

УДК 615.322: 616.14-002: 615.273.53

DOI: 10.24959/ubphj.17.95

Г. С. КАЛЕНИЧЕНКО, Л. М. МАЛОШТАН, Ю. А. ФЕДЧЕНКОВА

Національний фармацевтичний університет

## Вивчення впливу екстракту з листя ліщини звичайної на коагуляційний гемостаз

**Актуальність.** Внаслідок недостатньої вивченості фармакологічної дії ліщини звичайної (*Corylus avellana*) народна медицина надає їй незрівнянно більшого значення, ніж наукова. У зв'язку з цим фармакологічне вивчення ліщини звичайної є доцільним з метою розширення області застосування цієї лікарської рослини, в тому числі вивчення її антикоагулянтної дії.

**Мета роботи** полягала у вивченні впливу екстракту з листя ліщини на коагуляційну ланку гемостазу за умов експериментального тромбофлебіту периферичних вен у кролів.

**Матеріали та методи.** Об'єктом дослідження був густий екстракт з листя ліщини. Дослідження антикоагулянтної дії екстракту проводили на моделі експериментального тромбофлебіту периферичних вен у кролів із застосуванням скринінгових тестів для оцінки коагуляційної ланки гемостазу.

**Результати та їх обговорення.** Встановлено, що досліджуваний екстракт впливає на внутрішній шлях утворення протромбінази та на кінцевий етап згортання крові – фібриноутворення. Подовження АЧТЧ свідчить про наявність прямої антикоагулянтної дії екстракту з листя ліщини, що за виразністю переважає препарат порівняння ескувіт.

**Висновки.** Отримані результати досліджень дозволяють рекомендувати екстракт з листя ліщини звичайної в якості лікувально-профілактичного засобу для запобігання поширення тромбоутворення при тромбофлебитах та тромбозах.

**Ключові слова:** екстракт з листя ліщини звичайної; тромбофлебіт; антикоагулянтна дія

A. S. Kalenichenko, L. N. Maloshtan, Y. A. Fedchenkova

### Study of the influence of extract from the leaves of *Corylus avellana* on coagulation hemostasis

**Topicality.** In consequence, insufficiently studied of the pharmacological actions of *Corylus avellana*, folk medicine makes it more important significance than scientific. In this connection pharmacological study of *Corylus avellana* is reasonable in terms of expanding field of application of this herb, including the study of its anticoagulant action.

**Aim.** To study the effect of the extract from the leaves of *Corylus avellana* on the coagulation hemostasis in experimental model of thrombophlebitis of peripheral veins in rabbits.

**Materials and methods.** The object of the study was a thick extract from the leaves of *Corylus avellana*. The study of the anticoagulant effect of the extract was carried out on the model of experimental thrombosis of peripheral veins in rabbits using screening tests for the assessment of coagulation hemostasis.

**Results and discussion.** It has been established that the investigated extract affects the intrernal pathway formation of prothrombinase and the final stage of blood clotting – fibrin formation. Prolongation of APTT has indicates a direct anticoagulant effect of the extract from the leaves of *Corylus avellana*, expression that action prevails comparison drug eskuvit.

**Conclusions.** The obtained results allow to recommend the extract from the leaves of *Corylus avellana* as a therapeutic and preventive remedy in order to prevent the spread of thrombosis with thrombophlebitis and thrombosis.

**Key words:** extract from the leaves of *Corylus avellana*; thrombophlebitis; anticoagulant activity

А. С. Калениченко, Л. Н. Малаштан, Ю. А. Федченкова

### Изучение влияния экстракта из листьев лещины обыкновенной на коагуляционный гемостаз

**Актуальность.** Вследствие недостаточной изученности фармакологического действия лещины обыкновенной (*Corylus avellana*) народная медицина придает ей несравненно большее значение, чем научная. В связи с этим фармакологическое изучение лещины обыкновенной целесообразно в плане расширения области применения этого лекарственного растения, в том числе изучение его антикоагулянтного действия.

**Цель работы** заключалась в изучении влияния экстракта из листьев лещины на коагуляционное звено гемостаза в условиях экспериментального тромбофлебита периферических вен у кроликов.

