

## Краткие сообщения

© Коллектив авторов, 2020

УДК 612.115.064

Успенская М.С., Ляпина М.Г., Майстренко Е.С.

# Гепариноид из корней пиона (*Paeonia anomala*): воздействие на полимеризацию и растворение фибрина при тромбообразовании

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,  
119234, г. Москва, Россия, Ленинские горы, д. 1/12

Исследование гепаринов и гепариноидов в качестве антитромботических агентов актуально для физиологии и медицины. Многие растения включают гепариноподобные компоненты (гепариноиды), которые препятствуют тромбообразованию. **Цель** – установление влияния экстракта из корней пиона «Марьин корень» (*Paeonia anomala*), содержащего гепариноид, на полимеризацию фибрина при процессах тромбообразования *ex vivo* и определение возможных механизмов его антитромботического действия. **Методика.** Исследовано влияние гепариноида из пиона (*Paeonia anomala*) на процессы растворения фибрина в условиях тромбообразования *ex vivo*. Разработана модель тромбоза (МТ) *ex vivo*. К плазме крови крыс (объем 0,2 мл) добавляли 2 НИН ед. тромбина (0,05 мл), фибриновый сгусток образовывался в течение 2–3 мин. Экстракт гепариноида из пиона (0,1 мл 0.5%-й) добавляли к преобразованному сгустку через 12 мин после моделирования тромбоза (опыт А), или одновременно с добавлением тромбина к плазме крови (опыт Б). Использовали венозную (из *v. jugularis*) кровь крыс-самцов Wistar. Полимеризацию фибрина выявляли по тесту фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) плазмы крови на нестабилизированном фибрине. В продуктах растворения фибрина под влиянием гепариноида оценивали активность тромбина (по тесту тромбинового времени), свертывающего фактора XIIIa (по определению активности фактора XIIIa) и ФДПА. **Результаты.** В опыте А спустя 10 мин после добавления гепариноида к преобразованному сгустку отмечалось появление в нем жидкой фазы, что свидетельствовало о способности исследуемого гепариноида растворять фибрин. В опыте Б сгусток или не образовывался, или же был рыхлым. Полученные данные свидетельствовали об ингибировании процесса полимеризации фибрина под влиянием гепариноида. Выявлены антитромбиновые и антифибринстабилизирующие эффекты гепариноида из пиона при добавлении к фибриновому сгустку. Рассматриваются возможные механизмы действия гепариноида на блокаду полимеризации фибрина. **Заключение.** Растительный гепариноид препятствовал процессам полимеризации фибрина или растворял образующиеся фибриновые сгустки, что связано с его антитромбиновым и антифибринстабилизирующим действием.

**Ключевые слова:** экстракт пиона; фибринолиз; тромбоз; антикоагулянт; гепариноид.

**Для цитирования:** Успенская М.С., Ляпина М.Г., Майстренко Е.С. Гепариноид из корней пиона (*Paeonia anomala*): воздействие на полимеризацию и растворение фибрина при тромбообразовании. *Патологическая физиология и экспериментальная терапия.* 2020; 64(2): 80–84.

**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.02.80-84

**Для корреспонденции:** Ляпина Маргарита Григорьевна, e-mail: lyapinal@mail.ru

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Участие авторов:** концепция и дизайн исследования; сбор и обработка материала – Успенская М.С.; написание текста – Ляпина М.Г.; редактирование – Майстренко Е.С. Утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи – все соавторы.

Поступила 16.10.2019

Принята к печати 20.04.2020

Опубликована 28.05.2020

Uspenskaya M.S., Lyapina M.G., Maistrenko E.S.

