https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19
УДК 54.056:615.22

Check for updates

CC BY 4.0

Оригинальная статья / Research article

Выделения формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов

А. М. Богоутдинова[1], А. К. Уэйли[1], А. О. Понкратова[1], А. А. Орлова[1], М. Ю. Гончаров[1], В. С. Шпакова[2], Н. Т. Фарманова[3], Д. Х. Нуруллаева[3], А. Т. Шарипов[3], С. П. Гамбарян[2], М. Н. Повыдыш[1]*

[1] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А
[2] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова Российской академии наук, 194223, Россия, г. Санкт-Петербург, пр. Тореза, д. 44
[3] Ташкентский Фармацевтический институт, 700015, Узбекистан, г. Ташкент, ул. Ойбека, д. 45

***Контактное лицо:** Повыдыш Мария Николаевна. **E-mail:** maria.povydysh@pharminnotech.com

ORCID: А. М. Богоутдинова – https://orcid.org/0000-0002-8218-0177; А. К. Уэйли – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924; А. О. Понкратова – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; А. А. Орлова – https://orcid.org/0000-0002-7836-578; М. Ю. Гончаров – https://orcid.org/0000-0002-9706-9850; В. С. Шпакова – https://orcid.org/0000-0002- 9304-7099; Н. Т. Фарманова – https://orcid.org/0000-0002-0250-3379; Д. Х. Нуруллаева – https://orcid.org/0000-0003-4324-9220; А. Т. Шарипов – https://orcid.org/0000-0003- 1738-0145; С. П. Гамбарян – https://orcid.org/0000-0002-1470-0791; М. Н. Повыдыш – https://orcid.org/0000-0002-7768-905.

Статья поступила: 20.10.2021 **Статья принята в печать:** 25.11.2021 **Статья опубликована:** 27.12.2021

Резюме

Введение. Анализ клинической и лабораторной картины поражения вирусом SARS-CoV-2 позволяет говорить о наличии в патогенезе больных нарушений микроциркуляции и транспортировки кислорода, гемолиза эритроцитов, интраальвеолярного фибринообразования и микротромбообразования. Соответственно, поиск потенциальных антикоагулянтов, антиагрегантов эритроцитарного ряда, мембраностабилизирующих препаратов и мягких тромболитических препаратов способны предотвратить развитие угрожающих жизни осложнений и снизить смертность пациентов COVID-19.

Цель. Выделение формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и выявление молекулярных механизмов его влияния на активацию тромбоцитов *in vitro*, индуцированную TRAP-6 (Thrombin receptor activated peptide) и ADP (Аденозиндифосфат).

Материалы и методы. Надземные части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) были собраны в питомнике лекарственных растений СПХФУ (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км). Выделение формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида осуществляли методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором. Структуру формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида подтверждали методом одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III, 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрией высокого разрешения (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Германия) в сравнении с литературными данными. Изучение влияния формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида на индуцированную активацию тромбоцитов проводили на тромбоцитах человека, выделенных из крови здоровых добровольцев. Для исследования влияния формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида на агрегацию тромбоцитов использовали метод проточной цитофлуорометрии на приборе Cyto-FLEX (Beckman-Coulter, США).

Результаты и обсуждение. Согласно разработанной в предыдущих исследованиях методики фракционирования и очистки суммарного экстракта травы *O. arvensis* был выделен формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозид в индивидуальном виде для последующих биологических исследований со суммарным выходом 30 % в сравнении с его содержанием в изначальном экстрактом. В пробах с формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозидом и ADP наблюдается выраженное ингибирование активации тромбоцитов – процент активных тромбоцитов колеблется в пределах 6,3–6,6 % при дозах формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида 1 μM, 3 μM и 30 μM. Ингибирующее действие формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида не носит дозозависимый характер ($p \leq 0,05$). В пробах с формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозидом и TRAP также наблюдается выраженное ингибирование активации тромбоцитов. Процент активных тромбоцитов равен 8 % при дозах формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида 1 μM, 15 % при дозах 3 μM, и 16 % при дозе 30 μM. У ингибирующего эффекта формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида наблюдается слабая дозозависимость ($p \leq 0,05$).