**Материалы и методы.** Объектом исследований был густой экстракт из листьев лещины. Исследование антикоагулянтного действия экстракта проводили на модели экспериментального тромбофлебита периферических вен у кроликов с использованием скрининговых тестов для оценки коагуляционного звена гемостаза.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что исследуемый экстракт влияет на внутренний путь образования протромбиназы и на конечный этап свертывания крови – фибринообразование. Удлинение АЧТВ свидетельствует о наличии прямого антикоагулянтного действия экстракта из листьев лещины, что по выраженности действия преобладает препарат сравнения ескувит.

**Выводы.** Полученные результаты исследований позволяют рекомендовать экстракт из листьев лещины обыкновенной в качестве лечебно-профилактического средства для предотвращения распространения тромбообразования при тромбофлебитах и тромбозах.

**Ключевые слова:** экстракт из листьев лещины обыкновенной; тромбофлебит; антикоагулянтное действие

### ВСТУП

Ліщина звичайна (*Corylus avellana* L.) – єдиний вид роду, що зустрічається у дикорослому стані в Україні [1]. Ця сировина багата різними класами БАВ, зокрема фенольними сполуками. До теперішнього часу з листя ліщини звичайної, з різних флор зростання, були виділені такі фенольні сполуки як хлорогенова кислота, неохлорогенова кислота, кофейна кислота, елагова кислота, галова кислота, кумарова кислота, кемпферол, кверцетин, мірицетин, афзелін, катехін та ін. [2-4]. Цим сполукам притаманна антиоксидантна, протизапальна та капілярозміцнююча дія, яка і обумовлює широке застосування ліщини в народній медицині при варикозному розширенні вен, капілярних геморагіях, трофічних виразках гомілки тощо. Однак внаслідок недостатньої вивченості фармакологічної дії сировини народна медицина надає ліщині незрівнянно більшого значення, ніж наукова. У зв'язку з цим фармакологічне вивчення екстракту з листя ліщини звичайної є доцільним у плані розширення області застосування цієї лікарської рослини в якості лікарського засобу з флеботропною дією. До важливих механізмів флеботропної дії відносять збільшення венозного тону, ендотеліопротективну та протизапальну дію, що було вивчено в попередніх наших дослідженнях фармакологічної активності екстракту з листя ліщини. Також частина фармакологічної дії флеботропних препаратів може бути реалізована за рахунок впливу на активність згортаючих факторів крові коагуляційної ланки гемостазу [5]. Тому метою нашої роботи було вивчення впливу ліщини звичайної на систему коагуляційного гемостазу за умов експериментального тромбоемболію периферичних вен у кролів. Це є актуальним дослідженням, так як гіперкоагуляція – розповсюджене ускладнення найпоширеніших судинних захворювань, яка є причиною розвитку тромбоемболій.

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом дослідження був густий екстракт з листя ліщини звичайної, одержаний методом дрібної мацерації шляхом екстракції спиртом етиловим у співвідношенні сировина-екстрагент 1 : 15. Для отримання субстанції з листя ліщини звичайної використовували сировину, заготовлену в червні 2015 року в Харківській області (Вільшанський район, околиці селища Протопопівка). В сировині ліщини звичайної (в перерахунку на абсолютно суху сировину) визначено кількісний вміст суми фенольних сполук (в перерахунку на кислоту галлову) –  $9,41 \pm 0,04$  %, суми гідроксикоричних кислот (в перерахунку на кислоту хлорогеновою) –  $2,57 \pm 0,04$  %, суми флавоноїдів (у перерахунку на рутин) –  $2,71 \pm 0,03$  %. Експериментальний тромбоемболію відтворювали введенням в крайову вену вуха 0,2 мл розчину Люголя за методикою, розробленою на кафедрі фізіології та анатомії людини НФаУ [6]. Така модель дозволяє отримати порушення кровотоку внаслідок стазу і запалення венозної стінки, що характерно для більшості тром-

ботичних станів у людини. В експерименті використовували 14 кролів масою 3,0-3,5 кг, розділених на 3 групи: 1 – контрольна патологія (4 кролі) – неліковані тварини з відтвореною патологією; 2 – тварини, які на тлі тромбоемболію отримували лікування густим екстрактом з листя ліщини у дозі 25 мг/кг (6 кролів); 3 група – тварини, які на тлі тромбоемболію отримували лікування препаратом порівняння ескувітом у дозі 5 мг/кг (4 кролі). Як препарат порівняння використовували аналог за фармакологічною дією таблетки ескувіт (АТ «Галичфарм», Україна).

