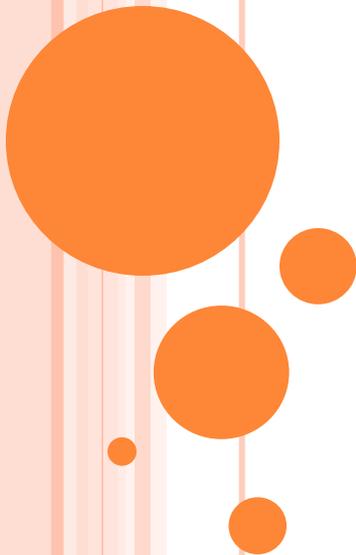




ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Изучение веществ с антитромботической активностью



СИСТЕМА ГЕМОСТАЗА (функции)

- **В неповрежденных сосудах - поддержание текущей крови в жидком состоянии.**
- **При повреждении сосуда:**
 - ✓ **остановка кровотечения (образование тромба),**
 - ✓ **участие в регенерации сосудистой стенки.**

ОСНОВНЫЕ КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА:

- 1. Сосудистая стенка.**
- 2. Тромбоциты.**
- 3. Плазменные белки систем свертывания и противосвертывания.**

МЕХАНИЗМЫ (ЭТАПЫ) ГЕМОСТАЗА

- 1. Сосудисто-тромбоцитарный (микроциркуляторный) гемостаз.**
- 2. Коагуляционный (плазменный, макроциркуляторный) гемостаз.**
- 3. Фибринолиз, регенерация тканей**



