

УДК 615.273:57.085

DOI 10.20538/1682-0363-2016-4-30-39

Для цитирования: Зверев Я.Ф., Кудинов А.В., Момот А.П., Федорев С.А., Замятина С.В., Кулеш Н.И., Лычева Н.А., Федоров Д.В. Антиагрегантная и антикоагулянтная активность 7-О-гентиобиозида формононетина в условиях *in vitro* и *in vivo*. *Бюллетень сибирской медицины*. 2016; 15 (4): 30–39.

Антиагрегантная и антикоагулянтная активность 7-О-гентиобиозида формононетина в условиях *in vitro* и *in vivo*

Зверев Я.Ф.¹, Кудинов А.В.¹, Момот А.П.^{1,2,4}, Федорев С.А.³,
Замятина С.В.¹, Кулеш Н.И.³, Лычева Н.А.⁴, Федоров Д.В.¹

¹ Алтайский государственный медицинский университет
Россия, 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40

² Алтайский филиал Гематологического научного центра
Россия, 656045, г. Барнаул, ул. Лятишевского, 1

³ Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН
Россия, 690022, г. Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159

⁴ Алтайский филиал НИИ физиологии и фундаментальной медицины СО РАН
Россия, 656038, г. Барнаул, пр. Ленина, 40

РЕЗЮМЕ

Цель. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* исследовать влияние изофлавоноида 7-О-гентиобиозида формононетина (ГБФ), выделенного из корней растения маакия амурская (*Maackia amurensis Rupr. et Maxim.*), на показатели сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза.

Материал и методы. В экспериментах *in vitro* использовалась плазма крови 19 практически здоровых добровольцев обоего пола в возрасте 23–34 года, не принимавших каких-либо лекарственных препаратов на протяжении как минимум 2 нед до забора крови. Изучение ГБФ проводилось с применением обедненной или обогащенной тромбоцитами плазмы, полученной в соответствии с имеющимися рекомендациями. В контрольных исследованиях применялась та же плазма, но с добавлением растворителя в конечных концентрациях 1,25–2,5%. В качестве объекта сравнения в ходе изучения влияния ГБФ на коагуляционный гемостаз использовали гепаринизированную плазму крови человека с конечной концентрацией нефракционированного гепарина 0,2–0,5 МЕ/мл.

Исследования *in vivo* выполнены на аутбредных крысах сток Wistar обоего пола массой 220–270 г. На протяжении всего периода наблюдения животные находились в условиях свободного доступа к воде и пище при нормальном чередовании светлого и темного времени суток. Для изучения влияния длительного введения ГБФ на показатели сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза животные были разделены на четыре группы по 10–12 крыс в каждой. Первой и второй группам крыс на протяжении 10 сут перорально вводили ГБФ в виде крахмальной взвеси в дозе 25 мг/кг массы тела. Полученные результаты сравнивали с соответствующими показателями контрольных животных (третья и четвертая группы), которые в течение такого же периода времени получали эквивалентные количества крахмальной слизи.

Результаты. В опытах с использованием плазмы крови здоровых людей ГБФ в концентрациях 1,0–50,0 мМ способствовал дозозависимому ослаблению индуцируемой аденозиндифосфатом (АДФ) агрега-

✉ Зверев Яков Фёдорович, e-mail: zver@asmu.ru

ции тромбоцитов. В концентрации 50,0 мМ ГБФ вызывал гипокоагуляционные сдвиги в плазме крови, сопоставимые с действием 0,2–0,5 МЕ/мл гепарина. Выявленный гипокоагуляционный эффект подтвердился при применении тромбоэластометрии, демонстрируя выраженную гипокоагуляцию и существенное снижение динамики фибринообразования.

При хроническом энтеральном введении ГБФ крысам в дозе 25 мг/кг было зафиксировано почти 10-кратное снижение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов на фоне увеличения содержания этих клеток в периферической крови. Кроме того, в этих условиях наблюдался выраженный гипокоагуляционный эффект ГБФ, который реализовывался в торможении реакций внутреннего и внешнего путей свертываемости крови, снижении скорости образования фибрина и его механической плотности.

Заключение. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* впервые выявлена способность изофлавоноида 7-О-гентиобиозида формонетина, выделенного из корней маакии амурской, ингибировать показатели сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза. Этот факт имеет важное практическое значение, поскольку открывает перспективу создания нового лекарственного средства, способного уменьшить вероятность возникновения тромбозов при различных сердечно-сосудистых заболеваниях.

Ключевые слова: 7-О-гентиобиозид формонетина, агрегация тромбоцитов, свертываемость крови, здоровые доноры, крысы Wistar.

ВВЕДЕНИЕ

Флавоноиды, один из основных классов вторичных растительных метаболитов, составляют многочисленную группу природных полифенолов. К настоящему времени известно более 20 тыс. индивидуальных соединений, часть из которых издавна применяется в народной медицине благодаря многогранному благоприятному воздействию на организм человека [1]. В последние годы интерес к возможному клиническому использованию многих флавоноидов и изофлавоноидов существенно вырос в связи с полученными доказательствами их эффективности для снижения риска и облегчения течения сердечно-сосудистых заболеваний [2–4].

Полифенольный комплекс из древесины дальневосточного растения маакия амурская (*Maackia amurensis Rupr. et Maxim.*) кроме изофлавоноидов содержит птерокарпаны, мономерные, димерные стильбены и другие соединения. Препарат мёаксар® (Р N003294/01), полученный из ядровой древесины этого растения, наряду с гепатопротекторным действием обладает антиоксидантной, противоопухолевой, гемореологической, антитромбогенной и анитромбоцитарной активностью [5–7].

