УДК [615.038: 616.13/616.14]

УРАКОВ А. Л.[1], САМОРОДОВ А. В.[2],
КАМИЛОВ Ф. Х.[2], ХАЛИУЛЛИН Ф. А.[2]

Полирегионарная агрегатометрия крови пациентов с острым тромбозом, как потенциальная модель доклинических исследований новых корректоров системы гемостаза ex vivo

[1] Ижевская государственная медицинская академия
426034, г. Ижевск, ул. Коммунаров, 281
[2] Башкирский государственный медицинский университет
450000, г. Уфа, ул. Ленина 3
e-mail: AVSamorodov@gmail.com

Реферат

Современные рекомендации по разработке новых фармакологических средств воздействия на систему гемостаза ограничиваются исследованиями на здоровых добровольцах in vitro, здоровых лабораторных животных и животных с модельными тромбозами в условиях in vivo. Однако видовые и сезонные особенности системы гемостаза подопытных животных не всегда могут адекватно представлять процессы, происходящие у человека в момент эпизода сердечно-сосудистой катастрофы. В этой связи основной целью данной работы является изучение системы гемостаза пациентов с состоявшимся тромбозом и использование полученных данных в качестве модели для оценки фармакологической эффективности лекарственных средств на примере аспирина и пентоксифиллина в условиях ex vivo. Экспериментальная работа выполнена на крови здоровых доноров-мужчин и пациентов с остро возникшим тромбозом. Результаты проведенного исследования демонстрируют, что состоявшийся тромбоз одного из регионов сосудистого русла не всегда сопровождается системным напряжением свертывающей системы. Методом полирегиональной тромбоэластографии изучена система гемостаза и установлено, что гиперагрегация тромбоцитов является ответственным звеном в развитии системной гиперактивности гемостаза в тех случаях, когда она регистрируется. Тромбоэмболия легочной артерии, мезентериальный тромбоз и острый коронарный синдром наиболее часто сопровождаются системной гиперагрегацией тромбоцитов, что может быть использовано для оценки терапевтической эффективности лекарственных средств в условиях ex vivo. На примере аспирина и пентоксифиллина продемонстрирована необходимость доклинических исследований потенциальных корректоров системы гемостаза, направленных на оценку терапевтической эффективности в условиях ex vivo у пациентов с состоявшимся тромбозом.

Ключевые слова: *система гемостаза, артериальный тромбоз, венозный тромбоз, гиперагрегация тромбоцитов.*

Введение

Современные рекомендации по разработке новых фармакологических средств воздействия на систему гемостаза ограничиваются исследованиями на здоровых добровольцах *in vitro*, здоровых лабораторных животных и животных с модельными тромбозами в условиях *in vivo* [1]. Однако видовые и сезонные особенности системы гемостаза подопытных животных не всегда могут адекватно представлять процессы, происходящие у человека в момент эпизода сердечно-сосудистой катастрофы. Имеется ограниченное количество сообщений о моделях гиперактивности системы гемостаза в условиях *in vitro*, выполняемых на крови здоровых добровольцев. Однако данные методы исследования официально не регламентированы и не стандартизированны. В этой связи основной целью данной работы является изучение системы гемостаза пациентов с состоявшимся тромбозом и использование полученных данных в качестве модели для оценки фармакологической эффективности лекарственных средств на примере аспирина и пентоксифиллина.

Материал и методы исследования

Исследовательская работа проведена в три этапа. На первом этапе методами полирегиональной тромбоэластографии и агрегатометрии исследовали систему гемостаза здоровых добровольцев и пациентов с тромбозом. Далее сопоставили показатели агрегации тромбоцитов артериального и венозного русла для каждого вида тромбоза, оценили частоту «напряженности» системы гемостаза в группах тромбоза за счет гиперагрегации тромбоцитов. Завершили исследование оценкой репрезентативности выборки пациентов и попыткой скорректировать нарушения системы гемостаза антиагрегантами в условиях *ex vivo* с расчетом IC50 и сравнением полученных эффективных концентраций для интактных и исходно компрометированных тромбоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальная работа выполнена в условиях in vitro на крови доноров-мужчин и пациентов с остро возникшим тромбозом. Исследование было одобрено этическим комитетом ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Минздрава России (№ 2 от 17.10.2012).