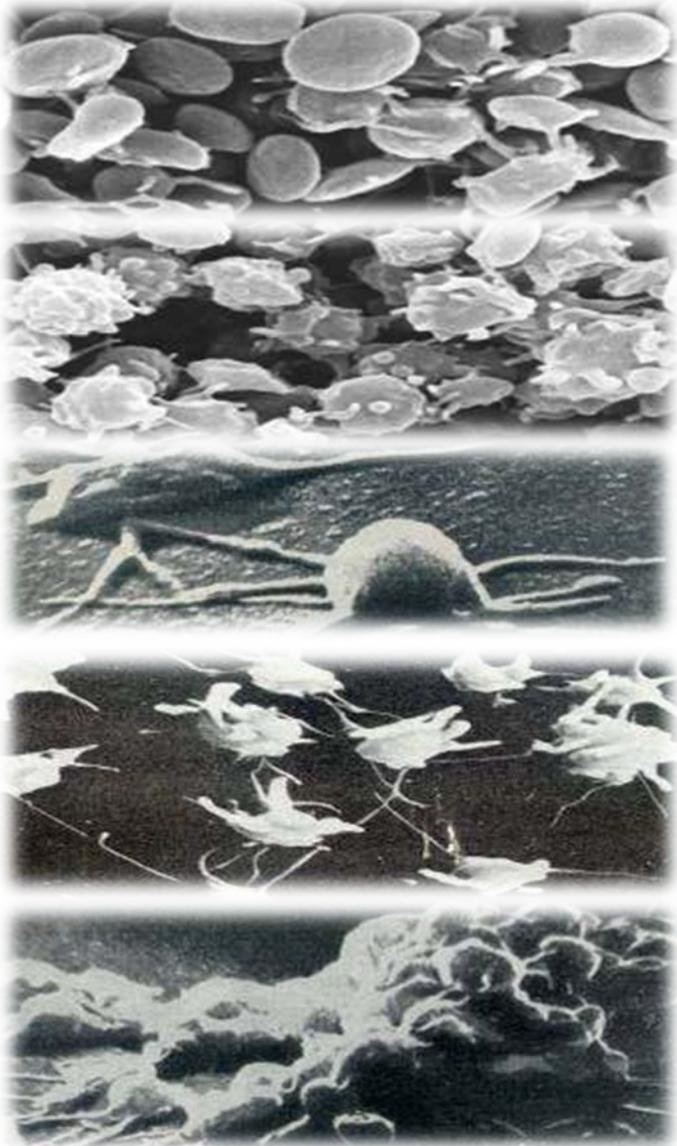
РЕЦЕПТОРЫ НА ТРОМБОЦИТАРНОЙ МЕМБРАНЕ

Мембранные рецепторы		Агонисты (лиганды)	Число рецепторов на 1 тромбоците
Рецепторы для высокомолекулярных белков	GPIb-V-IX	Фактор Виллебранда, тромбин	50 000
	GPIIb-IIIa	Фибриноген, фактор Виллебранда, фибрин, фибронектин, витронектин, тромбоспондин	50 000
	GPIc-IIa	Фибронектин, ламинин	1000
	VN-R	Витронектин, тромбоспондин	100
	GPIa-IIa	Коллаген	1000
	GPIIb	Тромбоспондин	
	GPVI	Коллаген	
Рецепторы для физиологических стимуляторов	P2-R	АДФ	Выс. афф. 600 Низ. афф. 60 000
	α_2 -adr-R	Адреналин	300
	5-HT ₂ -R	Серотонин	50
	H ₁ R	Гистамин	
	V ₁ -R	Вазопрессин	
	Thr-R (STDR)	Тромбин	1700-2000
	TP-R	Тромбоксан	1000-1700

Функции тромбоцитов

- ❖ формирование первичной тромбоцитарной пробки в зоне повреждения сосуда за счет адгезии и последующей агрегации;
 - ❖ катализ гуморальных реакций гемостаза за счет:
 - а) предоставления фосфолипидной поверхности (фактор 3 тромбоцитов или тромбоцитарный тромбопластин), необходимой для взаимодействия большинства плазменных белков гемостаза;
 - б) выброса прокоагулянтов из пулов хранения;
 - ❖ ретракция сгустка крови;
 - ❖ стимуляция локальной вазоконстрикции, репарации тканей, регулирование местной воспалительной реакции за счет высвобождения соответствующих медиаторов из пулов хранения тромбоцитов.
- 

ТРОМБОЦИТАРНЫЙ ГЕМОСТАЗ



Адгезия

(коллаген – vWF – ТЦ)

