

ФАРМАКОЛОГИЯ СИСТЕМЫ КРОВИ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-12-19-22

ГЕМОРЕОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ ЭКСТРАКТА ДОННИКА БЕЛОГО (*MELILOTUS ALBUS* L.) ПРИ ГЛОБАЛЬНОЙ ИШЕМИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА

П. П. Щетинин¹, В. В. Удуд^{1,2}, В. П. Демкин¹, А. П. Щетинина¹

Синдром повышенной вязкости крови является важным звеном в патогенезе ишемии и реперфузии головного мозга, приводящим к расстройствам в системе микроциркуляции, уменьшению кислородтранспортной функции крови, замедлению потока крови и способствующим развитию повторных тромбозов. Исследовано влияние сухого экстракта донника белого (*Melilotus albus* L.) на реологические свойства крови крыс в условиях экспериментальной глобальной ишемии головного мозга. Исследуемый экстракт (300 мг/кг внутривенно, 1 раз в день в течение 3 дней до и после 5 дней создания ишемии головного мозга) предупреждал ишемия-опосредованное ухудшение гемореологии у крыс по показателю вязкости цельной крови во всем диапазоне ($5 - 300 \text{ с}^{-1}$) скоростей сдвига на 8–28 % ($p < 0,05$), как за счет влияния на клеточные (повышение деформируемости на 6–17 %, $p < 0,05$ и снижение агрегационной активности эритроцитов на 50 %, $p < 0,05$), так и на плазменные (снижение вязкости плазмы крови на 7 %, $p < 0,05$) гемореологические параметры в сравнении со значениями у животных контрольной группы. Продемонстрированные гемореологические эффекты повышали соотношение гематокрит/вязкость на 7–11 % ($p < 0,05$) при высоких ($50 - 300 \text{ с}^{-1}$) скоростях сдвига, что указывает на значимое повышение доступности кислорода для тканей у крыс после глобальной ишемии головного мозга.

Ключевые слова: *Melilotus albus*; донник белый; сухой экстракт; глобальная ишемия головного мозга; реологические свойства крови; крысы.

ВВЕДЕНИЕ

В течение последних лет особое внимание уделяют поиску эффективного фармакологического решения проблемы ишемического и реперфузионного повреждения тканей головного мозга, развивающейся вследствие инсульта. Острые и хронические расстройства кровообращения головного мозга ведут к ухудшению качества жизни пациентов, снижению социальной и семейной адаптации, повышению риска развития повторных острых нарушений мозгового кровообращения и, в конечном счете, к росту смертности и сокращению продолжительности жизни [1].

Результаты многочисленных исследований свидетельствуют о нарушении реологических свойств крови в эксперименте при церебральной ишемии [5, 12]. Гемореологические нарушения, в свою очередь, способствуют еще большему нарушению микроциркуляции в головном мозге, формированию спазма и тромбоза его сосудов [7]. Вместе с тем терапия, направленная на улучшение вязкостных свойств крови, представляет

собой резерв в лечении заболеваний, сопровождающихся формированием синдрома повышенной вязкости крови (СПВК). Актуальность такого лечения возрастает с широким внедрением методов механической реканализации сосудов мозга (ультразвуковая деструкция тромба, аспирация тромба или его механическое удаление) и проведением внутривенной и/или внутриартериальной тромболитической терапии с использованием препаратов-активаторов плазминогена (стрептокиназа, фибринолизин, тенектеплаза и др.), а, значит, неминуемым возникновением реперфузии мозга и развитием синдрома восстановленного кровотока с резкой активацией окислительного стресса [10, 15].

Существуют данные о возможности использования фитосредств, способных подавлять реакции перекисного окисления липидов, в качестве вспомогательных средств-нейропротекторов при лечении церебральной ишемии и реперфузии [11]. Проведенные ранее исследования свойств экстрактов из наземных частей растений рода *Melilotus* подтверждают высокую антиоксидантную активность и способность корригировать гемореологические изменения при экспериментальном СПВК. Основной эффект обеспечивается суммой полифенольных соединений — прежде всего кумаринами, содержащимися в значительном количестве в выделенных экстрактивных комплексах [6, 8].

Целью настоящего исследования явилось изучение гемореологических эффектов стандартизованного су-

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Россия, 634050, Томск, пр. Ленина, 36.

² ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук», Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е. Д. Гольдберга, Россия, 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3.