Заключение. Введение формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида в дозах 1 μM, 3 μM, 30 μM выраженно ингибирует активацию тромбоцитов, индуцированную ADP и TRAP-6. Для ADP дозозависимого эффекта не возникает, в то время как для TRAP есть слабый дозозависимый эффект, наибольшая эффективность ингибирования достигается при минимальной исследованной дозе 1 μM. Во всех случаях полученные результаты являются статистически значимыми.

Ключевые слова: *Ononis arvensis*, тромбоциты, формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозид, флавоноиды, изофлавоноиды, активация тромбоцитов, проточная цитофлуорометрия

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. А. М. Богоутдинова, А. К. Уэйли, А. О. Понкратова, А. А. Орлова, В. С. Шпакова, Н. Т. Фарманова, Д. Х. Нуруллаева, А. Т Шарипов – экспериментальная работа. М. Ю. Гончаров, С. П. Гамбарян, М. Н. Повыдыш – обсуждение результатов исследования, подготовка текста статьи.

© Богоутдинова А. М., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Гончаров М. Ю., Шпакова В. С., Фарманова Н. Т., Нуруллаева Д. Х., Шарипов А. Т., Гамбарян С. П., Повыдыш М. Н., 2021
© Bogoutdinova A. M., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Goncharo M. Yu., Shpakova V. S., Farmanova N. T., Nurullaeva D. Kh., Sharipov A. T., Gambaryan S. P., Povydysh M. N., 2021

Финансирование. Результаты работы получены в рамках Соглашения № 075-15-2021-967 от 24 сентября 2021 г. при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Для цитирования: Богоутдинова А. М., Уэйли А. К., Понкратова А. О., Орлова А. А., Гончаров М. Ю., Шпакова В. С., Фарманова Н. Т., Нуруллаева Д. Х., Шарипов А. Т., Гамбарян С. П., Повыдыш М. Н. Выделения формононетин-7-О-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и оценка его влияния на индуцированную активацию тромбоцитов. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4–1):14–19. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19

Isolation of Formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside from the Grass of *Ononis arvensis* L. and the Assessment of its Effect on Induced Platelet Activation

Alina M. Bogoutdinova[1], Andrei K. Whaley[1], Anastasiia O. Ponkratova[1], Anastasia A. Orlova[1], Michail Yu. Goncharov[1], Valentina S. Shpakova[2], Nodira T. Farmanova[3], Dilobar Kh. Nurullaeva[3], Avez T. Sharipov[3], Stepan P. Gambaryan[2], Maria N. Povydysh[1]*

[1] Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia
[2] Federal State Budgetary Institution of Science Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry. I. M. Sechenov Russian Academy of Sciences, 44, Toreza Ave., St. Petersburg, 194223, Russia
[3] Tashkent Pharmaceutical Institute, 45, Oybek str., Tashkent, 700015, Uzbekistan

***Corresponding author:** Maria N. Povydysh. **E-mail:** maria.povydysh@pharminnotech.com

ORCID: Alina M. Bogoutdinova – https://orcid.org/0000-0002-8218-0177; Andrei K.Whaley – https://orcid.org/0000-0002-4847-5924; Anastasiia O. Ponkratova – https://orcid.org/0000-0003-4879-9336; Anastasia A. Orlova – https://orcid.org/0000-0002-7836-578; Michail Yu. Goncharov – https://orcid.org/0000-0002-9706-9850; Valentina S. Shpakova – https://orcid.org/0000-0002- 9304-7099; Nodira T. Farmanova – https://orcid.org/0000-0002-0250-3379; Dilobar Kh. Nurullaeva – https://orcid.org/0000-0003-4324-9220; Avez T. Sharipov – https://orcid.org/0000-0003- 1738-0145; Stepan P. Gambaryan – https://orcid.org/0000-0002-1470-0791; Maria N. Povydysh – https://orcid.org/0000-0002-7768-905.

