NAMANGAN DAVLAT UNIVERSITETI
ILMIY AXBOROTNOMASI, [2026-8]
ISSN:2181-1458
ISSN:2181-0427

03.00.00-BIOLOGIYA
journal.namdu.uz
BIOLOGICAL

УДК 616.8;577.2.04;612.8

ВЛИЯНИЕ ФЛАВАНОИДА СКУТЕЛЛАРИНА НА КОАГУЛЯЦИОННЫЙ ГЕМОСТАЗ ПЛАЗМЫ КРОВИ КРЫС *IN VITRO*

Асатиллаев Жахонгир Неъматжон угли
Узбекский государственный университет физической культуры и спорта
ORCID: 0009-0008-2545-0290
E-mail: jahongirasatillayev5@gmail.com
Хошимов Нозимжон Нумонжонович
Ташкентский университет гуманитарных наук, доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник.
ORCID: 0000-0002-4708-741X
E-mail: khoshimovn@gmail.com
Юлдашева Наргиза Муратбаевна
Институт химии растительных веществ имени академика С. Ю. Юнусова Академии наук Республики Узбекистан
ORCID: 0009-0002-8467-6077
E-mail: e_yuldashevan175@gmail.com

Аннотация: *Цель исследования данного работа оценить влияние фитохимически стандартизированной скутелларин-содержащей фракции (Skutellarin), полученной из надземных частей Inula salicina L., на основные параметры коагуляционного гемостаза плазма крови крыс в условиях in vitro. В исследовании использовали Skutellarin, стандартизированную по содержанию скутелларина, а также плазму препараты крыс. Оценивали тромбиновое время (ТВ), время рекальцификации плазмы, активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ). Skutellarin вызывала дозозависимое увеличение времени свертывания в исследованных тестах, включая ТВ, время рекальцификации, АЧТВ и ПВ, что указывает на выраженный гипокоагулянтный эффект in vitro. Полученные данные подтверждают наличие комплексного влияния Skutellarin на плазменные и клеточные звенья гемостаза.*

Ключевые слова: *гемостаз, коагуляция, тромбин, АЧТВ, протромбиновое время, тромбоциты, скутелларин, Skutellarin, Inula salicina.*

IN VITRO SHAROITIDA KALAMUSH QONI PLAZMASI KOAGULYATSION GEMOSTAZIGA SKUTELLARIN FLAVONOIDINING TA’SIRI

Annotatsiya: *Mazkur tadqiqotning maqsadi Inula salicina L. o‘ simligining yer ustki qismlaridan olingan, fitokimyoviy jihatdan standartlashtirilgan skutellarin saqlovchi fraksiyaning (Skutellarin) in vitro sharoitida kalamushlar qon plazmasining koagulyatsion gemostazining asosiy ko‘ rsatkichlariga ta’sirini baholashdan iborat. Tadqiqotda skutellarin miqdori bo‘ yicha standartlashtirilgan Skutellarin hamda kalamushlarning qon plazmasi va trombotsit preparatlaridan foydalanildi. Trombin vaqti (TV), plazmani rekalsifikatsiya qilish vaqti, faollashtirilgan qisman tromboplastin vaqti (QFTV) hamda protrombin vaqti (PV) baholandi. Skutellarin o‘ rganilgan testlarning barchasida, jumladan TV, plazmani rekalsifikatsiya qilish vaqti, QFTV va PV bo‘ yicha ivish vaqtining dozaga bog‘ liq ravishda uzayishiga olib keldi. Mazkur natijalar birikmaning in vitro sharoitida yaqqol gipokoagulyant ta’sirga ega ekanligini ko‘ rsatadi. Olingan ma’lumotlar Skutellarinning gemostazning plazmatik va hujayraviy bo‘ g‘ inlariga kompleks ta’sir ko‘ rsatishi mumkinligini tasdiqlaydi.*

Kalit so‘ zlar: *gemostaz, koagulyatsiya, trombin, QFTV, protrombin vaqti, trombotsitlar, skutellarin, Skutellarin, Inula salicina.*