Информированное согласие было получено у всех участников исследования до забора крови. Контрольную группу составили 32 мужчин и 28 женщин в возрасте 53,7±7,9. В число добровольцев входили лица, у которых при обследовании не было выявлено признаков гематологических, сердечно-сосудистых заболеваний, патологии печени, почек. Участники испытания в течение недели до начала исследования не принимали препаратов, способных изменять функцию тромбоцитов. У всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании.

В исследовании, направленном на определение у пациентов, страдающих тромбозом, была использована кровь пациентов, находящихся в анестезиолого-реанимационном отделении №1 ГБУЗ Республиканской клинической больницы им. Г.Г. Куватова Минздрава России в период 2012-2014 года, со следующими остро возникшими заболеваниями: острый коронарный синдром (ОКС), тромбоэмболия легочной артерии (ТЭЛА), тромбоз глубоких вен (ТГВ) / мезентериальный тромбоз (МТ). В таблице 1 представлены клинические и демографические показатели группы острого тромбоза и контрольной группы. Достоверных различий по основным параметрам (пол, возраст, сопутствующие заболевание) между группами не было.

Исходные показатели агрегации тромбоцитов госпитализированных пациентов были получены при заборе венозной и артериальной крови до начала проведения антитромботической/тромболитической терапии при катетеризации центральной вены и артерии, согласно плану проведения интенсивной терапии и мониторинга гемодинамики. Анализу подвергались только результаты на образцах крови пациентов с установленным позже диагнозом, соответствующему указанным выше нозологиям.

Забор артериальной крови проводился из бедренной артерии, а венозной - из кубитальной вены с использованием систем вакуумного забора крови BD Vacutainer® (Dickinson and Company, США). В качестве стабилизатора крови использовался 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1.

Все тесты проведены на обогащенной и обедненной тромбоцитами плазмах. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугированием цитратной крови при 100g в течение 10 минут, бестромбоцитарной плазмы - при 300g в течение 15 минут. В работе использовалась центрифуга ОПН-3.02 (ОАО ТНК «ДАСТАН», Киргизия).

Исследование агрегации тромбоцитов осуществляли с помощью лазерного анализатора агрегации тромбоцитов «Биола 230LA» (ООО НПФ «БИОЛА», Россия). В качестве индуктора агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл, коллаген — 5 мг/мл, адреналин — 5 мкг/мл, ристомицин — 10 мг/мл производства “Технология-Стандарт” (г. Барнаул, Россия).

Определение циркулирующих агрегатов проводили по методу Wu & Hoak в модификации FH Kohanna. Венозную кровь набирали в две пробирки, в одной из которых содержится раствор ЭДТА, а в другой — смесь раствора ЭДТА с 4 % раствором формалина. После перемешивания содержимое пробирок отстаивали 30 мин при комнатной температуре. Во время отстаивания тромбоцитарные агрегаты оседают, а отдельные тромбоциты остаются в надосадочном слое. Затем подсчитывали число тромбоцитов в надосадочном слое в каждой из пробирок [5].

Тромбоэластографию проводили на аппарате TEG 5000 (Haemoscope Corporation, США). При анализе тромбоэластограмм определяли общую тенденцию коагуляции (R), функциональную активность тромбоцитов и фибриногена (MA, Angle), активность фибринолиза (CLT) и физико-механические свойства образовавшихся сгустков (G). В качестве активатора ТЭГ использовали 0,2 М р-р (“Технология-Стандарт”, Россия).