Досліджуваний екстракт та препарат порівняння вводили 1 раз на день внутрішньошлунково за 6 днів до моделювання патології та протягом всього експерименту. Виведення тварин з експерименту проводили на 10 добу після індукції тромбоемболію шляхом повітряної емболії. Усі втручання та евтаназію тварин здійснювали з дотриманням принципів «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей» (Страсбург, 1986) та I-го Національного конгресу з біоетики (Київ, 2001). Для встановлення деяких механізмів антикоагулянтної дії екстракту (а саме впливу на стадії та фактори згортання) використовували скринінгові тести для оцінки коагуляційної ланки гемостазу.

Для оцінки впливу екстракту з листя ліщини на внутрішню та спільну ланки коагуляційного каскаду було визначено рівень активованого часткового тромбoplastичного часу (АЧТЧ). Оцінка впливу екстракту на зовнішній шлях коагуляційного гемостазу була проведена шляхом визначення протромбінового часу (ПЧ), міжнародного нормалізованого відношення (МНВ) та протромбінового індексу (ПІ). Для оцінки активності прокоагулянтної ланки гемостазу був визначений рівень тромбінового часу (ТЧ), фібриногену [7]. Вимірювання здійснювали за допомогою тест наборів АЧТЧ (Технологія – стандарт), Техпластин – тест (Технологія – стандарт), Тромбо – тест (Технологія – стандарт), Тех – фібриноген – тест (Технологія – стандарт) з використанням коагулометра. Показники реєстрували до відтворення патології (вихідні значення, зазначені в таблиці як 0) та на 10-у добу після відтворення патології.

Отримані результати обробляли за програмою Statistica 6.0 на основі дисперсійного аналізу для даних з повторними вимірюваннями з використанням критеріїв Крускала-Уоліса, Мана-Уїтні та методу Данета при рівні вірогідності  $p < 0,05$ .

### РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження показників коагуляційної ланки гемостазу показало, що в умовах експериментального тромбоемболію периферичних вен кролі з групи контрольної патології мали більш виражені зміни АЧТЧ, ПЧ, ТЧ у бік гіперкоагуляції у порівнянні з вихідними даними. Адже зниження показників АЧТЧ, ПЧ та ТЧ вказують на гіперкоагуляційні порушення крові. Також про гіперкоагуляцію свідчить зниження рівня

Таблиця

**ПОКАЗНИКИ КОАГУЛЯЦІЙНОГО КОМПОНЕНТУ СИСТЕМИ ГЕМОСТАЗУ В УМОВАХ ЛІКУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ТРОМБОФЛЕБІТУ ЕКСТРАКТОМ З ЛИСТЯ ЛІЩИНИ**

Показник	День	Групи тварин		
		контрольна патологія	екстракт з листя ліщини	ескувіт
Протромбіновий час, с	0	7,47 ± 0,10	7,33 ± 0,03	7,77 ± 0,13
	10	5,80 ± 0,32*	7,12 ± 0,08*	7,2 ± 0,04*/**
ПІ, %	10	129,91 ± 0,15	103,12 ± 0,03*/**	107,86 ± 0,03**
МНВ	10	0,74 ± 0,1	0,96 ± 0,04	0,91 ± 0,02
Тромбіновий час, с	0	35,8 ± 0,35	33,03 ± 0,92	31,23 ± 0,39
	10	23,77 ± 0,86	32,12 ± 0,66*/**/**	24,4 ± 0,52
АЧТЧ, с	0	27,13 ± 1,15	26,97 ± 0,64	28,4 ± 0,79
	10	20,47 ± 0,86*	31,13 ± 1,54*/**/**	38,43 ± 0,86*/**
Фібриноген, г/л	0	2,12 ± 0,15	2,00 ± 0,26	1,99 ± 0,07
	10	5,23 ± 0,55*	2,00 ± 0,13**/**	3,23 ± 0,15*/**