IN VITRO EFFECT OF THE FLAVONOID SCUTELLARIN ON THE COAGULATION HEMOSTASIS OF RAT BLOOD PLASMA

Abstract: *The aim of this study was to evaluate the effect of a phytochemically standardized scutellarin-containing fraction (Scutellarin), obtained from the aerial parts of Inula salicina L., on the main parameters of coagulation hemostasis in rat blood plasma*

in vitro. The study used Scutellarin standardized for scutellarin content, as well as rat blood plasma and platelet preparations. Thrombin time (TT), plasma recalcification time, activated partial thromboplastin time (APTT), and prothrombin time (PT) were assessed. Scutellarin caused a dose-dependent prolongation of clotting time in all tests examined, including TT, plasma recalcification time, APTT, and PT, indicating a pronounced hypocoagulant effect in vitro. The obtained findings suggest that Scutellarin may exert a complex effect on both the plasma and cellular components of the hemostatic system.

Keywords: *hemostasis, coagulation, thrombin, APTT, prothrombin time, platelets, scutellarin, Scutellarin, Inula salicina.*

Введение

Система гемостаза представляет собой высокоорганизованный физиологический механизм, обеспечивающий поддержание целостности сосудистого русла и предотвращение кровопотери при повреждении сосудистой стенки. Избыточная или неконтролируемая активация гемостатических механизмов, напротив, может приводить к патологическому тромбообразованию и развитию тромботических осложнений. Тромбоэмболические состояния, включая ишемическую болезнь сердца, ишемический инсульт, глубокий венозный тромбоз и тромбоэмболию легочной артерии, относятся к основным причинам заболеваемости и смертности во всем мире; по эпидемиологическим оценкам, тромбоэмболические состояния в совокупности были связаны примерно с одной четвертью всех случаев смерти в мире в 2010 г. [1,2].

Современная концепция гемостаза существенно расширяет классическое представление о коагуляции как о линейном каскаде реакций. В соответствии с клеточно-ориентированной моделью гемостаза коагуляция реализуется как динамическое взаимодействие клеток и плазменных факторов и включает взаимоперекрывающиеся стадии инициации, амплификации и пропагации. Существенное значение при этом имеют тканевой фактор, активированные тромбоциты и клеточные поверхности, на которых формируются комплексы, обеспечивающие генерацию тромбина [3-5].

Тромбин занимает центральное положение в регуляции гемостаза, поскольку участвует в образовании фибрина и одновременно усиливает активацию тромбоцитов и последующее формирование тромба. Поэтому изменение образования или функциональной активности тромбина может отражаться сразу на нескольких звеньях гемостаза. Оценка коагуляционного состояния в экспериментальных условиях обычно включает исследование протромбинового времени, АЧТВ, тромбинового времени и других функциональных показателей, однако эти тесты характеризуют отдельные стороны коагуляционного процесса и не позволяют самостоятельно определить конкретную молекулярную мишень исследуемого соединения [3-5].

Необходимость поиска новых регуляторов гемостаза сохраняет актуальность вследствие ограничений существующих антитромботических подходов, включая риск кровотечений, лекарственные взаимодействия и необходимость мониторинга в ряде клинических ситуаций [6,7]. В связи с этим природные биологически активные соединения представляют интерес как потенциальные источники веществ, способных модулировать несколько взаимосвязанных звеньев гемостаза.

Особый интерес представляет скутелларин — флавоноид, входящий в состав ряда лекарственно значимых растительных фракций. Для оценки потенциальных антигемостатических свойств стандартизированных фракций необходим комплексный подход, включающий как плазменные коагуляционные тесты, так и исследование функции тромбоцитов. В литературе показано, что близкое по структуре соединение скутеллареин способно подавлять активацию и агрегацию тромбоцитов, однако молекулярные механизмы антиагрегационного действия флавоноидов могут быть различными и не должны выводиться только из результатов стандартных агрегометрических тестов [8-10].

Цель исследования

Оценить влияние Scutellarina на основные параметры коагуляционного гемостаза в плазме крови крыс *in vitro*, а также определить направления дальнейшего изучения механизма её действия.