Для более эффективного применения этого уникального реликтового растения в медицине представлялось важным оценить возможность использования других органов растения (например, корней в качестве источника сырья для создания лекарственных средств). Недавно в нашей лаборатории было показано, что корни в отличие от древесины маакии содержат глав-

ным образом гликозидные формы изофлавонов и птерокарпанов, а комплекс изофлавоноидов из корней растения обладает выраженными антиоксидантными и гепатопротекторными свойствами [8, 9].

Целью данного исследования явилось изучение влияния выделенного из коры корней маакии 7-О-гентиобиозида формонетина (рис.) на процессы тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

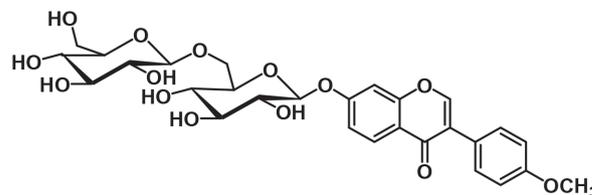


Рисунок. Структура 7-О-гентиобиозида формонетина

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Гликозилированный изофлавоноид 7-О-гентиобиозид формонетина (ГБФ) был выделен из спиртового экстракта корней маакии. Степень его чистоты (98%) определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии [10]. В опытах *in vitro* анализировались образцы плазмы с концентрацией ГБФ в плазме крови 1,0–50,0 мМ. Учитывая ограниченную растворимость ГБФ в воде, использовали его водно-спиртовые растворы с конечной концентрацией этанола в плазме крови не более 2,5%. В экспериментах *in vitro* использовалась плазма крови 19 практически здоровых добровольцев обоего пола в возрасте 23–34 года ((28 ± 2,5) года), не принимавших

каких-либо лекарственных препаратов на протяжении как минимум 2 нед до забора крови. Изучение ГБФ проводилось с применением обедненной или обогащенной тромбоцитами плазмы, полученной в соответствии с имеющимися рекомендациями [11,12]. В контрольных исследованиях применялась та же плазма, но с добавлением растворителя в конечных концентрациях 1,25–2,5%. В качестве объекта сравнения в ходе изучения влияния ГБФ на коагуляционный гемостаз использовали гепаринизированную плазму крови человека с конечной концентрацией нефракционированного гепарина 0,2–0,5 МЕ/мл.

По окончании периода введения у крыс под легким эфирным наркозом из брюшной аорты забирали кровь в объеме 5 мл. Забор крови для исследования осуществляли в полистироловый шприц с широкой иглой, содержащий 0,11 М (3,8%) раствора натрия лимоннокислого 3-замещенного (цитрата натрия). Соотношение крови и цитрата натрия составляло 9 : 1 [11]. У первой и третьей групп животных определяли показатели сосудисто-тромбоцитарного гемостаза – число тромбоцитов (PTL, $10^9/л$) и АДФ-агрегацию (%). Количество тромбоцитов определялось с помощью автоматического гематологического анализатора Drew3 (Drew Scientific, Великобритания – США). У крыс второй и четвертой групп определяли показатели коагуляционного гемостаза.

Исследование функции тромбоцитов проводилось на оптическом агрегометре Chronolog 490-4D (CHRONO-LOG Corporation, США), оценивающим агрегацию кровяных пластинок в плазме крови по изменению ее оптической плотности, с регистрацией степени светопропускания (%). В качестве агониста агрегации применялась динатриевая соль АДФ в конечной концентрации (в кювете агрегометра) 20 мкМ.

В число изучаемых показателей коагуляционного гемостаза были включены активированное парциальное (частичное) тромбопластиновое время (АПТВ) (реагент «АПТВ-Эл-тест»),

протромбиновое время (ПВ) (реагент «Техпластин-тест»), тромбиновое время (ТВ) (реагент «Тромбо-тест»). Оценку показателей АПТВ, ПВ и ТВ производили на автоматическом коагулометре Sysmex CA-1500 (Sysmex Corporation, Япония). При анализе конечного этапа свертывания крови учитывалось анцистроновое время («Анцистрон»), которое определяли на полуавтоматическом коагулометре АПГ4-02П (ЭМКО, Россия). Все отмеченные выше исследования проводились с помощью наборов реагентов фирмы «Технология – Стандарт» (Россия).

Для графической регистрации процессов свертывания крови использовали методику тромбоэластометрии (тромбоэластометр Rotem Gamma и реагенты Tem Innovations GmbH Star-TEM 10 в режиме NATEM, производства Rotem, Германия). Учитывали следующие показатели: СТ – время начала свертывания, с; CFT – время формирования сгустка, с; MCF – максимальная твердость сгустка, мм; угол α – кинетика образования сгустка, град.

Полученные результаты обрабатывали статистическим методом вариационных рядов с использованием критерия Манна – Уитни. Все расчеты велись по общепринятым формулам, n – выборка для каждой из групп в конкретный период эксперимента. Разница сравниваемых значений считалась статистически достоверной, если показатель $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние ГБФ *in vitro* на агрегацию тромбоцитов в плазме практически здоровых людей представлено в табл. 1. Добавление к плазме крови этанола в конечной концентрации 1,25–2,5% не приводило к изменению агрегации тромбоцитов. В то же время внесение в плазму ГБФ в концентрации 1,0–50,0 мМ способствовало дозозависимому снижению агрегации этих клеток. Этот эффект наблюдался при использовании 10,0 мМ ГБФ и существенно усиливался с увеличением его концентрации вплоть до 50,0 мМ.

