

УДК 57.042:612.115.38

ВЛИЯНИЕ ПРОПОЛИСА НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ**Ивашенко М.Н., Самodelкин А.Г.***ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия»,
Нижегород, e-mail: kafedra2577@mail.ru*

Тромбоциты крови – важнейшие участники как нормального гемостаза, так и патологического тромботического процесса, состояние которых критично для самых разных заболеваний и состояний. Воздействуя на тромбоциты, можно предупредить образование тромбов, задержать развитие инфарктов, инсультов. По этой причине поиск эффективных и безопасных средств, комплексно воздействующих на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, остается актуальной задачей современной науки. Статья посвящена изучению влияния прополиса на агрегацию тромбоцитов. Исследование проводилось *in vitro*, в работе использовали анализатор агрегации тромбоцитов AP 2110. В качестве индукторов агрегации использовались АДФ в конечной концентрации 5 мкг/мл и коллаген в конечной концентрации 20 мг/мл. Антиагрегантные свойства прополиса исследовали в конечной концентрации 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} г/мл. Растворы прополиса в изученных концентрациях эффективно снижали агрегационную функцию кровяных пластинок. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что полученные данные имеют определенные клинические перспективы и требуют дальнейшего изучения.

Ключевые слова: агрегация, тромбоциты, АДФ, коллаген, прополис, продукты пчеловодства**EFFECT OF PROPOLIS ON PLATELET AGGREGATION****Ivashchenko M.N., Samodelkin A.G.***FSBEI HPE «Nizhny Novgorod state agricultural Academy», Nizhny Novgorod,
e-mail: kafedra2577@mail.ru*

Platelets are blood – the most important participants as normal hemostasis and thrombotic pathological process that is critical for a variety of diseases and conditions. By acting on platelets, it is possible to prevent the formation of blood clots, to delay the development of heart attacks, strokes. For this reason, the search for effective and safe means to comprehensively affecting vascular-platelet hemostasis, remains a challenge for modern science. The article is devoted to the study of the effect of propolis on platelet aggregation. The study was conducted *in vitro*, we used the analyzer platelet aggregation AR 2110. As the aggregation inducers were used ADP at a final concentration of 5 μ g/ml collagen at a final concentration of 20 mg/ml Antiplatelet properties of propolis was investigated at a final concentration of 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} g/ml Solutions of propolis in the studied concentrations effectively reduced the aggregation function of blood platelets. Our findings suggest that the data obtained are of some clinical perspective and requires further study.

Keywords: aggregation, platelets, ADP, collagen, propolis, bee products

Тромбоциты крови – важнейшие участники как нормального гемостаза, так и патологического тромботического процесса, состояние которых критично для самых разных заболеваний и состояний. Тромбоцитарные тромбы могут образовываться в самых разных ситуациях и играют центральную роль в таких патологических состояниях, как инфаркты и инсульты [6, 7, 8].

По этой причине поиск эффективных и безопасных средств, комплексно воздействующих на сосудисто-тромбоцитарный гемостаз, остается актуальной задачей современной науки.

В последние годы наметилась четкая тенденция к созданию и использованию лекарственных средств, приготовленных из природного сырья, многие из которых обладают разносторонней биологической активностью и в то же время безвредны для организма. К этой группе с полным правом относится прополис. Прополис обладает широким спектром биологических и фармакологических эффектов и, вероятно, может оказывать влияние на агрегацию тромбоцитов [1, 2, 5].

В связи с этим цель исследования – выяснение механизма влияния прополиса на функциональную активность тромбоцитов в условиях *in vitro*.

Материалы и методы исследования

Исследование выполнялось на образцах крови практически здоровых доноров ($n = 25$), лиц обоего пола в возрасте от 19 до 40 лет. Кровь для исследования бралась у обследуемых утром натощак. Свертывание крови предупреждали 3,8 % раствором цитрата натрия, добавленным в соотношении 1:9. Для исключения контактной активации тромбоцитов в работе использовали силиконовую посуду. Исследование индуцированной агрегации тромбоцитов проводили в течение 3-х часов после получения крови.

Для исследования индуцированной агрегации тромбоцитов использовали анализатор агрегации тромбоцитов AP 2110. В основе принципа работы прибора лежит метод светорассеяния, предложенный Born G.V. (1962).

