

## ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ СУХОГО ЕКСТРАКТУ

### З ТРАВИ ГЕРАНІ БОЛОТНОЇ

Національний фармацевтичний університет (м. Харків)

Дослідження виконані згідно з планом НДР Національного фармацевтичного університету з проблеми МОЗ України «Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування в медичній практиці», № державної реєстрації 0103U000478; термін виконання 2014 – 2016 рр.

**Вступ.** Профілактика та лікування кровотеч різного генезу внаслідок їх поширеності, широкого спектра клінічних проявів та ризику виникнення ускладнень є актуальною проблемою сучасної медицини. Фармакотерапія порушень збалансованості між системою зсідання та антизсіданням крові в основному базується на застосуванні препаратів гемостатичної дії. Незважаючи на велику кількість препаратів синтетичного походження, невідповідно зростає інтерес до фітопрепаратів, оскільки вони характеризуються низькою токсичністю, високим рівнем спорідненості з компонентами метаболізму організму людини, достатньою ефективністю та безпечністю при тривалому застосуванні. До таких лікарських рослин відноситься герань болотна, яка за літературними даними використовується в народній медицині як гемостатичний засіб при кровотечах різного генезу, що було підтверджено попередньо проведеним скринінгом [6]. При дослідженні судинно-тромбоцитарної ланки гемостазу були отримані дані, які свідчать про наявність активного тромбоцитарного компонента в механізмі гемостатичної дії.

**Мета дослідження** – вивчення впливу комплексу БАР герані болотної на стадії коагуляційного гемостазу.

**Об'єкт і методи дослідження.** Вивчення механізму коагуляційного гемостазу проводили на 30-ти білих нелінійних щурах масою 160-200 г. Всіх тварин було розподілено на 3 групи (по 10 в кожній): 1 група – інтактні тварини, отримували дистильовану воду; 2 група – тварини, отримували досліджуваній екстракт в його ефективній дозі 3мг/кг; 3 група – тварини, яким вводили референс-препарат – екстракт грициків звичайних ( $ED_{50} = 7\text{мг/кг}$ ). Екстракт герані болотної та препарат порівняння вводили протягом 3 днів перорально у вигляді водного розчину, стабілізованого твіном-80 [1, 7].

Через 3 дні всіх дослідних тварин виводили з експерименту та відбирали кров. Для отримання плазми кров змішували з 3,8% розчином цитрату натрію в пропорції 1:9, перемішували плавними рухами, щоб уникнути гемолізу та утворення піни. Потім кров

центрифугували впродовж 10 хвилин із швидкістю 3000 об/хв. [3].

При роботі з тваринами дотримувалася Міжнародний кодекс медичної етики (Венеція, 1983), «Європейська конвенція щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями» (Страсбург, 1986), Directive 2010/63/EU of European Parliament and Council on the protection of animals used for scientific purposes та закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження» № 3477-IV від 21.02.2006 р [5].

Експериментально визначали наступні показники коагулограми: час рекальцифікації, протромбіновий час, тромбіновий час та рівень фібриногену.

Час рекальцифікації плазми є загальноприйнятим тестом на згортання стабілізованої плазми і полягає у визначенні часу зсідання плазми після додавання до неї розчину оптимальної концентрації хлориду кальцію. Даний показник вказує на наявність гіперкоагуляції чи гіпокоагуляції.

Зовнішній шлях зсідання моделювали тестом визначення протромбінового часу, який інформує про активність факторів II, VII, X та V. Принцип методу визначення протромбінового часу полягає у встановленні часу зсідання бідної на тромбоцити цитратної плазми в присутності іонів кальцію та надлишку тканинного тромбoplastину. В цих умовах час утворення згустку фібрину залежить тільки від активності факторів протромбінового комплексу [9].

Тромбіновий час характеризував кінцевий етап зсідання крові – перетворення фібриногену в фібрин під дією тромбіну. Принцип визначення даного показника характеризується тим, що при додаванні тромбіну до цитратної плазми час утворення згустку фібрину залежить тільки від кількості та активності фібриногену в даній плазмі, активності тромбіну та наявності інгібіторів [2].