Материалы и методы

Исследуемый материал и фитохимическая стандартизация

В исследовании использовали фитохимически стандартизированную скутелларин-содержащую фракцию (Skutellarin), выделенную из надземных частей растения Inula salicina L. Растительное сырьё было собрано в период цветения в районе Бурчимулла Бостанлыкского района Ташкентской области, подвергнуто ботанической идентификации и высушено в затенённых условиях.

3,0 кг высушенного сырья многократно экстрагировали 70%-ным этанолом при комнатной температуре. Объединённые экстракты концентрировали под вакуумом при 40 °C, после чего последовательно разделяли на гексановую, хлороформную, этилацетатную и n-бутанольную фракции. Этил ацетатную фракцию

дополнительно фракционировали на силикагелевой колонке с использованием градиентной системы CHCl3–MeOH.

Химический профиль Skutellarin характеризовали с использованием HPLC/UPLC/LC–MS и данных $^{1}H/^{13}C$-NMR. По данным количественного HPLC-анализа, фракция содержала 84,0% скутелларина, 6,0% апигенин-7-О-глюкуронида, 4,0% производных лютеолина и около 6,0% других флавоноидных и фенольных компонентов. Указанный состав использовали как критерий контроля качества и стандартизации исследуемой фракции. Поскольку Skutellarin представляет собой многокомпонентную стандартизированную фракцию, наблюдаемые биологические эффекты в настоящем исследовании следует относить к Skutellarin в целом, а не исключительно к чистому скутелларину.

Животные и экспериментальный дизайн

Исследование проводили на здоровых адаптированных самцах беспородных белых крыс массой 200–250 г. Животных содержали при температуре 22±2 °C в условиях 12-часового цикла свет/темнота при свободном доступе к стандартному корму и питьевой воде. Продолжительность адаптационного периода составляла не менее 7 суток.

Работа с лабораторными животными проводилась с учетом принципов ARRIVE 2.0 и концепции 3R [11]. Институциональное биоэтическое разрешение было оформлено протоколом №4 от 17 февраля 2026 года Института биофизики и биохимии при Национальном университете Узбекистана. Все экспериментальные процедуры выполнялись в соответствии с институциональными требованиями по содержанию, обращению и обеспечению надлежащих условий для лабораторных животных.

Выделение тромбоцитов

Для выделения тромбоцитов к крови добавляли 3,8%-ный раствор цитрата натрия в соотношении 1:9. Тромбоцитсодержащую плазму получали центрифугированием при 1150 об/мин в течение 15 мин. После этого тромбоцитсодержащую плазму дополнительно центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 мин. Полученную суспензию тромбоцитов переводили в рабочую среду следующего состава: NaCl - 150 мМ, KCl - 2,7 мМ, NaH2PO4 - 0,37 мМ, MgCl2 - 1 мМ, CaCl2 -1 мМ, глюкоза -5 мМ, HEPES-NaOH - 10 мМ, гепарин - 50 ЕД/мл, сывороточный альбумин - 0,35% и апираза - 0,15 мг/мл; pH среды составлял 6,5. Все процедуры выделения и последующего анализа проводили при комнатной температуре (+20…+24 °C). Оптическая агрегометрия как метод оценки агрегации тромбоцитов основана на изменении светопропускания суспензии тромбоцитов [12].

Коагуляционные тесты

В цитратной плазме определяли тромбиновое время (ТВ), время рекальцификации плазмы, протромбиновое время (ПВ) и активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) [13,14]. ПВ преимущественно отражает состояние внешнего и общего путей коагуляции, АЧТВ - внутреннего и общего путей, тогда как ТВ чувствительно к этапу превращения фибриногена в фибрин под действием тромбина и последующей полимеризации фибрина. Все коагуляционные исследования выполняли в соответствии с рекомендациями производителя с использованием одноканального коагулометра CYANCoag (Бельгия; модель CY003, №5400439).