Тромбоциты при исследовании на агрегометре находились в условиях, приближенных к физиологическим, при температуре $+ 37^{\circ}\text{C}$ и постоянной скорости перемешивания, моделирующей кровообращение.

В исследовании, в качестве индукторов агрегации использовались АДФ в конечной concentra-

ции 5 мкг/мл и collagen в конечной концентрации 20 мг/мл.

В работе изучали антиагрегантные свойства водной вытяжки прополиса. Водную вытяжку прополиса (1:10) получали по методике Т.В. Вахониной (1992), температура извлечения около 93 °С. Образцы прополиса разводили дистиллированной водой, помещали на водяную баню и кипятили в течение часа. Раствор хранили в закрытом сосуде из темного стекла в холодильнике в течение пяти дней. Антиагрегантные свойства прополиса исследовали в конечной концентрации 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-7} , 10^{-9} г/мл. Для изучения влияния водного раствора прополиса на агрегационную активность тромбоцитов клетки крови предварительно инкубировали в течение 10 минут исследуемыми соединениями. В качестве контроля использовались клетки крови, которые не подвергались воздействию исследуемого соединения.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования влияния водного раствора прополиса на АДФ-, collagen-индуцированную агрегацию тромбоцитов приведены в табл. 1, 2.

Проведенное исследование показало, что растворы прополиса в изученных концентрациях эффективно снижали агрегационную функцию кровяных пластинок. Наиболее существенно изменялась функциональная активность тромбоцитов при использовании прополиса в концентрации 10^{-3} г/мл. При этом зарегистрировано

понижение степени агрегации тромбоцитов на 37 % по отношению к контролю (с $64,67 \pm 10,2\%$ до $40,86 \pm 14,67\%$; $p \leq 0,05$).

При применении водной вытяжки прополиса в концентрации 10^{-5} г/мл степень агрегации кровяных пластинок статистически достоверно понижалась с $61,07 \pm 9,24\%$ до $47,92 \pm 15,29\%$.

Прополис в концентрации 10^{-7} г/мл снижал агрегационную активность тромбоцитов на 23 % по сравнению с контрольным уровнем (контроль – $56,96 \pm 9,79\%$, опыт – $44,02 \pm 12,71\%$; $p \leq 0,05$).

Инкубация кровяных пластинок водной вытяжкой прополиса в концентрации 10^{-9} г/мл сопровождалась изменением исследуемого показателя на 26 %. Агрегационная способность тромбоцитов статистически достоверно понижалась, если в контроле степень агрегации тромбоцитов составляла $56,97 \pm 9,76\%$, то после воздействия водной вытяжки прополиса она составила $42,3 \pm 11,34\%$.

При исследовании collagen-индуцированной агрегации тромбоцитов, было обнаружено, что прополис вызывает выраженное подавление collagen-стимулированной агрегации тромбоцитов (табл. 2). Эффект подавления collagen-агрегации зависел от величины применяемой дозы.

Таблица 1

Изменение АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов при действии водной вытяжки прополиса, (М ± м)

Исследуемое вещество, г/мл	Степень агрегации, %		Скорость агрегации, %/мин	
	До	После	До	После
Прополис 10^{-3}	$64,67 \pm 10,2$	$40,86 \pm 14,67^*$	$42,14 \pm 7,63$	$40,49 \pm 7,91$
Прополис 10^{-5}	$61,07 \pm 9,24$	$47,92 \pm 15,29^*$	$42,73 \pm 12,59$	$42,1 \pm 12,34$
Прополис 10^{-7}	$56,96 \pm 9,79$	$44,02 \pm 12,71^*$	$30,4 \pm 5,86$	$40,61 \pm 8,76$
Прополис 10^{-9}	$56,97 \pm 9,76$	$42,3 \pm 11,34^*$	$30,37 \pm 5,87$	$35,86 \pm 8,41$

Пр и м е ч а н и е . * различия между контролем и опытом статистически достоверны, $P \leq 0,05$.

