



UDK: 616.8; 577.2.04; 612.8

Yulduz KUVANDIKOVA,
O'zbekiston Milliy universiteti tayanch doktoranti
E-mail: kuvandikovayulduz@gmail.com
Zulayxo MAMATOVA,
O'zbekiston Milliy universiteti dotsenti
Zarnigor RAXMONALIYEVA,
O'zbekiston Milliy universiteti magistranti

O'zR FA Bioorganik kimyo instituti katta ilmiy xodimi, PhD R.Maxmudov taqrizi asosida

DETERMINATION OF THE ANTICOAGULANT PROPERTIES OF THE POLYPHENOLIC COMPOUND PC 9 IN RAT BLOOD PLASMA UNDER *IN VITRO* CONDITIONS

Annotation

This article analyzes the results of coagulation tests - activated partial thromboplastin time (QFTV), prothrombin time (PT), and fibrinogen levels - obtained during the evaluation of the polyphenolic compound PC-9 as a novel anticoagulant agent. The experiments were conducted on male white Wistar rats weighing 200–300 g. QFTV and PT tests were performed using the classical coagulation method, while the fibrinogen level was measured using the Von Clauss method. All studies were carried out in accordance with Good Laboratory Practice (GLP) and the requirements established by the European Union Directive 2010/63/EU and organizations such as the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) in the United States. Differences in coagulation time indicators and fibrinogen concentrations were identified between the experimental and control groups, allowing for the assessment of the anticoagulant efficacy of the compound. The coagulation tests conducted on the PC-9 polyphenolic compound demonstrated significant anticoagulant properties. Further *in vivo* models and clinical trials are recommended. Based on the results of this experiment, the compound shows potential for use as an anticoagulant.

Key words: anticoagulant, blood plasma, blood clotting time, coagulation tests, polyphenol, hemostasis system.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АНТИКОАГУЛЯНТНЫХ СВОЙСТВ ПОЛИФЕНОЛЬНОГО СОЕДИНЕНИЯ РС 9 В ПЛАЗМЕ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ *IN VITRO*

Аннотация

В данной статье анализируются результаты коагуляционных тестов – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое время (ПВ) и уровень фибриногена – полученные при испытании полифенольного соединения РС-9 в качестве нового антикоагулянтного средства. Эксперименты проводились на самцах белых крыс линии Вистар массой 200 - 300 г. Тесты на АЧТВ и ПВ выполнялись с использованием классического метода коагуляции, а уровень фибриногена определялся по методу фон Клауса. Все исследования проводились в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (GLP) и требованиями, установленными Директивой Европейского Союза 2010/63/EU, а также организациями, аналогичными Комитету по уходу и использованию лабораторных животных (IACUC) в США. Были выявлены различия в показателях времени и концентрации фибриногена между экспериментальной и контрольной группами, что позволило оценить эффективность антикоагулянтного соединения. Коагуляционные тесты, проведенные с полифенольным соединением РС-9, продемонстрировали его выраженные антикоагулянтные свойства. В дальнейшем рекомендуется проведение *in vivo* моделей и клинических испытаний. Полученные результаты указывают на перспективность применения данного полифенольного соединения в качестве антикоагулянта.

Ключевые слова: антикоагулянт, плазма крови, время свертывания крови, коагуляционные тесты, полифенол, система гемостаза.

PC 9 POLIFENOL MODDASINING ANTIKOAGULYANT XUSUSIYATINI KALAMUSH QON PLAZMASIDA *IN VITRO* SHAROITIDA ANIQLASH

Annotatsiya

Ushbu maqolada PC-9 polifenolning yangi antikoagulyant modda sifatida sinovdan o'tkazishda olingan koagulyatsiya testlari natijalari - aktivlashtirilgan tromboplastin vaqt, prothrombin vaqt va fibrinogen darajalari - tahlil qilinadi. Tajribalar 200-300 g oq Wistar zotli erkak kalamushlarda o'tkazildi. Qisman faollashgan tromboplastin vaqti va prothrombin vaqti testlari Klassik koagulyatsiya metodi yordamida, Fibrinogen testi Von Claus Metodi yordamida qilindi. Ushbu tadqiqotlarning barchasi Yevropa Ittifoqining 2010/63/EU direktivasi va Amerikada IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) kabi tashkilotlar tomonidan o'rnatilgan qoidalar va talablar bo'yicha yaxshi laboratoriya amaliyoti asosida olib borildi. Eksperimental va nazorat guruhlarini o'rtasida vaqt ko'rsatkichlari va fibrinogen konsentratsiyasi bo'yicha farqlar aniqlanib, antikoagulyant moddaning samaradorligi baholanadi. PC-9 polifenol moddasi ustida olib borilgan koagulyatsiya testlari moddaning antikoagulyant xususiyatlarini sezilarli namoyish etdi. Kelgusida *in vivo* modellar va klinik sinovlar o'tkazish tavsiya etiladi. Ushbu eksperimentdan olingan natijalar asosida polifenol moddasini antikoagulyant sifatida qo'llash istiqbollari mavjudligi ko'rsatildi.

