

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Бояринцев Д.И., Буслаева Н.Н., 2016
УДК 615.273.53: 615.32: 615.076.9

**ПРОТЕКТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ ПРЯМОГО АНТИКОАГУЛЯНТА
ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ТРОМБОЗА IN VIVO**

Д.И. БОЯРИНЦЕВ, Н.Н. БУСЛАЕВА

ГБОУ ВПО Тюменский ГМУ Минздрава России, г. Тюмень

**PROTECTIVE EFFECTS OF DIRECT ANTICOAGULANT IN THE MODELING
OF THROMBOSIS IN VIVO**

D.I. BOYARINTSEV, N.N. BUSLAEVA

Tyumen State Medical University, Tyumen

Исследование биологического действия лекарственных кандидатов представляет существенную проблему. В частности, достаточно сложно провести комплексное исследование системы гемостаза и оценить влияние на свертывание крови новых антикоагулянтов. Нами исследовано состояние показателей гемостаза и состояние гемодинамики в присутствии антикоагулянтов растительного происхождения при моделировании претромботического состояния у лабораторных животных.

Ключевые слова: *растительные антикоагулянты, гемостаз, моделирование тромбоза.*

The study of the biological action of drug candidates is a significant problem. In particular, it's difficult to perform a comprehensive research of hemostatic system and to estimate the effects on blood clotting of new anticoagulants. In this work, we study hemostasis and hemodynamics during the testing of plant anticoagulants in animal model of thrombosis.

Keywords: *plant anticoagulant, hemostasis, modeling of thrombosis.*

Введение

Исследование биологического действия синтезированных или получаемых из природных объектов химических соединений представляет существенную проблему. Способы моделирования физиологических или патологических изменений (особенно in vitro) не всегда соот-

носятся с фактическим ходом событий. Одной из систем, комплексное исследование которой достаточно сложно в силу ее многокомпонентности, является система гемостаза. При этом количество исследуемых противосвертывающих средств велико, а интенсивность исследований не уменьшается [5]. В лабораториях Тюмен-

ского ГМУ из ряда растений, произрастающих в Западной Сибири, выделены и частично охарактеризованы эффекторы с антикоагулянтной активностью [1, 2, 3]. Существующие данные говорят об их высокой противосвертывающей активности, приемлемой продолжительности действия и низкой токсичности. Однако их влияние на гемостаз оценено, главным образом, с использованием стандартных «пробирочных» тестов, что делает моделирование претромботических и тромботических состояний для оценки их протекторной активности актуальным.

Для активации процессов свертывания крови были предложены различные модели, в основе которых лежит контролируемое нанесение опытному животному повреждения для развития гемостатической или тромботической реакции. Отдельное место среди них занимает тромбоз, индуцируемый лазером. Метод основан на повреждении эндотелия сосуда вследствие поглощения энергии лазерного излучения кровью или красителем, введенным в кровоток, выделением тепла и, как следствие, повреждением стенки сосуда изнутри [4]. Регулируя мощность лазерного излучения и используя вещества, интенсивно его поглощающие, становится возможным моделирование различных механизмов тромбобразования за счет послойного повреждения стенки сосудов, начиная с эндотелия. А использование интравитальной микроскопии позволяет непосредственно контролировать и управлять течением процесса свертывания крови.

Материалы и методы

В качестве модельных объектов использовались самцы белых беспородных крыс массой 200 ± 40 г. Для каждого эксперимента формировали контрольные и опытные группы животных, не менее чем из 5 особей. Общее количество животных – 52. Работу с животными проводили с соблюдением принципов гуманности (директива 86/609/ЕЕС и «Хельсинкская декларация» (1996)). Все манипуляции проводились под общим наркозом, по завершении эксперимента животное декапиту-

ровали, не выводя из состояния сна. Влияние раствора антикоагулянта оценивали после его введения в яремную вену, для постановки тестов отбирали кровь из парной вены и получали плазму.

