

Ispitivanje delovanja tinkture i alkaloida iz gaveza (*Symphytum officinale* L.) na koagulaciju humane krvi

Ispitivano je dejstvo tri ekstrakta gaveza (*Symphytum officinale* L.) u tri različite koncentracije na koagulaciju krvi: ekstrakt kompleksa N-oksida i pirolizidin alkaloida, ekstrakt simlandina i tinktura gaveza. Na osnovu hemijske strukture alkaloida pretpostavljeno je da će ekstrakti pokazati prokoagulatívno dejstvo. Vreme koagulacije mereno je medicinskom metodom. Nakon toga je ispitano dejstvo ekstrakata na protrombinsko vreme, kako bi se utvrdili faktori koagulacije na koje su ekstrakti ispoljili svoje dejstvo. Ekstrakti su pokazali antikoagulatívno dejstvo. Najizraženije antikoagulatívno dejstvo ispoljio je simlandin i ono je opadalo sa porastom koncentracije rastvora. Jedino najveća koncentracija kompleksa N-oksida i pirolizidin alkaloida je produžila i vreme koagulacije i protrombinsko vreme, na osnovu čega se može zaključiti da je faktor prelaska protrombina u trombin ključan u ovom slučaju. Simlandin nije ispoljio dejstvo na protrombinsko vreme, na osnovu čega je ovaj faktor eliminisan kao uzročnik produženog vremena koagulacije. Najveći zapreminski udeo tinkture produžio je protrombinsko vreme, ali ne i vreme koagulacije, na osnovu čega se može zaključiti da faktor formiranja protrombina u ovom slučaju nije ključan za produžavanje vremena koagulacije.

Uvod

Više od 50 supstanci koje utiču na koagulaciju pronađeno je u krvi i okolnom tkivu. Neke od njih ubrzavaju proces koagulacije i nazivaju se prokoagulantima, dok ga drugi inhibiraju i nazivaju se antikoagulantima. Zgrušavanje krvi zavisi od ravnoteže između

ove dve grupe supstanci. Antikoagulantima preovlađuju u krvotoku i na taj način sprečavaju koagulaciju krvi prilikom njene cirkulacije kroz krvne sudove. Međutim, kada dođe do povrede krvnog suda, u neposrednoj blizini oštećenog tkiva aktiviraju se prokoagulantima i započinje proces formiranja koaguluma (Guyton i Hall 2006).

Zgrušavanje krvi započinje reakcijom na oštećenje krvnog suda ili same krvi kroz kaskadu hemijskih reakcija u kojima učestvuje više od 12 faktora koagulacije. Kao rezultat nastaje kompleks aktiviranih supstanci. Ovaj kompleks, aktivator protrombina, predstavlja katalizator u reakciji prelaska protrombina u trombin. Trombin se ponaša kao enzim, koji utiče na fibrinogen da formira niti fibrina. Ove niti formiraju mrežu u koju se hvataju trombociti, eritrociti i krvna plazma, na taj način formirajući koagulum (Guyton i Hall 2006; Jackson i Nemerson 1980).

Prosečno vreme koagulacije iznosi od 1 do 6 minuta no ono u velikoj meri zavisi od dubine rane i hiperemije. Takođe, nedostatak nekih od faktora koagulacije može da produži vreme krvarenja. Kao valjan pokazatelj brzine koagulacije koristi se tzv. protrombinsko vreme (PT). To je vreme koje protekne od trenutka dodavanja tkivnog faktora u plazmu do formiranja koaguluma. Protrombinsko vreme daje indicaciju o koncentraciji protrombina u plazmi. Normalno protrombinsko vreme kod čoveka približno iznosi od 9 do 12 sekundi (Anđelković *et al.* 2004).

