

УДК 577.2.04:612.1

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИФЕНОЛА РС-8 В КАЧЕСТВЕ АНТИКОАГУЛЯНТА КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

¹Кувандикова Ю.Р. кизи, ¹Маматова З.А.,

¹Абдуллажоновна З.Ж. кизи, ²Хошимов Н.Н., ³Рахимов Р.Н.

¹Национальный университет Узбекистана, Ташкент;

²Институт биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана, Ташкент;

³Институт биоорганической химии имени А.С. Садыкова

Академии Наук Республики Узбекистан, Ташкент, e-mail: kuvandikovayulduz@gmail.com

Цель исследования – влияние природного полифенола на процесс свертывания плазмы крови с помощью коагуляционных тестов – частичного активированного тромбопластинового времени, протромбинового времени и фибриногенового теста в условиях *in vitro* для изучения антикоагулянтных свойств полифенола растительного происхождения и в итоге на его основе разработки лекарственных препаратов с антикоагулянтной активностью. Исследования проводились согласно европейским и российским стандартам по обращению с животными. Эксперименты проводились согласно Директиве ЕС 2010/63/ЕС о защите животных для научных целей и Федеральному закону РФ 498-ФЗ об ответственном обращении с животными, с учетом рекомендаций этического комитета. В эксперименте использовались белые крысы весом 200–300 г, возрастом 2–3 месяца. Крысы содержались при температуре 20–28 °С и влажности 50%. Результаты исследований показали, что полифенол дозозависимо удлинял время свертывания плазмы крови и частичного активированного тромбопластинового времени, протромбинового времени и фибриногенового теста, что позволило считать изученный полифенол антикоагулянтом. Статистическая обработка данных выполнялась с помощью t-критерия Стьюдента и программ Excel и OriginPro 2017. Полученные данные свидетельствуют о том, что влияние этих природных веществ на систему гемостаза открывают новые перспективы для разработки безопасных и эффективных антикоагулянтов и их можно использовать для предотвращения и лечения тромбозов, улучшая общее состояние сердечно-сосудистой системы.

Ключевые слова: антикоагулянт, плазма крови, время свертывания крови, коагуляционные тесты, полифенол, система гемостаза

USE OF PC-8 POLYPHENOL AS AN ANTICOAGULANT IN RATS BLOOD IN *IN VITRO* CONDITIONS

¹Kuvandikova Yu.P. kyzy, ¹Mamatova Z.A.,

¹Abdullazhonova Z.Zh. kyzy, ²Khoshimov N.N., ³Rakhimov R.N.

¹National University of Uzbekistan, Tashkent;

²Institute of Biophysics and Biochemistry at the National University of Uzbekistan, Tashkent;

³Institute of Bioorganic Chemistry named after A.S. Sadykov Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan, Tashkent, e-mail: kuvandikovayulduz@gmail.com

The purpose of the study is the influence of natural polyphenol on the process of blood plasma coagulation using coagulation tests – partial activated thromboplastin time, prothrombin time and fibrinogen test *in vitro* to study the anticoagulant properties of plant-based polyphenol and, ultimately, based on it, the development of drugs with anticoagulant activity. The studies were carried out in accordance with European and Russian standards for the treatment of animals. The experiments were carried out in accordance with the EU Directive 2010/63/EU on the protection of animals for scientific purposes and the Federal Law of the Russian Federation 498-FL on the responsible treatment of animals, taking into account the recommendations of the ethical committee. In the experiment, white rats weighing 200-300 g and 2-3 months old were used. Rats were kept at a temperature of 20-28°C and 50% humidity. The research results showed that the polyphenol dose-dependently extended the clotting time of blood plasma in partial activated thromboplastin time, prothrombin time and fibrinogen tests, which made it possible to consider the studied polyphenol as an anticoagulant. Statistical data processing was performed using Student's t-test and Excel and OriginPro 2017 programs. The data obtained indicate that these natural substances' influence on the hemostatic system opens up new prospects for the development of safe and effective anticoagulants and can be used to prevent and treat thrombosis, improving the overall condition of the cardiovascular system.