Received: 20.10.2021 **Revised:** 25.11.2021 **Published:** 27.12.2021

Abstract

Introduction. Analysis of the clinical and laboratory picture of the SARS-CoV-2 infection suggests the presence of microcirculation and oxygen transport disorders, hemolysis of erythrocytes, intra-alveolar fibrin formation and microthrombus formation in the patient's pathogenesis. Accordingly, the search for potential anticoagulants, erythrocyte antiplatelet agents, membrane stabilizing drugs and mild thrombolytic drugs can prevent the development of life-threatening complications and reduce the mortality of COVID-19 patients.

Aim. Isolation of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside from the grass of *Ononis arvensis* L. and identification of the molecular mechanisms of its effect on platelet activation *in vitro*, induced by TRAP-6 (Thrombin receptor activated peptide) and ADP (adenosine diphosphate).

Materials and methods. Terrestrial parts of *Ononis arvensis* L. were collected in the SPCPU nursery of medicinal plants (Leningrad region, Vsevolozhsky district, Priozerskoe highway, 38 km). Isolation of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside was carried out by preparative high performance liquid chromatography on a Smartline device (Knauer, Germany) equipped with a spectrophotometric detector. The structure of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside was confirmed by one-dimensional and two-dimensional NMR spectroscopy (Bruker Avance III, 400 MHz, Germany), as well as high-resolution mass spectrometry (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Germany). The study of the effect of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside on induced platelet activation was carried out on human platelets isolated from the blood of healthy volunteers. To research the effect of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside on platelet aggregation flow cytofluorometry with Cyto-FLEX (Beckman-Coulter, USA) was used.

Results and discussion. According to the method of fractionation and purification of the total extract of *O. arvensis* developed in previous studies, formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside was isolated in an individual form for subsequent biological studies with a total yield of 30 % in comparison with its content in the original extract. In samples with formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside and ADP, there is a pronounced inhibition of platelet activation – the percentage of active platelets ranges from 6.3–6.6 % at doses of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside 1 μM, 3 μM and 30 μM. The inhibitory effect of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside is not dose-dependent ($p \leq 0.05$). In samples with formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside and TRAP, there is also a pronounced inhibition of platelet activation. The percentage of active platelets is 8 % at 1 μM formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside doses, 15 % at 3 μM doses, and 16 % at 30 μM doses.

Conclusion. Administration of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside at doses of 1 μM, 3 μM, 30 μM strongly inhibits platelet activation induced by ADP and TRAP-6. For ADP, there is no dose-dependent effect, while for TRAP there is a weak dose-dependent effect, the greatest inhibition efficiency is achieved with the minimum investigated dose of 1 μM. In all cases, the results obtained are statistically significant.

Keywords: *Ononis arvensis*, platelets, formononetin-7-O-β-D-glucopyranosid, flavonoids, isoflavonoids, platelet activation, flow cytometry

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Alina M. Bogoutdinova, Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Ponkratova, Anastasia A. Orlova, Valentina S. Shpakova, Nodira T. Farmanova, Dilobar Kh. Nurullaeva, Avez T. Sharipov, Shavkadzhon I. Azizov. – experimental work; Mikhail Yu. Goncharov., Stepan P. Gambaryan, Maria N. Povydysh – discussion of research results, preparation of the text of the article.

Funding. Research results were obtained with financial support from the Russian Ministry of Education and Science in accordance to agreement № 075-15-2021-967 from 24th of September 2021.