хого экстракта, полученного из надземной части донника белого, в условиях модели глобальной ишемии головного мозга у крыс.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено на аутбредных крысах-самцах линии Вистар (21 особь) массой 250–290 г, полученных из питомника лабораторных животных НИИФиРМ имени Е. Д. Гольдберга, на модели глобальной ишемии головного мозга (ИГМ) с соблюдением принципов гуманности, изложенных в Директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС).

В эксперименте использовали модифицированную авторами модель ИГМ [2]. Для этого животных наркотизировали уретаном (Urethane, США) внутривенно в дозе 1 г/кг и производили билатеральную окклюзию общих сонных артерий в течение 15 мин в сочетании с экспериментальной гипотензией, для чего артериальное давление понижали до 50 мм рт. ст. контролируемым кровопусканием. В случае развития апноэ крыс интубировали и подключали к аппарату искусственной вентиляции легких (Animal Ventilator R407, КНР). У группы ложноперированных (ЛО) животных проводили аналогичное вмешательство, но без лигирования сосудов.

В работе использовали сухой экстракт донника белого (*Melilotus albus* L.), полученный из надземной части растения методом многоступенчатого противоточного экстрагирования этанолом 70 %. Полученный жидкий экстракт упаривали под вакуумом (при 30–40 мм рт. ст.) при температуре не более 45 °С на ротационном испарителе (BUCHI Rotavapor R-300, Швейцария) до содержания влаги не более 40 %. Доведение содержания влаги до стандартной величины (25 %) осуществляли в вакуумном сушильном шкафу (VT 6025, США) при температуре не выше 45 °С. Стандартизацию экстракта осуществляли по содержанию кумарина — не менее 0,5 %.

Введение исследуемого экстракта в дозе 300 мг/кг осуществляли в виде суспензий в 2 % крахмальной слизи внутривенно в течение 3 дней до и в течение 5 дней после создания ИГМ. Животные контрольной группы и ЛО животные получали эквивалентное количество 2 % крахмальной слизи.

Забор крови осуществляли из общей сонной артерии крыс, в качестве стабилизатора использовали раствор цитрата натрия 3,8 % в соотношении с кровью 1:9 (v/v). В пробах крови оценивали вязкость цельной крови, гематокрит, вязкость плазмы, способность эритроцитов к спонтанной агрегации, деформируемость эритроцитов, а также рассчитывали коэффициент доступности кислорода для тканей. Вязкость цельной крови (мПа · с) и плазмы (мПа) оценивали на ротационном вискозиметре (Rotovisco RV 100, Германия) при скоростях сдвига 5–300 с⁻¹ и 300 с⁻¹, соответственно. Гематокрит определяли методом центрифугирования в стеклянных капиллярах на гематокритной центрифуге (ELMI SM-70, Латвия). Спонтанную агрегацию эритроцитов определяли методом силлектометрии [9]. Критерием оценки агрегационной активности эритроцитов служил полупериод агрегации эритроцитов (с). Деформируемость эритроцитов (отн. ед.) оценивали методом эктацитометрии [3]. Доступность кислорода для тканей рассчитывали по соотношению гематокрит/вязкость крови (отн. ед.) на высоких (от 50 до 300 с⁻¹) скоростях сдвига [13].

Для статистической обработки данных использовали программный пакет для статистического анализа “Statistica 12”, рассчитывали среднее значение, стандартную ошибку. Достоверность различий ($p < 0,05$) между сериями определяли с использованием непараметрического критерия Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На 5 сут после получения ИГМ у животных контрольной группы наблюдалось повышение вязкости крови во всем диапазоне скоростей сдвига. Вязкость крови при низких скоростях сдвига (от 5 до 10 с⁻¹) возрастала на 33–43 % ($p < 0,05$), а при скоростях сдвига от 50 до 300 с⁻¹ на 14–23 % ($p < 0,05$), по сравнению со значениями у ЛО животных, $p < 0,05$ (табл. 1).

Повышение агрегационной активности эритроцитов выразилось в сокращении полупериода агрегации на 49 % ($p < 0,05$), по сравнению со значением у ЛО крыс (табл. 2).