Т а б л и ц а 1

Влияние ГБФ на агрегацию тромбоцитов здоровых доноров в условиях <i>in vitro</i>							
Показатель	Норма	Плазма-контроль	Плазма + растворитель	ГБФ 1,0 мМ	ГБФ 10,0 мМ	ГБФ 25,0 мМ	ГБФ 50,0 мМ
<i>N</i>	–	25	16	17	28	11	7
АДФ-агрегация, %	70–80	72 ± 9,6	75 ± 17,3	71 ± 16,4	56 ± 18,6*	48 ± 8,5*	10 ± 12,2*

П р и м е ч а н и е. Здесь и в табл. 2–4: *N* – количество опытов; норма – нормальные значения для образцов контрольной плазмы, обогащенной тромбоцитами, от практически здоровых людей по данным лаборатории патологии гемостаза Краевой клинической больницы г. Барнаула; плазма-контроль – образцы плазмы крови практически здоровых людей; плазма + растворитель – плазма-контроль, содержащая этанол в конечных концентрациях 1,25–2,5%. * $p < 0,05$ в сравнении с группой «Плазма + растворитель».

В экспериментах *in vivo* было установлено, что 10-дневное введение подопытным животным ГБФ сопровождалось значительными изменениями в системе сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. При применении ГБФ количество тромбоцитов существенно увеличивалось. Отмечался рост данного показателя на 60,4% по сравнению с контрольными значениями: с $(477 \pm 23) \cdot 10^9/\text{л}$ до $(765 \pm 40) \cdot 10^9/\text{л}$; $p < 0,001$. При анализе результатов АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов было установлено, что введение ГБФ обусловило почти 10-кратное снижение АДФ-агрегации по сравнению с показателями контрольных животных: с $(34,2 \pm 3,53)\%$ до $(3,5 \pm 1,15)\%$; $p < 0,001$.

Влияние ГБФ на показатели гемокоагуляции плазмы здоровых людей представлены в табл. 2. Установлено, что ГБФ в концентрации 1,0 мМ обладал некоторым активирующим действием на гемокоагуляцию, что демонстрировали результаты оценки АПТВ и анцистронового времени в сравнении с контрольными значениями этих показателей. Однако, начиная с концентрации изофлавоноида 10,0 мМ, были зафиксированы изменения, которые с увеличением концентрации приобретали, как правило, характер гипокоагуляционных сдвигов исследованных показателей. Так, существенное удлинение АПТВ на 33,5% отмечалось при применении 25,0 мМ ГБФ, а достоверное снижение коагуляции в тесте протромбинового времени

наблюдалось и в более низких концентрациях: на 16,9% при 10,0 мМ ($p < 0,05$). В тесте тромбинового времени в концентрациях ГБФ 1,0–25,0 мМ эффект отсутствовал, однако при ее увеличении до 50,0 мМ коагуляция не происходила. Важно отметить, что эффект высоких концентраций ГБФ был сопоставим с действием 0,2–0,5 МЕ/мл гепарина.

Отсутствие радикальных изменений со стороны показателя анцистронового времени позволяет предположить, что исследуемый изофлавоноид практически не влияет на свойства образующегося фибрина.

Анализ сдвигов в системе гемостаза крыс в ответ на хроническое применение ГБФ подтвердил наличие существенных сдвигов в целом ряде изучаемых показателей (табл. 3). Определено, что ведение ГБФ сопровождалось отчетливым и глубоким гипокоагуляционным сдвигом учитываемых показателей гемокоагуляции – АПТВ, ПВ и ТВ, превысивших контрольные значения в 1,4; 1,6 и 1,7 раза соответственно.

Один из интегральных методов исследования системы гемостаза – тромбоэластометрия – как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo* позволил провести оценку вклада исследованных участников гемостатических реакций в образование фибрина и описать плотность фибринового сгустка, играющего решающую роль в исходах внутрисосудистого свертывания крови.

Таблица 2

Влияние ГБФ на показатели коагуляционного гемостаза у здоровых доноров в условиях <i>in vitro</i>				
Показатель	АПТВ, с	Протромбиновое время, с	Тромбиновое время, с	Анцистроновое время, с
Плазма-контроль	$32,3 \pm 1,5$ $N = 4$	$11,7 \pm 0,20$ $N = 3$	$17,3 \pm 0,31$ $N = 3$	$28,0 \pm 3,00$ $N = 3$
Плазма + растворитель	$31,1 \pm 4,73$ $N = 9$	$11,8 \pm 0,55$ $N = 9$	$17,4 \pm 0,94$ $N = 9$	$31,1 \pm 1,53$ $N = 11$
ГБФ 1,0 мМ	$26,4 \pm 0,79^*$ $N = 5$	$11,5 \pm 0,11$ $N = 5$	$16,9 \pm 0,09$ $N = 5$	$25,8 \pm 0,78^*$ $N = 5$
ГБФ 10,0 мМ	$30,3 \pm 0,28$ $N = 5$	$12,8 \pm 0,21^*$ $N = 5$	$16,8 \pm 0,05$ $N = 5$	$25,9 \pm 1,19^*$ $N = 5$
ГБФ 25,0 мМ	$46,6 \pm 1,63^*$ $N = 4$	$15,0 \pm 4,41^*$ $N = 8$	$18,1 \pm 0,13$ $N = 4$	$30,1 \pm 15,10$ $N = 5$
ГБФ 50,0 мМ	Нет свертывания $N = 5$	$40,0 \pm 1,38^*$ $N = 5$	Нет свертывания $N = 5$	$37,0 \pm 1,64^*$ $N = 5$
Гепарин 0,2 МЕ/мл	$62,6 \pm 7,40^*$ $N = 4$	$11,7 \pm 0,21$ $N = 4$	$60,1 \pm 30,48^*$ $N = 4$	$31,8 \pm 0,41$ $N = 6$
Гепарин 0,5 МЕ/мл	$123,3 \pm 0,82^*$ $N = 4$	$13,8 \pm 0,48$ $N = 4$	Нет свертывания $N = 5$	$30,0 \pm 0,89$ $N = 6$

Таблица 3

Показатели коагуляционного гемостаза после 10-дневного энтерального введения 25 мг/кг ГБФ крысам			
Показатель	АПТВ, с	Протромбиновое время, с	Тромбиновое время, с
Контрольные животные	$15,0 \pm 1,62$ $N = 9$	$18,2 \pm 0,83$ $N = 10$	$27,9 \pm 1,41$ $N = 10$
ГБФ	$20,4 \pm 0,91^*$ $N = 8$	$28,2 \pm 1,22^*$ $N = 7$	$48,3 \pm 2,61^*$ $N = 7$
p	$< 0,03$	$< 0,001$	$< 0,001$

Как видно из табл. 4, результаты, полученные при применении данного методического приема, подтвердили вышеприведенные сведения относительно гипокоагуляционной активности ГБФ (по показателям СТ и СФТ), не связанной с эф-

фектами используемого растворителя. При этом не было отмечено достоверных изменений скорости образования и плотности фибринового сгустка (по показателям угла α и MCF соответственно).