**A heparinoid from peony roots (*Paeonia anomala*): effects on polymerization and dissolution of fibrin in thrombosis**School of Biology, M.V. Lomonosov Moscow State University,  
Leninskie Gory 1/12, Moscow 119234, Russia

Studying heparins and heparinoids as antithrombotic agents is relevant for physiology and medicine. Many plants contain heparin-like components (heparinoids) that prevent thrombosis. **The aim** of the study was to identify effects of a heparinoid obtained from peony (Maryin root, *P. anomala*) roots on polymerization of fibrin and fibrinolytic activity of blood plasma and to suggest possible mechanisms of these effects in experimentally induced *ex vivo* thrombosis in rats. **Methods.** The effect of peony (*Paeonia anomala*) root heparinoid on fibrin dissolution was studied in the *ex vivo* conditions of thrombosis. For *ex vivo* modeling of thrombosis (MT), 2 NIH units of thrombin (0.05 ml) were added to 0.2 ml of rat plasma. A fibrin clot formed within 2-3 minutes. The peony heparinoid extract (0.5%, 0.1 ml) was added either to the pre-formed clot at 12 min after MT induction (experiment A) or simultaneously with the addition of thrombin to plasma (experiment B). Jugular vein blood from Wistar male rats was used. Fibrin polymerization was detected using a plasma fibrin-depolymerization activity (FDPA) test on non-stabilized fibrin. Thrombin activity (thrombin time test), coagulation factor XIIIa activity, and FDPA were evaluated in products of fibrin dissolution induced by the heparinoid. **Results.** In experiment A, at 10 min after the addition of heparinoid to the pre-formed clot, a liquid phase emerged, which indicated an ability of the pion heparinoid to dissolve fibrin. In experiment B, the clot either did not form or was liquid. These results indicated inhibition of fibrin polymerization under the action of the heparinoid. Therefore, the peony heparinoid added to the fibrin clot antagonized thrombin and fibrin stabilization. The article addresses possible mechanisms of the heparinoid inhibition of fibrin polymerization. **Conclusion.** The studied plant heparinoid prevented processes of fibrin polymerization or dissolved formed fibrin clots due to depression of thrombin activity and fibrin stabilization.

**Keywords:** peony extract; fibrinolysis; thrombosis; anticoagulant; heparinoid.**For citation:** Uspenskaya M.S., Lyapina M.G., Maistrenko E.S. A heparinoid from peony roots (*Paeonia anomala*): effects on polymerization and dissolution of fibrin in thrombosis. *Patologicheskaya Fiziologiya i Eksperimental'naya terapiya. (Pathological Physiology and Experimental Therapy, Russian Journal)*. 2020; 64(2): 80-84. (in Russian).**DOI:** 10.25557/0031-2991.2020.02.80-84**For correspondence** Lyapina Margarita Grigoryevna, leading specialist of laboratory of protective systems of blood by named Prof. B.A. Kudryashov, e-mail: lyapinal@mail.ru**Acknowledgments.** The study had no sponsorship.**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.**Contribution:** the concept and design of the study — Uspenskaya M.S.; collection and processing of material — Uspenskaya M.S.; statistical processing — Maistrenko E.S., Lyapina M.G.; writing a text — Lyapina M.G.; editing — Maistrenko E.S. Approval of the final version of the article, responsibility for the integrity of all parts of the article — all authors.**Information about the authors:**Uspenskaya M.S., <https://orcid.org/0000-0002-5368-4026>Lyapina M.G., <https://orcid.org/0000-0001-6039-5161>Maistrenko E.S., <https://orcid.org/0000-0003-3227-1465>

Received 16.10.2019

Accepted 20.04.2020

Published 28.05.2020

Известно, что во многих растениях (бурые морские водоросли, кора березы, разные виды пионов и др.) содержится гепариноподобный сульфатированный гликозаминогликан [1-5]. Механизм антикоагулянтного действия гепариноподобных компонентов растений известен и заключается в ингибировании как фактора Ха, так и тромбина в зависимости от их молекулярной массы [6, 7]. По антикоагулянтному действию в организме компоненты корня пионов (древовидного, молочноцветкового, желтого, «Марьяна корня») подобны низкомолекулярным гепаринам (НМГ) животно-