Symphytum officinale ili gavez, kako se naziva u narodu, je biljka koja je rasprostranjena po celoj srednjoj Evropi. Nalazi se na vlažnim mestima, livadama, u jarcima i u blizini vode. U narodnoj medicini lekovitu primenu imaju list i koren gaveza. Ekstrakti ovih biljnih organa našli su primenu u lečenju otvo-

Ivana Vujković Bukvin (1993), Palić, 43. Nova 24, učenica 3. razreda Gimnazije „Svetozar Marković“ u Subotici

Luka Ritopečki (1994), Deliblato, Lole Ribara 62, učenik 2. razreda Srednje medicinske škole „Stevica Jovanović“ u Pančevu

MENTOR:
Vedrana Savić, student Farmaceutskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

renih rana, utičući na njihovo zarastanje (Stickel i Seitz 2000). Ovo se objašnjava prisustvom alantoina (IUPAC naziv (2,5-dioximidazolidin-4-yl) urea), koji pospešuje rast i deobu ćelija i na taj način se oštećeno tkivo mnogo brže obnavlja (Wood 2008).

Pored alantoina u *Symphytum officinale* nalazi se veliki broj alkaloida, čije je dejstvo na zarastanje rana nepoznato. Koagulacija krvi je bitan stadijum u zarastanju rana. Polazeći od ove činjenice i uzimajući u obzir hemijsku strukturu pirolizidin alkaloida, pretpostavili smo da će ispitivani ekstrakti pokazati prokoagulativno dejstvo na koagulaciju krvi (Wood 2008).

Cilj ovog istraživanja je bio da se utvrdi dejstvo tinkture i alkaloida izolovanih iz gaveza na vreme koagulacije krvi i protrombinsko vreme.

Materijal i metode

Ispitivano je dejstvo tri ekstrakta na koagulaciju krvi: ekstrakt kompleksa N-oksida i pirolizidin alkaloida, ekstrakt simlandina i tinktura gaveza. Kompleks N-oksida i pirolizidin alkaloida i tinktura su rastvoreni u fiziološkom rastvoru, dok je simlandin rastvoren u DMSO. Ispitivana su tri razblaženja ekstrakata: masene koncentracije od 5 g/L, 2.5 g/L i 0.5 g/L kompleksa N-oksida i pirolizidin alkaloida i simlandina, odnosno zapreminskog udela od 5%, 2.5% i 0.5% tinkture. Ispitano je dejstvo ekstrakata na koagulaciju krvi merenjem vremena koagulacije prema medicinskoj metodi i dejstvo na protrombinsko vreme, kako bi se utvrdili faktori koagulacije na koje ispoljavaju dejstvo. Kod kontrole je, umesto ekstrakata, upotrebljen fiziološki rastvor, odnosno DMSO. Merenje vremena koagulacije krvi prema medicinskoj metodi izvršeno je u triplikatu, a merenje protrombinskog vremena u duplikatu usled nedostatka plazme. Rezultati su prikazani na osnovu medijana, a greške određene razlikom minimuma i maksimuma prilikom merenja.

Uzorci listova i korena gaveza sakupljeni su u okolini Petničke pećine.

Ekstrakcija i priprema rastvora kompleksa N-oksida i pirolizidin alkaloida. Osušeni listovi gaveza rastvoreni u vinskoj kiselini postavljeni su na refluks. Nakon toga je filtrat uparen do određene zapremine, razređen metanolom i koncentrisan vakuum uparivačem. Dobijeni talog je rastvoren u 20 mL fiziološkog rastvora (5 g/L). Napravljena su razblaženja (2.5 g/L, 0.5 g/L) (Mroczek *et al.* 2002).

Ekstrakcija i priprema rastvora simlandina.

Osušeni koren gaveza je usitnjen do praha. Zagrejani metanolni rastvor korena je filtriran. Filtrat je koncentrisan vakuum uparivačem. Dodata je koncentrovana H₂SO₄ do 2 M rastvora koncentrisanog filtrata. Rastvoru je dodat cink, a zatim je izvršena filtracija. Filtrat je ekstrahovan pomoću hloroforma. Sloj sa hloroformom je uklonjen. pH organskog sloja je povećana dodavanjem NH₄OH. Ponovo je izvršena ekstrakcija pomoću hloroforma. Organski sloj je koncentrisan vakuum uparivačem. Uzorak simlandina je rastvoren u 6 mL DMSO (5 g/L). Napravljena su razblaženja (2.5 g/L, 0.5 g/L) (Kim *et al.* 2001).

