при пероральном введении в течение 30 суток субстанции низкомолекулярных пептидов, экстрагированной из листьев *Taraxacum mongolicum*, в дозах 0,6, 0,2, 0,1 мг/кг и ацетилсалициловой кислоты (АК) в дозе 13 мг/кг по сравнению с плацебо-контролем

	Амплитуда, %	Скорость, отн. ед.	Период инициации, с
Плацебо-контроль – (n=5)	31,7±4,7	40,7±16,2	0,7±0,6
Группа 1 (n = 5, 0,6 мг/кг)	10,0±3,2 #) p = 0,00001	15,6±4,6 #) p = 0,0006	7,6±4,8 #) p = 0,004
Группа 2 (n = 5, 0,2 мг/кг)	16±4,1 #) p = 0,0004	23,8±7,9 #) p = 0,014	5,5±1,7 #) p = 0,04
Группа 3 (n = 5, 0,1 мг/кг)	14,2±4 #) p = 0,00001	18,2±5,9 #) p = 0,002	6,8±1,9 #) p = 0,01
Группа 4 (n = 5, АК 13 мг/кг)	13,7±1,5 #) p = 0,0002	22,3±2,9 #) p = 0,013	6,3±0,6 #) p = 0,03

Различия статистически достоверны по сравнению с #) группой плацебо-контроля при уровне значимости p<0,05.

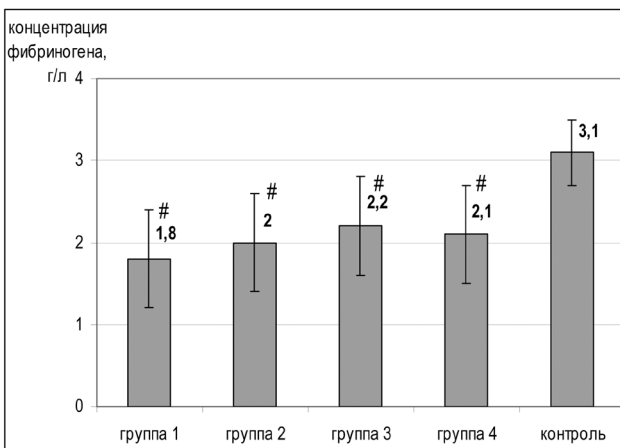


Рисунок 1. Концентрация фибриногена у крыс экспериментальных групп 1, 2, 3, 4, которым вводили р. о. в течение 1 месяца раствор субстанции низкомолекулярных пептидов, экстрагированной из листьев *Taraxacum mongolicum* в дозах 0,6, 0,2, 0,1 мг/кг, а также раствор ацетилсалициловой кислоты в дозе 13 мг/кг соответственно

#) различия статистически достоверны по сравнению с группой плацебо-контроля при уровне значимости p<0,05
лудков у крыс группы 4 (АК). В одном из желудков наблюдалось 2 очага кровоизлияния, в двух других – точечные изъязвления слизистой оболочки.

Таким образом, на основе вышеприведенных данных можно предположить, что полученная субстанция низкомолекулярных пептидов из листьев *Taraxacum mongolicum* ингибирует АДФ-индуцированную агрегацию в обогащенной тромбоцитами плазме в диапазоне доз 0,1–0,6 мг/кг при введении р. о. в течение 1 месяца крысам линии SHR, причем выраженность эффекта эквивалентна эффекту, который вызывает ацетилсалициловая кислота при введе-



Рисунок 2. Показатели поражения слизистой желудков у крыс экспериментальных групп 1, 2, 3, 4, которым вводили р. о. в течение 1 месяца раствор субстанции низкомолекулярных пептидов, экстрагированной из листьев *Taraxacum mongolicum* в дозах 0,6, 0,2, 0,1 мг/кг, а также раствор ацетилсалициловой кислоты в дозе 13 мг/кг соответственно

нии р. о. в дозе 13 мг/кг. Наиболее выраженный антикоагулянтный эффект наблюдался у крыс, которым вводили средство в наибольшей дозе 0,6 мг/кг. Показатели антикоагулянтного действия, вызываемого исследуемой субстанцией в дозе 0,6 мг/кг, и АК в дозе 13 мг/кг, эквивалентны. Учитывая то, что АК вызывает повреждение слизистой оболочки желудка, следует отметить, что при достижении эквивалентного антиагрегационного и антикоагуляционного эффекта исследуемая субстанция не оказывала побочного ulcerогенного действия.

Таким образом, полученная новая субстанция низкомолекулярных пептидов, экстрагированная из листьев *Taraxacum mongolicum*, обладает антиагрегационной и антикоагулянтной активностью при пероральном введении крысам, наблюдаемый эффект сравним с действием ацетилсалициловой кислоты, данная субстанция не оказывает ulcerогенного действия на слизистую желудка.

Литература

1. Комаров, А. Л., Джалилова Г. В., Федоткина Ю. Я. // Актуальные вопросы болезней сердца и сосудов. 2010. № 1. С. 12–20.
2. Красненкова, Т. П., Иванов О. А., Домаш В. И., Кардаш О. Ф., Афонин В. Ю., Шилов В. В. // Тез. докл. науч.-практ. конф. «Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения». Новый Свет, Крым, Украина. 2011. С. 533–534.
3. Кубатиев, А. А., Тюкавкина Н. А., Быков В. А., Рудько И. А., Ядигарова З. Т. // Химико-фармацевтический журнал. 1999. № 12. С. 3–4.
4. Bassand, J. P., Hamm C., Ardissino D. // Eur Heart J. 2007. V. 28. P. 1598–1660.
5. De Wert, F. V., Bax J., Betriu A. et al. // Eur Heart J. 2008. V. 29. P. 2909–2945.
6. Gryglewski, R. J., Korbut R., Robak J., Swips // J. Biochem Pharmacol. 1987. V. 36. P. 317–322.
7. Koch, E. // Phytomedicine. 2005. V. 12. P. 10–16.
8. Mehta, S. R, Yusuf S. // Eur Heart J. 2000. V. 21. P. 2033–2041.
9. Osman, H. E, Maalej N., Shanmuganayagam D., Folts J. D. // J Nutr. 1998. V. 128. P. 2307–2312.
10. Yun, S., Cho H., Choi H. Biosci. Biotechnol. Biochem. 2002. V. 66, № 9. P. 1859–1864.