Примітки: \* – відхилення достовірне відносно вихідних даних,  $p < 0,05$ ; \*\* – відхилення достовірне відносно контрольної патології,  $p < 0,05$ ; \*\*\* – відхилення достовірне відносно ескувіту,  $p < 0,05$ .

МНВ (нижче 1,0) та підвищення ПІ (норма 90-105 %). Отримані дані свідчать про те, що у групі контрольної патології спостерігалися порушення коагуляційної ланки гемостазу на всіх етапах згортання крові в бік гіперкоагуляції, а також зміни рівнів факторів коагуляційного каскаду як зовнішнього, так і внутрішнього шляху згортання крові. В той час підвищений рівень фібриногену може вказувати не тільки на тромбоутворення, а і на розповсюдження запального процесу (табл.).

Відомо, що вкорочення АЧТЧ характеризує прискорене утворення активного комплексу протромбінази (фактор  $V_a$  + фактор  $X_a$  +  $Ca^{2+}$ ) за внутрішнім механізмом коагуляції, в якому ключову роль відіграє мембранний фосфоліпід тромбоцитів (тромбоцитарний фактор 3-кефалін), що слугує каталізатором протромбіноутворення. Цей механізм починається всередині пошкоджених судин, де на фосфоліпідах мембран формених елементів (переважно тромбоцитах) активується плазменний фактор XII. Плазменні фактори VIII, IX, XI, XII та прекалікреїн беруть участь тільки у внутрішньому механізмі згортання крові, саме тому тест АЧТЧ чутливий до зміни їх активності та не залежить від дефіциту тромбоцитів [8]. Цей тест використовують для оцінки специфічної активності антикоагулянтів прямої дії [9].

Дані, отримані в результаті експерименту, дозволяють зробити висновок, що у групі лікування густим екстрактом з листя ліщини на 10-й день досліді відбувалось вірогідне подовження АЧТЧ у порівнянні з вихідними даними, контрольною патологією та препаратом порівняння. Рівень АЧТЧ достовірно подовжувався в 1,5 рази у порівнянні з групою контрольної патології, що свідчить про виражений вплив досліджуваного екстракту на стадію протромбіноутворення за внутрішнім механізмом згортання крові. Також отримані результати свідчать про прямий антикоагулянтний ефект екстракту з листя ліщини, що імовірно, обумовлено дією флавоноїдів.

Дослідження впливу екстракту на протромбіноутворення за зовнішнім та загальним механізмом згортання крові визначали в тесті ПЧ. Відомо, що утворення протромбінази за зовнішнім механізмом пов'язано з вивільненням із субендотелію пошкоджених тканин тробопластину (фактор III). Цей фактор разом з фактором VII у присутності  $Ca^{2+}$  активує фактор X, що входить до складу активної протромбінази. Таким чином, тест ПЧ дає змогу оцінити активність факторів протромбінового комплексу (II, V, VII, X), в тому числі дозволяє визначити належність дослідженої речовини до антикоагулянтів непрямої дії [8, 9]. В експерименті нами було встановлено, що в групі лікування екстрактом відбувалось достовірне збільшення ПЧ у порівнянні з контролем. Проте показник МНВ не входив до терапевтичного діапазону та залишався в межах фізіологічної норми.

Для оцінки кінцевого етапу згортання крові (перетворення фібриногену на фібрин) досліджували ТЧ та кількість фібриногену. Вкорочення показника тромбінового часу свідчить про підвищення активності процесу фібриноутворення, що також може бути пов'язано з підвищенням кількості фібриногену в плазмі [8]. Виходячи із даних таблиці, можна зробити висновок, що екстракт з листя ліщини вірогідно збільшував ТЧ в 1,4 рази у порівнянні з контролем та вірогідно перевищував препарат порівняння ескувіт. Також у групі лікування екстрактом з листя ліщини спостерігалось вірогідне зменшення фібриногену у 2,6 рази у порівнянні з контрольною патологією.