Результаты исследования обработаны с применением статистического пакета Statistica 10,0 (StatSoft Inc, США). Проверку на нормальность распределения фактических данных выполняли с помощью критерия Шапиро-Уилка. Для описания групп использованы медиана и межквартильный интервал. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса (для независимых наблюдений) и Фридмена (для повторных наблюдений). Влияние различных факторов на частоту тромбоза, в рамках оценки репрезентативности выборки, определены методом сопряженных таблиц с применением χ^2 Пирсона. Критический уровень значимости p для статистических критериев принимали равным 0,05. Величину IC50 аспирина и пентоксифиллина рассчитывали с помощью нелинейного фиттинга кривых, описывающих антиагрегационную активность (%) по логарифмическому уравнению с 4 параметрами, используя программное обеспечение GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., США).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ системы гемостаза контрольной группы (таблица 3) демонстрирует, что показатели функциональной активности тромбоцитов артериальной и венозной крови находятся в пределах референсных значений и не имеют статистических различий. Это полностью соотносится с данными литературы [6].

Группа тромбоза была разделена на подгруппы согласно выбранным нозологиям (таблица 2). Группа ОКС исходно включала 27 пациентов. Первичный диагноз выставлялся на основании клинической картины, данных электрокардиографии и биохимических маркеров инфаркта миокарда. Далее из 27 — 16 пациентам был выставлен диагноз инфаркт миокарда, из них гиперагрегация регистрировалась у 22 пациентов. Показатели тромбоэластографии (таблица 4) свидетельствовали о различной напряженности гемостатического потенциала в артериальном и венозном участках кровотока.

Клинические и демографические характеристики добровольцев

Таблица 1

Характеристика	Все пациенты, n=150	Контрольная группа, n=60	Группа тромбоза, n=90	p
Возраст, годы	57,9±8,5	53,7±7,9	58,1±8,4	0,749
Мужской пол (%)	78 (52,0)	32 (53,3)	46 (51,1)	0,906
Сахарный диабет (%)	24 (21)	9 (15,0)	15 (16,6)	0,605
Курение (%)	11 (7,4)	3 (5,0)	8 (8,9)	0,083
Синусовый ритм (%)	141 (94)	58 (96,6)	83 (92,2)	0,215
Онкопатология (%)	26 (17,3)	9 (15,0)	17 (18,8)	0,603
Гиперагрегация тромбоцитов (%)	75 (50,0)	0 (0,0)	75 (83,3)	0,0001

Примечание: Данные представлены как M±SD для возраста и как медиана для остальных значений, p - уровень статистической значимости сравнения групп контроля и тромбоза.

Клинические характеристики групп тромбоза

Таблица 2

Характеристика	ТЭЛА, n=38	ОКС, n=27	ОНМК, n=16	ТГВ/МТ, n=32
Возраст, годы	48,4±12,6	53,7±16,7	56,9±11,4	41,1±14,5
Мужской пол (%)	14	13	7	15
Сахарный диабет (%)	4	5	2	4
Курение (%)	2	2	1	3
Синусовый ритм (%)	27	18	15	23
Онкопатология (%)	5	3	3	6
Гиперагрегация тромбоцитов (%)	29 (76,3)	22 (81,5)	1 (6,3)	23 (71,3)

Примечание: Данные представлены как M±SD для возраста и как медиана для остальных значений.

Показатели агрегации тромбоцитов контрольной и групп тромбоза, Me (25–75)