For citation: Bogoutdinova A. M., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Orlova A. A., Goncharo M. Yu., Shpakova V. S., Farmanova N. T., Nurullaeva D. Kh., Sharipov A. T., Gambaryan S. P., Povydysh M. N. Isolation of formononetin-7-O-β-D-glucopyranoside from the grass of *Ononis arvensis* L. and the assessment of its effect on induced platelet activation. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(4–1):14–19. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-14-19

ВВЕДЕНИЕ

Согласно современным данным, 20–25 % всех препаратов, упомянутых в Фармакопеях, происходят из природных источников, независимо от того, используются ли они в виде индивидуальных природных соединений в неизменном виде, или с небольшими химическими модификациями. Фактически, около 50 % фармацевтических препаратов производятся на основе соединений, впервые идентифицированных или выделенных из растений [1].

Тяжелый острый респираторный синдром, развивающийся при новой коронавирусной инфекции (COVID-19), приводит к значительным человеческим жертвам. Хотя изначально заболевание преимущественно характеризовалось респираторными симптомами, стало ясно, что в него вовлечены и другие системы, включая сердечно-сосудистую. Анализ клинической и лабораторной картины поражения вирусом SARS-CoV-2 позволяет говорить о наличии в патогенезе больных нарушений микроциркуляции и транспортировки кислорода, гемолиза эритроцитов, интраальвеолярного фибринообразования и микротромбообразования. Предупреждение данных процессов, превентивная и ранняя терапия, применение антикоагулянтов, антиагрегантов, мембраностабилизирующих препаратов и, возможно, мягких тромболитических препаратов для амбулаторного применения способны предотвратить развитие угрожающих жизни осложнений и снизить смертность пациентов COVID-19 [2–4]. Таким образом, исследования, связанные с поиском новых антикоагулянтов, антитромбоцитарных и антитромботических средств, имеют важное значение.

В настоящее время на фармацевтическом рынке существует достаточно препаратов из группы антиагрегантов с различными механизмами действия (клопидогрел, циклопидин, дипиридамол, ацетилсалициловая кислота), однако в некоторых случаях риски от применения этих препаратов могут превышать их пользу. Например, при наличии сопутствующих заболеваний, связанных с риском повышенных кровотечений, применение таких препаратов противопоказано.

Исследованиям действия препаратов природного происхождения на тромбоциты и поиску новых природных молекул с кардиотропной активностью посвящено большое количество работ [5–7]. Однако в большинстве исследований отмечается только конечный результат действия препаратов без анализа молекулярных механизмов, ответственных за ингибирование, либо активирование тромбоцитов. Известно, что в основе многих сердечно-сосудистых заболеваний лежит окислительный стресс, часто связанный с местным или системным воспалением [8–10]. Сообщается об антиагрегантной и тромболитической активности природных соединений, относящихся к классу флавоноидов. Обладая также высоким антиоксидантным потенциалом, данные соединения позволяют увеличить эффективность терапии патологий, сопровождающихся развитием окислительного стресса.

Формононетин и его производные относятся к классу изофлавонов. Для ряда гликозидов формононетина, в том числе формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида показаны антиоксидантная, кардиопротекторная, нейропротекторная, противовоспалительная и антиагрегантная активность и др. [11–16]. Целью данного исследования является выделение формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и выявление молекулярных механизмов его влияния на активацию тромбоцитов *in vitro*, индуцированную TRAP-6 (Thrombin receptor activated peptide) и ADP (Аденозиндифосфат).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Надземная часть стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) была собрана в питомнике лекарственных растений СПХФУ (Ленинградская область, Всеволожский район, Приозерское шоссе, 38 км). Выделение формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида осуществляли методами колоночной хроматографии (Dianion HP-20) и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе Smartline (Knauer, Германия), оснащенном спектрофотометрическим детектором, при длине волны 254 нм. Применяли хроматографическую колонку Kromasil 100-5C18, 250 × 30 мм. Скорость потока элюента – 40 мл/мин. Элюент: вода (компонент A), ацетонитрил (компонент B) с содержанием ТФУ 0,1 % (с H_2O : CH_3CN – 5:95 до H2O : CH3CN – 50:50, по объему). Структуру формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида подтверждали методом одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III, 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрией высокого разрешения (HR-ESI-MS) (Bruker Micromass Q-TOF, Германия).