Отримані нами дані свідчать про виражений вплив досліджуваного екстракту з листя ліщини на внутрішній шлях утворення протромбінази та на кінцеву фазу згортання крові – фібриноутворення.

Слід відмітити, що в дослідженні механізмів антикоагулянтної дії препарат порівняння ескувіт проявив менш виражений вплив на показники коагуляційної ланки гемостазу, про що свідчить показник ПІ, який був вищий за показник у групі лікування екстрактом, та показник ТЧ, який достовірно не відрізнявся від показників контроль-

ної патології. Також рівень фібриногену був достовірно збільшений в 1,6 рази по відношенню до групи лікування екстрактом з листя ліщини. Отже, отримані дані вказують на те, що за виразністю антикоагулянтної дії екстракт з листя ліщини дещо переважав препарат порівняння ескувіт.

### ВИСНОВКИ

Встановлено, що екстракт володіє прямою антикоагулянтною дією на моделі експериментального тромбофлебіту, впливаючи на внутрішній шлях ут-

ворення протромбінази та на кінцевий етап згортання крові – фібриноутворення.

За виразністю антикоагулянтної дії в умовах експериментального тромбофлебіту екстракт з листя ліщини дещо переважав препарат порівняння ескувіт.

Отримані результати досліджень дозволяють рекомендувати екстракт з листя ліщини в якості лікувально-профілактичного засобу для запобігання поширенню тромбоутворення при тромбофлебитах та тромбозах.

**Конфлікт інтересів:** відсутній.

### ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Определитель высших растений Украины / под ред. Д. Н. Доброчаева, Н. И. Котова, Ю. Н. Прокудина и др. – К. : Наук. думка, 1987. – С. 548.
2. Хворост, О. П. Фармакогностичне вивчення рослин порядку березоцвіті та отримання нових біологічно активних субстанцій різної спрямованості дії: автореф. дис. ... докт. фарм. наук: спец. 15.00.02 «Фармацевтична хімія та фармакогнозія» / Хворост Ольга Павлівна; Національний фармацевтичний університет. – Х., 2006. – 34 с.
3. Мовсумов, И. С. Биологически активные вещества *Corylus avellana* L., произрастающей в Азербайджане / И. С. Мовсумов, Д. Ю. Юсифова, Э. А. Гараев // Химия растительного сырья. – 2013. – № 4. – С. 259–261.
4. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds / I. Oliveira, A. Sousa, P. Valenta et al. // Food Chemistry. – 2007. – № 105. – P. 1018–1025.
5. Духанин, А. С. Актуальные вопросы применения ангиопротекторов / А. С. Духанин, Л. Н. Шимановский // Междунар. мед. журн. – 2015. – № 2. – С. 79–85.
6. Спосіб моделювання тромбофлебітів периферичних судин: Інформаційний лист, протокол № 25 від 20.11.2002 р., Національний фармацевтичний університет МОЗ України / уклад. : Л. М. Малоштан, О. В. Должикова, І. О. Батура. – К. : Укрмедпатентпром, 2002. – 2 с.
7. Бокарев, И. Н. Лабораторные методы исследования системы свертывания крови : метод. рек. / И. Н. Бокарев. – 2-е изд. – М. : АТГПСС им. А. Шмидта – Б. А. Кудряшова, 2011. – 15 с.
8. Медведев, В. В. Клиническая лабораторная диагностика: справочник для врачей / В. В. Медведев, Ю. З. Волчек ; под ред. В. А. Яковлева. – СПб. : Гиппократ, 2006. – 360 с.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. чл.-кор. РАМН, профессора Р. У. Хабриева. – 2-изд. перераб. и доп. – М. : Медицина, 2005. – 832 с.