Таблица 3

Группа	Кровь	АДФ, мм	Коллаген, мм	Адреналин, мм	Ристомицин, мм	Wu–Hoak, %
Контроль	Вена	46,5 (36,3–54,1)	43,2 (38,5–54,7)	41,5 (37,2–51,3)	48,9 (37,5–53,6)	1,1 (0,0–1,7)
	Артерия	47,5 (44,1–56,1)	48,1 (37,8–53,2)	37,2 (31,5–43,9)	44,6 (37,1–48,9)	0,8 (0,0–1,3)
ТЭЛА	Вена	70,3 (66,3–76,2)*	72,4 (68,4–74,4)*	70,8 (66,4–72,3)*	68,6 (61,5–71,9)*	19,1 (15,8–20,7)*
	Артерия	68,8 (64,9–76,3)*	68,7 (60,5–72,9)*	67,7 (61,3–73,6)*	59,5 (55,8–71,9)**	18,0 (15,8–19,8)*
ТГВ/МТ	Вена	71,4 (69,1–74,7)**	69,8 (65,3–75,1)*	71,1 (68,1–75,4)*	73,2 (70,2–76,4)**	18,4 (16,9–20,4)**
	Артерия	70,1 (68,4–74,5)**	72,4 (68,1–77,3)**	69,9 (67,1–75,2)*	69,4 (65,3–71,4)**	17,9 (16,8–18,6)**
ОКС	Вена	72,7 (68,3–77,3)**	71,6 (67,2–76,3)**	67,9 (64,9–71,1)*	69,1 (65,4–72,3)*	17,8 (16,1–18,9)**
	Артерия	64,6 (63,2–71,5)*	63,5 (61,1–67,4)*	65,2 (62,4–69,1)*	63,7 (60,1–67,8)*	17,4 (16,8–19,1)**
ОНМК	Вена	50,4 (42,7–56,3)	41,8 (37,2–56,1)	43,2 (38,7–54,1)	47,6 (34,8–56,4)	2,2 (0,1–2,7)
	Артерия	49,2 (44,1–58,8)	44,6 (36,9–54,4)	38,6 (32,1–47,9)	45,1 (38,3–49,1)	1,9 (0,2–2,3)

Примечание: уровень статистической значимости различий признаков в сравнении с контрольной группой: * — $p \leq 0{,}001$, ** — $p \leq 0{,}01$. Различия между артериальной и венозной крови внутри групп нет.

Время реакции (R), характеризующее первую стадию свертывания крови (свертывание плазмы), в венозном участке кровообращения увеличивалось в среднем на 30% (p=0,007) по сравнению с контролем, а в артериальном участке оно возрастало незначительно (p=0,3). Значительно возрастает показатель МА, характеризующий способность тромбоцитов к агрегации, ретракции и реакции высвобождения, в 2,7 раза для венозной и в 4,2 раза для артериальной крови. Резко снижено время достижения максимальной прочности сгустка – ТМА, значение которого снижались на 29,5% относительно контроля для венозной и на 37,5% для артериальной крови. Показатель прочности сгустка (G) в венозной крови были выше на 45,8% контрольных значений, и практически в 1,5 раза в артериальной больше в сравнении с венозной кровью (p=0,005). Таким образом, у пациентов с острым инфарктом миокарда состояние гемостаза, по данным полирегиональной тромбоэластографии, в различных участках сосудистого русла характеризуется неоднородной напряженностью свертывающего потенциала. Интенсивность этого потенциала наиболее высокая в венозном русле, снижается на артериальном уровне, хотя значительно превышает те же показатели у здоровых людей. Показатели фибринолиза максимальны в артериальном русле, уменьшаются на венозном участке с отсутствием статистической разницы (p=0,2). Показатели Wu-Hoak в увеличивается более чем в 15 раз ($p \leq 0,01$) как в артериальной, так и в венозной крови в сравнении с группой контроля. Показатели агрегации тромбоцитов демонстрируют гиперагрегацию на всех индукторах, как на артериальной, так и на венозной крови (таблица 3).

В группу ТЭЛА исходно было распределено 38 пациентов, при этом у 3 пациентов диагноз ТЭЛА не подтвердился, у 6 пациентов не регистрировалась гиперагрегация тромбоцитов. В группу ТГВ/МТ исходно распределено 32 пациента, но у 9 пациентов гиперактивности тромбоцитов при скрининге выявлено не было. Практически с одинаковой частотой гиперагрегация тромбоцитов сопровождает ТЭЛА и мезентериальный тромбоз. Показатели Wu-Hoak в опытных группах, аналогично группе ОКС, увеличиваются более чем в 15 раз ($p \leq 0,01$) как в артериальной, так и в венозной крови в сравнении с группой контроля. Показатели агрегации тромбоцитов демонстрируют гиперагрегацию на всех индукторах, как на артериальной, так и на венозной крови. Результаты тромбоэластографии характеризуются повышением активности тромбоцитарного звена гемостаза - показатель МА возрастает в среднем на 46,9%, повышением времени формирования сгустка – показатель ТМА снижается в среднем на 39%, увеличением прочности сгустка – показатель G возрастает практически в 2,3 раза относительно контроля равнозначно как в артериальном, так и в венозном участке кровотока. Показатели фибринолиза, вероятно, компенсаторно характеризуются повышением активности, преимущественно в венозном участке кровотока – параметр CLT снижается на 17,5% для артериальной, на 21,4% для венозной крови относительно контроля.

