

**ПОЛУЧЕНИЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
НОВОГО АНТИКОАГУЛЯНТА ПРЯМОГО ДЕЙСТВИЯ**

Н.Н. Буслаева, Д.И. Бояринцев

Научный руководитель: к.б.н. Е.П. Калинин

Тюменский государственный медицинский университет

Россия, г. Тюмень, ул. Одеская, 54, 625023

E-mail: natalie.buslaeva@gmail.com

**PREPARATION AND EXPERIMENTAL EFFICIENCY MARK OF
NEW DIRECT ANTICOAGULANT**

N.N. Buslaeva, D.I. Boyarintsev

Scientific Supervisor: Ph.D. E.P. Kalinin

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

E-mail: natalie.buslaeva@gmail.com

***Abstract.** Compounds with anticoagulant activity have been extracted from plant (*Vaccinium myrtillus*). The action of effectors realize at intrinsic way of blood coagulation. In this work we study influences of new plant-derived direct anticoagulant in vitro and in vivo (in laser-induced model of thrombosis) at hemostasis and hemodynamics and compare its effects with heparin.*

Введение. В лабораториях Тюменского ГМУ из растений, произрастающих в Западной Сибири, получены экстракты, обладающие антикоагулянтной активностью [1]. Существующие данные говорят о высокой противосвертывающей активности растительных эффекторов, приемлемой продолжительности действия и низкой токсичности [2, 3]. Однако их влияние на гемостаз оценено, главным образом, с использованием «пробирочных» тестов, а для тестирования использовались суммарные экстракты, без выделения действующего вещества, что делает моделирование претромботических и тромботических состояний для оценки их противосвертывающей активности актуальным.

Материалы и методы исследования. Антикоагулянт получали из листьев черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus*) по разработанной в нашей лаборатории оригинальной методике. Оценку показателей свертывания крови (активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ) и протромбиновое время (ПВ)) проводили на автоматическом коагулометре «Solar» (Беларусь) с использованием стандартных тест-систем. Агрегацию тромбоцитов исследовали с помощью анализатора «Biola-LA 230» (Россия) и наборов «Технология-Стандарт» (Россия). Исследование деформируемости эритроцитов проводили методом эктацитометрии в проточной камере. Для тестирования антикоагулянта in vivo использовали самцов белых беспородных крыс. Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности (директива 86/609/ЕЕС и «Хельсинкская декларация» (1996)). Все манипуляции проводились под общим наркозом, по завершении эксперимента животное декапитировали не выводя из состояния сна. Влияние раствора антикоагулянта оценивали после его введения в яремную вену. Лазер-индуцированный тромбоз моделировали на прижизненном препарате сосудов брыжейки тонкого кишечника, с видеофиксацией изменений. Для облечения

использовали полупроводниковый лазер (535 нм, 50 мВт), время воздействия от 30 до 180 секунд, диаметр светового пятна – 30-40 мкм. В качестве объектов воздействия выбирались артериолы и вены диаметром 25-50 мкм. Во всех экспериментах сравнивали результаты с контрольной группой животных. Статистический анализ 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. В качестве сырья для получения антикоагулянтов использовали листья черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus*). Сухое измельченное сырье экстрагировали гидроксидом аммония, полученный экстракт отфильтровывали, порции экстракта объединяли, концентрировали, диализовывали, недиализуемую часть высушивали. Полученный экстракт в Трис-НС1 буфере (рН 7,2) в сравнении с контролем дозависимо удлинял АЧТВ, ПВ и ТВ (рис.1). Наибольшую активно раствор экстракта черники угнетал АЧТВ (в концентрации 2,5 мг/мл эффективность торможения $i = 0,65$). Последующее разделение экстракта провели гель-фильтрацией (Toyopearl HW-40, Fine колонка 500X10 мм, элюент 0,25 мМ ацетатно-аммонийный буфер (рН 7,6)). Удалось разделить экстракт черники на 6 фракций, из которых наиболее активной оказалась фракция 1 (рис.2.).

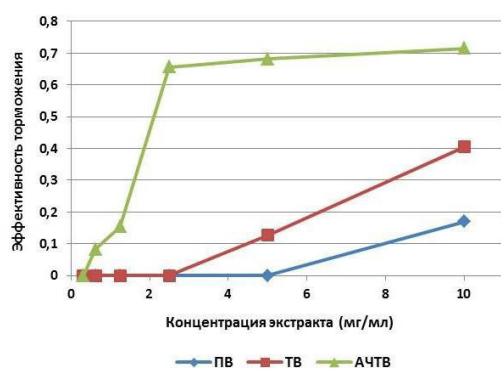


Рис. 1. Зависимость эффективности торможения плазмокоагуляции от концентрации экстракта