Т а б л и ц а 4

Влияние ГБФ на показатели тромбоэластограммы здоровых доноров в условиях <i>in vitro</i>				
Показатель	СТ, с	СФТ, с	MCF, мм	Угол α , град
Растворитель (этанол 2,5%)	1155 ± 92 N = 6	675 ± 46 N = 6	29,8 ± 0,63 N = 6	26,5 ± 1,66 N = 6
ГБФ 1,0 мМ	1200 ± 96 N = 4	662 ± 235 N = 4	23,8 ± 5,44 N = 4	27,3 ± 6,77 N = 4
ГБФ 10,0 мМ	1501 ± 204 N = 4	1016 ± 140* N = 4	18,0 ± 4,85 N = 4	18,8 ± 2,84 N = 4
ГБФ 25,0 мМ	2197 ± 167* N = 4	1106 ± 102* N = 4	27,6 ± 2,01 N = 4	18,3 ± 1,31 N = 4
ГБФ 50,0 мМ	3304 ± 91* N = 4	Нет свертывания N = 4	Нет свертывания N = 4	Нет свертывания N = 6
Гепарин 0,2 МЕ/мл	1825 ± 16* N = 4	Нет свертывания N = 4	7,0 ± 1,00* N = 4	Нет свертывания N = 6

ОБСУЖДЕНИЕ

Подавляющий функцию тромбоцитов эффект изучаемого нами препарата не явился неожиданным. Способность флавоноидов и изофлавоноидов подавлять процесс агрегации тромбоцитов известна. Ранее в экспериментах *in vivo* суммарный сухой экстракт из древесины мааки равно как и экстракт той же части растения, содержащий сумму изофлавоноидов, существенно ослабляли агрегацию тромбоцитов у овариоэктомизированных крыс [13].

Предполагается, что механизм антиагрегантного действия флавоноидов может быть связан с ингибированием каскада образования тромбосана A_2 (ТХА₂), взаимодействием с тромбосановыми рецепторами, влиянием на внутриклеточные события, инициируемые в результате активирования этих рецепторов, изменением уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), ингибированием GPIIb/IIIa рецепторов тромбоцитов, а также известными антиоксидантными свойствами этих соединений [14].

Отдельно отметим, что недавно было убедительно продемонстрирована способность ряда флавоноидов ингибировать активность метаболического каскада арахидоновой кислоты [15]. Оказалось, что из 29 изученных флавоноидов и изофлавоноидов в эксперименте *in vitro* некоторые проявили себя как антагонисты тромбосановых рецепторов, а генистеин и дайдзеин в значительной мере подавляли образование ТХА₂, ингибируя активность циклооксигеназы (ЦОГ), сопоставимо с известным ингибитором этого фермента ацетилсалициловой кислотой. Последний факт пред-

ставляется особенно интересным, учитывая, что оба отмеченных соединения, как и использованный нами ГБФ, являются изофлавоноидами. Как известно, активность циклооксигеназы в тромбоцитах обеспечивает метаболизм арахидоновой кислоты с образованием в качестве конечного продукта этого каскада синтеза тромбосана A_2 . Примечательно, что активность тромбосансинтазы под влиянием изученных флавоноидов в цитированной выше работе практически не изменялась [15]. Сходные результаты были получены ранее и другими исследователями [16, 17].

Хорошо известна способность тромбина повышать активность тромбоцитов. Специфически взаимодействуя с активируемыми протеазами PAR рецепторами на мембране тромбоцитов, тромбин обуславливает агрегацию последних. Исследования недавних лет, продемонстрировавшие антитромбоцитарное действие ряда флавоноидов, предполагают связь между подавлением амидолитической и протеолитической активности тромбина и угнетением агрегации тромбоцитов [18–20].

Отдельно отметим и возможную антитромбоцитарную активность флавоноидов, обусловленную их антиоксидантными свойствами. Установлена прямая связь между оксидативным стрессом и повышением функциональной активности тромбоцитов [21]. Не исключено, что выявленная активность флавоноидов обусловлена их способностью проявлять себя в качестве скавенджеров активных форм кислорода, свободных радикалов жирных кислот и гидроперекисей липидов [1, 22]. В любом случае установление точного механизма действия исследуемого препарата требует дальнейшего более детального изучения.

Анализируя предполагаемые механизмы воздействия флавоноидов на сложный каскад свертывания крови, следует отметить две основные возможные мишени, играющие ключевую роль в процессе гемокоагуляции. Этими мишенями являются сериновые протеазы: фактора Ха, в комплексе с фактором V активирующий переход протромбина в тромбин, и сам тромбин, обеспечивающий переход фибриногена в фибрин. Исследования последних лет показывают, что природные полифенолы способны ингибировать активность многих ферментов, в том числе сериновых протеаз [23]. Так, было продемонстрировано, что некоторые сульфатированные флавоноиды непрямо ингибируют фактор Ха посредством модулирования активности антитромбина III [24, 25]. А совсем недавно с помощью метода молекулярного моделирования (молекулярного докинга) удалось показать, что четыре флавоноида из 19 изученных полифенолов прямо ингибировали активность фактора Ха, связываясь с активными местами в его молекуле и блокируя тем самым доступ к ней субстратов [26].