Изучение влияния антикоагулянтов на состояние гемодинамики в лазериндуцированной модели тромбоза проводили на прижизненном препарате сосудов микроциркуляторного русла брыжейки тонкого кишечника.

Интравитальное наблюдение производилось при помощи цифровой камеры, установленной на микроскопе Meiji Techno ML 9000.

При проведении исследования через срединный разрез извлекали петлю тонкой кишки, брыжейку расправляли на стекле рабочего столика микроскопа. Индуцировали претромботическое состояние световым потоком полупроводникового лазера (535 нм, 50 мВт). Время воздействия составляло от 30 до 180 секунд. Диаметр луча, сфокусированного на брыжейке, составлял 30-40 мкм, что позволяло локализовать воздействие на отдельном участке микроциркуляторного русла. В качестве объектов воздействия выбирались артериолы и вены диаметром 25-50 мкм. Измерение диаметра сосудов, скорости кровотока, линейных размеров тромбов производили при помощи автоматических систем анализа изображения Bioquant и Micros. Во всех случаях сравнивали результаты экспериментов с контрольной группой животных, которым вместо раствора антикоагулянта вводился изотонический раствор хлорида натрия.

В качестве антикоагулянта использовали очищенный экстракт из листьев черники обыкновенной (*Vaccinium myrtillus*), полученный по разработанной нами оригинальной методике. Для оценки его влияния на свертывание крови определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ) и протромбиновое время (ПВ) *in vitro*, используя плазму крови и рассчитывая эффективность торможения реакций по формуле:

$$i = 1 - (t_k/t_0),$$

где i – эффективность торможения,
 t_k – время, затрачиваемое на фибринообразование в контрольной пробе,
 t_0 – время, затрачиваемое на фибринообразование в опытной пробе.

Также оценивали влияние экстракта на показатели свертывания крови, АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (АТ) и деформируемость эритроцитов (ДЭ) после его введения лабораторным животным. Оценку показателей свертывания крови проводили на автоматическом коагулометре «Solar» (Беларусь), с использованием стандартных тест-систем. Агрегацию тромбоцитов исследовали турбидиметрическим методом Борна с помощью анализатора агрегации тромбоцитов «Viola-LA 320» (Россия), и стандартных наборов для оценки агрегации тромбоцитов «Технология-Стандарт» (Россия). Исследование деформируемости эритроцитов проводили методом эктацитометрии в проточной камере. Статистический анализ полученных данных выполняли методами вариационной статисти-

стики для малых рядов наблюдений. Статистическую значимость оценивали, используя U-критерий Манна-Уитни, значимыми считались отличия при значениях $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Полученный из листьев черники экстракт тестировали для определения этапа свертывания крови, на котором реализуется его действие. Для этого определяли его влияние на АЧТВ, ПВ и ТВ в плазме крови. Наиболее выражено в присутствии экстракта тормозилось АЧТВ, что свидетельствует о преимущественном влиянии экстракта на внутренний путь плазмокоагуляционного каскада. Это наблюдение позволило нам использовать в качестве объекта сравнения коммерческий препарат нефракционированного гепарина. Одновременно, анализируя представленный на рисунке 1 график, мы определили концентрацию экстракта, достаточную для уверенного выявления его антикоагулянтного действия при внутривенном введении. Определенная таким образом конечная концентрация экстракта составила 1 мг/мл.