Изучение влияния формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида на индуцированную активацию тромбоцитов проводили на тромбоцитах человека, выделенных из крови здоровых добровольцев. Все экспериментальные протоколы одобрены и утверждены этическим комитетом Института эволюционной физиологии и биохимии РАН (протокол № 3-03 от 02.03.20) и соответствуют Хельсинкской декларации. Кровь отбирали в пробирку с цитратным буфером с добавлением EGTA (2,5 μM), центрифугировали 7 минут при 1400 g. Затем отбирали плазму, обогащённую тромбоцитами (platelet-rich plasma, PRP).

Для исследования влияния формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида на активацию тромбоцитов, индуцированную ADP или TRAP-6, PRP разбавляли HEPES буфером (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl2, 1 mM CaCl2, 10 m M D-глюкозы, 10 mM HEPES, pH = 7.4;

разведение 1:13), затем в пробы вводили гликозид формононетина в концентрациях 1 μM, 3 μM, 30 μM. Пробы с введённым веществом инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем во все пробы за исключением контроля вводили активирующий фактор – ADP 5 μM или TRAP 5 μM и фибриноген, меченый Alexa-Fluor 647 (Molecular Probes, Германия). После инкубации с активирующим фактором в течение 5 минут, реакция останавливалась разведением в фосфатном буфере (PBS) в соотношении 10:1. Для анализа использовали метод проточной цитофлуорометрии на приборе Cyto-FLEX (Beckman-Coulter, США). Каждый образец оценивали по 15 000 событий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Фракционирование и очистка суммарного экстракта, полученного из 300 грамм травы стальника полевого с целью выделения формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида в индивидуальном виде для последующих биологических исследований были проведены согласно методике, разработанной в предыдущем исследовании [17]. Сырье подвергали воздушно-теневой сушке, 300 г сырья измельчали и просеивали через сито с диаметром отверстий 1,0 мм. Проводили многократную экстракцию сырья 96 % этиловым спиртом в соотношении 1:6.

Первый этап исчерпывающей жидкость-жидкостной экстракции проводился с равными объемами гексана, затем к спиртовому извлечению добавлялось 50 мл воды очищенной и по аналогии проводили исчерпывающую жидкость-жидкостную экстракцию с равными объемами дихлорметана. Содержание формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида в остаточной водно-спиртовой подфракции после всех этапов жидкость-жидкостной экстракции составило 83 % в сравнении с изначальным экстрактом. В качестве вещества сравнения использовали выделенный в результате предыдущих исследований формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозид [18].

Потери формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида на этапе жидкость-жидкостной экстракции можно объяснить его частичной растворимостью в дихлорметане и также тем фактом, что этанол способен смешиваться в любых соотношениях как с водой, так и с дихлорметаном, что может вызывать изменения коэффициента распределения формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида.

Остаточную водно-спиртовую подфракцию выпаривали до приблизительного объема 75 мл и загружали на открытую колонку с обращенно-фазовым сорбентом Dianion HP 20. Элюирование проводили аналогично с предыдущими исследованиями с постепенным понижением полярности изначального элюента с шагом 10 % (с H2O:96 % EtOH 100:0 до H2O:96 % EtOH 0:100, по объему). Сбор элюата осуществляют в колбы по 100 мл. После ВЭЖХ анализа собранных фракций все фракции со значимым содержанием формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида без мешающих, совместно или близко элюирующими пиками объединяли и выпаривали до объема 20 мл. Содержание формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида в полученной фракции после очистки на колонке в сравнении с изначальным экстрактом составило 37 %.

Формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозид затем выделяли в индивидуальном виде путем препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии. Содержание формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида после очистки на препаративном хроматографе в сравнении с изначальным экстрактом составило 30 %.

