

СПОСОБ ПРОФИЛАКТИКИ ТРОМБОЗОВ И ЭМБОЛИЙ

© 2003 г. И.А. Щекина, А.И. Сливкин, Г.Н. Медникова, И.К. Щекин

*Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко
Воронежский государственный университет*

Агрегация тромбоцитов играет фундаментальную роль в патологическом тромбогенезе, следовательно, профилактика тромбозов должна быть направлена на снижение адгезивности и агрегации тромбоцитов.

Полимерный водорастворимый аналог кислоты ацетилсалициловой (ИАСК) представляет собой матричный вариант кислоты ацетилсалициловой (АСК), синтезированный на основе химической иммобилизации АСК в сополимер N-винилпирролидона с N-винил-γ-аминомасляной кислотой. Целью химической модификации АСК было создание растворимой формы кислоты ацетилсалициловой, с пониженными побочными эффектами и обладающей большей продолжительностью действия. Сопоставление фармакологических свойств ИАСК и препарата АСК проводилось по антиагрегантному действию на тромбоциты, эритроциты и определение влияния этих веществ на реологические свойства крови.

На основании полученных результатов исследования, можно сделать вывод, что субстанция ИАСК в дозе 1 мг/кг по АСК выражено подавляет агрегацию тромбоцитов и эритроцитов, но в большей мере влияет на тромбоцитарное звено гемостаза.

Таким образом, субстанция ИАСК отчетливо снижает вязкость крови кроликов при высоких скоростях сдвига, но в сравнении с препаратом АСК этот эффект отмечается позже.

Использование этого способа позволит изменять реологические свойства крови, влиять на агрегацию тромбоцитов, эритроцитов, что способствует профилактике тромбозов и эмболий при сердечно-сосудистых заболеваниях.

В настоящее время существует большой выбор фармакологических препаратов с помощью которых, действуя на различные звенья тромбогенеза (биосинтез, метаболизм, реализацию конечных эффектов TxA_2 и PGI_2), можно оказывать регулирующее действие на реологические свойства крови и микроциркуляцию. Агрегация тромбоцитов играет фундаментальную роль в патологическом тромбогенезе, следовательно, профилактика тромбозов должна быть направлена на снижение адгезивности и агрегации тромбоцитов. Механизмом, лежащим в основе антитромбоцитарного действия кислоты ацетилсалициловой (АСК) является блокада простагландин-циклооксигеназного комплекса тромбоцитов и блокада рецепторов, воспринимающих действие индукторов агрегации [1].

Полимерный водорастворимый аналог кислоты ацетилсалициловой (ИАСК) представляет собой матричный вариант АСК, синтезированный на основе химической иммобилизации кислоты ацетилсалициловой в сополимер N-винилпирролидона с N-винил-γ-аминомасляной кислотой. Целью химической мо-

дификации АСК было создание растворимой формы кислоты ацетилсалициловой, с пониженными побочными эффектами и обладающей большей продолжительностью действия. Сопоставление фармакологических свойств ИАСК и препарата АСК проводилось по антиагрегантному действию на тромбоциты, эритроциты и определение влияния этих веществ на реологические свойства крови.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проведен на 18-ти кроликах-самцах породы «Шиншила», массой 4,0 – 4,5 кг.

Для выполнения эксперимента по оценке антиагрегационного действия полимерный водорастворимый аналог кислоты ацетилсалициловой и препарат сравнения АСК вводили внутривенно однократно в эквивалентной дозе 1 мг/кг веса по АСК. Кровь забирали из краевой ушной вены кролика самотеком в пластиковые пробирки до введения вещества и через 1, 3, 7 и 12 часов после введения изучаемых веществ. Исследовали влияние ИАСК и АСК на агрегацию тромбоцитов, агрегацию эритроцитов и вязкость крови.