Не исключено, что обнаруженные эффекты обусловлены прямым или непрямым воздействием на активность тромбина, ингибирование которой может приводить к развитию как антитромбоцитарного, так и антикоагулянтного эффектов. В ряде исследований, проведенных в последние годы, предпринимались попытки выявить прямое влияние флавоноидов на активность тромбина, фактора, играющего центральную роль в процессе свертывания крови. С помощью экспериментов *in vitro* удалось показать угнетение амидолитической активности тромбина при воздействии полифенольных комплексов и отдельных компонентов, выделенных из различных растений [27, 28]. Использование молекулярного докинга подтвердило способность ряда флавоноидов прямо блокировать активность тромбина за счет связывания с активными центрами его молекулы [18, 29]. И наконец совсем недавно было показано, что из 20 проверенных природных полифенолов только шесть ингибировали амидолитическую активность тромбина и лишь три подавляли его протеолитическую активность, угнетая способность тромбина индуцировать полимеризацию фибриногена [29]. Правда, в данных экспериментах аналогичный эффект фиксировался лишь в концентрации ГБФ 50,0 мМ. В меньших концентрациях прямое антитромбиновое действие соединения не обнаруживалось.

В результате проведенного исследования впервые установлено, что изофлавоноид 7-О-гентио-

биозид формонетина оказывает существенное влияние на процессы сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза в крови человека в экспериментах *in vitro*.

Нерешенной остается проблема, касающаяся возможности воспроизведения аналогичного действия в условиях целого организма. Эта непростая проблема связана с особенностями химического строения ГБФ, его биодоступности и метаболизма в организме человека. Однако эксперименты с длительным введением ГБФ крысам подтверждают факт наличия антитромбоцитарного и антикоагулянтного действия этого изофлавоноида *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В экспериментах *in vitro* и *in vivo* впервые выявлена способность изофлавоноида 7-О-гентиобиозида формонетина, выделенного из корней маакии амурской, ингибировать ряд показателей сосудисто-тромбоцитарного и коагуляционного гемостаза. Этот факт имеет важное практическое значение, поскольку открывает перспективу создания нового лекарственного средства, способного уменьшить вероятность возникновения тромбозов при различных сердечно-сосудистых заболеваниях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом ДВО РАН № 15-1-5-002.

СООТВЕТСТВИЕ ПРИНЦИПАМ ЭТИКИ

Удостоверяем, что протокол исследования соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований. Протокол исследования одобрен Локальным комитетом по биомедицинской этике Алтайского государственного медицинского университета (протокол № 24 от 02 сентября 2015 г.).

Эксперименты с участием людей и опыты на животных проводили с соблюдением требований Хельсинкской декларации Всемирной медицинской организации (2000 г.), «Правил клинической практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ № 266 от 19.06.2003) и «Правил лабораторной практики в Российской Федерации» (приказ МЗ РФ № 708 н от 23.08.2010).