Среди выбранных нозологий группа ОНМК практически не сопровождалась системной гиперагрегацией тромбоцитов, гиперкоагуляцией. Анализ показателей системы гемостаза, регистрируемых на разных участках кровотока, не выявили статистически значимых изменений относительно контроля. Возможно, это объясняется иными патогенетическими путями развития ОНМК, преобладанием гемодинамических расстройств, длительным приемом антитромбоцитарной, антигипертензивной, гиполипидемической терапией.

Таким образом, установлено, что гиперактивность системы гемостаза пациентов с состоявшимся тромбозом обусловлена гиперагрегацией тромбоцитов, что может быть использовано в качестве модели оценки фармакологической эффективности антиагрегационных препаратов в условиях *ex vivo*.

Оценка репрезентативности выборки.

На данном этапе исследовательской работы необходимо оценить репрезентативность собственной выборки в рамках основной цели исследования. Для этого в качестве критериев анализа выбрали демографические характеристики и данные анамнеза. На сегодняшний день проведены многочисленные исследования, посвященные эпидемиологии тромбозов различной локализации, выявлены группы риска и установлен спектр и частота различных эпизодов тромботических и тромбоэмболических осложнений. Для оценки частоты сахарного диабета, онкологической патологии и курения у пациентов с тромбозом провели анализ исходных данных методом сопряженных таблиц с применением χ^2 Пирсона. Установлено, что частота тромбоза не зависит от пола (p=0,337) в данной возрастной группе, что полностью соотносится с данными литературы [7]. Курящие лица в данной выборке преимущество распределены в группу тромбоза (χ^2 = 3,947368, p=0,04694), что соотносится с данными литературе о вкладе курения в увеличение частоты тромбозов [3]. Сопутствующие заболевания - сахарный диабет (χ^2 = 3,875271, p=0,03612) и онкологическая патология (χ^2 = 4,159431, p=0,04235) с разной частотой статистически значимо способствуют развитию тромбоза в данной выборке, что соотносится с данными литературы [4]. Так как основной целью исследования является оценить эффективность антиагрегантов на тромбоцитах в состоянии гиперагрегации для оценки частоты гиперагрегации была введена дополнительная бинарная категориальная переменная, характеризующая показатели агрегации тромбоцитов, отличные от референсных значений. Далее методом сопряженных таблиц с применением χ^2 Пирсона установлено, что тромбозы различной локализации сопровождаются гиперагрегацией тромбоцитов (χ^2 = 3,875271, p=0,0031) [2]. По частоте показателя синусовый ритм статистически значимого различия в группах тромбоза и контроля не было, однако анализ данных литературы не относит данный показателей к точному предиктору развития тромбоза [2].