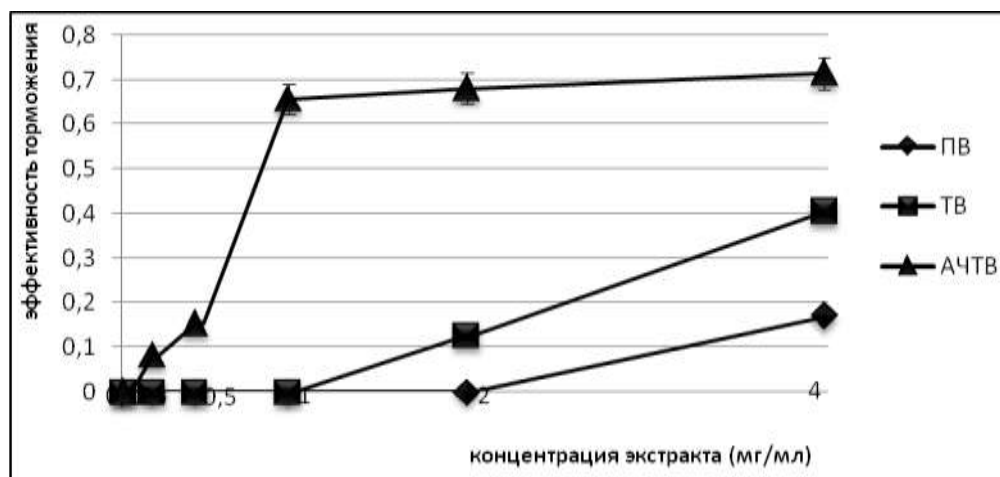


Рис. 1. Зависимость эффективности торможения свертывания крови в зависимости от концентрации экстракта листьев черники

После введения экстракта в кровотоки крыс через 5, 30 и 90 мин осуществляли отбор проб крови. Далее получали богатую и бедную тромбоцитами плазму, используя её для оценки АЧТВ и АТ. В течение времени наблюдения выявлялось выраженное

($i=0,17 \pm 0,003$) торможение АЧТВ (рис. 2).

Так же, в сравнении с контролем на $14,4 \pm 0,1\%$ снижалась интенсивность АДФ-индуцированной АТ (рис. 3), и на $15 \pm 2,3\%$ повышалась деформируемость эритроцитов (рис. 4).

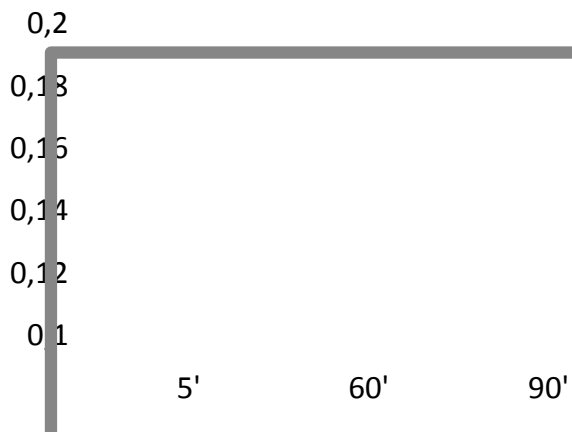


Рис. 2. Эффективность торможения АЧТВ от времени при внутривенном введении лабораторным животным экстракта листьев черники

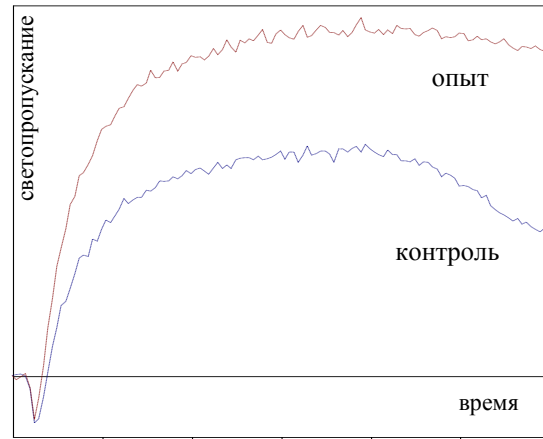


Рис. 3. Изменение агрегации тромбоцитов при внутривенном введении лабораторным животным экстракта листьев черники