Таблица 2

Изменение collagen-индуцированной агрегации тромбоцитов при действии водной вытяжки прополиса, (М ± м)

Исследуемое вещество, г/мл	Степень агрегации, %		Скорость агрегации, %/мин	
	До	После	До	После
Прополис 10^{-3}	$64,27 \pm 3,73$	$15,82 \pm 2,91^*$	$46,4 \pm 4,62$	$14,17 \pm 2,08^*$
Прополис 10^{-5}	$63,98 \pm 7,06$	$55,67 \pm 2,59$	$45,8 \pm 2,74$	$30,7 \pm 3,55$
Прополис 10^{-7}	$66,05 \pm 2,97$	$70,7 \pm 4,77$	$41,47 \pm 3,16$	$35,13 \pm 6,61$
Прополис 10^{-9}	$61,6 \pm 4,03$	$67,22 \pm 2,82$	$40,4 \pm 3,3$	$39,7 \pm 4,78$

Пр и м е ч а н и е . * различия между контролем и опытом статистически достоверны, $P \leq 0,05$.

Как показано в табл. 2, растворы водной вытяжки прополиса в концентрации 10^{-3} г/мл уменьшали скорость агрегации кровяных пластинок на 75%. Степень агрегации также достоверно уменьшалась на 70%. В нескольких опытах агрегационная способность тромбоцитов снижалась до 0%. Водная вытяжка прополиса в остальных изученных концентрациях заметных изменений функциональной активности кровяных пластинок не вызывала.

Результаты настоящих экспериментов показали, что водная вытяжка прополиса эффективно снижает агрегационную способность тромбоцитов. Дезагрегирующий эффект зависит как от концентрации пчелопродукта, так и от природы и механизма действия применяемого индуктора агрегации. Согласно полученным данным прополис замедляет АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов в широком диапазоне концентраций (от 10^{-3} до 10^{-9} г/мл). Уменьшение коллаген-стимулированной агрегации отмечено при использовании апипродукта в концентрации 10^{-3} г/мл. Является важным тот факт, что на количество тромбоцитов прополис никакого влияния не оказывал.

Мы предполагаем, что зарегистрированные изменения функциональной активности тромбоцитов при действии пчелопродукта есть результирующая разнонаправленных процессов, обусловленных особенностями в физиологическом действии различных компонентов прополиса.

Согласно литературным данным АДФ является слабым агрегирующим агентом, коллаген – сильным индуктором агрегации. Установлено, что под влиянием индукторов агрегации реализуются три взаимосвязанных пути внутриклеточной передачи сигналов активации тромбоцитов: тромбоксановый, полифосфоинозитидный и протеин-тирозинкиназный [3, 4].

Общим для всех путей при действии на тромбоциты различных индукторов агрегации является повышение уровня свободного цитоплазматического Ca^{2+} .

К основным рецепторам, которые обеспечивают непосредственную связь тромбоцитов с коллагеном и имеют большое функциональное значение, относятся GPIa-IIa и GPVI. В результате кооперативного эффекта связи лигандов с этими рецепторами происходит стимуляция протеин-тирозинкиназного пути, фосфорилирование и стимуляция фосфолипазы C_2 . Активация тромбоцитов коллагеном с последующей агрегацией включает и две положительные обратные связи, осуществляемые через тромбоксановый и по-

лифосфоинозитидный пути. Последний стимулируется в результате активации фосфолипазы C_2 , завершается мобилизацией внутриклеточного Ca^{2+} и индуцированием секреторной реакции с высвобождением АДФ. Повышение цитоплазматического Ca^{2+} приводит к активации фосфолипазы A_2 , образованию фосфолипидов плазматической мембраны (фосфатидилхолина и фосфатидилинозитола).

АДФ относится к слабым агонистам, вызывающим генерацию ТХА₂ тромбоцитами и снижение уровня цАМФ. Возможно, зарегистрированный эффект влияния апипродуктов на агрегируемость клеток связан с изменениями мембраны тромбоцитов. АДФ на тромбоцитарной мембране соединяется с тремя пу-ринергическими рецепторами (P_2X_1 , P_2Y_1 и P_2Y_{12}). Первый из них, P_2X_1 (ионотропный рецептор), ответственен за вход в клетку экзогенного Ca^{2+} и Na^+ , два других P_2Y -рецептора сцеплены с G-протеинами, передающими сигнал стимуляции внутрь клетки. Через P_2Y_1 АДФ вызывает включение полифосфоинозитидного пути передачи сигналов активации и увеличение в комплексе GPIIb-IIIa доступности мест связи для фибриногена, а через P_2Y_{12} – активацию тромбоксанового пути и ингибирование аденилатциклазы. Для развития полной агрегации при действии на тромбоциты АДФ необходимо соединение этого агониста с обоими P_2Y -рецепторами [3, 4].