Таким образом, по основным маркерным точкам анализа, сформированная выборка достаточно адекватно соотносится с основными популяционными

Показатели тромбоэластографии контрольной группы и групп тромбоза, Me (25-75)

Таблица 4

Показатель		Вена	Артерия	p
Контроль	R, мин	12,8(10,3-15,6)	13,4(11,6-16,2)	0,3
	TMA, мин	35,7(32,8-41,4)	37,6(34,1-39,7)	0,4
	MA, мм	57,3(54,2-61,2)	54,1(50,6-59,8)	0,6
	G, дин/см^2	5,7(4,5-7,9)	5,1(4,2-7,8)	0,4
	CLT, мин	38,7(35,4-42,4)	36,4(35,6-41,5)	0,7
ОКС	R, мин	17,9(16,3-25,4)*	14,8(10,8-19,2)	0,01
	TMA, мин	25,1(23,7-28,4)**	23,1(19,1-24,8)**	0,2
	MA, мм	119,8(94,8-121,7)**	176,5 (154,3-187,3)**	0,001
	G, дин/см^2	8,4(7,9-9,1)*	12,5(10,6-13,3)**	0,005
	CLT, мин	39,7(38,4-43,5)	41,4(39,7-44,6)	0,2
ТЭЛА	R, мин	14,7(11,5-18,3)	15,2(13,7-17,6)	0,2
	TMA, мин	21,7(19,4-23,1)*	22,9(18,4-23,4)**	0,6
	MA, мм	84,2(79,6-87,1)**	79,5(77,1-82,3)**	0,3
	G, дин/см^2	13,1(10,5-15,2)**	11,8(9,6-13,2)**	0,1
	CLT, мин	30,4(28,4-35,1)*	30,1(28,5-32,6)*	0,4
ОНМК	R, мин	12,3(10,7-14,2)	13,1(12,1-17,3)	0,6
	TMA, мин	34,9(33,2-40,8)	35,9(33,7-39,4)	0,5
	MA, мм	58,4(55,3-62,7)	55,2(54,8-60,7)	0,3
	G, дин/см^2	5,4(4,4-7,7)	5,3(4,4-7,9)	0,7
	CLT, мин	36,4(34,9-43,1)	35,6(34,1-40,2)	0,4
ТГВ/МТ	R, мин	13,8(11,5-15,2)	14,0(12,7-15,3)	0,2
	TMA, мин	22,3(19,7-22,4)**	21,6(18,6-24,1)**	0,4
	MA, мм	81,4(79,6-86,9)**	77,3(76,3-81,5)**	0,1
	G, дин/см^2	12,5(10,4-15,2)**	10,5(9,7-12,3)**	0,3
	CLT, мин	32,7(29,7-34,2)*	32,4(29,2-36,5)*	0,6

Примечание: Уровень статистической значимости различий признаков в сравнении с контрольной группой: * — $p \leq 0,001$, ** — $p \leq 0,01$; p — уровень статистической значимости различий признаков между артериальной и венозной кровью.

характеристиками пациентов с тромбозом и приемлема для оценки терапевтической эффективности лекарственных средств в условиях *ex vivo*.

Оценка эффективности аспирина и пентоксифиллина и сравнение показателей их антиагрегационной активности на интактных и исходно компрометированных тромбоцитах.

Исследование влияния аспирина и пентоксифиллина на тромбоциты в состоянии гиперактивности изучено на крови 48 пациентов с диагносцированным эпизодом сердечно-сосудистой катастрофы (таблица 5). Из данных таблицы 5 видно, что выбранные препараты способны одинаково эффективно корректировать гиперагрегацию тромбоцитов как на артериальном, так и на венозном участках кровотока. Концентрация пентоксифиллина, при которой АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов снижается на 50%, составляет $4,4\times10^{-3}$ М/л. Сопоставление показателей зависимости «концентрация-эффект» для интактных тромбоцитов и тромбоцитов в состоянии гиперактивности демонстрирует троекратное увеличение дозы для достижения аналогичного эффекта.

IC50 пентоксифиллина в группе контроля составила $1,4\times10^{-3}$ М/л. Ацетилсалициловая кислота, аналогично пентоксифиллину, в условиях in vitro способна корректировать гиперактивность тромбоцитов. При этом расчетное IC50 ацетилсалициловой кислоты составляет $4,2\times10^{-3}$ М/л для контрольной группы и $3,9\times10^{-3}$ М/л – в условиях гиперактивности тромбоцитов. Следовательно, эффективность аспирина в условиях in vitro при исходно компрометированных тромбоцитах возрастает. Таким образом, разные значения эффективных концентраций для одного лекарственного препарата демонстрируют необходимость применение модели оценки терапевтической эффективности как на здоровых добровольцах, так и на исходно компрометированных тромбоцитах в условиях *ex vivo*.