Priprema rastvora tinkture gaveza. Usitnjen koren gaveza preliven je 96% etanolom. Smeša je ostavljena da stoji preko noći. Rastvor gaveza u etanolu je koncentrovan pod vakuumom. Stoprocentna tinktura razblažena je do 5% dodavanjem fiziološkog rastvora. Napravljena su razblaženja (25%, 5%) (Putinen 1996).

Ispitivanje prisustva alkaloida. Dragendorfovom reagensom ispitano je prisustvo alkaloida u ekstraktima. Na osnovu količine taloga koji se formirao pretpostavljeno je da je najveća koncentracija alkaloida u ekstraktu kompleksa N-oksida i pirolizidin alkaloida, zatim u tinkturi, a najmanja u ekstraktu simlandina (Ćetković 2003).

Merenje vremena koagulacije krvi po medicinskoj metodi. Postavljena su sahatna stakla i na svako od njih je naneto 20 μL rastvora ekstrakata i kontrolnog uzorka bez ekstrakta (fiziološki rastvor, odnosno DMSO). Krv je uzeta intravenski, iz šprica je istisnuta u erlenmajer. Automatskom pipetom od 1000 μL na svako od sahatnih stakala naneta je kap krvi (zapremina je aproksimirana na 50 μL – prosečna zapremina jedne kapi). Igla se provlačila kroz krv i u trenutku kada je uočena nit fibrina, beleženo je vreme koagulacije. Vreme je mereno od trenutka kada je krv istisnuta iz šprica u erlenmajer.

Merenje PT (Prothrombin time). Krv je uzeta intravenski i sakupljena u vakutejner sa Na-citratom. Citratna krv je centrifugirana 25 min na 4000 rpm. Plazma je izolovana i skladištena na 4°C do upotrebe. Prazne epruvete su inkubirane na 38°C, neposredno pre merenja. U epruveti za slepu probu odmereno je: 0.1 mL plazme (4°C), 0.1 mL PT reagensa (4°C), 0.1 mL 0.2 M CaCl₂ (sobna temperatura), a u epruvete sa uzorcima: 0.1 mL plazme (4°C), 40 μL ekstrakta (sobna temperatura), 0.1 mL PT reagensa (4°C), 60 μL 0.3 M CaCl₂ (sobna

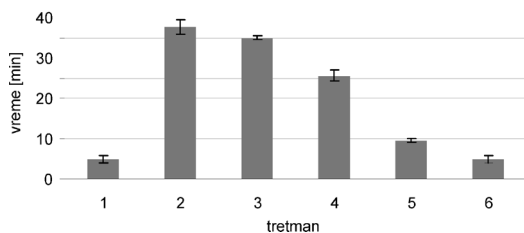
temperatura). Štoperica je uključena u trenutku dodavanja CaCl_2 . Kao PT reagens upotrebljen je RecombiPlasTin 2G – vodeni rastvor rekombinantnog humanog tkivnog faktora, kalcijum hlorida i prezerativa (Uzan *et al.* 1998).

Rezultati

Vreme koagulacije

Antikoagulatívno dejstvo ispoljili su ekstrakt simlandin i ekstrakt kompleksa N-oksida i pirolizidin alkaloida.

Simlandin je produžio vreme koagulacije u svim ispitivanim koncentracijama. Najizraženije dejstvo, pri čemu je vreme koagulacije produženo 7.8 puta, pokazala je najmanja koncentracija simlandina (0.5 g/L). Koncentracija od 2.5 g/L produžila je vreme koagulacije 7.3 puta, dok je najveća koncentracija (5 g/L) pokazala najslabije antikoagulatívno dejstvo produživši vreme koagulacije 5.3 puta (slika 1).