Статистический анализ

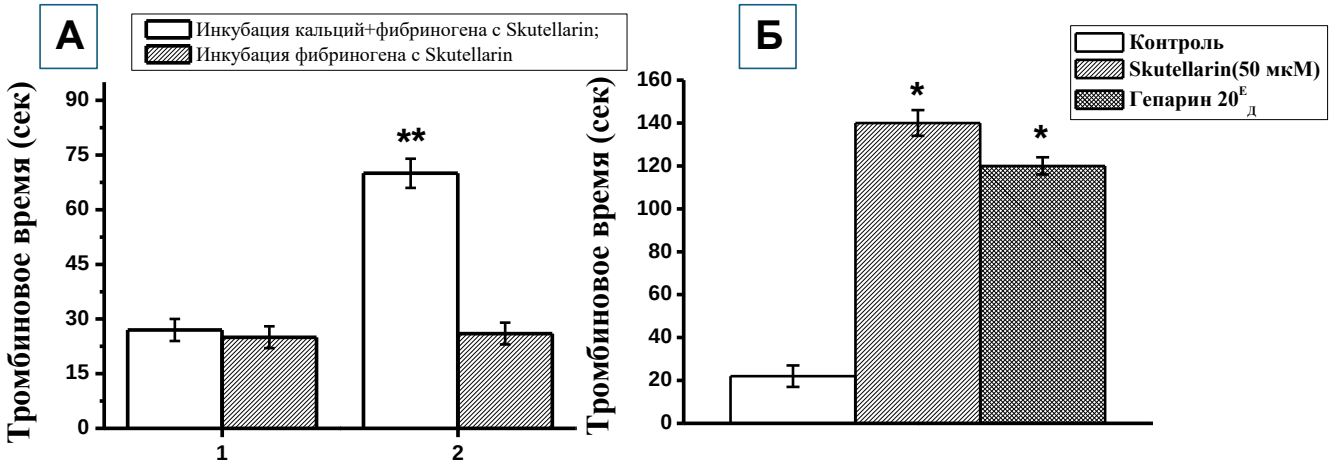
Полученные результаты были статистически обработаны с использованием специализированного программного пакета OriginPro 7.5 (OriginLab Corporation, США). Данные представлены в виде Mean ± SEM (среднее значение ± стандартная ошибка среднего). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Для статистической обработки экспериментальных данных использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующим применением критериев Dunnett или Tukey.

Результаты и их обсуждение

Влияние Skutellarin на тромбиновое время

Предыдущие исследования, проведённые нами, позволили установить некоторые механизмы ингибирующего действия различных биологически активных соединений, выделенных из местного растительного сырья, на суспензию кровяной плазмы и тромбоцитов крыс, а также на синаптосомальную суспензию головного мозга [15–24]. В настоящем исследовании целью проведённых экспериментов было оценить влияние флавоноидного соединения на систему гемостаза с использованием комплекса коагуляционных тестов.

В исследованиях на плазме крови крыс оценивали влияние различных концентраций Skutellarin на тромбиновое время. В контрольных образцах время образования сгустка после добавления тромбина составляло примерно 18–24 с. При концентрации Skutellarin 50 мкМ в одной из экспериментальных постановок выраженного удлинения ТВ не наблюдали, тогда как при предварительной инкубации фракции с плазмой в присутствии тромбина и кальция с последующим добавлением фибриногена отмечалось дозозависимое увеличение ТВ. При концентрации 50 мкМ ТВ возрастало до приблизительно 140 с (рис. 1 А, Б).