Формононетин, начиная с концентрации 1 μM практически полностью ингибирует ADP-индуцированную активацию тромбоцитов (рисунок 1)

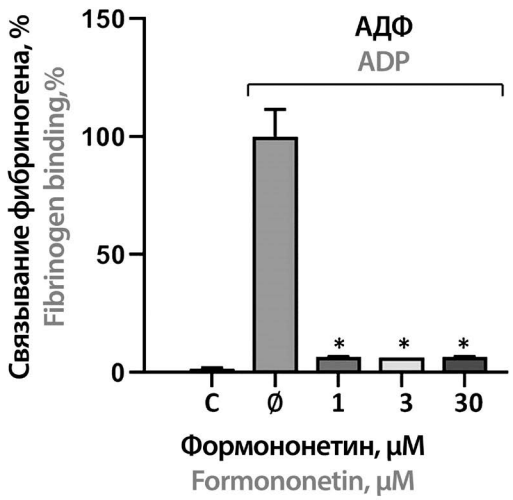

Рисунок 1. Формононетин ингибирует ADP-индуцированную активацию тромбоцитов

Figure 1. Formononetin inhibits ADP-induced platelet activation

Активацию тромбоцитов, вызванную ADP, приняли за 100 % и рассматривали как позитивный контроль. В контрольной пробе без активации наблюдалось 1.5 % активированных тромбоцитов. В пробах с формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозидом и ADP наблюдается выраженное ингибирование активации тромбоцитов – процент активных тромбоцитов колеблется в пределах 6,3–6,6 % при дозах формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида 1 μM, 3 μM и 30 μM. Данные представлены как M ± SD, (N = 4, $p \leq 0,05$).

Сходные результаты были получены при активации тромбоцитов TRAP-6, были получены результаты, представленные на (рисунок 2).

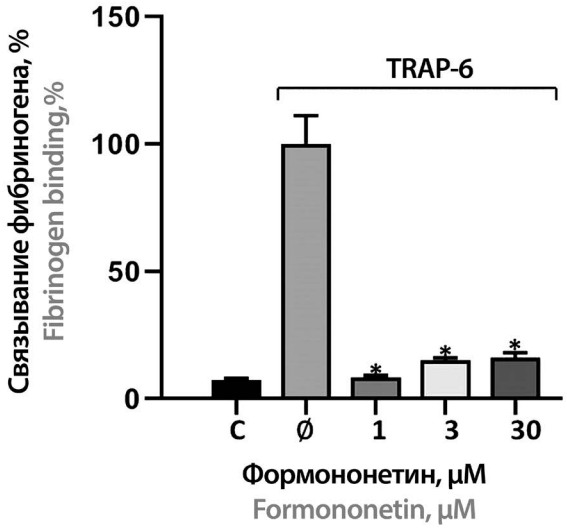

Рисунок 2. Формононетин ингибирует активацию тромбоцитов, вызванную TRAP-6

Figure 2. Formononetin inhibits TRAP-6-induced platelet activation

Как и в первом случае, активацию тромбоцитов, вызванную TRAP-6 в пробе, приняли за 100 %. Процент активированных тромбоцитов в контрольной пробе равен 7,3 %. В пробах с формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозидом и TRAP наблюдается выраженное ингибирование активации тромбоцитов. Процент активных тромбоцитов равен 8 % при дозах формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида 1 μM, 15 % при дозах 3 μM, и 16 % при дозе 30 μM. Данные представлены как M ± SD, (N = 4, p ≤ 0,05).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами была дополнена методика выделения формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида из травы стальника полевого (*Ononis arvensis* L.), что позволило установить процент выхода формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозида из суммарного экстракта.