Заключение

Результаты проведенного исследования демонстрируют, что состоявшийся тромбоз одного из регионов сосудистого русла не всегда сопровождается системным напряжением свертывающей системы.

Показатели антиагрегационной активности аспирина и пентоксифиллина на образцах артериальной и венозной крови пациентов с тромбозом, Me (25-75)

Таблица 5

Группа	Кровь	Конц., М/л	40×10^{-4}	20×10^{-4}	10×10^{-4}	5×10^{-4}	IC50
Тромбоз	Вена	Пентоксиф.	42,8 (41,1-44,8)	25,8*(21,5-26,5)	6,9**(4,6-8,1)	0,0**(0,0-0,0)	$4,4\times10^{-3}$
		Аспирин	58,8 (55,7-61,3)	30,4*(27,8-33,4)	9,9**(8,2-11,4)	0,0**(0,0-0,0)	$3,9\times10^{-3}$
	Артерия	Пентоксиф.	49,6 (39,9-54,2)	29,7*(23,7-31,4)	8,7**(5,9-10,4)	0,0**(0,0-0,0)	$4,4\times10^{-3}$
		Аспирин	56,4 (53,8-63,4)	36,1*(29,2-43,7)	10,4**(7,6-13,7)	0,0**(0,0-0,0)	$3,9\times10^{-3}$
Контроль	Вена	Пентоксиф.	63,7 (58,9-69,2) α	48,4*(42,7-56,5) β	12,7**(10,5-15,6) β	0,0**(0,0-0,0) γ	$1,4\times10^{-3}$
		Аспирин	41,5 (38,4-42,7) α	13,7**(10,8-16,4) β	0,0**(0,0-0,0) β	0,0**(0,0-0,0) γ	$4,2\times10^{-3}$
	Артерия	Пентоксиф.	61,6 (57,4-64,1) α	50,1* (46,9-57,3) β	10,5**(8,9-16,9) β	0,0**(0,0-0,0) γ	$1,4\times10^{-3}$
		Аспирин	39,8 (36,1-43,2)	14,5**(10,3-17,1) β	0,0**(0,0-0,0) β	0,0**(0,0-0,0) γ	$4,2\times10^{-3}$

Примечание: *p<0,05; **p<0,001 — уровень статистической значимости различий в сравнении с концентрацией 40×10-4 М/л. αp<0,05; βp<0,001; γp>0,05 — уровень статистической значимости различий показателей в группах интактных тромбоцитов и тромбоцитов в состоянии гиперагрегации. Представлена АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов. Различия между показателями артериал. и венозной крови не достоверны.

Однако методами полирегиональной тромбоэластографии и агрегатометрии возможно регистрировать гиперагрегацию тромбоцитов. ТЭЛА, мезентериальный тромбоз и ОКС наиболее часто сопровождаются системной гиперагрегацией тромбоцитов, что может быть использовано для оценки терапевтической эффективности лекарственных средств в условиях *ex vivo*. Необходимость доклинических исследований потенциальных корректоров системы гемостаза, направленных на оценку терапевтической эффективности в условиях ex vivo у пациентов с состоявшимся тромбозом продемонстрирована на примере аспирина и пентоксифиллина.

Литература

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. - М.: Гриф и К. 2012. 944 с.

2. European Society of Cardiology. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. European Heart Journal. 2014. Vol. 35. P. 3033-80.

3. Honda T., Fujimoto K., Miyao Y. et al. Current cigarette smoking is an independent risk factor for subacute stent thrombosis in acute myocardial infarction patients // Cardiol. 2014. Vol. 63. № 5. P. 358-364.

4. Kodiatte T. A., Manikyam U. K., Rao S. B. et al. Mean platelet volume in type 2 diabetes mellitus // Journal of Laboratory Physicians. 2012. Vol. 4. № 1. P. 5-9.