Slika 1. Vreme koagulacije

1 – kontrola, 2 – simlandin (0.5 g/L), 3 – simlandin (2.5 g/L), 4 – simlandin (5 g/L), 5 – pirolizidin alkaloidi (5 g/L), 6 – tinktura (5%)

Figure 1. Time of coagulation

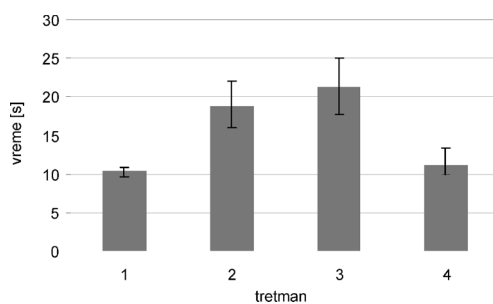
1 – control, 2 – symlandine (0.5 g/L), 3 – symlandine (2.5 g/L), 4 – symlandine (5 g/L), 5 – pyrrolizidine alkaloids (5 g/L), 6 – tincture (5%)

Isključivo najveća koncentracija kompleksa N-oksida i pirolizidin alkaloida (5 g/L) je pokazala antikoagulatívno dejstvo, produživši vreme koagulacije 2.0 puta (slika 1). Manje koncentracije kompleksa (2.5 g/L i 0.5 g/L) nisu pokazale nikakav uticaj na koagulaciju krvi.

Tinktura korena gaveza nije promenila vreme koagulacije krvi u odnosu na kontrolu.

Protrombinsko vreme

Rastvori kompleksa N-oksida i pirolizidin alkaloida i tinkture pokazali su dejstvo na formiranje protrombina, produživši protrombinsko vreme (slika 2). Najveća koncentracija kompleksa (5 g/L) produžila je protrombinsko vreme 1.8 puta, dok manje koncentracije nisu pokazale nikakvo dejstvo. Petoprocentni rastvor tinkture, takođe je produžio protrombinsko vreme 2.0 puta, međutim manji zapreminski udeli nisu pokazali nikakvo dejstvo. Simlandin nije pokazao nikakvo dejstvo na formiranje protrombina.



Slika 2. Protrombinsko vreme

1 – kontrola, 2 – pirolizidin alkaloidi (5 g/L), 3 – tinktura (5%), 4 – simlandin (5 g/L)

Figure 2. Prothrombin time

1 – control, 2 – pyrrolizidine alkaloids (5 g/L), 3 – tincture (5%), 4 – symlandine (5g/L)

Diskusija

Činjenica da veće zapreminske koncentracije simlandina pokazuju slabije antikoagulatívno dejstvo može se objasniti time što ekstrakt nije potpuno čist. Naime, moguće je prisustvo nekih prokoagulatívni supstanci, čija koagulatívna aktivnost dolazi do izražaja pri većim koncentracijama ekstrakta i na taj način smanjuje antikoagulatívno dejstvo simlandina.

Kako simlandin nije pokazao nikakav uticaj na protrombinsko vreme, ovaj faktor je eliminisan kao mogući uzročnik produženog vremena koagulacije.

Ista koncentracija pirolizidin alkaloida (5 g/L) je i pokazala antikoagulatívno dejstvo, i produžila protrombinsko vreme. Na osnovu toga može se zaklju-

čiti da je faktor formiranja protrombina u ovom slučaju ključan za produžavanje vremena koagulacije.

Tinktura nije pokazala antikoagulativno dejstvo, iako je njen najveći zapreminski udeo (5%) produžio protrombinsko vreme, što znači da faktor formiranja protrombina u ovom slučaju nije ključan za produžavanje vremena koagulacije i da su prisutne prokoagulative supstance neutralisale dejstvo alkaloida u tinkturi.

Zaključak

Nasuprot očekivanim rezultatima, ekstrakti gavez nisu pokazali prokoagulativno, već izrazito antikoagulativno dejstvo. Najveće antikoagulativno dejstvo pokazao je simlandin, međutim nije utvrđen faktor koagulacije na koji utiče, i za to su potrebna dalja istraživanja. U narodnoj medicini gavez se koristi kako bi ubrzao zarastanje rana, međutim prisustvo pirolizidin alkaloida moglo bi da izazove suprotno dejstvo. Kako do sada nije bilo poznato da pirolizidin alkaloidi deluju kao antikoagulanti, to ostavlja prostor za dalja istraživanja. Iako je simlandin toksičan po organizam, pokazuje antikoagulativno dejstvo, osobinu koja bi mogla imati medicinsku primenu. Dalja istraživanja trebalo bi da detaljnije ispituju ovo njegovo svojstvo i pronađu način njegove bezbedne primene, ukoliko on postoji.