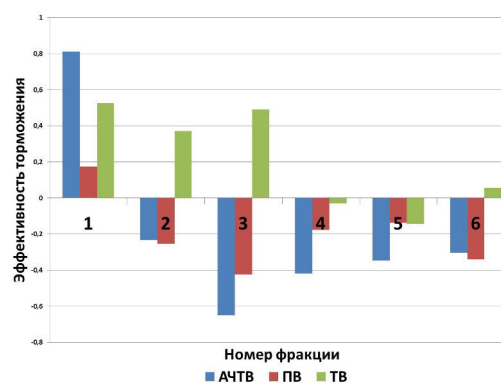


Рис. 2. Противосвертывающая активность фракций экстракта

После введения экстракта в кровотоки крыс через 5, 30 и 90 мин осуществляли отбор проб крови, получали богатую и бедную тромбоцитами плазму, используя её для оценки АЧТВ и АТ. В течение времени наблюдения сохранялось выраженное ($i = 0,17 \pm 0,003$) торможение АЧТВ. Также, в сравнении с контролем, на $14,4 \pm 0,1\%$ снижалась интенсивность АДФ-индуцированной АТ, и на $15 \pm 2,3\%$ повышалась деформируемость эритроцитов. При моделировании тромбоза индуцированного лазерным излучением фиксировали изменение скорости кровотока и диаметра сосудов микроциркуляторного русла. В контрольной группе уже на первых секундах облучения наблюдалось увеличение скорости кровотока, а уже через 30 секунд скорость кровотока замедлялась и увеличивалась зернистость потока (рис.3). При увеличении продолжительности облучения до 90-180 секунд отмечалась вазодилатация и выраженная миграция лейкоцитов в зону повреждения (рис.4). В дальнейшем наблюдается адгезия и агрегация форменных элементов с формированием пристеночного тромба, а затем и полная остановка кровотока вследствие закупорки им сосуда (рис.5).

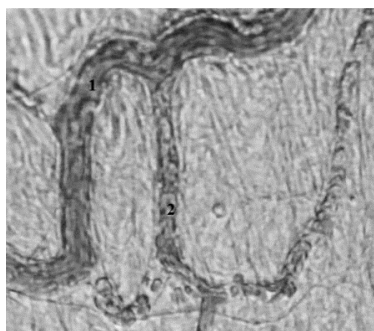


Рис. 3. Изменение скорости кровотока через 30 секунд от начала облучения (1 – нормальный кровоток, 2 – замедление кровотока).

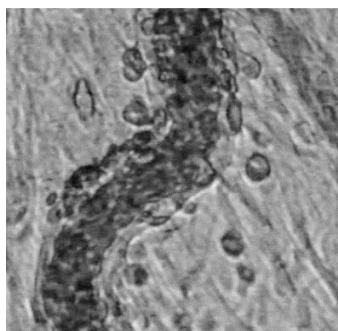


Рис. 4. Миграция лейкоцитов в очаг повреждения через 60-90 секунд от начала облучения.

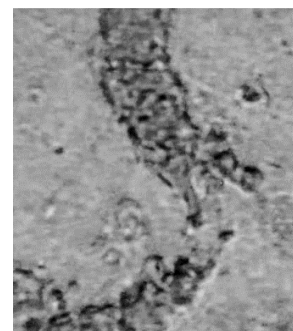


Рис. 5. Тромбоз сосуда через 150-180 секунд от начала облучения.

В сравнении с контрольной группой на фоне предварительного введения гепарина потребовалось увеличить время облучения до 360 секунд, полной остановки кровотока не наблюдалось, а гемодинамика восстанавливалась через 15 минут после прекращения воздействия. При предварительном введении животным исследуемого экстракта листьев черники продолжительность облучения, необходимая для нарушения гемодинамики, составила 300 секунд. По сравнению с контролем увеличилось время развития гемодинамических нарушений, снизилась скорость тромбообразования, а остановка кровотока была временной (восстановление через 12-18 минут).

Закключение. Полученные в ходе исследования результаты позволяют утверждать, что из листьев черники может быть получен антикоагулянт, выраженно угнетающий реакции внутреннего пути плазмокоагуляции в тестах *in vitro* и *in vivo*. Преимущественное влияние антикоагулянта на АЧТВ, и фактически исчезающее при разбавлении влияние на ПВ и ТВ свидетельствует о специфичном торможении активности факторов внутреннего пути плазмокоагуляции, однако точка приложения эффекта, а также детали механизма угнетения свертывания эффектором нами пока не уточнены. Продолжительность действия полученного антикоагулянта составляет не менее 1,5 часов, а его внутривенное введение не приводит к гибели животного. Как и официальный прямой антикоагулянт – гепарин, исследуемый антикоагулянт снижает активность развития тромботических реакций при моделировании тромбоза. Кроме влияния на плазмокоагуляционный гемостаз, антикоагулянт ограниченно угнетает агрегацию тромбоцитов и повышает эластичность мембран эритроцитов, что позволяет говорить о его мембранопротекторных свойствах. Последнее утверждение требует детального исследования, в первую очередь – уточнения механизма наблюдаемых эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Русакова О.А. Растения флоры Сибири, как источники антикоагулянтов прямого действия // В сб.: Обмен веществ в норме и патологии. - Тюмень, 1992. - С. 84.
- 2 Губаев А. Г. Фармакологические свойства антикоагулянта прямого действия из травы ноней темная: автореф. дисс. канд. мед. наук. – Тюмень, 1996. – 20 с.
- 3 Дементьева И.А., Леонова О.П., Умутбаева М.К. Препарат противосвертывающего действия из медуницы мягчайшей // Молодежь – практ. здравоохранению: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. мол. ученых. - М., 1990. - С. 42-43.