У крыс контрольной группы, перенесших ИГМ, отмечали ухудшение деформационных свойств эритро-

Таблица 1. Влияние экстракта донника белого (300 мг/кг, 3 сут профилактического и 5 сут лечебного введения внутрь) на вязкость цельной крови у крыс после глобальной ИГМ ($M \pm m$)

| Группа животных | Вязкость цельной крови, мПа · с | | | | | |
|-------------------------------------|---------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | скорость сдвига | | | | | |
| | 5 с ⁻¹ | 7 с ⁻¹ | 10 с ⁻¹ | 50 с ⁻¹ | 100 с ⁻¹ | 300 с ⁻¹ |
| ЛО ($n = 7$) | 7,8 ± 0,3 | 7,3 ± 0,2 | 6,8 ± 0,2 | 4,9 ± 0,1 | 4,3 ± 0,2 | 4,2 ± 0,1 |
| Контроль ($n = 7$) | 11,2 ± 1,0* | 10,0 ± 0,7* | 9,1 ± 0,6* | 6,0 ± 0,2* | 5,2 ± 0,1* | 4,8 ± 0,1* |
| Экстракт донника белого ($n = 7$) | 8,3 ± 0,3 ⁺ | 7,8 ± 0,3 ⁺ | 7,4 ± 0,3 ⁺ | 5,1 ± 0,1 ⁺ | 4,7 ± 0,1 ⁺ | 4,4 ± 0,1 ⁺ |

* $p < 0,05$, по сравнению с показателями у ЛО животных; ⁺ $p < 0,05$, по сравнению с показателями у контрольной группы животных.

цитов по сравнению с ЛО животными. Индекс деформируемости эритроцитов во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига был на 16–21 % ($p < 0,05$) ниже значений этого показателя у группы ЛО животных (табл. 3).

Вязкость плазмы крыс контрольной группы была на 12 % выше, чем вязкость плазмы ЛО крыс. Совокупность выявленных изменений гемореологических параметров у крыс в условиях ИГМ свидетельствует о формировании СПВК и аналогично расстройствам реологии крови у больных, перенесших острое нарушение мозгового кровообращения [14].

Снижение деформационных свойств и повышение способности эритроцитов к спонтанной агрегации у крыс после эпизода церебральной ишемии негативно сказывалось на вязкостных свойствах крови и основной функции эритроцитов — кислородтранспортной. Расчетный показатель доступности кислорода для тканей в диапазоне высоких скоростей сдвига достоверно снижался (на 8–15 %, $p < 0,05$) (табл. 4).

ИГМ провоцирует развитие окислительного стресса, при котором происходит окислительная модификация мембран эритроцитов и выявленное нами изменение их функциональных свойств.

Внутрижелудочное лечебно-профилактическое введение экстракта донника белого крысам в условиях модели глобальной ИГМ предупреждало нарушение реологических свойств крови.

После окончания курсового введения препарата вязкость крови во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига была достоверно ниже на 8–28 % ($p < 0,05$) значений контрольной группы (табл. 1). Анализ вклада изменений отдельных гемореологических параметров в способность экстракта донника белого уменьшать вязкость крови позволил установить, что наиболее чувствительны к действию препарата были показатели клеточной реологии. Полу период агрегации эритроцитов увеличивался на 50 % ($p < 0,05$), а индекс деформируемости эритроцитов достоверно повышался на 6–17 % ($p < 0,05$), по сравнению с контролем (табл. 2).

Восстановление вязкости крови при высоких скоростях сдвига, по-видимому, связано с улучшением деформируемости эритроцитов, снижение их агрегационной активности, вероятно, способствует уменьшению вязкости крови на низких скоростях сдвига [4].

Таблица 2. Влияние экстракта донника белого (300 мг/кг, 3 сут профилактического и 5 сут лечебного введения внутрь) на вязкость плазмы и полу период агрегации эритроцитов периферической крови у крыс после глобальной ИГМ ($M \pm m$)

| Группа животных | Вязкость плазмы, мПа | Полупериод агрегации эритроцитов, с |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------------------------|
| ЛО ($n = 7$) | 1,30 ± 0,05 | 9,89 ± 0,92 |
| Контроль ($n = 7$) | 1,46 ± 0,10* | 5,00 ± 0,15* |
| Экстракт донника белого ($n = 7$) | 1,35 ± 0,08 | 7,50 ± 0,50 ⁺ |

* $p < 0,05$, по сравнению с показателями у ЛО животных; ⁺ $p < 0,05$, по сравнению с показателями контрольной группы животных.

Вязкость плазмы у крыс данной группы была на 7 % ($p < 0,05$) ниже показателя у контрольных животных и существенно не отличалась от значений у ЛО крыс. Значения гематокрита у животных, получавших исследуемый экстракт, фактически не отличались от таковых в контрольной группе и у ЛО крыс и составлял (48 ± 1) % ($p < 0,05$).