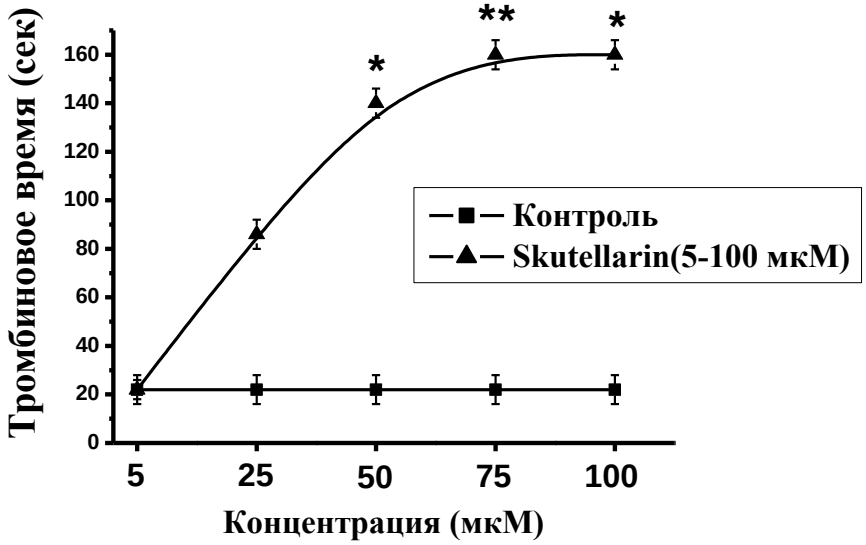


1. Рисунок. А) Влияние Skutellarina на тромбиновое время. 1 - Контроль; 2- Skutellarin (50 мкМ). Б) Исследование влияния Skutellarina на тромбиновое время. Показатель достоверности: * - P <0,05; (n = 6

Полученные данные указывают на влияние Skutellarin на конечный этап формирования фибринового сгустка. Однако изолированное удлинение ТВ не позволяет сделать вывод о прямом ингибировании превращения протромбина в тромбин. Для разграничения влияния на активность тромбина, функциональные свойства фибриногена и процессы полимеризации фибрина необходимы специализированные биохимические тесты.

Дозозависимое влияние Skutellarin на тромбиновое время

При исследовании диапазона концентраций 5–100 мкМ выявлялось дозозависимое удлинение ТВ, причем при 25 мкМ эффект был минимальным, а при повышении концентрации до 75–100 мкМ увеличение времени свертывания становилось более выраженным (рис. 2).

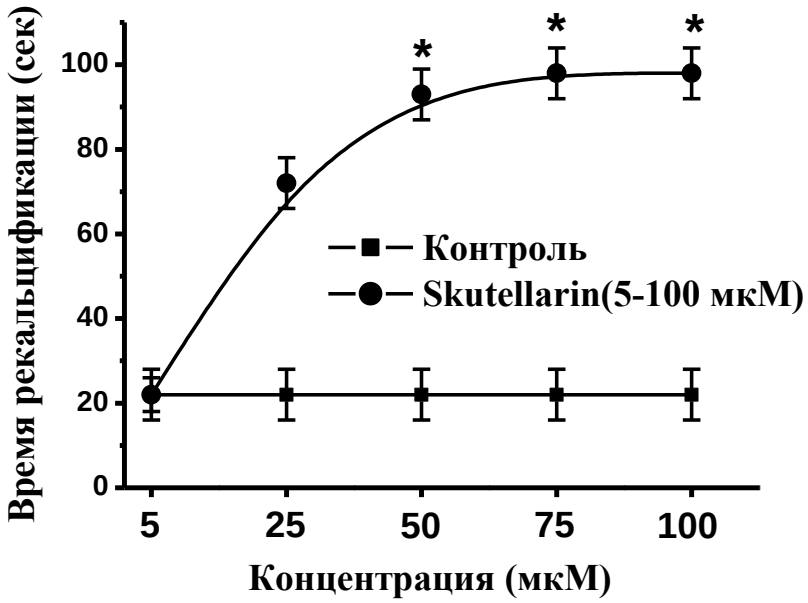


2. Рисунок. Исследование влияния Skutellarina в концентрациях (5-100 мкМ) на тромбиновое время. Показатель достоверности: * - P <0,05; ** - P <0.01; (n = 6).

Полученная зависимость указывает на наличие концентрационно-зависимого антикоагулянтного эффекта Skutellarin в использованной экспериментальной системе.

Влияние Skutellarin на время рекальцификации плазмы

Под действием Skutellarin в диапазоне 5–100 мкМ отмечалось удлинение времени рекальцификации плазмы (рис. 3). Выраженность эффекта увеличивалась по мере повышения концентрации исследуемой фракции.