Мы предполагаем, что полученные нами данные имеют определенные перспективы, и требуют дальнейшего изучения.

Список литературы

1. Балуда В.П., Балуда М.В., Деянов И.И. Физиология системы гемостаза. – М., 1995. – 243 с.
2. Вашкинел В.К., Петров М.Н. Ультраструктура и функция тромбоцитов человека. – Л.: Медицина, Ленингр. отд., 1982. – 87 с.
3. Зубаиров Д.М. Молекулярные основы свертывания крови и тромбообразования. – Казань, 2000. – 367с.
4. Вахонина Т.В. Пчелиная аптека. – СПб.: Лениздат, 1992. – 190 с.
5. Починкова П. Пчелиные продукты в медицине. – София: Изд-во Българската АН, 1986. – 232 с.
6. Асафова Н.Н., Орлов Б.Н., Козин Р.Б. Физиологически активные продукты пчелиной семьи: Общебиологические и эколого-химические аспекты. Физиологическое обоснование практического применения / Под ред. Б.Н. Орлова. – Н. Новгород: Изд. Ю.А. Николаев, 2001. – 368 с.
7. Шитикова, А.С. Тромбоцитопатии, врожденные и приобретенные / Под ред. Л.П. Папаян, О.Г. Головиной. – СПб.: ИИЦ ВМА, 2008. – 320 с.
8. Васина Л.В., Веселкина О.С., Петрищев Н.Н. Механизмы влияния препарата «Озагрел» на агрегационную активность тромбоцитов // Региональное кровообращение и микроциркуляция. – 2012. – Т. 11, №3 (43). – С. 76–80.

References

1. Baluda V.P., Baluda M.V., Dejanov I.I. Fiziologija sistemy gemostaza. M., 1995. 243 p.
2. Vashkinel' V.K., Petrov M.N. Ul'trastruktura i funkciya trombocitov cheloveka. L.: Medicina, Leningr. otd., 1982. 87 p.
3. Zubairov D.M. Molekuljarnye osnovy svertyvaniya krovi i tromboobrazovaniya. Kazan', 2000. 367 p.
4. Vahonina T.V. Pchelinaja apteka. SPb.: Lenizdat, 1992. 190 p.
5. Pochinkova P. Pchelinye produkty v medicine. Sofija: Izd-vo Blgorskata AN, 1986. 232 p.
6. Asafova N.N., Orlov B.N., Kozin R.B. Fiziologicheski aktivnye produkty pchelinoj sem'i: Obshhebiologicheskie i jekologo-himicheskie aspekty. Fiziologicheskoe obosnovanie prakticheskogo primeneniya / Pod red. B.N. Orlova. N. Novgorod: Izd. Ju.A. Nikolaev, 2001. 368 p.
7. Shitikova, A.S. Trombocitopatii, vrozhdennye i priobretennye / Pod red. L.P. Papajan, O.G. Golovinoj. SPb.: IIC VMA, 2008. 320 p.
8. Vasina L.V., Veselkina O.S., Petrishhev N.N. Mehanizmy vlijaniya preparaty «Ozagrel» na agregacionnuju aktivnost' trombocitov // Regional'noe krovoobrashhenie i mikrocirkuljacija. 2012. T. 11. no. 3 (43). pp. 76–80.

Рецензенты:

Тяпугин С.Е., д.с.-х.н., профессор кафедры физиологии и биохимии животных ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, г. Нижний Новгород;

Великанов В.И., д.б.н., профессор кафедры анатомии, хирургии и внутренних незаразных болезней ФГБОУ ВПО «Нижегородская государственная сельскохозяйственная академия, г. Нижний Новгород.

Работа поступила в редакцию 29.12.2014.