Влияние веществ на агрегацию тромбоцитов исследовали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 220 LA) научной производственной фирмы «Биола» (г. Москва) в модификации Габбасова З.А и соавторов [2]. Метод основан на регистрации степени изменений светопропускания плазмы, богатой тромбоцитами, при добавлении к последней веществ, индуцирующих агрегацию, в условиях постоянного перемешивания, а также на анализе флуктуаций светопропускания, вызванных случайным изменением числа частиц в оптическом канале. Исследования проводили на богатой тромбоцитами плазме, полученной по способу, описанному Люсовым В.А., Белоусовым Ю.Б. [3]. Для этого вензную кровь, получаемую из краевой ушной вены кроликов, стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Цитратную кровь центрифугировали при 200g в течение 10 минут на центрифуге ОПН-3. Бедную тромбоцитами плазму получали центрифугированием обогащённой тромбоцитами плазмы при 650g в течение 15 минут. В ходе эксперимента в кювету агрегометра вносили 0,3 мл плазмы, инкубировали при температуре 37°C в течение 2 минут. После инкубации добавляли индуктор агрегации динатриевую соль аденозин-5-дифосфорной кислоты (АДФ) (фирмы «Reanal», Венгрия) в конечной концентрации 5 мкМ. При графической регистрации процесса агрегации кровяных пластинок (в течение 5-ти минут) получали кривые, отражающие падение оптической плотности обогащённой тромбоцитами плазмы. Уровень агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. Для кривых среднего размера был рассчитан индекс агрегации, равный квадрату степени агрегации минус 1. Расчёт антиагрегационного действия изучаемых веществ проводили по формуле 1 и измеряли в $\Delta\%$:

$(A-B) \cdot 100\% / A$ (1), где А - уровень агрегации тромбоцитов у кроликов до введения препаратов; В - уровень агрегации тромбоцитов плазмы после введения препаратов. При этом, исходную агрегацию тромбоцитов принимали за 100%.

Влияние веществ на агрегацию эритроцитов исследовали на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов (модель 220 LA) научной производственной фирмы «Биола» (г. Москва) в модификации Габбасова З.А. и соавт. [2]. Принцип метода заключается в фотометрической регистрации снижения оптической плотности форменных элементов крови вследствие их агрегации. Цитратную кровь центрифугировали для отделения эритроцитов на центрифуге ОПН-3 при 200g в течение 10 минут и трижды отмывали физиологическим раствором для более полного удаления белков плазмы. 0,01 мл осад-

ка отмытых эритроцитов ресуспендировали в 10 мл трис-НСI буфера. Исследования проводили на фоне перемешивания со скоростью 800 об/мин. В качестве индуктора агрегации использовали раствор трипсина кристаллического, растворённого в трис-НСI буфере в концентрации 0,3 мг/мл. После добавления к 0,275 мл суспензии эритроцитов 0,025 мл индуктора агрегации регистрировали кривые светопропускания. Уровень агрегации оценивали по величине максимальной амплитуды агрегатограммы. Для кривых среднего размера был рассчитан индекс агрегации, равный квадрату степени агрегации минус 1. Расчёт антиагрегационного действия изучаемых веществ проводили по формуле 2 и оценивали в $\Delta\%$:

$(A-B) \cdot 100\% / A$ (2), где А - уровень агрегации эритроцитов у кроликов до введения препаратов; В - уровень агрегации эритроцитов у кроликов после введения препаратов.

Вязкость крови определяли на анализаторе крови реологическом АКР-2. Для этого 0,85 мл цельной крови инкубировали при 37 °С в течение 15 минут, затем стакан с пробой и ротором помещали в стартер и исследовали вязкость крови при различных скоростях сдвига (200, 20 и 5 с⁻¹), моделирующих различную интенсивность кровотока в сосудах. Низкие скорости сдвига характерны для микроциркуляторного русла. Вязкость крови при таких скоростях сдвига зависит, в основном, от степени агрегации эритроцитов. При больших скоростях сдвига 100-200 обратных секунд вязкостные характеристики крови зависят от способности эритроцитов изменять свою форму, т.е. деформабильности эритроцитов. Вязкость крови измеряли в сантипуазах (сПз), изменение вязкости оценивали в $\Delta\%$, при этом исходные показатели вязкости крови принимали за 100%. Сравнивали изменение вязкости крови под влиянием АСК и ИАСК.