Позитивная динамика реологических свойств крови у животных, получавших исследуемый экстракт, способствовала значительному улучшению снабжения кислородом тканей организма (табл. 3). Доступность кислорода для тканей на высоких скоростях сдвига была достоверно выше на 7–11 % ($p < 0,05$) в сравнении со значениями у животных контрольной группы (табл. 4).

Таким образом, предупреждение ишемия-опосредованного повышения вязкости крови при курсовом применении экстракта донника белого в условиях модели глобальной ИГМ у крыс обусловлено влиянием препарата как на клеточные (деформируемость и агрегация эритроцитов), так и на плазменные (вязкость плазмы) факторы. Восстановление реологических свойств крови под влиянием препарата, очевидно, повышает доступность кислорода для тканей. С учетом важной роли нарушений гемореологических параметров в патогенезе нарушений мозгового кровообращения экстрактивный комплекс, выделенный из донника белого, может быть предложен для дальнейших исследований в качестве средства вспомогательной терапии, снижающего выраженность ишемических осложнений при нарушении мозгового кровообращения.

Таблица 3. Влияние экстракта донника белого (300 мг/кг, 3 сут профилактического и 5 сут лечебного введения внутрь) на индекс деформируемости эритроцитов при разных скоростях сдвига у крыс после глобальной ИГМ ($M \pm m$)

| Группа животных | Индекс деформируемости эритроцитов, отн. ед., при скорости сдвига | | | |
|-------------------------------------|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | 90 с ⁻¹ | 180 с ⁻¹ | 360 с ⁻¹ | 890 с ⁻¹ |
| ЛО ($n = 7$) | 0,140 ± 0,011 | 0,228 ± 0,013 | 0,325 ± 0,009 | 0,430 ± 0,016 |
| Контроль ($n = 7$) | 0,110 ± 0,002* | 0,180 ± 0,002* | 0,262 ± 0,006* | 0,361 ± 0,003* |
| Экстракт донника белого ($n = 7$) | 0,129 ± 0,010 ⁺ | 0,190 ± 0,012 ⁺ | 0,292 ± 0,008 ⁺ | 0,398 ± 0,008 ⁺ |

* $p < 0,05$, по сравнению с показателями у ЛО животных; ⁺ $p < 0,05$, по сравнению с показателями контрольной группы животных.

Таблица 4. Влияние экстракта донника белого (300 мг/кг, 3 сут профилактического и 5 сут лечебного введения внутрь) на соотношение гематокрит/вязкость крови на высоких скоростях сдвига (от 50 до 300 с⁻¹), косвенно характеризующее доступность кислорода для тканей у крыс после глобальной ИГМ (отн. ед., $M \pm m$)

| Группа животных | Скорость сдвига | | |
|---------------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 50 с ⁻¹ | 100 с ⁻¹ | 300 с ⁻¹ |
| ЛО (n = 7) | 9,7 ± 0,2 | 10,5 ± 0,3 | 11,0 ± 0,3 |
| Контроль (n = 7) | 8,2 ± 0,2* | 9,3 ± 0,2* | 10,1 ± 0,2* |
| Экстракт донника белого (n = 7) | 9,1 ± 0,2 ⁺ | 9,9 ± 0,2 ⁺ | 11,0 ± 0,2 ⁺ |

* $p < 0,05$, по сравнению с показателями у ЛО животных; ⁺ $p < 0,05$, по сравнению с показателями контрольной группы животных.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт донника белого (300 мг/кг внутрижелудочно 1 раз в день в течение 3 дней до и 5 дней после постановки модели) предупреждает ишемия-опосредованное повышение вязкости цельной крови у крыс на 8–28 % ($p < 0,05$) во всем диапазоне скоростей сдвига (5–300 с⁻¹) и вязкости плазмы крови на 7 % ($p < 0,05$) при скорости сдвига 300 с⁻¹, по сравнению со значениями контрольной группы животных.

2. Экстракт донника белого (300 мг/кг внутрижелудочно 1 раз в день в течение 3 дней до и 5 дней получения ИГМ) способствует увеличению полупериода агрегации эритроцитов на 50 % ($p < 0,05$); повышению индекса деформируемости эритроцитов на 6–17 % ($p < 0,05$) у крыс в группе с введением экстракта донника белого, по сравнению с контрольной группой.

3. Под влиянием экстракта донника белого при глобальной ИГМ повышается соотношение гематокрит/вязкость на 7–11 % ($p < 0,05$) во всем диапазоне высоких (50–300 с⁻¹) скоростей сдвига, что указыва-

ет на значимое повышение доступности кислорода для тканей у крыс.