Keywords: anticoagulant, blood plasma, blood clotting time, coagulation tests, polyphenol, hemostasis system

Введение

В последние десятилетия внимание ученых и медиков все больше привлекает использование биологически активных веществ в качестве антикоагулянтов плазмы. Антикоагулянты играют ключевую роль

в предотвращении образования тромбов, что существенно снижает риск развития таких серьезных заболеваний, как инфаркт миокарда, инсульт, тромбоэмболия и другие сердечно-сосудистые патологии. Проблема тромбообразования актуальна не только в кардиологии, но и в таких областях,

как хирургия, онкология и неврология, где риск тромбоэмболических осложнений особенно высок [1].

Биологически активные вещества, получаемые из природных источников, представляют собой перспективное направление в разработке новых антикоагулянтов. Природные антикоагулянты можно найти в растениях, морских организмах и даже в некоторых микроорганизмах. Эти вещества часто обладают многофункциональными свойствами, оказывая одновременно антиоксидантное, противовоспалительное и антикоагулянтное действие. Важно отметить, что такие вещества могут лучше переноситься организмом и иметь меньший риск развития побочных эффектов по сравнению с синтетическими препаратами [2].

Научные исследования показали, что многие биологически активные вещества, такие как полифенолы, флавоноиды, салицилаты и сульфаты, обладают способностью ингибировать различные этапы процесса свертывания крови. Флавоноиды, например, присутствующие в большом количестве в овощах и фруктах, также обладают выраженными антикоагулянтными свойствами и могут снижать риск тромбообразования. Полифенолы могут оказывать влияние на активность тромбоцитов и уровень фибриногена, тем самым препятствуя образованию тромбов. Например, среди полифенолов:

– кверцетин обладает способностью ингибировать агрегацию тромбоцитов и снижать уровень тромбоксана, что препятствует тромбообразованию [3]. Он также может снижать уровень фибриногена и повышать активность эндотелиальной синтазы, улучшая сосудистую функцию;

– ресвератрол ингибирует агрегацию тромбоцитов и снижает уровень факторов свертывания крови, таких как фибриноген. Он также стимулирует выработку оксида азота (NO), который обладает вазодилатирующим и антитромботическим эффектом; эпигаллокатехин-3-галлат снижает агрегацию тромбоцитов и уровень тромбина. Он также может ингибировать активность тканевого фактора (ТФ) и тромбинового рецептора, что препятствует активации свертывающей системы крови;

– куркумин снижает агрегацию тромбоцитов и уровень факторов свертывания крови, таких как фибриноген. Он также обладает противовоспалительными свойствами, что помогает уменьшить риск тромбообразования;

– рутин обладает антикоагулянтными свойствами, ингибируя агрегацию тромбоцитов и снижая уровень тромбоксана. Он также укрепляет капилляры и улучшает кровоток,

что способствует снижению риска тромбообразования;

– гесперидин уменьшает агрегацию тромбоцитов и снижает уровень факторов свертывания крови. Он также улучшает функцию эндотелия и обладает противовоспалительными свойствами;

– катехины снижают агрегацию тромбоцитов и уровень фибриногена. Они также могут ингибировать активность ферментов, участвующих в процессе свертывания крови [4].

Процесс коагуляции (свертывания крови) представляет собой переход крови из жидкого состояния в гелеобразную массу и образование тромба. В течение жизни кровь находится в жидком состоянии внутри сосудов, однако в случаях нарушения целостности кровеносных сосудов кровь в течение определенного времени изменяет свое жидкое состояние, превращаясь в студенистую массу, тромб [5]. Именно это состояние называется коагуляцией, или свертыванием крови. Оба состояния крови необходимы для жизни человека, жидкое состояние важно для кровообращения, а кровь в виде тромба предотвращает кровотечение из поврежденных вен [6]. Свертывание крови состоит из «каскадных» комплексных реакций, кульминацией которых является превращение фибриногена в фибрин [7, 8]. С другой стороны, фибрин сохраняет клетки крови. Все процессы происходят при переходе одного фактора свертывания крови на другой [9, 10].