го или синтетического происхождения [8]. Препараты НМГ сохраняют свое действие в течение 1 сут, не проявляя побочных отрицательных эффектов в виде повышенной кровоточивости. НМГ являются препаратами выбора для профилактики и лечения тромбозов [3]. Применяемый в клинике препарат Сулодексид (СЛД) животного происхождения также включает НМГ, но в отличие от него может вводиться перорально [10]. Установлено, что растения могут служить источником лекарственного сырья не только антикоагулянтов, но и фибринолитиков, и тромболитиков [11-

13]. Ранее было показано, что экстракты из корней пиона «Марьин корень» проявляют антикоагулянтное (по тесту активированного частичного тромбопластинного времени) действие как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*, и оказывают гипополипидемическое действие при нарушениях функционирования гемостатической системы и метаболических процессов в организме, в частности, при нарушении жирового обмена [14, 15].

Цель исследования -- установление влияния экстракта из корней пиона «Марьин корень» (*Paeonia anomala*), содержащего гепариноид, на полимеризацию фибрина при процессах тромбообразования *ex vivo* и определение возможных механизмов его антитромботического действия.

### Методика

*In vitro* с помощью коагулологических тестов исследованы растворимые продукты нестабилизированного фибрина, образующиеся под действием экстракта из корней «Марьин корень».

В исследованиях применяли экстракт корней пиона «Марьин корень» (*P. anomala*), содержащий гепариноподобное вещество, наличие которого определяли фотоэлектроколориметрическим методом с использованием Азура А (красителя на гепарин) и протаминсульфата (ингибитора гепарина). Гепариноид в количестве 1,0 мг, растворенный в 0,5 мл физиологического раствора, содержал 30,0 МЕ гепарина (метод В.А. Шестакова и соавт.) [16].

Эксперименты на животных проводили в соответствии с этическими принципами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, март, 1986), Базельской и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВО Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова, биологический факультет. Кровь у животных брали из яремной вены, в качестве консерванта использовали цитрат натрия (3,8%) в соотношении 9:1. Для получения бедной тромбоцитами плазмы кровь центрифугировали при 3000g в течение 10–12 мин. Разработана модель тромбоза (МТ) *ex vivo*. В пробирки к 0,2 мл плазмы крови крыс добавляли 2 НИН ед. тромбина (0,05 мл), фибриновый сгусток образовывался в течение 2–3 мин. Одновременно с добавлением тромбина (опыт Б) или через 12 мин после добавления тромбина (опыт А) добавляли 0,1 мл 0,2%-ного раствора гепариноида из пиона. Полимеризацию фибрина выявляли по тесту фибриндеполимеризационной активности (ФДПА) плазмы крови на нестабилизиро-

ванном фибрине. Оценивали влияние гепариноида на активность образующихся в условиях *in vitro* продуктов растворения фибрина, в которых измеряли активность тромбина (по тесту тромбинового времени), свертывающего фактора XIIIa (по определению активности фактора XIIIa) и ФДПА [17].

Для характеристики параметров фибринолитического звена противосвертывающей системы (ПСС) крови готовили фибриновые нестабилизированные фактором XIIIa пластины, характеризующиеся наличием водородных связей в растворимом фибрин-полимере. Определяли суммарную фибринолитическую активность (СФА), включающую активность комплексов гепарина с компонентами плазмы крови и активность плазмина, а также ФДПА, отражающую процесс деполимеризации фибрина [17].

Все данные обработаны статистически с помощью пакета программ Statistica7. Использовали непараметрический критерий Вилкоксона и t-критерий Стьюдента.

### Результаты

Полученный нами гепариноид, содержащийся в экстракте из корней пиона «Марьин корень», обладал антикоагулянтным действием и антифибринстабилизирующей активностью. По сравнению с контролем гепариноид повышал активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) на 43% (контроль – 100%), и снижал активность фактора XIIIa на 25% (контроль – 100%).