Рівень фібриногену в плазмі крові визначали за допомогою хлориду кальцію. Для цього до плазми додавали розчин 10%  $\text{CaCl}_2$  та залишали на 45хв., потім висушували та зважували згусток, що утворився. В таких умовах при високих концентраціях  $\text{CaCl}_2$  та низьких концентраціях фібриногену час реакції утворення згустку залежить тільки від кількості фібриногену [4].

Для визначення протромбінового та тромбінового часу використовували чотирьохканальний аналітичний коагулометр RT-2204 C [8].

**Показники гемокоагуляції у щурів ( $X \pm x$ ,  $n = 10$ )**

Показники	Інтактні тварини	Екстракт герані болотної, 3 мг/кг	Екстракт грициків звичайних, 7 мг/кг
Час рекальцифікації плазми, с	43,7 ± 1,4	47,0 ± 1,2*	45,5 ± 1,26*
Протромбіновий час, с	12,17 ± 0,48	12,82 ± 0,26*	12,31 ± 0,39*
Тромбіновий час, с	33,00 ± 1,24	30,00 ± 1,07*	31,5 ± 0,82*
Фібриноген, г/л	2,55 ± 0,39	2,81 ± 0,22*	2,63 ± 0,26*

**Примітка:** \* –  $p < 0,05$  по відношенню до контролю.

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакета програм Statistica for Windows 6. 0 з використанням t-критерію Ст'юдента та кореляційного аналізу [10].

**Результати досліджень та їх обговорення.**

Аналіз отриманих результатів свідчить про наявність у тварин помірно вираженої гіперкоагуляції, які отримували екстракт герані болотної та препарат-порівняння – екстракт грициків звичайних (**табл.**).

У групі тварин, яким вводили сухий екстракт з трави герані болотної спостерігалось вірогідне підвищення часу рекальцифікації в порівнянні з інтактними тваринами, що свідчить про ймовірний вплив комплексу БАР герані болотної на I фазу зсідання крові.

При введенні сухого екстракту з трави герані болотної тромбіновий час зменшувався на 9,1% по відношенню до контролю і на 4,75% у порівнянні з екстрактом грициків звичайних, який не проявив вірогідного впливу на активність тромбіну. Встановлена активність досліджуваного екстракту обумовлена наявністю в його складі аскорбінової кислоти, яка за рахунок активації ферментів дихання в печінці, підсилює її дезінтоксикаційну і білковоутворюючу функції, підвищує синтез протромбіну, який під впливом протромбінази перетворюється в тромбін.

Рівень фібриногену підвищувався в 1,1 рази та в 1,06 рази по відношенню до контролю та препарату-порівняння відповідно.

**Таблиця**

При дослідженні протромбінового часу встановлено, що при введенні сухого екстракту з трави герані болотної та препарату-порівняння – екстракту грициків звичайних – рівень протромбінового часу в плазмі крові щурів практично не змінювався.

Отримані результати свідчать про помірний вплив комплексу БАР герані болотної на I та III фазу коагуляційного гемостазу. Дана активність може бути

обумовлена наявністю елагової кислоти та рутину, які впливають на різні ланки гемостазу та сприяють нормалізації гемокоагуляції шляхом зменшення тривалості кровотечі, збільшення іонів  $Ca^{2+}$  (за рахунок флавоноїдів та елагової кислоти). Також в механізмі дії фенольних сполук може мати значення і опосередкований ефект – шляхом стабілізації в крові адреналіну, який стимулює зсідання крові та захищає вже утворені фібринові згустки від інактивації в кров'яному руслі.

**Висновки.**

1. У тварин введення сухого екстракту з трави герані болотної призводить до помірної гіперкоагуляції шляхом підвищення часу рекальцифікації, зниження тромбінового часу, зростання рівню фібриногену в крові.

2. Результати досліджень свідчать про вплив комплексу БАР герані болотної на I та III стадії гемокоагуляції, що може бути обумовлено наявністю фенольних сполук, таких як елагова кислота, аскорбінова кислота та рутин.

**Перспективи подальших досліджень.** Детальне вивчення механізмів дії сухого екстракту з трави герані болотної на внутрішній та зовнішній механізми коагуляційного гемостазу.