Традиционные антикоагулянты, такие как гепарин и варфарин, широко применяются в клинической практике. Однако их использование связано с рядом побочных эффектов, включая риск чрезмерного разжижения крови, что может привести к серьезным кровотечениям. Более того, длительное применение этих препаратов требует постоянного контроля показателей свертываемости крови и корректировки дозировки, что создает дополнительные сложности для пациентов и врачей. В связи с этим возникает потребность в поиске альтернативных средств, обладающих высокой эффективностью и меньшим количеством побочных эффектов [11].

Целью исследования является изучение антикоагулянтных свойств полифенола растительного происхождения РС-8 в условиях *in vitro* для разработки на его основе лекарственных препаратов с антикоагулянтной активностью.

Материалы и методы исследования

В экспериментах использована кровь лабораторных белых беспородных крыс-

самцов весом 200–300 г. Для предотвращения свертывания крови, взятой из десны крысы, использовали 3,8% цитрата натрия в соотношении 9:1. Для получения богатой тромбоцитами плазмы кровь в течение 10 мин центрифугировали со скоростью 2000 об/мин. Затем полученный супернатант центрифугировали со скоростью 3000 об/мин в течение 15 мин и получили плазму, бедную тромбоцитами. Выделенную плазму инкубировали в кювете коагулометра при 37 °С в течение 2 мин.

Влияние полифенола РС-8 на процесс свертывания плазмы крови, бедной тромбоцитами, изучали с помощью коагуляционных тестов – частичного активированного тромбопластинового времени – АЧТВ, протромбинового времени – ПТ и фибриногенных тестов в условиях *in vitro* на коагулометре (CYANCoag, Бельгия).

Для проведения АЧТВ-теста в плазму, находящуюся в инкубации (100 мкл), добавляли 100 мкл реагента 1 (R1) – лиофильного раствора и инкубировали при 37°С в течение 180 с. Затем вводили 100 мкл реагента 2 (R2) – 0,025 М CaCl₂ и наблюдали время свертывания плазмы. Полученный результат был принят за контроль. В процессе измерения АЧТВ зарегистрировать время от момента добавления в кювету коагулометра раствора кальция хлорида до момента образования сгустка. Затем изучалось влияние вещества на время коагуляции плазмы.

Для проверки на ПТ-тест на плазму, находящуюся в инкубации (100 мкл), вводили лиофильного раствора R1 тромбопластина по 100 мкл и инкубировали при 37°С в течение 120 с. Затем был введен R2 и получен контроль. При этом во время измерения ПТ регистрировалось время, прошедшее с момента добавления ренампластина в кювету коагулометра до образования сгустка крови. Затем изучалось влияние вещества на время коагуляции плазмы.

Для проверки на фибриноген-тест использовался метод VonClauss. Для этого готовили 200 мкл плазменного буфера в соотношении 1:10 и инкубировали при 37°С в течение 120 с. Затем ему вводили 100 мкл R1 (тромбина) для получения контрольного значения. Затем изучалось влияние вещества на время коагуляции плазмы.