Полученные результаты показали, что формононетин-7-O-β-D-глюкопиранозид значительно ингибирует активацию тромбоцитов, индуцированную ADP и TRAP-6. Для выяснения молекулярных механизмов ингибирующего воздействия формононетина на тромбоциты необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*. 2020;83(3):770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
2. Al-Ani F., Chehade S., Lazo-Langner A. Thrombosis risk associated with COVID-19 infection. A scoping review. *Thrombosis research*. 2020;1(192):152–160. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.05.039.
3. Tsoupras A., Lordan R., Zabetakis I. Thrombosis and COVID-19: The Potential role of nutrition. *Frontiers in Nutrition*. 2020;7:177. DOI: 10.3389/fnut.2020.583080.
4. Громов А. А., Кручинина М. В., Рабко А. В. Коронавирусная болезнь COVID-19: неиспользованные возможности терапии. *Русский медицинский журнал*. 2020;28(9):2–6.
5. Nignpense E. B., Chinkwo K. A., Blanchard C. L., Santhakumar A. B. Polyphenols: modulators of platelet function and platelet microparticle generation? *International journal of molecular sciences*. 2020;21(1):146. DOI: 10.3390/ijms21010146.
6. Olas B. A review of in vitro studies of the anti-platelet potential of citrus fruit flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 2021:112090. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112090.
7. Ивкин Д. Ю., Лужанин В. Г., Карпов А. А., Минасян С. М., Полещенко Я. И., Мамедов А. Э., Повыдыш М. Н., Поройков В. В., Наркевич И. А. Эмбинин-перспективное кардиотоническое средство природного происхождения. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;3:166–170.
8. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*. 2018;13:757. DOI: 10.2147/CIA.S158513.
9. Peoples J. N., Saraf A., Ghazal N., Pham T. T., Kwong J. Q. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Experimental & molecular medicine*. 2019;51(12):1–3. DOI: 10.1038/s12276-019-0355-7.
10. Steven S., Frenis K., Oelze M., Kalinovic S., Kuntic M., Bayo Jimenez M. T., Vujacic-Mirski K., Helmstädter J., Kröller-Schön S., Münzel T., Daiber A. Vascular inflammation and oxidative stress: major triggers for cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019:1–26. DOI: 10.1155/2019/7092151.
11. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016:5. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
12. Cheng Y., Xia Z., Han Y., Rong J. Plant natural product formononetin protects rat cardiomyocyte H9c2 cells against oxygen glucose deprivation and reoxygenation via inhibiting ROS formation and promoting GSK-3β phosphorylation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016:1–11. DOI: 10.1155/2016/2060874.
13. Huang Z., Liu Y., Huang X. Formononetin may protect aged hearts from ischemia/reperfusion damage by enhancing autophagic degradation. *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(6):4821–4830. DOI: 10.3892/mmr.2018.9544.
14. Li T., Zhong Y., Tang T., Luo J., Cui H., Fan R., Wang Y., Wang D. Formononetin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via regulation of the PI3K/PTEN/Akt signaling pathway. *Drug design, development and therapy*. 2018;12:3675. DOI: 10.2147/DDDT.S180837.
15. Zhu H., Zou L., Tian J., Lin F., He J., Hou J. Protective effects of sulphonated formononetin in a rat model of cerebral ischemia and reperfusion injury. *Planta medica*. 2014;80(04):262–268. DOI: 10.1055/s-0033-1360340.
16. Зверев Я. Ф. Антитромбоцитарная активность флавоноидов. *Вопросы питания*. 2017;86(6):6–20.
17. Лужанин, В. Г., Уэйли, А. К., Понкратова, А. О., Гришукова Е. А., Сулоев, И. С., Смирнов, С. Н., Серебряков, Е. Б. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.). *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(1):83–89. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.

REFERENCES

1. Newman D. J., Cragg G. M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of natural products*. 2020;83(3):770–803. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.
2. Al-Ani F., Chehade S., Lazo-Langner A. Thrombosis risk associated with COVID-19 infection. A scoping review. *Thrombosis research*. 2020;1(192):152–160. DOI: 10.1016/j.thromres.2020.05.039.