ЛИТЕРАТУРА

- Upadhyay S., Dixit M. Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling // *Oxid. Med. Cell. Longev.* doi: /10.1155/2015/504253. Epub. 2015. Jun 9.
- Новотный Дж.А. Антоцианины, флавоноиды и сердечно-сосудистые заболевания // *Вопросы диетологии.* 2014; 4 (3): 28–31.
- Воробьева Е.Н., Фомичева М.А., Воробьев Р.И. и др. Алиментарные факторы риска сердечно-сосудистых заболеваний и их коррекция // *Атеросклероз.* 2015; 1: 68–73.
- Jacques P.F., Cassidy A., Peterson J.J., Dwyer J.T. Dietary flavonoid intakes and CVD incidence in the Framingham Offspring Cohort // *Br. J. Nutr.* 2015; 114 (9): 1496 – 1503. doi: 10.1017/S0007114515003141. Epub. 2015. Sep 3.
- Fedoreev S.A., Kulesh N.I., Glebko L.I. et al. Maksar: a preparation based on Amur Maackia // *Pharm. Chem. J.* 2004; 38: 605–610.
- Федореев С.А., Кулеш Н.И., Мищенко Н.П. и др. Средство, обладающее противоопухолевой активностью. Патент 2414920 РФ. Бюлл. № 9, 27.03.2011.
- Плотникова А.М., Шульгау З.Т., Плотникова Т.М. Антитромбогенная и антитромбоцитарная активность экстракта из древесины маакии амурской // *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2009; 147 (2): 164–167.
- Kulesh N.I., Fedoreyev S.A., Veselova V.M. et al. Antioxidant Activity of the Isoflavonoids from the Roots of *Maackia amurensis* // *Nat. Prod. Comm.* 2013; 8 (5): 589–592.
- Кушнерова Н.Ф., Федореев С.А., Фоменко С.Е. и др. Гепатопротекторные свойства изофлавоноидов из корней *Maackia amurensis* при экспериментальном поражении печени четыреххлористым углеродом // *Эксперим. и клин. фармакол.* 2014; 77 (2): 26–30.
- Замятина С.В., Зверев Я.Ф., Кулеш Н.И., Федореев С.А. Средство, обладающее антиагрегантной и антикоагулянтной активностью. Патент 2573379 РФ. Бюлл. № 2, 12.08.2016.
- Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. Издание 3-е. М.: Ньюдиамед, 2008: 292.
- Мамаев А.Н., Гильманов А.Ж., Вавилова Т.В., Момот А.П. Преаналитический этап исследования системы гемостаза // *Клин. лаб. диагностика.* 2011; 4: 35–39.
- Anischenko A.M. Hemoreological effects of complex isoflavonoid preparation in ovariectomized rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013; 154 (6): 755–757.
- Fuentes E., Palomo I. Antiplatelet effects of natural bioactive compounds by multiple targets: Food and drug interactions // *J. Funct. Foods.* 2014; 6: 73– 81.
- Karličková J., Říha M., Filipský T. et al. Antiplatelet effects of flavonoids mediated by inhibition of arachidonic acid based pathway. Published on-line. Planta med © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York ISSN 0032-0943. doi:10.1055/s-0035-1557902.
- Navarro-Nucez L., Lozano M.L., Palomo M. et al. Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway // *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56 (9): 2970–2976. doi: 10.1021/jf0723209. Epub. 2008. Apr 15.
- Navarro-Nucez L., Castillo J., Lozano M.L. et al. Thromboxane A₂ receptor antagonism by flavonoids: structure-activity relationships // *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57 (4): 1589–1594. doi: 10.1021/jf803041k.
- Mozzicafreddo M., Cuccioloni M., Eleuteri A.M. et al. Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human thrombin // *Biochimie.* 2006; 88 (9): 1297–1306. Epub. 2006. Apr 27.
- Bijak M., Saluk J., Ponczek M.B., Nowak P. Antithrombin effect of polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds // *Phytother. Rec.* 2013; 27 (1): 71–76. doi: 10.1002/ptr.4682. Epub. 2012. Apr 4.
- Mira A., Alkhiary W., Shimizu K. Antiplatelet and anticoagulant activities of *Angelica shikokiana* extract and its isolated compounds // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2015; 1–9. doi: 10.1177/1076029615595879. Epub. 2015. Jul 15.
- Бышевский А.Ш., Умутбаева М.К., Алборов Р.Г. Связь гемостаза с перекисным окислением липидов. М.: Мед. книга, 2003: 95.
- Cuccioloni M., Mozzicafreddo M., Bonfili L. et al. Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases // *Chem. Biol. Drug Des.* 2009; 74(1): 1–15. doi: 10.1111/j.1747-0285.2009.00836.x.
- Gunnarson G.T., Riaz M., Adams J., Desai U.R. Synthesis of per-sulfated flavonoids using 2,2,2-trichloro ethyl protecting group and their factor Xa inhibition potential // *Bioorg. Med. Chem.* 2005; 13 (5): 1783–1789.
- Correia-da-Silva M., Susa E., Duarte B. et al. Flavonoids with an oligopolysulfated moiety: a new class of anticoagulant agents // *J. Med. Chem.* 2011; 54 (1): 95–106. doi: 10.1021/jm1013117. Epub. 2010. Dec 7.
- Bijak M., Ponczek M.B., Nowak P. Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X. Intern // *J. Biol. Macromol.* 2014; 65: 129–135. doi: 10.1016/j.jbiomac.2014.01.023. Epub. 2014. Jan 18.
- Cuccioloni M., Mozzicafreddo M., Sparapani L. et al. Pomegranate fruit components modulate human thrombin // *Fitoterapia.* 2009; 80 (5): 301–305. doi: 10.1016/j.fitote.2009.03.009. Epub. 2009. Apr 7.
- Pawlaczyk I., Czerchawski L., Kuliczkowski W. et al. Anticoagulant and anti-platelet of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. // *Thromb. Res.* 2011; 124 (4): 328–340. doi: 10.1016/j.thromres.2010.11.031. Epub. 2010. Dec 18.
- Liu L., Ma H., Yang N. et al. A series of natural flavonoids as thrombin inhibitors: structure-activity relationships // *Thromb. Res.* 2010; 126 (5): e365–e378. doi: 10.1016/j.thromres.2010.08.006. Epub. 2010. Sep 15.
- Bijak M., Ziewiecki R., Saluk J. et al. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds // *Med. Chem. Res.* 2014; 23: 2324–2337. Epub. 2013. Oct 16.

Поступила в редакцию 21.04.2016

Утверждена к печати 25.07.2016

Зверев Яков Фёдорович, д-р мед. наук, профессор кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

Кудинов Алексей Владимирович, канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

Момот Андрей Павлович, д-р мед. наук, профессор Алтайского государственного медицинского университета, Алтайского филиала НИИ физиологии и фундаментальной медицины СО РАН, директор Алтайского филиала Гематологического научного центра, г. Барнаул.

Федореев Сергей Александрович, д-р хим. наук, зав. лабораторией химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток.

Замятина Светлана Владимировна, канд. мед. наук, доцент кафедры биохимии и клинической лабораторной диагностики Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

Кулеш Надежда Ивановна, канд. хим. наук, ст. науч. сотрудник лаборатории химии природных хиноидных соединений Тихоокеанского института биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, г. Владивосток.

Лычева Наталья Александровна, аспирант кафедры физиологии, мл. науч. сотрудник Алтайского государственного медицинского университета, Алтайского филиала НИИ физиологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Барнаул.

Фёдоров Дмитрий Владимирович, д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой сестринского дела Алтайского государственного медицинского университета, г. Барнаул.

✉ Зверев Яков Фёдорович, e-mail: zver@asmu.ru.

УДК 615.273:57.085

DOI 10.20538/1682-0363-2016-4-30–39

For citation: Zverev Ya.F., Kudinov A.V., Momot A.P., Fedoreyev S.A., Zamyatina S.V., Kulesh N.I., Lychova N.A., Fyodorov D.V. The antiplatelet and anticoagulant activity of 7-O-gentiobiozide formononetin *in vitro* and *in vivo*. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2016; 15 (4): 30–39.