В опыте А, на модели тромбообразования через 10 мин после добавления к преобразованному фибриновому сгустку 0,1 мл 0,2%-го гепариноида, установлено появление жидкой фазы, которую мы анализировали на наличие противосвертывающих свойств. В жидкой фазе содержались продукты растворения фибрина (ПРФ). Контролем служила нормальная плазма крови. ПРФ обладали антитромбиновой активностью (по тесту ТВ) и ФДПА, увеличивая их по сравнению с контролем на 11,1 и 32,0 % соответственно. Кроме того, ПРФ снижали активность фактора XIIIa на 12,0 ед/мл (т.е. на 14,2%) по сравнению с контролем (табл.).

В опыте Б в жидкой фазе, содержащей ПРФ, через 20 мин после образования фибринового сгустка установлено повышение антикоагулянтной активности по тесту ТВ на 36%, ФДПА – на 76% и антифибринстабилизирующей активности на 24% по сравнению с контролем.

### Обсуждение

На основании проведенного исследования в жидких фазах, представляющих собой продукты раство-

Таблица

**Антитромбиновая, фибриндеполимеризационная и антифибринстабилизирующая активности продуктов растворения фибрина на модели тромбообразования после добавления гепариноида**

Условия опытов	Активности продуктов растворения фибрина		
	Тромбиновое время, с (%)	Фибриндеполимеризационная активность, мм <sup>2</sup> (%)	Анти свертывающий фактора XIIIa, ед/мл (%)
Опыт А	33,1 ± 0,6 (111,1%)*	15,8 ± 0,9 (132%)**	73,0 ± 5,1 (85,8%)*
Опыт Б	40,8 ± 0,6 (135%)**	21,2 ± 1,1 (176%)**	65,0 ± 3,5 (76%)**
Контроль	30,0 ± 0,4 (100%)	12,0 ± 1,3 (100%)	85,0 ± 5,1 (100%)

**Примечание.** Статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятого за 100%. \*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

рения фибрина под влиянием гепариноида из пиона, было показано повышение фибриндеполимеризующей активности на 32% (опыта А) и 76% (опыт Б) по сравнению с показателями в крови здоровых крыс. Эти эксперименты свидетельствуют, что гепариноид из пиона способен препятствовать процессам тромбообразования, что доказывает опыт Б, когда гепариноид добавляли к плазме крови предварительно до формирования фибринового сгустка. Последующее добавление тромбина в систему уже содержащую гепариноид, предотвращало процессы его полимеризации. Поэтому можно говорить о механизме антиполимеризационного действия гепариноида в процессе полимеризации фибрина, обусловленном, с одной стороны, его ингибированием активности тромбина, участвующего в начальной стадии полимеризации [6], а с другой стороны, о блокаде активности фактора XIII [18], участвующего в заключительной стадии полимеризационного процесса [3, 8]. Впервые выявлено, что при моделировании экспериментального тромбоза *ex vivo* добавление к кровяному сгустку 0,2 мл 0,2%-го гепариноида приводило к возрастанию ФДПА крови.

Анализируя полученные результаты, необходимо также отметить, что экстракт из корней пиона «Марьян корень» оказывает не только антикоагулянтный эффект, подобно гепарину [8], но и особый вид фибринолитического действия – фибриндеполимеризационное. Ранее [1] сообщалось об ограничении взаимодействия тромбина с фибриногеном под влиянием ингибиторов растительного происхождения, что и мы наблюдали в наших исследованиях. Кроме того, мы установили наличие в продуктах растворения фибринового сгустка антифибринстабилизирующей активности, что также обусловлено присутствием гепариноида, который сам по себе обладает свойством снижать активность фактора XIIIa крови.