Kalit so'zlar: antikoagulyant, qon plazmasi, qon ivish vaqti, koagulyatsion testlar, polifenol, gemostaz tizimi.

Kirish. Qon ivishi tizimi koagulyatsiya kaskadi orqali amalga oshadi va bu jarayon ko'plab kasalliklarda patologik o'zgarishlarga olib keladi. Koagulyatsiya kaskadi bu eng murakkab bosqich bo'lib, plazmadagi ivish omillari (faktorlar) ketma-ket faollashib, fibrin iplarini hosil qiladi. Fibrin trombositlar bilan birikib, mustahkam qon ivigani (tromb) hosil qiladi [1,7,9].

Shu jihatdan PC 9 polifenol moddasining qonning giperkoagulyatsiyasiga ta'sirini o'rganish va uni amaliyotga tatbiq etish bizning maqsadimiz. Polifenollar trombositlarning faolligini susaytiradi, ularning agregatsiyasini kamaytiradi[2]. Bu esa tromb hosil bo'lishining oldini oladi. Shuningdek, polifenollar Koagulyatsiya faktorlariga to'g'ridan-to'g'ri ta'sir qiladi[3]. Ba'zi polifenollar trombin, Xa omili, yoki fibrinogen bilan to'g'ridan-to'g'ri o'zaro ta'sirga kirishib, ularning faolligini kamaytiradi[5,10]. Oksidlovchi stress trombositlarning haddan tashqari faollashuviga sabab bo'ladi[4,8]. Polifenollar esa bu stressni kamaytirib, giperkoagulyatsiyani oldini oladi. Polifenollar qon tomirlar devorini sog'lom saqlashda yordam beradi, NO (azot oksidi) ishlab chiqarilishini oshiradi. NO esa trombositlar faolligini inhiberladi[6,11].

Material va usullar. PC-8 polifenolining qon plazmasining ivish jarayoniga ta'siri qisman faollashgan tromboplastin vaqti – QFTV, prothrombin vaqti – PT va Fibrinogen testlariga in vitro usulida trombositlar soni kam bo'lgan kalamushlarning qon plazmasida koagulometrda tekshirib ko'rildi(Rayto, Xitoy). Plazmani tayyorlash uchun qon 9:1 nisbatda natriy sitrat bilan olinadi. 1500–3000 g da 15 daqiqa sentrifugalanadi va trombositless plazma olinadi. Plazmani inkubatsiya qilish uchun 100 µL plazma ustiga 100 µL QFTV reaktivi (aktivator+fosfolipid) solib aralashtiriladi va 37° da 3-5 daqiqa inkubatsiya qilinadi. So'ngra 100 µL oldindan 37° ga qizdirilgan 0.025 M CaCl₂ qo'shiladi. Shu paytdan taymer ishga tushiriladi. Pihti hosil bo'lguncha vaqt sekunlarda o'lchanadi va bu QFTV ko'rsatkichi hisoblanadi. Odatda normal holatda 25-35 soniya Ichida qon iviydi.