### REFERENCES

1. Dobrochaeva, D. N., Kotov, N. I., Prokudin, Yu. N. et al. (Eds.). (1987). *Opredelitel' vysshikh rastenii Ukrainy [The determinant of higher plants in Ukraine]*. Kiev: Naukova dumka, 548.
2. Khvorost, O. P. (2006). Farmakognostychnye vyvchennia roslin poriadku berezocviti ta otrymannia novykh biologichno aktyvnykh substancii rıznoï spriamovanosti dii' [The pharmacognostic study of Betulales order plants and creation of new biologically active substances with different action direction]: *Extended abstract of candidate's thesis*. National University of Pharmacy. Kharkov, 34.
3. Movsumov, I. S., Jusifova, D. Ju., Garaev, Je. A. (2013). *Khimiia rastitel'nogo syr'ia. – Chemistry of plant raw materials, 4, 259–261.*
4. Oliveira, I., Sousa, A., Valenta, P., Paula, B., Andrade, I., Ferreres, F. et al. (2007). Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chemistry, 105*, 1018–1025.
5. Duhanin, A. S., Shimanovskii, L. N. (2015). *Mezhdunarodnyi medicinskii zhurnal. – International Medical Journal, 2*, 79–85.
6. Maloshtan, L. M., Dolzhykova, O. V., Batura, I. O. (2002). Spisib modeliuvannia tromboflebitiv peryferychnykh sudyn [The method of modeling peripheral vascular thrombophlebitis]. *Informaciyni lyst, (25)*. Natsionalnyi farmatsevtichnyi universytet. Kyiv: Ukrmedpatentprom, 2.
7. Bokarev, I. N. (2011). *Laboratornye metody issledovaniia sistemy svertyvaniia krvi [Laboratory Methods of blood coagulation system: Guidelines]*. (2<sup>nd</sup> ed.). Moscow: ATGPSS im. A.Shmidta–B.A. Kudriashova, 15.
8. Medvedev, V. V., Volchek, Ju. Z. (2006). *Klinicheskaia laboratornaia diagnostika [Clinical Laboratory Services]*. St. Petersburg: Gippokrat, 360.
9. Habriev, R. U. et al. (Eds.). (2005). *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniiu novykh farmakologicheskikh veshhestv [Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances ]*. (2<sup>nd</sup> ed.). Moscow: Medicina, 832.

### Відомості про авторів:

Калениченко Г. С., аспірант кафедри фізіології та анатомії людини, Національний фармацевтичний університет.

E-mail: anna.geiderikh@list.ru. ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-0934-6265>

Малоштан Л. М., д-р біол. н., професор кафедри фізіології та анатомії людини, Національний фармацевтичний університет.

ORCID – <http://orcid.org/0000-0003-1904-9579>

Федченко Ю. А., канд. фарм. н., доцент кафедри фармакогнозії, Національний фармацевтичний університет.

ORCID – <http://orcid.org/0000-0003-1240-3053>

### Information about authors:

Kalenichenko G. S., postgraduate student of the human physiology and anatomy department, National University of Pharmacy.

E-mail: anna.geiderikh@list.ru. ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-0934-6265>

Maloshtan L. N., d. biol. s., professor, head of the human physiology and anatomy department, National University of Pharmacy.

ORCID – <http://orcid.org/0000-0003-1904-9579>

Fedchenko Y. A., c. pharm. s., associate professor of the Pharmacognosy department, National University of Pharmacy.

ORCID – <http://orcid.org/0000-0003-1240-3053>

### Сведения об авторах:

Калениченко А. С., аспирант кафедры физиологии и анатомии человека, Национальный фармацевтический университет.

E-mail: anna.geiderikh@list.ru. ORCID – <http://orcid.org/0000-0002-0934-6265>

Малоштан Л. Н., д-р биол. н., профессор кафедры физиологии и анатомии человека, Национальный фармацевтический университет.

ORCID – <http://orcid.org/0000-0003-1904-9579>

Федченко Ю. А., канд. фарм. н., доцент кафедры фармакогнозии, Национальный фармацевтический университет,

ORCID – <http://orcid.org/0000-0003-1240-3053>

Рекомендовано д. фарм. н., професором С. М. Марчишин

Надійшла до редакції 14.01.2017 р.