Результаты исследования и их обсуждение

При изучении механизма действия полифенола РС-8 на процесс свертывания крови сначала было исследовано его влияние на частично активированное тромбопластиновое время (АЧТВ)-тест. АЧТВ-тест показывает изменение активностей факто-

ров внутреннего пути свертывания крови (VIII, IX, XI, XII), прекаллекреина и высокомолекулярного кининогена [5]. В АЧТВ-тесте более короткое время свертывания крови указывает на гиперкоагуляцию крови и тромбоз, а в обратном случае – на гипокоагуляцию. АЧТВ-тест показывает влияние факторов плазмы на свертываемость крови и не зависит от низкого количества тромбоцитов или их низкой функциональной активности. Согласно результатам наших исследований время свертывания крови в контроле составило 27,2 с, а полифенол РС-8 в концентрациях 10–100 мкм удлинял время свертывания крови до 30–96 с (в среднем 49,93 с), то есть на 54,47% (таблица). При этом оптимальная доза для РС-8 составляла 50 мкм. АЧТВ в норме составляет 25–39 с, и, хотя сокращение этого времени считается менее значимым для медицины, современные исследования показывают, что эта цифра указывает на симптомы синдрома внутрисосудистой коагулопатии, тромбоэмболии, атеросклероза. Удлинение АЧТВ может наблюдаться при неправильном или чрезмерном применении гепарина, недостаточности антифосфолипидных антител, недостаточности факторов свертывания крови, таких как V, VIII, IX, X, XI, XII. Это, в свою очередь, может привести к большой кровопотере при тяжелых травмах, во время операции, в послеродовых ситуациях. В настоящее время в медицине в основном используется гепарин для предотвращения свертывания крови, однако он может слишком сильно разжижать кровь, иногда даже приводя к значительной потере крови. В связи с этим наша основная цель – найти естественное антикоагулянтное средство, которое не вызывало бы избыточного разжижения крови и которое можно было бы применять в будущих медицинских процедурах.

Протромбиновое время – коагуляционный тест, позволяющий оценить активацию свертывающей системы крови по внешнему механизму (то есть через VII фактор и тканевый тромбопластин). Зависит от наличия в крови VII, X, V факторов коагуляции, а также протромбина и фибриногена. Протромбин – это белок, который синтезируется в печени при участии витамина К. Он является одним из нескольких веществ, известных как факторы свертывания крови. При травмах, вызывающих кровотечение, факторы свертывания крови вместе образуют сгустки. Скорость свертывания крови зависит от количества факторов свертывания и их правильного функционирования. В нормальных условиях кровь свертывается в течение 10–13 с. Если кровь сверты-

вается слишком медленно, после травмы может возникнуть сильное кровотечение [12]. При быстром свертывании крови могут образоваться опасные тромбы в артериях или венах. Высокое потребление добавок и продуктов, содержащих витамин К, таких как печень, брокколи, горох, зеленый чай, капуста, репа и соевые бобы, а также прием лекарств, содержащих эстроген, таких как противозачаточные таблетки и препараты для заместительной гормональной терапии, также могут влиять на свертываемость крови [13]. В случаях, когда употребление слишком большого количества препаратов, разжижающих кровь, вызывает проблемы, используется варфарин, который действует на внешние факторы свертывания крови. Однако, поскольку он обладает таким же сильным действием, как и гепарин, мы стремились найти вещество, которое могло бы быть его альтернативой, но действовало бы более естественно и нормально. Кроме того, мы определили, на какой именно фактор крови (внешний или внутренний) наше вещество оказывает более сильное влияние. С этой точки зрения мы можем видеть, что полифенол РС-8 влияет на внешние факторы свертывания крови и при концентрации 50 мкМ незначительно увеличивает время коагуляции, а именно на 23,5%.

Определение конечной стадии свертывания крови имеет значение при общей оценке системы гемостаза в клинической лаборатории, и наиболее распространенным методом в этом отношении является тест на фибриноген. Увеличение или уменьшение количества фибриногена в крови связано с тромбозным состоянием организма, при действии тромбина фибриноген превращается в фибрин, тем самым обеспечивая функционирование системы гемостаза. Образование фибриногена является последней стадией свертывания крови, синтезируется в паренхиматозных клетках печени и попадает в кровь. Нормальный уровень концентрации фибриногена в крови состав-

ляет 1,7–4,0 г/л, а при патологических состояниях - от -0 до 10 г/л и выше.