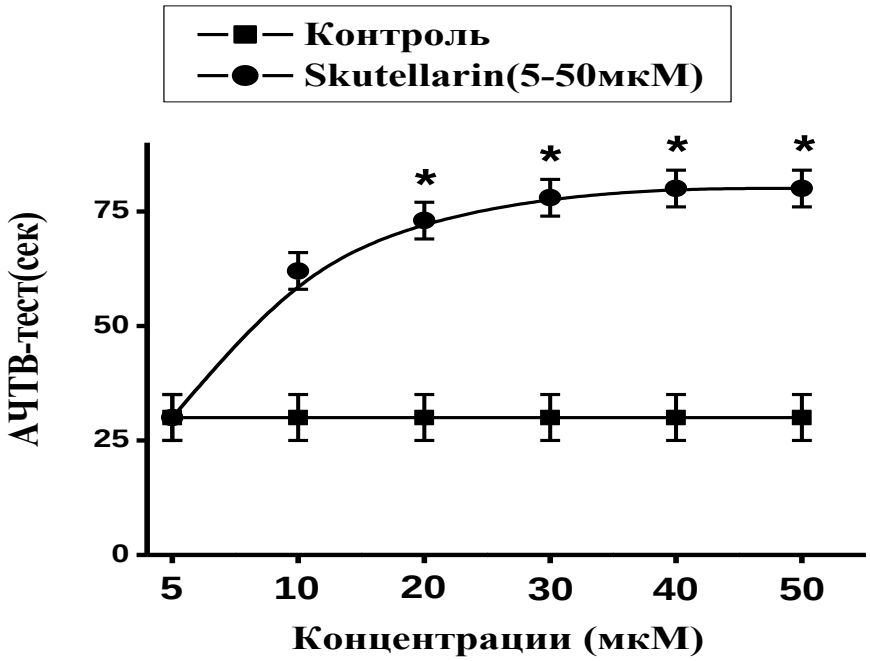


3. Рисунок. Влияние Skutellarina на активированное время рекальцификации плазмы. Показатель достоверности: * - P <0,05; (n = 6).

Полученные результаты свидетельствуют о снижении коагуляционного потенциала плазмы в условиях эксперимента. При этом изменение времени рекальцификации само по себе не позволяет установить конкретный фактор свертывания или белок-мишень.

Влияние Skutellarin на АЧТВ

Skutellarin в исследованном диапазоне (5-50 мкМ) концентраций вызывала дозозависимое удлинение АЧТВ (рис. 4). АЧТВ является интегральным функциональным тестом, чувствительным преимущественно к изменениям внутреннего и общего путей коагуляции.

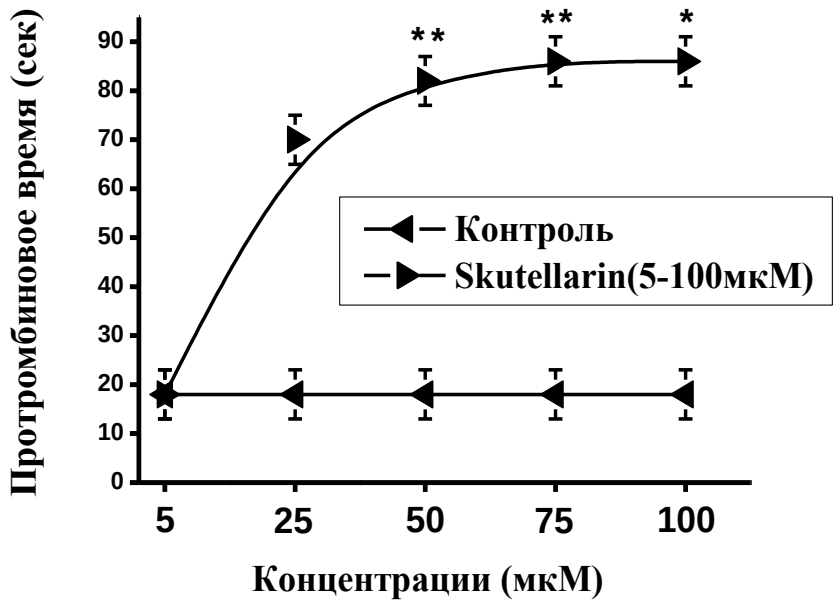


4. Рисунок. Исследование влияния Skutellarina (5-50 мкМ) на АЧТВ-тест. Показатель достоверности: * - P <0,05; (n = 6).

Поэтому полученный эффект свидетельствует об изменении коагуляционного потенциала, но не позволяет определить конкретный фактор или молекулярную мишень Skutellarin без проведения фактор-специфических исследований.