The antiplatelet and anticoagulant activity of 7-O-gentiobiozide formononetin *in vitro* and *in vivo*

Zverev Ya.F.¹, Kudinov A.V.¹, Momot A.P.^{1,2,4}, Fedoreyev S.A.³, Zamyatina S.V.¹, Kulesh N.I.³, Lychova N.A.⁴, Fyodorov D.V.¹

¹ *Altai State Medical University
40, Lenin Av., Barnaul, 656038, Russian Federation*

² *Hematological Research Center RAMN, Altai Department
1, Lapidevskogo St., Barnaul, 656024, Russian Federation*

³ *G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences
159, Pr. 100 let Vladivostoku, Vladivostok, 690022, Russian Federation*

⁴ *Institute of Physiology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences
40 Lenin Av., 656038, Barnaul, Russian Federation*

ABSTRACT

Aim. In experiments *in vitro* and *in vivo* it was investigated the effect of isoflavone 7-O-gentiobiozide formononetin (GBF) isolated from the roots of the plant *Maackia amurensis* (*Maackia amurensis* Rupr. et Maxim.), on the processes of vascular-platelet and coagulation hemostasis.

Materials and methods. In experiments using blood of healthy human plasma in concentrations of GBF 1,0–50,0 mM promoted dose-dependently ADP-induced weakening of platelet aggregation. Since the concentration of 10,0 mM GBF induced hypocoagulative changes in blood plasma, comparable with the effect of 0,2–0,5 IU/ml heparin. Revealed hypocoagulative effect was confirmed in the application thromboelastometry, showing pronounced hypocoagulation and a significant reduction in fibrin formation dynamics.

Results. In chronic GBF oral administration to rats at a dose of 25 mg/kg was fixed almost a 10-fold reduction in ADP-induced platelet aggregation, with increased content of these cells in the peripheral blood. Furthermore, in these conditions, there was a pronounced effect of GBF's hypocoagulation which was implemented in inhibiting reactions inner and outer tracks of blood clotting, reducing the rate of formation of fibrin and its mechanical density.

Conclusion. Thus, in experiments *in vitro* and *in vivo* for the first time revealed the ability of isoflavone 7-O-gentiobiosideformononetin extracted from the roots *Maackia amurensis*, inhibit the processes of vascular-platelet and coagulation hemostasis. This fact is of great practical importance, because it opens the prospective of the development of a new drug that can reduce the risk of thrombosis in various cardiovascular diseases.

Keywords: 7-O-gentiobioside formononetin, platelet aggregation, blood clotting, healthy donors, Wistar rats.

REFERENCES

- Upadhyay S., Dixit M. Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015; 504253. doi: /10.1155/2015/504253. Epub. 2015. Jun 9.
- Novotnyiy Dzh. A. Antotsianinyi, flavonoidyi i serdechno-sosudistyie zabolovaniya [Anthocyanins, flavonoids and cardiovascular disease] // *Vopr. Dietol.* 2014; 4 (3): 28–31 (in Russian).
- Vorobeva E.N., Fomicheva M.L., Vorobev R.I. i dr. Alimentarnyye faktoryi riska serdechno-sosudistyyih zabolovaniy i ih korrektsiya [Nutritional risk factors for cardiovascular diseases and their correction] // *Ateroskleroz – Atherosclerosis*, 2015; 1: 68–73 (in Russian).
- Jacques P.F., Cassidy A., Peterson J.J., Dwyer J.T. Dietary flavonoid intakes and CVD incidence in the Framingham Offspring Cohort // *Br. J. Nutr.* 2015; 114 (9): 1496 – 1503. doi: 10.1017/S0007114515003141. Epub. 2015. Sep 3.
- Fedoreev S.A., Kulesh N.I., Glebko L.I. et al. Maksar: a preparation based on Amur *Maackia* // *Pharm. Chem. J.* 2004; 38: 605–610.
- Fedoreev S.A., Kulesh N.I., Mischenko N.P. et al. Sredstvo, obladayuschee protivopuholevoy aktivnostyu [A Means of having anticancer activity]. Patent RF 2414920. Bull. № 9, 27.03. 2011 (in Russian).
- Plotnikova A.M., Shulgau Z.T., Plotnikova T.M. Antitrombogennaya i antitrombotsitarnaya aktivnost ekstrakta iz drevesinyi Maakii amurskoy [Antithrombogenic and antiplatelet activity of the extract from the wood of *Maackia amurensis*] // *Byull. eksperim. biol. i med – Bull. Experim. Biol. and Med.* 2009; 147 (2): 164–167 (in Russian).
- Kulesh N.I., Fedoreyev S.A., Veselova V.M. et al. Antioxidant Activity of the Isoflavonoids from the Roots of *Maackia amurensis* // *Nat. Prod. Comm.* 2013; 8 (5): 589–592.
- Kushnerova N.F., Fedoreev S.A., Fomenko S.E. et al. Gepatoprotekturnyye svoystva izoflavonoidov iz korney Maackia amurensis pri eksperimentalnom porazhenii pecheni chetyrehhloristyim uglerodom [Hepatoprotective properties of isoflavonoids from the roots of *Maackia amurensis* on experimental liver damage by carbon tetrachloride] // *Eksperim. i klin. Farmakol.* 2014; 77 (2): 26–30 (in Russian).
- Zamyatina S.V., Zverev Ya.F., Kulesh N.I., Fedoreev S.A. Sredstvo, obladayuschee antiagregantnoy i antikoagulyantnoy aktivnostyu [A Means of having antiplatelet and anticoagulant activity] Patent 2573379 RF. Bull. № 2, 12.08.2016 (in Russian).
- Barkagan Z.S., Momot A.P. Diagnostika i kontroliruemyaya terapiya narusheniy gemostaza. Izdanie 3. [Diagnostics and controlled therapy of disorders of hemostasis. Edition 3]. Moscow, Nyudiamed Publ., 2008: 292 (in Russian).
- Mamaev A.N., Gilmanov A.Zh., Vavilova T.V., Momot A.P. Preanaliticheskiy etap is-sledovaniya sistemyi gemostaza [The pre-analytical phase of the study of hemostasis system] // *Klin. lab. diagnostika.* 2011; 4: 35–39 (in Russian).
- Anischenko A.M. Hemoreological effects of complex isoflavonoid preparation in ovariectomized rats // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013; 154 (6): 755–757.
- Fuentes E., Palomo I. Antiplatelet effects of natural bioactive compounds by multiple targets: Food and drug interactions // *J. Funct. Foods.* 2014; 6: 73–81.
- Karličkova J., Říha M., Filipický T. et al. Antiplatelet effects of flavonoids mediated by inhibition of arachidonic acid based pathway. Published on-line. Planta med © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York ISSN 0032-0943. doi: 10.1055/s-0035-1557902.
- Navarro-Nucez L., Lozano M.L., Palomo M. et al. Apigenin inhibits platelet adhesion and thrombus formation and synergizes with aspirin in the suppression of the arachidonic acid pathway // *J. Agric. Food Chem.* 2008; 56(9): 2970–2976. doi: 10.1021/jf0723209. Epub. 2008. Apr 15.
- Navarro-Nucez L., Castillo J., Lozano M.L. et al. Thromboxane A₂ receptor antagonism by flavonoids: structure-activity relationships // *J. Agric. Food Chem.* 2009; 57 (4): 1589–1594. doi: 10.1021/jf803041k.
- Mozzicafreddo M., Cuccioloni M., Eleuteri A.M. et al. Flavonoids inhibit the amidolytic activity of human