PT (prothrombin) testi – ekstrinsik va umumiy koagulyatsiya yo'llarini baholaydi. U asosan faktor VII, shuningdek, faktor V, X, protrombin (II) va fibrinogen (I) ni baholashda ishlatiladi. Ayniqsa kumarin (warfarin) terapiyasi monitoringi, jigar yetishmovchiligi va DIC holatlarida qo'llaniladi. PT testi metodikasi (klassik usul): Qon 9:1 nisbatda 0.109 M Na-sitrat bilan olinadi. 1500–3000 g da 15 daqiqa sentrifugalanadi. Trombositless sitratlangan plazma olinadi. 100 µL plazma 37°C da 2 daqiqa davomida inkubatsiya qilinadi. 200 µL tromboplastin + CaCl₂ eritmasi 37°C da qizdirilgan holda qo'shiladi. Shu vaqtda taymer ishga tushiriladi. Trombin pihtisi hosil bo'lgan vaqtgacha bo'lgan oraliq (sekunlarda) -PT ko'rsatkichi hisoblanadi. Normada bu ko'rsatkich 11 – 15 soniya (reagentga qarab biroz farq qiladi) ni tashkil qiladi.

Fibrinogen testiga tekshirish uchun VonClaus methodidan foydalanildi. Tayyor plazmaga ma'lum miqdorda yuqori konsentratsiyali trombin qo'shiladi. Trombin plazmadagi fibrinogeni fibringa aylantiradi, natijada trombus (trombin pihtisi) hosil bo'ladi. Pihti hosil bo'lish vaqti (clotting time) maxsus qurilmada o'lchanadi. Bu vaqt standart kalibrovka grafigi bilan solishtiriladi va fibrinogen konsentratsiyasi (g/L) aniqlanadi. Bunda 1:10 nisbatda plazma buferi 200µl tayyorlab olindi hamda 37 da 120 sek inkubatsiya qilindi. So'ngra ustiga 100µl R1 (thrombin) solinib control olindi. Natijalar ijobiy bo'lgach modda ta'sir etildi.

Natijalar. PC-9 polifenolining qon ivish jarayoniga ta'sir mexanizmini aniqlash maqsadida qisman faollashgan tromboplastin vaqtiga-QFTV testiga qanday ta'sir qilishini ko'rdik. Tekshirishlarimiz natijasiga ko'ra nazorat guruhida QFTV ko'rsatkichi $32,6 \pm 0,18$ soniya ni tashkil etdi. Antikoagulyant modda yuborilgan eksperimental guruhda esa ushbu ko'rsatkich $123 \pm 0,75$ soniya gacha sezilarli darajada uzaygan ($p < 0,05$). Bu esa mazkur moddaning ichki koagulyatsiya yo'lga ta'sir qiluvchi antikoagulyant xususiyatga ega ekanligini ko'rsatadi. Bunda PC-9 uchun optimal doza 50µl ni tashkil etdi.

PT (Prothrombin Time) testi bo'yicha nazorat guruhida ko'rsatkich $25,67 \pm 0,7$ soniyani tashkil etgan bo'lib, modda yuborilgan guruhda u $8,4 \pm 7,4$ soniyaga o'zgardi. Biroq bu o'zgarish statistik jihatdan ishonchli emas edi ($T = 1,71$; $p > 0,05$), ya'ni PC-9 moddasining ekstrinsik yo'lga ahamiyatli ta'siri aniqlanmadi.

Fibrinogen miqdori nazoratda $11,4 \pm 3,72$ mg/dl bo'lgan, modda ta'sirida esa bu qiymat $78,3 \pm 1,22$ mg/dl gacha oshdi. Bu farq ishtirok etgan testlar orasida eng aniq o'zgarishlardan biri bo'lib, statistik tahlilga ko'ra $p < 0,05$ darajasida ishonchli hisoblandi ($T = 9,42$). Bu esa PC-9 moddasining fibrinogen darajasini oshiruvchi ta'siri borligini ko'rsatadi.

1-jadval

PC-9 polifenolining koagulyatsion testlarda plazmaning ivish vaqtiga ta'siri

PC 9 polifenolining qon ivishiga ta'siri			
	M±m	T	P
Kontrol	32,6±0,18		
QFTV	123±0,75	104,24	<0,05
Kontrol	25,67±0,7		
PT	8,4±7,4	1,71262	>0,05
Kontrol	11,4±3,72		
Fibrinogen	78,3±1,22	9,42542	<0,05

Izoh: T - Student kriteriyasi bo'yicha ishonchlilik darajasi. (***) $p < 0,005$; 95% dan yuqori; n=6)