5. Kohanna F. H., Smith M. H., Salzman E. W. Do patients with thromboembolic disease have circulating platelet aggregates? // Blood. 1984. Vol. 64. № 1. P. 205-209.

6. Naimi S., Goldstein R., Proger S. Studies of Coagulation and Fibrinolysis of the Arterial and Venous Blood in Normal Subjects and Patients with Atherosclerosis // Circulation. 1963. Vol. 27. P. 904-918.

7. Patrono C., Andreotti F., Arnesen H. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis // European Heart Journal. 2011. Vol. 32. P. 2922–2932.

UDK [615.038: 616.13/616.14]

Urakov A. L.[1], Samorodov A. V.[2], Kamilov F. Kh.[2], Khaliullin F. A.[2]

Polyregional aggregatometry of blood in patients with acute thrombosis as a potential model for preclicinal studies of new correctors of hemostasis system ex vivo

[1] Izhevsk State Medical Academy,
426034, Russia, Izhevsk, Kommunarov Street, 281
[2] Bashkir State Medical University, Ufa, Russia
450000, Ufa, 3 Lenina str.
e-mail: AVSamorodov@gmail.com

Abstract

Current recommendations to develop new pharmacological agents influencing hemostasis system are limited to the studies carried out on healthy volunteers in vitro, healthy lab animals and animals with model thrombosis in vivo. However, specific and seasonal peculiarities of hemostasis system in laboratory animals may not always adequately represent processes that occur during an event of cardiovascular accident . In this context, the main objective of this work is to study hemostasis system in patients with thrombotic events and to use the received data as a model for assessing the effectiveness of pharmacological agents as exemplified by aspirin and pentoxifylline in ex vivo. Experimental work is carried out on the blood of healthy male donors and patients with acute thrombosis. The findings show that completed thrombosis in one of the regions of coronary blood stream is not always accompanied by systemic tension of the coagulation system. The method of polyregional thromboelastography was used to study hemostasis system and to find out that hyperaggregation of platelets is a responsible part in the development of system hyperactivity of hemostasis in cases where it is registered. Pulmonary embolism, mesenteric ischemia and acute coronary syndrome is most often accompanied by systemic hyperaggegatioin of platelets, which can be used to assess the therapeutic efficacy of medicaments under conditions ex vivo. Aspirin and pentoxifylline are taken as examples to prove the necessity of preclinical studies for potential correctors of hemostatic system aimed to assess therapeutic effectiveness under conditions ex vivo in patients with completed thrombosis.

Keywords: *hemostasis, arterial thrombosis, venous thrombosis, platelet hyperaggregation.*

References

1. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast' pervaja. - M.: Grif i K, 2012. - 944 s.

2. European Society of Cardiology. Guidelines on the diagnosis and management of acute pulmonary embolism. European Heart Journal. 2014. Vol. 35. P. 3033-80.

3. Honda T., Fujimoto K., Miyao Y. et al. Current cigarette smoking is an independent risk factor for subacute stent thrombosis in acute myocardial infarction patients // Cardiol. 2014. Vol. 63. № 5. P. 358-364.

4. Kodiatte T. A., Manikyam U. K., Rao S. B. et al. Mean platelet volume in type 2 diabetes mellitus // Journal of Laboratory Physicians. 2012. Vol. 4. № 1. P. 5-9.

5. Kohanna F. H., Smith M. H., Salzman E. W. Do patients with thromboembolic disease have circulating platelet aggregates? // Blood. 1984. Vol. 64. № 1. P. 205-209.

6. Naimi S., Goldstein R., Proger S. Studies of Coagulation and Fibrinolysis of the Arterial and Venous Blood in Normal Subjects and Patients with Atherosclerosis // Circulation. 1963. Vol. 27. P. 904-918.

7. Patrono C., Andreotti F., Arnesen H. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis // European Heart Journal. 2011. Vol. 32. P. 2922–2932.