3. Tsoupras A., Lordan R., Zabetakis I. Thrombosis and COVID-19: The Potential role of nutrition. *Frontiers in Nutrition*. 2020;7:177. DOI: 10.3389/fnut.2020.583080.
4. Gromov A. A., Kruchinina M. V., Rabko A. V. Coronavirus disease CIVID-19 - unused therapy opportunities. *Russkiy meditsinskiy zhurnal*. 2020;28(9):2–6. (In Russ.)
5. Nignpense E. B., Chinkwo K. A., Blanchard C. L., Santhakumar A. B. Polyphenols: modulators of platelet function and platelet microparticle generation? *International journal of molecular sciences*. 2020;21(1):146. DOI: 10.3390/ijms21010146.
6. Olas B. A review of in vitro studies of the anti-platelet potential of citrus fruit flavonoids. *Food and Chemical Toxicology*. 2021:112090. DOI: 10.1016/j.fct.2021.112090.
7. Ivkin D. Yu, Luzhanin V. G., Karpov A. A., Minasyan S. M., Poleshchenko Ya. I., Mamedov A. E., Povydysh M. N., Poroykov V. V., Narkevich I. A. Embinin is a perspective cardiotonic mean for natural origin. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;3:166–170. (In Russ.)
8. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., Bonaduce D., Abete P. Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical interventions in aging*. 2018;13:757. DOI: 10.2147/CIA.S158513.
9. Peoples J. N., Saraf A., Ghazal N., Pham T. T., Kwong J. Q. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in heart disease. *Experimental & molecular medicine*. 2019;51(12):1–3. DOI: 10.1038/s12276-019-0355-7.
10. Steven S., Frenis K., Oelze M., Kalinovic S., Kuntic M., Bayo Jimenez M. T., Vujacic-Mirski K., Helmstädter J., Kröller-Schön S., Münzel T., Daiber A. Vascular inflammation and oxidative stress: major triggers for cardiovascular disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2019:1–26. DOI: 10.1155/2019/7092151.
11. Panche A. N., Diwan A. D., Chandra S. R. Flavonoids: an overview. *Journal of Nutritional Science*. 2016:5. DOI: 10.1017/jns.2016.41.
12. Cheng Y., Xia Z., Han Y., Rong J. Plant natural product formononetin protects rat cardiomyocyte H9c2 cells against oxygen glucose deprivation and reoxygenation via inhibiting ROS formation and promoting GSK-3β phosphorylation. *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016:1–11. DOI: 10.1155/2016/2060874.
13. Huang Z., Liu Y., Huang X. Formononetin may protect aged hearts from ischemia/reperfusion damage by enhancing autophagic degradation. *Molecular Medicine Reports*. 2018;18(6):4821–4830. DOI: 10.3892/mmr.2018.9544.
14. Li T., Zhong Y., Tang T., Luo J., Cui H., Fan R., Wang Y., Wang D. Formononetin induces vasorelaxation in rat thoracic aorta via regulation of the PI3K/PTEN/Akt signaling pathway. *Drug design, development and therapy*. 2018;12:3675. DOI: 10.2147/DDDT.S180837.
15. Zhu H., Zou L., Tian J., Lin F., He J., Hou J. Protective effects of sulphonated formononetin in a rat model of cerebral ischemia and reperfusion injury. *Planta medica*. 2014;80(04):262–268. DOI: 10.1055/s-0033-1360340.
16. Zverev Ya. F. *Antitrombotsitarnaya aktivnost flavonoidov* [Antiplatelet activity of flavonoids]. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*. 2017;86(6):6–20. (In Russ.)
17. Luzhanin V. G., Whaley A. K., Ponkratova A. O., Grishukova E. A., Suloev I. S., Smirnov S. N., Serebryakov E. B. Isolation of individual compounds from the terrestrial parts of *Ononis arvensis* L. and *Solidago canadensis* L. *Razrabotka i registratsiya lekarst vennykh sredst v = Drug development & registration*. 2021;10(1):83–89. (In Russ.). https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89.