- thrombin // *Biochimie*. 2006; 88 (9): 1297–1306. Epub. 2006. Apr 27.
19. Bijak M., Saluk J., Ponczek M.B., Nowak P. Antithrombin effect of polyphenol-rich extracts from black chokeberry and grape seeds // *Phytother. Rec.* 2013; 27 (1): 71–76. doi: 10.1002/ptr.4682. Epub. 2012. Apr 4.
 20. Mira A., Alkhiary W., Shimizu K. Antiplatelet and anticoagulant activities of *Angelica shikokiana* extract and its isolated compounds // *Clin. Appl. Thromb. Hemost.* 2015; 1–9. doi: 10.1177/1076029615595879. Epub. 2015. Jul 15.
 21. Byishevskiy A.Sh., Umutbaeva M.K., Alborov R.G. Svyaz gemostaza s perekisnyim okis-leniem lipidov [Link of hemostasis with lipid peroxidation]. Moscow: Med. Kniga Publ., 2003; 95 (in Russian).
 22. Cuccioloni M., Mozzicafreddo M., Bonfili L. et al. Natural occurring polyphenols as template for drug design. Focus on serine proteases // *Chem. Biol. Drug Des.* 2009; 74 (1): 1–15. doi: 10.1111/j.1747-0285.2009.00836.x.
 23. Gunnarson G.T., Riaz M., Adams J., Desai U.R. Synthesis of per-sulfated flavonoids using 2,2,2-trichloro ethyl protecting group and their factor Xa inhibition potential // *Bioorg. Med. Chem.* 2005; 13 (5): 1783–1789.
 24. Correia-da-Silva M., Susa E., Duarte B. et al. Flavonoids with an oligopolysulfated moiety: a new class of anticoagulant agents // *J. Med. Chem.* 2011; 54 (1): 95–106. doi: 10.1021/jm1013117. Epub. 2010. Dec 7.
 25. Bijak M., Ponczek M.B., Nowak P. Polyphenol compounds belonging to flavonoids inhibit activity of coagulation factor X. Intern // *J. Biol. Macromol.* 2014; 65: 129–135. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2014.01.023. Epub. 2014. Jan 18.
 26. Cuccioloni M., Mozzicafreddo M., Sparapani L. et al. Pomegranate fruit components modulate human thrombin // *Fitoterapia*. 2009; 80 (5): 301–305. doi: 10.1016/j.fitote.2009.03.009. Epub. 2009. Apr 7.
 27. Pawlaczyk I., Czerchawski L., Kuliczkowski W. et al. Anticoagulant and anti-platelet of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis L.* // *Thromb. Res.* 2011; 124 (4): 328–340. doi: 10.1016/j.thromres.2010.11.031. Epub. 2010. Dec 18.
 28. Liu L., Ma H., Yang N. et al. A series of natural flavonoids as thrombin inhibitors: structure-activity relationships // *Thromb. Res.* 2010; 126 (5): e365–e378. doi: 10.1016/j.thromres.2010.08.006. Epub. 2010. Sep 15.
 29. Bijak M., Ziewiecki R., Saluk J. et al. Thrombin inhibitory activity of some polyphenolic compounds // *Med. Chem. Res.* 2014; 23: 2324–2337. Epub. 2013. Oct 16.

Received April 21.2016

Accepted July 25.2016

Zverev Yakov F., DM, Professor of the Department Pharmacology, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation.

Kudinov Alexey V., PhD, Associate Professor of the Department Pharmacology, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation.

Momot Andrei P., DM, Professor, Altai State Medical University, Physiological Research Institute of SO RAMN, Altai Department, Director of Hematological Research Center, Altai Department, Barnaul, Russian Federation.

Fedoreyev Sergey Al., DCh, Head of the Laboratory of Chemistry, Natural Quinonoid Compounds, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation.

Zamyatina Svetlana V., PhD, Associate Professor of Biochemistry's Faculty and Clinical Laboratory Diagnostics, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation.

Kulesh Nadezhda Iv., PhD, Senior Researcher of the Laboratory of Chemistry of Natural Quinonoid Compounds, G.B. Elyakov Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Vladivostok, Russian Federation.

Lychova Natalia A., Graduate of Physiological's Faculty, Junior Scientific Researcher, Altai State Medical University, Physiological Research Institute SO RAMN, Altai Department, Barnaul, Russian Federation.

Fyodorov Dmitry V., DM, Head of the Department of Nursing, Altai State Medical University, Barnaul, Russian Federation.

✉ **Zverev Yakov F.**, e-mail: zver@asmu.ru.