**Література**

1. Долгов В. В. Лабораторная диагностика нарушений гемостаза / В. В. Долгов, П. В. Свиринов – М. – Тверь : ООО Изд-во «Триада», 2005. – 227 с.
2. Козлов А. А. Пособие по методам исследования плазменного гемостаза / А. А. Козлов, А. Л. Берковский, Н. Д. Качалова. – М. : НПО «РЕНАМ», 2006. – 21 с.
3. Меньшиков В. В. Лабораторные методы исследования в клинике / В. В. Меньшиков. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
4. Момот А. П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики / А. П. Момот. – Спб. : Форма Т, 2006. – 208 с.
5. Резніков О. Г. Біотична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод рекомендації / О. Г. Резніков, А. І. Соловйов, О. В. Стефанов // Вісник фармакології і фармації. – 2006. – № 7. – С. 47–61.
6. Andersen Q. M. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications / Q. M. Andersen, K. R. Markham. – London : Press Taylor & Francis group, 2006. – 1197 p.
7. Brooks M. B. Comparative hemostasis: animal models and new hemostasis tests / M. B. Brooks, J. L. Catalano, T. Stokol // Clinics in laboratory medicine. – 2011. – Vol. 31, № 1. – P. 139–159.
8. Da Rin G. Total laboratory automation of routine hemostasis testing / G. Da Rin, G. Lippi // Journal of laboratory automation. – 2013. – Vol. 20 (10). – P. 1–4.
9. Lillicrap D. Molecular testing for disorders of hemostasis / D. Lillicrap // Internation Journal of laboratory hematology. – 2013. – Vol. 35, Is. 3. – P. 290–296.
10. Pandolfi M. The faulty statistics of complementary alternative medicine / M. Pandolfi, G. Carreras // Internal medicine. – 2013. – Vol. 25, Is. 7. – P. 607–609.

УДК 615.322:582.751:615.273

### ДОСЛІДЖЕННЯ МЕХАНІЗМІВ ДІЇ СУХОГО ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ ГЕРАНІ БОЛОТНОЇ

Остапець М. О., Деркач Н. В., Фомина Г. П.

**Резюме.** Стаття присвячена дослідженню впливу біологічно активних речовин герані болотної на механізм коагуляційного гемостазу. Встановлено, що на фоні введення екстракту герані болотної виникає помірний гіперкоагуляція по відношенню до контрольної групи. Прискорювався час рекальцифікації, що свідчить про ймовірний вплив комплексу БАР герані болотної на I фазу зсідання крові. При введенні досліджуваного екстракту знижувався тромбіновий час на 9,1% по відношенню до контролю та на 4,75% в порівнянні з референс-препаратом. Рівень фібриногену в крові збільшувався в 1,1 рази та в 1,06 рази по відношенню до контролю та препарату-порівняння – екстракту грициків звичайних відповідно, що вказує на вплив досліджуваного екстракту на I та III фази коагуляційного гемостазу. Отримані дані свідчать про помірний вплив біологічно активних речовин екстракту на I та III фази коагуляційного гемостазу. Дана активність обумовлена наявністю аскорбінової та елагової кислоти, а також рутину, які впливають на різні ланки гемостазу, сприяючи нормалізації гемокоагуляції шляхом зменшення тривалості кровотечі, збільшення іонів кальцію. Також значну роль відіграє і опосередкований ефект – шляхом мобілізації в крові адреналіну, який стимулює зсідання крові та захищає вже утворені фібринові згустки від інактивації в кров'яному руслі.

**Ключові слова:** сухий екстракт з трави герані болотної, тромбоцити, помірний гіперкоагуляція, час рекальцифікації, тромбіновий час, фібриноген.

УДК 615.322:582.751:615.273

### ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ СУХОГО ЭКСТРАКТА ТРАВЫ ГЕРАНИ БОЛОТНОЙ

Остапец М. А., Деркач Н. В., Фомина Г. П.