Влияние соединений на реологические свойства крови оценивалось по изменению параметров от исходных данных, с учетом средних отклонений показателей в контрольной группе животных.

Влияние ИАСК на реологические свойства крови

Вязкость крови вычисляется как отношение напряжения сдвига к скорости сдвига, действующей на кровь. Вследствие различия сдвиговых сил, действующих на кровь в различных участках сосудистой системы, вязкость крови значительно изменяется. Повышение процессов агрегации эритроцитов и тромбоцитов ведет к нарушению функционирования веноулярных отделов микроциркуляторного русла [4]. Действие препаратов с гемореологической активностью и улучшающих микроциркуляцию, должно быть в том числе направлено и на снижение процессов агрегации эритроцитов и тромбоцитов.

Влияние веществ на агрегацию тромбоцитов.

Под действием АСК в дозе 1 мг/кг достоверное снижение агрегации тромбоцитов ($p < 0,05$) отмечалось уже через 1 час после введения, процент ингибирования составил 40,56%, затем антиагрегационная активность ацетилсалициловой кислоты до 7-го часа исследования находилась практически на стационарном уровне, а к 12-му часу достигла максимального значения 66,64% ($p < 0,05$).

Влияние субстанции ИАСК в дозе 1 мг/кг по АСК на агрегацию тромбоцитов также наблюдалось с первого часа введения, но являлось недостоверным и составило всего 2,27%, затем происходило плавное увеличение эффекта и к 7-му часу исследования отличия от контроля стали достоверными (34,84%). Максимальный эффект наблюдался на 12-ый час исследования, на 12,74% превышая данный показатель в группе кроликов, получавших ацетилсалициловую кислоту.

Таким образом, для субстанции ИАСК наблюдается более плавное развитие эффекта, которое к 12-му часу превышает по ингибирующему влиянию на агрегационную функцию тромбоцитов препарат сравнения АСК (рис. 1).

Влияние субстанции ИАСК и препарата сравнения АСК в эквивалентных дозах по АСК (1 мг/кг) на агрегацию эритроцитов.

Под действием препарата АСК в дозе 1 мг/кг снижение агрегации эритроцитов (рис. 2) отмечалось уже через 1 час после введения, процент ингибирования агрегации эритроцитов составил 7,8 %, хотя отличия от контрольной группы были недостоверными, затем антиагрегационная активность кислоты ацетилсалициловой до 7-го часа эксперимента постепенно увеличивалась, а к 12-му часу эксперимента достигла максимального значения и составляла в сравнении с контрольными животными 40,3 %, различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

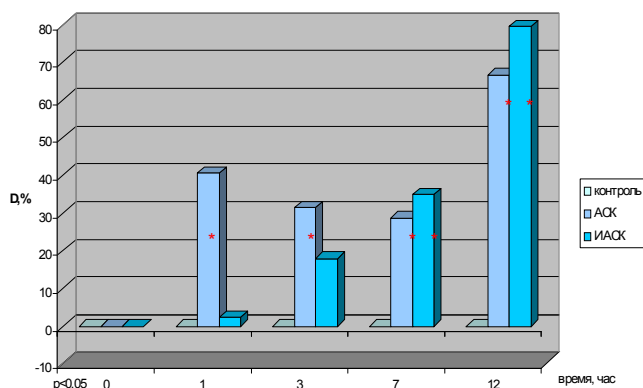


Рис. 1. Зависимость ингибирующего влияния на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов кроликов при введении АСК в дозе 1 мг/кг и ИАСК в эквивалентной дозе

Влияние субстанции ИАСК в дозе 1 мг/кг по АСК на агрегацию эритроцитов также наблюдалось с первого часа введения, но являлось недостоверным и составило 8,67%, затем происходило плавное увеличение эффекта и к 12-му часу эксперимента отличия от контроля стали достоверными (35,1%). Максимальный эффект наблюдаемый на 12-ый час эксперимента на 5,2% был ниже данного показателя в группе кроликов, получавших кислоту ацетилсалициловую.