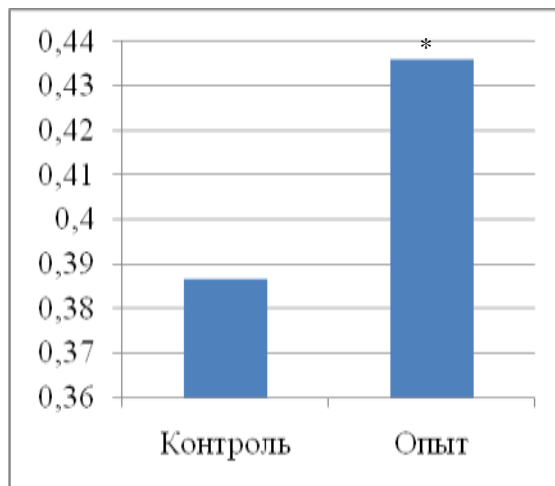


Рис. 4. Влияние экстракта листьев черники на деформируемость эритроцитов при внутривенном введении лабораторным животным (* $p < 0,05$)

Таким образом, внутривенное введение антикоагулянта, входящего в состав экстракта листьев черники, выражено угнетает активность реакций плазмокоагуляции не только в пробирочных тестах, но и при внутривенном введении лабораторным животным. Продолжительность антикоагулянтного действия экстракта сохраняется не менее 1,5 часов, а введение антикоагулянта не приводит к гибели животного.

При лазерном облучении фиксировали изменение скорости кровотока и диаметра сосудов микроциркуляторного русла. Уже на первых секундах облучения

наблюдалось увеличение скорости кровотока, сопровождавшееся характерными изменениями, в частности, повышалась его оптическая плотность. Через 30 секунд наблюдаемая картина менялась – скорость кровотока замедлялась и увеличивалась зернистость потока.

При увеличении продолжительности облучения до 90-180 секунд, после первой минуты облучения сохранялась вазодилатация, и отмечалась выраженная миграция лейкоцитов в зону повреждения (рис. 6). В дальнейшем наблюдается адгезия и агрегация форменных элементов с формиро-

ванием пристеночного тромба, а затем и полная остановка кровотока вследствие

закупорки им сосуда (рис. 5, 6, 7).

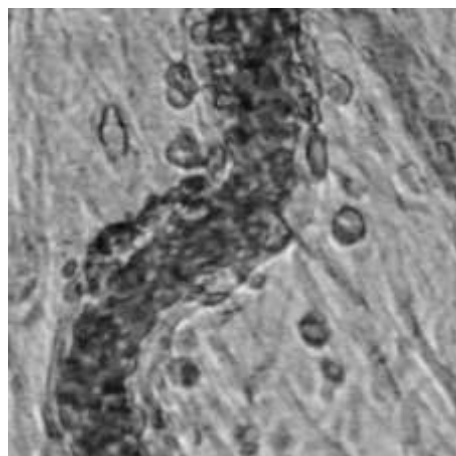
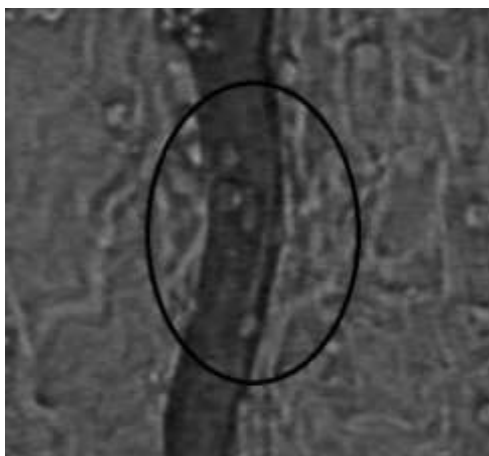


Рис. 5. Увеличение диаметра сосуда и миграция лейкоцитов в очаг повреждения через 60-90 секунд от начала облучения

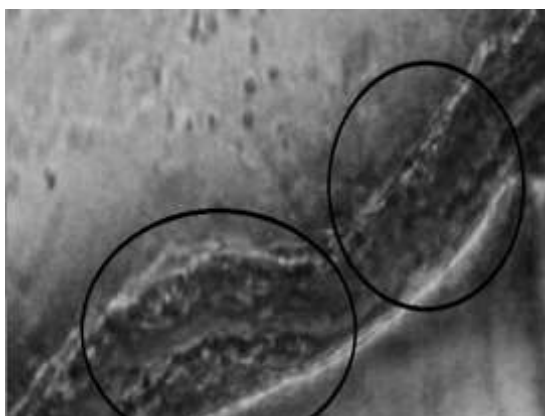


Рис. 6. Формирование пристеночных тромбов на облучаемых участках сосудов, через 120 секунд от начала облучения