Munozara. Olingan natijalar PC 9 polifenolining antikoagulyant xususiyatlari samarali ekanini ko'rsatadi. QFTV ko'rsatkichlarining uzayishi intrinsic yo'llar inhibitsiyasini ifodalaydi. Fibrinogen konsentratsiyasining pasayishi esa pihti tolalarining hosil bo'lishiga to'sqinlik qilishini ko'rsatadi. Bu antikoagulyant modda klinik amaliyotda tromboz profilaktikasi uchun istiqbolli vosita bo'lishi mumkin. Ayniqsa, polifenol tabiatga ega bo'lgan moddalarning xavfsizlik profili nisbatan yuqori bo'lganligi sababli, ularni uzoq muddatli qo'llash mumkinligi ham ushbu natijalar bilan birga ilmiy asosga ega bo'la boshlaydi. Shuningdek, ushbu polifenol moddaning QFTV, PT va fibrinogen darajalariga ta'siri, uni antikoagulyant sifatida ishlatish uchun potentsial asos bo'la oladi.

Xulosa. PC-9 hujayralarida olib borilgan koagulyatsiya testlari antikoagulyant moddaning QFTV, PT va fibrinogen darajalariga sezilarli ta'sirini namoyish etdi. Kelgusida in vivo modellar va klinik sinovlar o'tkazish tavsiya etiladi. Ushbu eksperimentdan olingan natijalar asosida polifenol moddasini antikoagulyant sifatida qo'llash istiqbollari mavjudligi ko'rsatildi.

ADABIYOTLAR

- Iroz, C. B., Dahl, C., Cassimatis, I. R., Wescott, A., & Miller, E. S, prophylactic anticoagulation for preterm premature rupture of membranes: a decision analysis//American Journal of Obstetrics & Gynecology, Maternal-fetal Medicine. 2021 Vol. 3. Is. 3. P. 100311. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ajogmf.2021.100311>

2. Lv, J., Li, Z., & Zhang, L. two new flavonoids from *Artemisia argyi* with their anticoagulation activities//*Natural Product Research*. 2017. Vol.32. Is. 6. P. 632–639. DOI:<https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1332603>
3. Steinbrecher, O., Šinkovec, H., Eischer, L., Kyrle, P. A., & Eichinger, S. D-dimer levels over time after anticoagulation and the association with recurrent venous thromboembolism//*Thrombosis Research*. 2021. Vol. 19. P. 160–164. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2020.11.015>
4. Montinari, M. R., Minelli, S., & De Caterina, R. eighty years of oral anticoagulation: Learning from history//*Vascular Pharmacology*. 2021. Vol 141. P. 106918. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106918>
5. Ragab, T. I., Amer, H., Mossa, A. H., Emam, M., Hasaballah, A., & Helmy, W. A. anticoagulation, fibrinolytic and the cytotoxic activities of sulfated hemicellulose extracted from rice straw and husk// *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018. Vol. 15. P. 86–91. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.05.010>
6. Ferreira, J. L., & Wipf, J. pharmacologic therapies in anticoagulation// *Medical Clinics of North America*. 2016. Vol. 100 Is. 4. P. 695–718. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2016.03.007>
7. Lefebvre, S., Hascoët, C., Damin-Pernik, M., Rannou, B., Benoît, E., & Lattard, V. monitoring of antivitamin K-dependent anticoagulation in rodents – Towards an evolution of the methodology to detect resistance in rodents// *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 2017. Vol. 138. P. 29–36. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.02.003>
8. Gao, L., Wang, F., Chen, Y., Li, F., Han, B., & Liu, D. the antithrombotic activity of natural and synthetic coumarins// *Fitoterapia*. 2021. Vol. 154. P. 104947. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2021.104947>
9. Deng, X., Lei, H., Ren, Y., Ai, J., Li, Y., Liang, S., Chen, L., & Liao, M. a novel strategy for active compound efficacy status identification in multi-tropism Chinese herbal medicine (*Scutellaria baicalensis* Georgi) based on multi-indexes spectrum-effect gray correlation analysis//*Journal of Ethnopharmacology*. 2023. Vol. 300. P. 115677. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115677>
10. Cartwright, B., & Mundell, N. anticoagulation for cardiopulmonary bypass: part one//*BJA Education*. 2023. Vol. 23. Is. 3. P. 110–116. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjae.2022.12.003>
11. Wang, J., Li, J., & Zhong, L. current status and prospect of anti-amyloid fibril therapy in AL amyloidosis//*Blood Reviews*. 2024. P. 101207. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.blre.2024.101207>