Таким образом, субстанция ИАСК по влиянию на агрегационную функцию эритроцитов не уступает АСК в эквивалентной дозе.

Влияние ИАСК и АСК в дозе 1 мг/кг по АСК на вязкость крови.

Вязкость крови при скорости сдвига 200 c^{-1}

На фоне введения как АСК, так и ИАСК в первые часы эксперимента вязкость крови (рис. 3) практически не изменялась (наблюдались недостоверные изменения вязкости крови на 3,4% в группе кроликов, получавших АСК и на 9% - ИАСК). К 7 часу после введения АСК отличия от контрольной группы сохранялись на прежнем уровне, являясь недостоверными. В группе кроликов, получавших субстанцию ИАСК к 7-му часу эффект достиг максимального значения 16,5%. Отличия статистически достоверны ($p < 0,05$).

Вязкость крови при скорости сдвига 20 c^{-1}

После введения как АСК, так и ИАСК уже в первые часы эксперимента наблюдались недостоверные изменения вязкости крови на 13,34% в группе кроликов, получавших АСК и на 15,32% - ИАСК. К 7-му часу после введения АСК отличия от контрольной группы сохранялись на прежнем уровне, являясь недостоверными. В группе кроликов, получавших ИАСК к 7-му часу эффект достиг максимального значения 21,75%. Отличия статистически достоверны ($p < 0,05$).

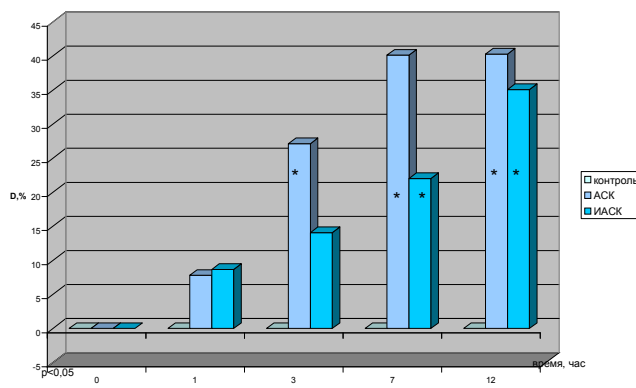


Рис. 2. Зависимость ингибирующего влияния на трипсин-индуцированную агрегацию эритроцитов кроликов при введении АСК в дозе 1 мг/кг и ИАСК в эквивалентной дозе