Для изучения влияния полифенола РС-8 на процесс свертывания плазмы крови, авторы исследовали время образования фибрина из фибриногена в контроле и при воздействии исследуемого вещества. По результатам авторских исследований время образования фибрина в контроле составило 5–10 с (3,5–8 г/л). При воздействии РС-8 это время увеличивается до 41–53 с (89%) (таблица). Оптимальная доза РС-8 при этом составляла 25 мкМ. В норме концентрация фибриногена колеблется от 1,7 до 4 г/л. При повышении содержания фибриногена увеличивается вероятность образования тромбов в головном мозге, легких или сердце. Изучение влияния полифенола РС-8 на последний этап свертывания крови с помощью фибриноген-теста позволило сделать выводы о свойствах данного вещества. Авторам было обнаружено, что РС-8 значительно снижает концентрацию фибриногена (на 89%), что подтверждает его потенциальную роль для будущих экспериментов, связанных с гиперкоагуляцией и связанными с ней заболеваниями.

Результаты экспериментов свидетельствуют об ингибировании одного из факторов XII, XI, IX, VIII в плазме под действием изученного полифенола. В этом процессе протромбиновое время или протромбиновый индекс внешнего механизма коагуляции плазмы определяет дефицит или активность факторов протромбинового комплекса (VII, X, V, II). Удлинение протромбинового времени под действием полифенола свидетельствует о блокировании внешнего пути свертывающей активности крови, то есть ингибировании активности факторов V и II. Таким образом, полифенол РС-8 влияет как на внешние, так и на внутренние пути свертывания крови, при этом он ингибирует один из факторов XII, XI, IX, VIII внутреннего пути свертывания крови, а также один из факторов V и II внешнего пути свертывания крови.

Изучение влияния полифенола РС-8 на время свертывания плазмы с помощью коагуляционных тестов

№	Условия	Время свертывания плазмы, с (M±m)	T	P
1	Контроль – АЧТВ-тест	27,20 ± 1,05		
	АЧТВ-тест + 50 мкМ РС-8	49,93 ± 4,96	4,48	> 95 %
2	Контроль – PT-тест	15,67 ± 0,42		
	PT-тест + 50 мкМ РС-8	20,67 ± 0,76	5,74	> 95 %
3	Контроль – Фибриноген-тест	5,87 ± 0,43		
	Фибриноген-тест + 25 мкМ РС-8	45,80 ± 1,33	28,62	> 95 %

Заключение

Полифенол РС-8 может влиять как на внешние, так и на внутренние пути свертывания крови при коагуляции, что объясняется ингибированием одного из факторов XII, XI, IX, VIII внутреннего пути, а также факторов V и II внешнего пути. В частности, полифенол РС-8 оказал значительное влияние на внутренние факторы свертывания крови и увеличил время АЧТВ на 54,47%; полифенол РС-8 не оказал сильного влияния на внешние факторы свертывания крови и увеличил время РТ на 23,5%; полифенол РС-8 значительно снизил концентрацию фибриногена и увеличил время свертывания крови на 89%. Таким образом, полифенол РС-8 в качестве антикоагулянта оказал значительное влияние на внутренние факторы свертывания крови и конечную стадию свертывания крови и был выбран в качестве антикоагулянта. В будущем будет проведено сравнительное исследование этого вещества с гепарином для лечения заболеваний, связанных с гиперкоагуляцией крови.

Изучение полифенолов и их влияния на систему гемостаза открывает новые перспективы для разработки безопасных и эффективных антикоагулянтов. Эти природные соединения обладают многофункциональными свойствами, которые могут быть использованы для предотвращения и лечения тромбообразований, улучшая общее состояние сердечно-сосудистой системы.