**Резюме.** Статья посвящена исследованию влияния биологически активных веществ герани болотной на механизм коагуляционного гемостаза. Установлено, что на фоне введения экстракта герани болотной возникает умеренная гиперкоагуляция по отношению к контрольной группе. Ускорялось время рекальцификации, что свидетельствует о вероятном влиянии комплекса БАВ герани болотной на I фазу свертывания. При введении исследуемого экстракта снижалось тромбиновое время на 9,1% по отношению к контролю и на 4,75% в сравнении с референс-препаратом. Уровень фибриногена в крови увеличивался в 1,1 раза и в 1,06 раза по отношению к контролю и препарату-сравнения экстракта пастушьей сумки соответственно, что указывает на влияние исследуемого экстракта на I и III фазы свертывания крови. Полученные результаты свидетельствуют об умеренном влиянии биологически активных веществ экстракта на I и III фазы коагуляционного гемостаза. Данная активность обусловлена наличием элаговой кислоты, аскорбиновой и рутина, которые влияют на разные звенья гемостаза, способствуют нормализации гемокоагуляции путем уменьшения длительности кровотечения, увеличения ионов кальция. Немаловажную роль играет и опосредованный эффект – путем стабилизации в крови адреналина, который стимулирует свертывания крови и защищает уже образованные фибриновые сгустки от инактивации в кровеносном русле.

**Ключевые слова:** сухой экстракт травы герани болотной, тромбоциты, умеренная гиперкоагуляция, время рекальцификации, тромбиновое время, фибриноген.

UDC 615.322:582.751:615.273

### The Studing of the Mechanism of Action of Dry Extract from Herba of Geranium Palustre

Ostapets M. O., Derkach N. V., Fomina G. P.

**Abstract.** The researches are realized according to the plan of Scientific Researches Work of the National University of Pharmacy «Pharmacological studying of biological active substances and medicine drugs by synthetic and natural origin, their using in practical medicine» (Registration №0103U000478).

Prevention and treatment bleeding of the different etiology – it is the most actual problem of modern medicine and experimental pharmacology. There are many hemostatics drugs which basically presented by synthetic drugs. But they have a lot of side-effects, because of that increased the interest to studying of phytochemical compounds, which are characterized by low toxicity, high level of connection with metabolic compound of human organism, sufficient effectively and safe during long using.

The most interest non-official medicinal plant is Geranium Palustre which by folk medicine dates is used at bleeding of different etiology. It was confirmation by conducted screening. At the studying of vessel-platelet hemostasis was received dates that indicates the presence of active platelet component in the mechanism of hemostatics activity.

The article is devoted to the studying of influence of biologically active substances from Geranium Palustre on coagulation mechanism of hemostasis. Studying of the coagulation mechanism performed at the 30 white non-linear rats. It was 3 group: 1 group – animals received 1 ml of distillate water; 2 group – animals received extract from Geranium Palustre; 3 group – rats received drug-comparison – extract of Bursa Pastoris. During works with animals followed the International codec's of medical ethics (Venice, 1983), «European convention about protection of spinebone animals, which using with experimental and others scientific purpose» (Strasbourg, 1986), Directive 2010/63/EU of European Parliament and Council on the protection of animals used for scientific purposes.

Established next indicators of coagulogram: recalcification time, prothrombin and thrombin time, level of fibrinogen. For measurement prothrombin and thrombin time are used analytical coagulograph RT-2204 C. The level of fibrinogen determined with helps of 10% calcium chloride.

It was established that on the background introduction of extract from *Geranium Palustre* there was a moderate hypercoagulation relative to the control group. Was accelerated recalcification time, that indicated about probable influence of complex BAS from *Geranium Palustre* on the I degree of coagulation. When administered of the test extract is decrease thrombin time by 9.1% relative to the control and 4.75% in comparison with the reference preparation. Blood fibrinogen levels increased 1.1-fold and 1.06-fold relative to the control and drug-extract comparison *Bursa Pastoris*, respectively, that indicated the effect of the test extract on the I and III degrees of blood coagulation.

Obtained results show moderate influence of biologically active substances from extract on the I and III degrees of coagulation. This activity is due by the presence of elagic acid, ascorbic and rutin, which affect on different link of hemostasis, promoted normalization of blood coagulation by decrease time of bleeding, an increase of calcium ions. Also important role played indirect effect – by stabilizing adrenaline in the blood, which stimulates blood clotting and protects the already formed fibrin clots from inactivation in the bloodstream.

**Keywords:** dry extract of *Geranium Palustre*, platelets, moderate hypercoagulation, recalcification time, thrombin time, fibrinogen.

*Рецензент – проф. Дев'яткіна Т. О.*

*Стаття надійшла 2. 02. 2015 р.*