Влияние Skutellarin на протромбиновое время

В диапазоне концентраций 5–100 мкМ Skutellarin вызывала дозозависимое удлинение ПВ; максимальное значение достигало приблизительно 85 с (рис. 5).



5. Рисунок. Влияние Skutellarina на протромбиновое время. Показатель достоверности: * - P <0,05; ** - P <0.01; (n = 6).

Удлинение ПВ свидетельствует о снижении коагуляционной активности внешнего и/или общего путей свертывания. Однако данный тест не позволяет определить, какой именно фактор свертывания является непосредственной мишенью действия исследуемой фракции.

Обсуждение

Совокупность результатов демонстрирует, что Skutellarin оказывает комплексное влияние на гемостатическую систему in vitro, затрагивая как плазменный компонент коагуляции, так и функцию тромбоцитов. Удлинение ТВ, времени рекальцификации, АЧТВ и ПВ указывает на снижение коагуляционного потенциала плазмы. Вместе с тем стандартные коагуляционные тесты являются интегральными и не позволяют самостоятельно локализовать действие исследуемой фракции на уровне конкретного фактора или фермента. Такое ограничение особенно важно для многокомпонентных растительных фракций, биологический эффект которых может определяться совокупным действием нескольких компонентов.

Полученное удлинение ТВ заслуживает отдельного внимания. Поскольку в тестовой системе конечный этап формирования сгустка оценивается после добавления экзогенного тромбина, повышение ТВ можно использовать как подавления превращения протромбина в тромбин. Удлинение АЧТВ и ПВ одновременно указывает на то, что эффект Skutellarin не ограничивается одним из путей коагуляции. Возможно, Skutellarin ингибирует одного из факторов IXa, Xa, XIa, XIIa, VII или II.

Заключение

Skutellarin оказывает выраженное гипокоагулянтное и антиагрегационное действие в использованной экспериментальной системе *in vitro*. Skutellarin дозозависимо увеличивает тромбиновое время, время рекальцификации, АЧТВ и протромбиновое время. Совокупность результатов свидетельствует о влиянии Skutellarin на плазменный компоненты система гемостаза. Полученные результаты создают научно обоснованную основу для дальнейшего изучения Skutellarina в качестве перспективного соединения для разработки новых антикоагулянтных лекарственных средств.

Литература

1. Wendelboe AM, Raskob GE. Global Burden of Thrombosis: Epidemiologic Aspects. Circulation Research. 2016;118(9):1340–1347. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306841

2. ISTH Steering Committee for World Thrombosis Day. Thrombosis: a major contributor to global disease burden. Thrombosis Research. 2014;134(5):970–973. doi:10.1016/j.thromres.2014.08.014.

3. Hoffman M, Monroe DM 3rd. A cell-based model of hemostasis. Thrombosis and Haemostasis. 2001;85(6):958–965. doi:10.1055/s-0037-1615947.

4. Hoffman M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. Blood Reviews. 2003;17(Suppl 1):S1–S5. doi:10.1016/S0268-960X(03)90000-2.

5. Smith SA. The cell-based model of coagulation. Journal of Veterinary Emergency and Critical Care. 2009;19(1):3–10. doi:10.1111/j.1476-4431.2009.00389.x.

6. Hirsh J. Current anticoagulant therapy—unmet clinical needs. Thrombosis Research. 2003;109(Suppl 1):S1–S8. doi:10.1016/S0049-3848(03)00250-0.

7. Weitz JI. Meeting the unmet needs in anticoagulant therapy. European Journal of Haematology. 2010;(72):1–28. doi:10.1111/j.1600-0609.2010.01461.x.

8. George JN. Platelets. The Lancet. 2000;355(9214):1531–1539. doi:10.1016/S0140-6736(00)02175-9.

9. Born GVR, Cross MJ. The aggregation of blood platelets. The Journal of Physiology. 1963;168(1):178–195. doi:10.1113/jphysiol.1963.sp007185.

10. Cattaneo M. P2Y12 receptors: structure and function. Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2015;13(Suppl 1):S10–S16. doi:10.1111/jth.12952.

11. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, et al. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. PLoS Biology. 2020;18(7):e3000410. doi:10.1371/journal.pbio.3000410.

12. Tian X, Chang L, Ma G, Wang T, Lv M, Wang Z, Chen L, Wang Y, Gao X, Zhu Y. Delineation of platelet activation pathway of scutellarein revealed its intracellular target as Protein Kinase C. Biological & Pharmaceutical Bulletin. 2016;39(2):181–191. doi:10.1248/bpb.b15-00511.

13. Ng VL. Prothrombin time and partial thromboplastin time assay considerations. Clin Lab Med. 2009;29(2):253–263. doi:10.1016/j.cll.2009.05.002.

14. Mackie I, Casini A, Pieters M, et al. International Council for Standardisation in Haematology recommendations on fibrinogen assays, thrombin clotting time and related tests in the investigation of bleeding disorders. Int J Lab Hematol. 2024;46(1):20–32. doi:10.1111/ijlh.14201.

15. Khoshimov NN, Mukhtorov AA, Nasirov KE, Rakhimov RN, Mamadaminov RR (2023). Effects of Polyphenols on changes in the transport of Ca^{2+} NMDA-receptors under the influence of L-glutamate. Research Journal of Pharmacy and Technology 16(3):1205-3

16. Numonjonovich KN, Baxtiyarovich KI, Ugli DJI, Salimovich KS, Ugli MAA, Ugli OMM, Erkinovich NK, Amindjanovna MZ, Abdullayevna SG, Nurillayevich RR (2024). Effect of Polyphenols on Changes in the Hemostatic System of Blood Plasma in Healthy and Model Rats with Alzheimer's Disease. Trends in Sciences 21(9):8081

17. Ugli DJI, Bakhtiyarovich KI, Numonjonovich KN, Erkinovich NK, Madmuradovna RG, Abdugaparovich MA, Amindjanovna MZ, Irkinovna YR, Rasuldjanovich MR, Raxmankulovna AN (2025). The Influence of Polyphenols on Calcium Dynamics in Synaptosomes of Model Rats with Attention Deficit Hyperactivity Disorder of Varying Ages. Trends in Sciences 22(9):10434

18. Khoshimov N. N., Saidmurodov S. A., Rakhimov R. N. The Mechanism of action of polyphenol on changes in the dynamics of calcium in the synaptosomes of the rat brain against the background of glutamate. The American journal of applied sciences, 3 (03), 48-55.

19. Khoshimov N. N. et al. Investigation of the effect of polyphenol euphorbin on the transport of L Glutamate and calcium channels to synaptosomes of rat brain //European Journal of Medicine. – 2018. – №. 6. – С. 72-82.

20. Nozim N. Khoshimov, Nasirov E. Kabil, Kamila A. Eshbakovaю. Research Influence Biological Active Agents in the Course of Regulation of Functional Activity of Platelets and System of a Haemostasis. European Journal of Medicine. 2015. Vol. 8, Is. 2, pp. 88-93, DOI: 10.13187/ejm.2015.8.88

21. Khoshimov N. N., Nasirov K. E. Action of Cytisinum on the Transport Mediators and Calcium Channel of Glutamatergic Neurotransmitter Systems of the NMDA Receptor //European Journal of Medicine. – 2017. – №. 5-2. – С. 56-63.

22. Mukhtorov A. A. et al. Regulation of transport of Ca^{2+} NMDA-receptors in rat brain synaptosomes under the influence of polyphenols //European Journal of Medicine. – 2022. – Т. 10. – №. 1. – С. 3-11.

23. Rakhimov R. N. et al. Isolation of New Ellagitannins from Plants of Euphorbiaceous and Its Effect on Calcium Transport in the Nerve Cell of the Rat Brain //Annals of the Romanian Society for Cell Biology. – 2021. – Т. 25. – №. 6.

24. Khoshimov, N. N., Rahimova, G. L., Mirzakulov, S. O., Azizov, V. G., Abduboqiyev, A. R., & Rakhimov, R. N. (2021). Study of the Neuroprotective Properties of Biologically Active Compounds. *Annals of the Romanian Society for Cell Biology*, *25*(6), 2775-2782.