Список литературы

1. Iroz C.B., Dahl C., Cassimatis I.R., Wescott A., Miller E.S. Prophylactic anticoagulation for preterm premature rupture of membranes: a decision analysis // *American Journal of Obstetrics & Gynecology, Maternal-fetal Medicine*. 2021. Vol. 3, Is. 3. P. 100311. DOI: 10.1016/j.ajogmf.2021.100311.
2. Lv J., Li Z., Zhang L. Two new flavonoids from *Artemisia argyi* with their anticoagulation activities // *Natural Product Research*. 2017. Vol. 32, Is. 6. P. 632–639. DOI: 10.1080/14786419.2017.1332603.
3. Steinbrecher O., Šinkovec H., Eischer L., Kyrle P.A., Eichinger S. D-dimer levels over time after anticoagulation and the association with recurrent venous thromboembolism // *Thrombosis Research*. 2021. Vol. 19. P. 160–164. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.11.015.
4. Montinari M.R., Minelli S., De Caterina R. Eighty years of oral anticoagulation: Learning from history // *Vascular Pharmacology*. 2021. Vol. 141. P. 106918. DOI: 10.1016/j.vph.2021.106918.
5. Ragab T.I., Amer H., Mossa A.H., Emam M., Hasaballah A., Helmy W.A. Anticoagulation, fibrinolytic and the cytotoxic activities of sulfated hemicellulose extracted from rice straw and husk // *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018. Vol. 15. P. 86–91. DOI: 10.1016/j.bcab.2018.05.010.
6. Ferreira J.L., Wipf J. pharmacologic therapies in anticoagulation // *Medical Clinics of North America*. 2016. Vol. 100, Is. 4. P. 695–718. DOI: 10.1016/j.mcna.2016.03.007.
7. Lefebvre S., Hascoët C., Damin-Pernik M., Rannou B., Benoît E., Lattard V. Monitoring of antivitamin K-dependent anticoagulation in rodents – Towards an evolution of the methodology to detect resistance in rodents // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2017. Vol. 138. P. 29–36. DOI: 10.1016/j.pestbp.2017.02.003.
8. Gao L., Wang F., Chen Y., Li F., Han B., Liu D. The antithrombotic activity of natural and synthetic coumarins // *Fitoterapia*. 2021. Vol. 154. P. 104947. DOI: 10.1016/j.fitote.2021.104947.
9. Deng X., Lei H., Ren Y., Ai J., Li Y., Liang S., Chen L., Liao M. A novel strategy for active compound efficacy status identification in multi-tropism Chinese herbal medicine (*Scutellaria baicalensis* Georgi) based on multi-indexes spectrum-effect gray correlation analysis // *Journal of Ethnopharmacology*. 2023. Vol. 300. P. 115677. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115677.
10. Cartwright B., Mundell N. Anticoagulation for cardiopulmonary bypass: part one // *BJA Education*. 2023. Vol. 23, Is. 3. P. 110–116. DOI: 10.1016/j.bjae.2022.12.003.
11. Wang J., Li J., Zhong L. Current status and prospect of anti-amyloid fibril therapy in AL amyloidosis // *Blood Reviews*. 2024. P. 101207. DOI: 10.1016/j.blre.2024.101207.
12. Gopalan B.P., Quang T., Lizarralde-Iragorri M.A., Lovins D., Cullinane A., Dulau-Florea A., Tromberg B., Shet A.S. incorporating Point-Of-Care technologies to assess treatment response in sickle cell disease // *Deleted Journal*. 2024. P. 100009. DOI: 10.1016/j.bvth.2024.100009.
13. De Laat-Kremers R., Costanzo S., Roest M., De Curtis A., Huskens D., Di Castelnuovo A., Ninivaggi M., Cerletti C., Donati M.B., De Laat B., Iacoviello L. Endogenous Thrombin Potential and Time-Dependent Thrombin Generation Parameters are Independent Risk Factors for Mortality in the General Population // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2024. DOI: 10.1016/j.jtha.2024.02.005.