Экстракт из корней пиона представляет фармакологический интерес в плане его применения для профилактики ряда заболеваний, (в том числе и сердечно-сосудистых), осложняющихся тромбозами.

### Заключение

Проведенное исследование доказало ингибирующий полимеризацию фибрина эффект растительного гепариноида из пиона «Марьян корень». Установлена его защитная функция при развитии состояния предтромбоза или тромбоза на модели тромбообразования *ex vivo*. Выявлено, что гепариноид уменьшает активность свертывающих факторов (фермента тромбина, фактора XIIIa, одновременно ограничивая процесс полимеризации фибрина. Раскрыт механизм антиполимеризационного действия гепариноида, который заключается в его способности вмешиваться в процессы полимеризации фибрина, как на начальном, так и на конечном этапе. Гепариноид может обеспечить растворение появляющихся в кровотоке фибриновых сгустков за счет своего прямого действия на полимеризующийся фибрин. Все указанные эффекты растительного гепариноида позволяют говорить об эффективности и перспективности изучения этого агента в целях предупреждения и лечения тромбоэмболических заболеваний и тромботических осложнений.

### Литература

#### (п.п. 3-8; 10-13 см. References)

1. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П., Карпова И.А., Русакова О.А., Самойлов М.А. и др. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения. *Медицинская наука и образование Урала*. 2012; 13(1): 163–70.
2. Кузнецова С.А., Дрозд Н.Н., Кузнецов Б.Н., Макаров В.А., Левданский В.А., Мифтаков Н.Т. Антикоагулянтное средство. 2009; Патент № 2399377. Россия.
3. Кричевский Л.А. Низкомолекулярные гепарины в современной системе управления свертываемостью крови. *Анестезиоло-*

- гия и реаниматология. Медицинская реабилитация. 2015; 15(116) – 16(117): 42–8.
14. Ляпина М.Г., Оберган Т.Ю., Ляпина Л.А., Успенская М.С. Способность гепариноида из коры корней пиона предотвращать процессы тромбообразования. *Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова, издательство «Наука» (Спб.)*. 2017; 103(10): 1201-6.
  15. Оберган Т.Ю., Ляпина М.Г., Успенская М.С., Ляпина Л.А. Гиполипидемическое и антитромботическое действие гепариноида из пиона при метаболическом синдроме. *Атеросклероз*. 11(3): 14-20.
  16. Шестаков В.А. Определение концентрации гепарина. *Грудная хирургия*. 1975; 2: 41-4.
  17. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. *Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови*. М.: Адвансд Солюшнз. 2012.
  7. Van Montfoort M.L., Meijers J.C. Anticoagulation beyond direct thrombin and factor Xa inhibitors: indications for targeting theintrinsic pathway. *Thromb. Haemost.* 2013; 110(2): 223–32.
  8. Manion JS, Thomason JM, Langston VC, Claude AK, Brooks MB, Mackin AJ, Lunsford KV. Anticoagulant effects of inhaled unfractionated heparin in the dog as determined by partial thromboplastin time and factor Xa activity. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2016; 26(1): 132-6. doi: 10.1111 / vec.12344.
  9. Krichevsky L.A. Low Molecular weight heparins in the modern blood coagulation control system. Anesthesiology and resuscitation. *Medical rehabilitation*. 2015; 15(116) – № 16(117): 42-8. (in Russian)
  10. Milani M. The sulodexide, a Review of new clinical studies. *Online J. Medicine and Medical Science Research*. 2013; Issue 5: 57–61.
  11. Pawlaczyk I., Czerchawski L., Kuliczkowski W., Karolko B., Pilecki W., Witkiewicz W., Gancarz R. Anticoagulant and anti-platelet activity of polyphenolic-polysaccharide preparation isolated from the medicinal plant *Erigeron canadensis* L. *Thromb. Res*. 2011; 127(4): 328–40.
  12. Wu M., Xu L., Zhao L., Xiao C., Gao N., Luo L., et al. Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from sea cucumber. *Mar. Drugs*. 2015; 13(4): 2063–84.
  13. Zhang S.B. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates. *Food Chem*. 2016; 202: 1-8.
  14. Lyapina M.G., Obergan T.Y., Lyapina L.A., Uspenskaya M.S. The ability heparinoida from the root bark of the peony to prevent the process of thrombosis. *Russian physiological journal. I.M. Sechenov*, 2017; 103(10): 1201-6. (in Russian)
  15. Obergan T.Yu., Lyapina M.G., Uspenskaya M.S., Lyapina L.A. lipid-Lowering and antithrombotic effect of heparinoid from pion in metabolic syndrome. *Atherosclerosis*. 2017; 11(3): 14-20. (in Russian)
  16. Shestakov V.A. Determination of heparin concentration. *Thoracic surgery*. 1975; 2: 41-4. (in Russian)
  17. Lyapina L.A., Grigorieva M.E., Obergan T.Yu., Shubina T.A. *Theoretical and practical issues of studying the functional state of the anticoagulant blood system. [Teoreticheskie i prakticheskie voprosy izucheniya funktsional'nogo sostoyaniya protivosvertvyayushchey sistema krovi]*. Moscow: Advanced Solutions. 2012. (in Russian)
  18. Adam EH, Kreuer S, Zacharowski K, Weber CF, Wildenauer R. FactorXIII: Pharmacodynamic and pharmacokinetic characteristics. *Anaesthesist*. 2017; 66(1): 52-9. doi: 10.1007 / s00101-016-0249-1
  19. Xiao C., Lian W., Zhou L., Gao N., Xu L., Chen J., et al. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors. *Thromb Res*. 2016; 146: 59–68.