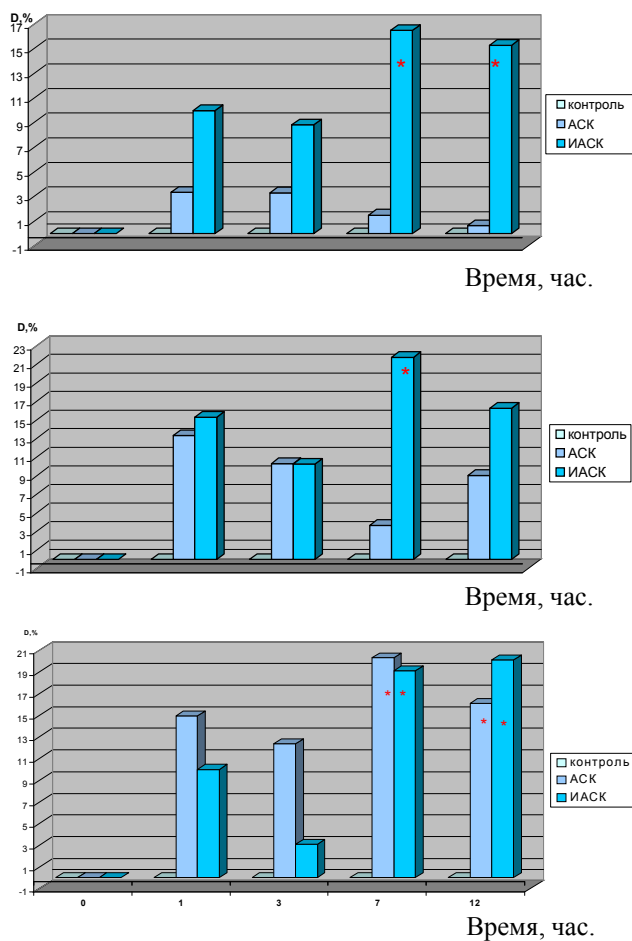


Рис. 3. Зависимость ингибирующего влияния ИАСК и АСК в дозе 1 мг/кг на вязкость крови кроликов (А – при скорости сдвига 200 с^{-1} , В – при скорости сдвига 20 с^{-1} , С – при скорости сдвига 5 с^{-1})

Вязкость крови при скорости сдвига 5 с^{-1}

После введения препарата сравнения АСК в дозе 1 мг/кг и субстанции ИАСК в дозе 1 мг/кг по АСК уже в первые часы исследования наблюдались изменения вязкости крови на 15 % в группе кроликов, получавших препарат АСК и на 10 % получавших субстанцию ИАСК в эквивалентной дозе. Следует отметить более выраженное влияние на вязкость крови при данной скорости сдвига АСК, что свидетельствует о более раннем развитии эффекта.

К 7-му часу после введения препарата АСК в дозе 1 мг/кг отличия от контрольной группы достигли максимального значения – 20,3 %. В группе кроликов, получавших субстанцию ИАСК эффект достиг максимального значения к 12-му часу 20,1 %. Отличия статистически достоверны ($p < 0,05$).

На основании полученных результатов исследования, можно сделать вывод, что субстан-

ция ИАСК в дозе 1 мг/кг по АСК выражено подавляет агрегацию тромбоцитов и эритроцитов, но в большей мере влияя на тромбоцитарное звено гемостаза. При этом эффект при введении субстанции ИАСК развивался несколько позднее, хотя был выражен так же как и у препарата сравнения АСК. Субстанция ИАСК на 17 – 20 % снижает вязкость крови кроликов при высоких скоростях сдвига, что превышает тот же эффект для АСК в той же дозе.

Таким образом, субстанция ИАСК отчетливо снижает вязкость крови кроликов при высоких скоростях сдвига, но в сравнении с препаратом АСК этот эффект отмечается позже. Высвобождение лекарственного вещества - кислоты ацетилсалициловой (или АСК с ГАМК) из матрицы, по-видимому, происходит постепенно. Отсроченное антиагрегантное действие ИАСК представляет большой интерес в связи с распространением двухслойных таблеток, состоящих из оболочки, содержащей первую дозу лекарственного вещества, создающего в крови терапевтическую концентрацию, и ядра, представляющего собой лекарственное вещество с пролонгатором, обеспечивающим постепенное высвобождение лекарственного вещества, что создает постоянный уровень препарата в крови [5].

Использование этого способа позволит изменять реологические свойства крови, влиять на агрегацию тромбоцитов, эритроцитов, что способствует профилактике тромбозов и эмболий при сердечно-сосудистых заболеваниях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антитромбоцитарная терапия ацетилсалициловой кислоты (Пер.с англ.) /Под ред. Руды М.Я. – М.: Химические свойства, 1999. - Руды М.Я.- 345 с.
2. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю. и др. Новый высокочувствительный метод анализа агрегации тромбоцитов./Лабораторное дело. – 1989. - № 10. – С. 15 – 18.
3. Габбасов З.А., Попов Е.Г., Гаврилов И.Ю. и др. Новый методический подход к исследованию агрегации тромбоцитов in vitro./Бюлл.экспер.биол.и мед. – 1989. - № 10. – С. 437 – 439.
4. Баркаган З.С., Молот А.П. Диагностика и контр. терапия нарушений гемостаза. – М.: Ньюдиамед – 2001. – 296 с.
5. Насыбулина Н.М. Нестероидные противовоспалительные препараты и их лекарственные формы/ХФЖ. – 1999. - № 2. – С. 30 – 35.