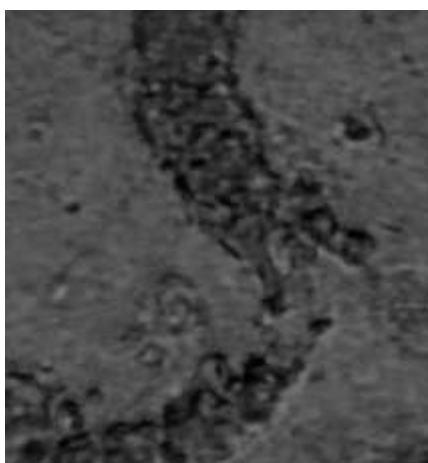


Рис. 7. Тромбоз сосуда через 150-180 сек от начала облучения

У контрольной группы животных формирование тромбов начиналось через 120 секунд облучения, и полная остановка кровотока на исследуемом участке проис-

В случае предварительного введения крысам исследуемого экстракта листьев черники, динамика изменений движения крови в сосудистом русле при облучении лазером претерпевала изменения. Так, формирование пристеночных тромбов начиналось не ранее чем через 150-180 секунд от начала облучения, а остановка кровотока на облучаемом участке сосуда происходила через 360-420 секунд. Примерно в половине случаев после прекращения облучения, тромботизированный сосуд реканализировался в течении 5-8 минут.

Выводы

Полученный из листьев черники экстракт обладает антикоагулянтной активностью, реализуемой на внутреннем пути плазмокоагуляции, а антикоагулянтное действие сохраняется при внутривенном введении лабораторным животным. Кроме влияния на плазмокоагуляционный гемостаз, антикоагулянт ограниченно угнетает агрегацию тромбоцитов и повышает эластичность мембран эритроцитов. Предварительное введение антикоагулянта увеличивает время воздействия, требуемого для развития тромбоза и сосудистых реакций при повреждении эндотелия лазером, что говорит о его выраженных протекторных свойствах.

ходила к 180 секунде. Прерывание облучения через 120 секунд сопровождалось восстановлением состояния сосудов и нормализацией кровотока в течение 7-12 минут.

Литература

1 Губаев А.Г. Фармакологические свойства антикоагулянта прямого действия из травы ноня темная: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.Г. Губаев. – Тюмень, 1996. – 20 с.

2 Дементьева И.А. Препарат противосвертывающего действия из медуницы мягчайшей / И.А. Дементьева, О.П. Леонова, М.К. Умутбаева // Молодежь – практ. здравоохранению: тез. докл. Всесоюз. науч. конф. мол. ученых. – М., 1990. – С. 42-43.

3 Русакова О.А. Растения флоры Сибири, как источники антикоагулянтов прямого действия / О.А. Русккова // Обмен веществ в норме и патологии. – Тюмень, 1992. – С. 84.

4 Kretz C.A. Tissue factor and thrombosis models / C.A. Kretz, N. Vaezzadeh, P. L. Gross // Arterioscler. Thromb Vasc. Biol. – 2010. – Vol. 30, № 5. – P. 900-908.

5 Weitz J.I. New antithrombotic drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed. / J.I. Weitz, J.W. Eikelboom, M.M. Samama // American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines, CHEST. – 2012. – 141 (2 suppl.). – P. e120S – e151S.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бояринцев Даниэль Игоревич – к.б.н., доц. ГБОУ ВПО Тюменский ГМУ Минздрава России, г. Тюмень.

E-mail: bdy0710@yandex.ru

Буслаева Наталья Николаевна – студентка ГБОУ ВПО Тюменский ГМУ Минздрава России, г. Тюмень.

E-mail: natalie.buslaeva@gmail.com