### References

1. Byshevsky A.Sh., Galyan S.L., Kalinin E.P., Karpova I.A., Rusakova O.A., Samoilov M.A. et al. Inhibitors of self-Assembly of fibrin of plant origin. *Medical science and education of the Urals*. 2012; 13(1): 163-70. (in Russian)
2. Kuznetsova S.A., Drozd N.N., Kuznetsov B.N., Makarov V.A., Levdansky V.A., Miftakhov N.T. *Anticoagulant remedy*. 2009; Patent No. 2399377. Russia. (in Russian)
3. Arata PX, Quintana I, Raffo MP, Ciancia M. Novel sulfated xylogalactoarabinans from green seaweed *Cladophora falklandica*: Chemical structure and action on the fibrin network. *Carbohydr Polym*. 2016; 154: 139-50. doi: 10.1016 / j.2016.07.088. Epub 2016 Jul 21.
4. Naqash S.Y., Nazeer S.A. Anticoagulant, antiherpetic and antibacterial activities of sulphated polysaccharide from Indian medicinal plant *Tridax procumbens* L. (Asteraceae). *Appl. Biochem. Biotechnol*. 2011; 165(3–4): 902–12.
5. Stebelski L., Brichant J.F., Pierard L., Peters P. Perioperative management of direct oral anticoagulants: not much evidence but several different approaches. *Rev. Med. Liege*. 2014. 69(12): 671–9.
6. Mourier PA, Guichard OY, Herman F, Sizun P, Viskov C. New Insights in Thrombin Inhibition Structure-Activity Relationships by Characterization of Octadecasaccharides from Low Molecular Weight Heparin. *Molecules*. 2017; 22(3). 8. doi: 10.3390 / molecules 22030428.

### Сведения об авторах:

**Успенская Марианна Сергеевна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ботанического сада биологического факультета МГУ, e-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru;

**Ляпина Маргарита Григорьевна**, вед. спец. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; e-mail: lyapinal@mail.ru;

**Майстренко Евгения Семеновна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. защитных систем крови им. проф. Б.А. Кудряшова каф. физиологии человека и животных биологического факультета МГУ; e-mail: mag238@mail.ru