Literatura

- Andelković I., Stajkovic A., Ilić A. 2004. *Anatomija i fiziologija za 1. razred medicinske i zubotehničke škole*. Beograd: Zavod za udžbenike i nastavna sredstva
- Ćetković S. G. 2003. *Hemija prirodnih proizvoda – praktikum*. Novi Sad: Univerzitet u NS, Tehnološki fakultet
- Guyton A. C., Hall J. E. 2006. *Textbook of Medical Physiology*. Philadelphia: Elsevier Saunders
- Jackson C. M., Nemerson Y. 1980. Blood Coagulation. *Annual Review of Biochemistry*, **49**: 765.
- Kim N. C., Oberlies N. H., Brine D. R. Handy R. W., Wani M. C. and Wall M. E. 2001. Isolation of Symlandine from the Roots of Common Comfrey (*Symphytum officinale*) Using Countercurrent Chromatography. *Journal of Natural Product*, **64**: 251.

Mroczek T., Glowniak K. and Wlaszczyk A. 2002. Simultaneous determination of N-oxides and free bases of pyrrolizidine alkaloids by cation-exchange solid-phase extraction and ion-pair high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **949**: 249.

Puotinen C. J. 1996. *Herbs for improved digestion: herbal remedies for stomach pain, constipation, ulcers, colitis, and other gastrointestinal problems*. London: McGraw Hill

Stickel F. and Seitz K. H. 2000. The efficacy and safety of comfrey. *Public Health Nutrition*, **3** (4A): 501.

Uzan A., Curaudeau A. H., Leadley R. J., Dunwiddie C. T. and Perrone M. H. 1998. Pharmaceutical composition comprising a compound having anti-Xa activity and a platelet aggregation antagonist compound, Patent Number: 6,103,705.

Wood M. 2008. *The Earthwise Herbal: A Complete Guide to Old World Medicinal Plants*. Berkeley: North Atlantic Books

Ivana Vujković Bukvin and Luka Ritopečki

Influence of Tincture and Alkaloids Isolated from comfrey (*Symphytum officinale* L.) on Human Blood Coagulation

Symphytum officinale or comfrey, as it is called in folk medicine, is used to stimulate wound healing. This is explained by the presence of allantoin, which stimulates cell proliferation, contributing wound healing. Except allantoin, there are some alkaloids present in comfrey. Based on their chemical structure we assumed they would show the procoagulant effect.

The aim of this research was to determine the effect of extracted alkaloids from comfrey and its tincture on coagulation and prothrombin time.

In our research we examined the effect of three extracts in three different concentrations (0.5, 2.5 and 5 g/L) on coagulation time: extract of the complex of N-oxides and pyrrolizidine alkaloids, extract of symmlandine and comfrey tincture. As control were used saline (for tincture and complex) and DMSO (for symmlandine). Coagulation time was measured by the

medical method. After that we measured the prothrombin time to determine the coagulation factors on which the extracts exhibited their effects.

The extracts showed anticoagulant activity. Sym-landine showed the most pronounced anticoagulant activity which decreased with increasing concentrations. Among sym-landine the highest concentration of the complex of N-oxides and pyrrolizidine alkaloids also inhibited blood coagulation (Figure 1). The tincture did not exhibit any effect on blood coagulation in reference to the control. Only the highest concentration of the complex of N-oxides and pyr-

rolizidine alkaloids increased the time of coagulation and the prothrombin time, based on what we assumed the factor of conversion of prothrombin to thrombin was crucial in this case (Figure 2). Sym-landine did not effect on prothrombin time, based on what we eliminated this coagulation factor as the agent of the prolonged time of coagulation. The highest volume concentration of the tincture increased the prothrombin time, but not the time of coagulation, based on what we assumed that the factor of conversion of prothrombin to thrombin was not the agent of prolonged time of coagulation. 