Данная работа выполнена при финансовой поддержке Программы повышения конкурентоспособности Томского государственного университета (Грант № 8.1.21.2018).

ЛИТЕРАТУРА

1. С. В. Котов, Л. В. Стаховская, Е. В. Исакова и др., *Инсульт. Руководство для врачей*, МИА, Москва (2013).
2. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, А. Н. Миронов и др. (ред.), Гриф и К, Москва (2012), сс. 481–482.
3. M. Bessis, N. Mohandas, S. Feo, *Blood Cells*, № 6, 315–327 (1980).
4. S. Chien, S. Usami, R. J. Dellenback, et al., *Science*, **157**(3790), 829–831 (1967).
5. B. M. Coull, N. Beamer, P. De Garmo, et al., *Stroke*, **22**(2), 162–168 (1991).
6. H. Elyasi, H. Rahimi, A. A. Kiani, *Herb. Med. J.*, **2**(4), 158–165 (2018); doi: 10.22087/hmj.v0i0.639.
7. K. Jackman, C. Iadecola, *Antioxid. Redox Sign.*, **22**(2), 149–160 (2015); doi: 10.1089/ars.2013.5669.
8. K. G. Mladenovic, M. Z. Muruzovic, O. D. Stefanovic, et al., *JAPS*, **26**(5), 1436–1444 (2016).
9. T. M. Plotnikova, G. A. Chernysheva, V. I. Smol'yakova, et al., *Bul. Exp. Biol. Med.*, **157**(2), 211–214 (2014); doi: 10.1007/s10517-014-2527-8.
10. T. Plotnikova, M. Plotnikov, G. Chernysheva, et al., *Key Eng. Mater.*, № 683, 469–474 (2016); doi: 10.4028/www.scientific.net / KEM.683.469.
11. Z. Rabiei, M. R. Bigdeli, Z. Lorigooini, *J. Babol Univ. Med. Sci.*, **17**(12), 47–56 (2015).
12. S. H. Song, J. H. Kim, J. H. Lee, etc., *BMC Neurol.*, **17**(1), 17–20 (2017); doi: 10.1186/s12883-017-0808-3.
13. J. F. Stoltz, M. Donner, S. Muller, A. Larcen, *J. Maladies Vasculaires*, **16**(3), 261–270 (1991).
14. J. H. Wood, D. B. Kee, *Stroke*, **16**(5), 765–772 (1985).
15. J. H. Zhang, A. Obenaus, D. S. Liebeskind, et al., *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **37**(12), 3818–3823 (2017); doi: 10.1177/0271678X17732695.

Поступила 31.10.19

HEMORHEOLOGICAL EFFECTS OF WHITE MELILOT (*MELILOTUS ALBUS L.*) EXTRACT IN EXPERIMENTAL GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA

P. P. Shchetinin¹, V. V. Udut^{1,2}, V. P. Demkin¹, and A. P. Shchetinina¹

¹ Tomsk State University, ul. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

² E. D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center of the Russian Academy of Sciences, ul. Lenina 3, Tomsk, 634028 Russia

Hyperviscosity syndrome is an important link in the pathogenesis of ischemia and reperfusion of the brain, leading to disorders in the microcirculation system, a decrease in the oxygen transport function of the blood, a slowdown in the blood flow and contributing to the development of repeated thrombosis. Effect of the dry extract of white melilot (*Melilotus albus L.*) on the rheological properties of rat blood under the conditions of a model of global cerebral ischemia was studied. The extract (in a dose of 300 mg of dry extract per 1 kg of rat body weight, intragastrically, once a day for 3 days before and 5 days after induction of the model) prevented ischemia-mediated deterioration of hemorheology in rats in terms of the whole blood viscosity index over the entire range (5–300 sec⁻¹) of shear rates by 8–28% ($p < 0.05$), both due to the effect on cellular (increase in deformability by 6–17%, $p < 0.05$, and decrease in the aggregation activity of red blood cells by 50%, $p < 0.05$) as well as plasma (decrease in blood plasma viscosity by 7%, $p < 0.05$) hemorheological parameters in comparison to values in the control group of animals. The observed hemorheological effects increased the hematocrit/viscosity ratio by 7–11% at high (50–300 sec⁻¹) shear rates, which indicated a significant increase in tissue oxygen availability in rats after global cerebral ischemia.

Keywords: *Melilotus albus L.*; white melilot; dry extract; global cerebral ischemia; rheological properties of blood; rats.