~ 3 сек

Агрегация

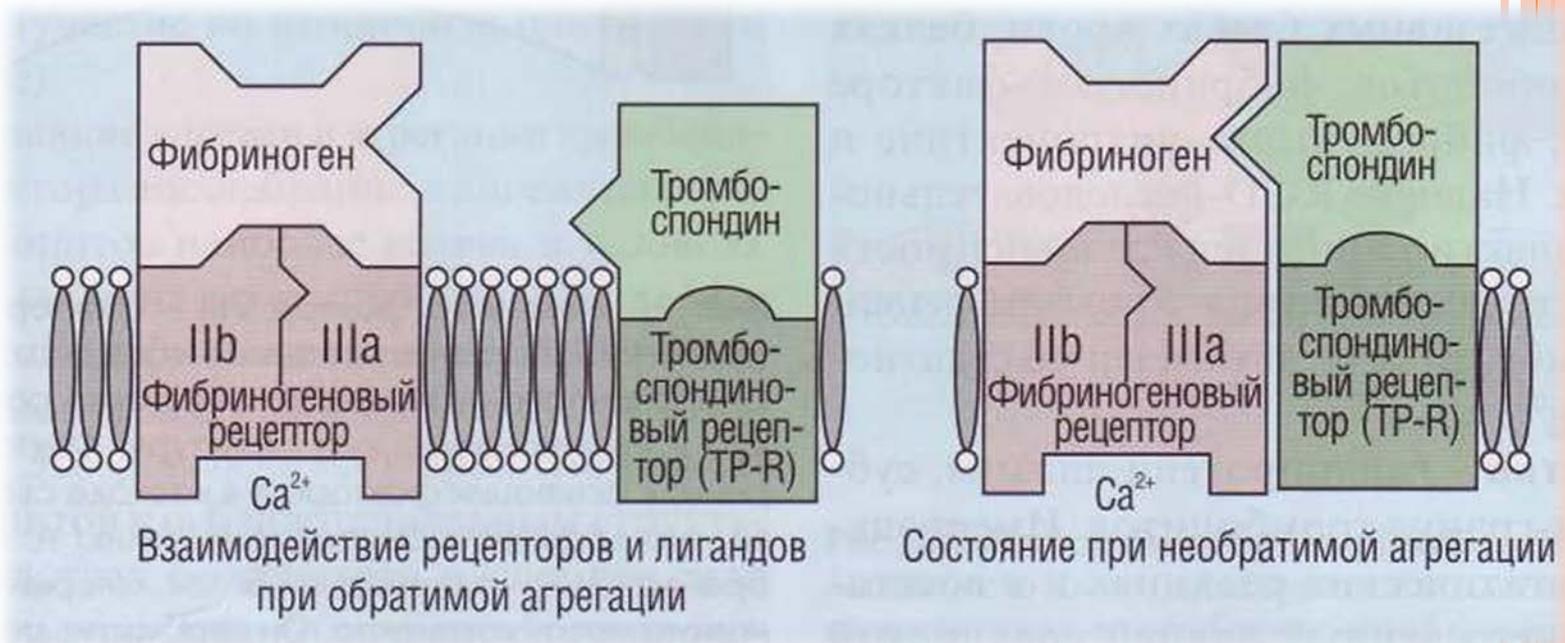
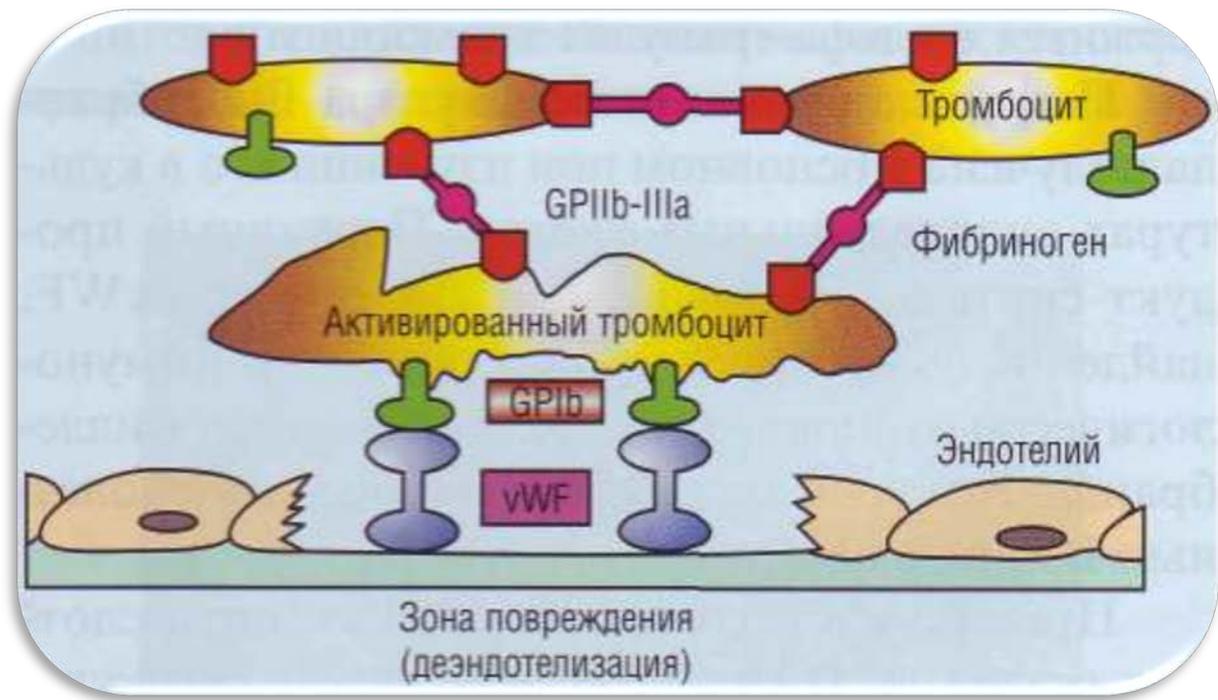
~ 10 сек

Белый ТЦ тромб

с фибрином

~ 5 мин





ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ВЕЩЕСТВ НА АГРЕГАЦИЮ ТРОМБОЦИТОВ

Основной целью исследования специфической фармакологической активности потенциальных антиагрегантов является изучение их действия на склеивание тромбоцитов.

Оценку специфической фармакологической активности потенциальных антиагрегантов необходимо проводить в три этапа:

- 1) оценка антиагрегационных свойств *in vitro*;
- 2) оценка специфической фармакологической активности *in vivo* на интактных животных;
- 3) оценка специфической фармакологической активности *in vivo* с использованием модельных состояний, сопровождающихся повышением агрегации и адгезии тромбоцитов.



ЗАБОР КРОВИ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ

- ❖ Наиболее доступными и удобными для проведения исследований являются **кролики**.
- ❖ Эксперименты *in vitro* выполняют на кроликах, массой 2,5-3 кг. А эксперименты *ex vivo* проводят на белых неинбредных крысах обоего пола массой 250-300 г.
- ❖ Забор крови у кроликов осуществляется **из краевой вены уха методом свободного падения капель** в пробирку с антикоагулянтом.
- ❖ Объем крови, взятой у кролика не должен превышать 20-25 мл однократно.
- ❖ Забор крови у одного кролика желательно проводить **не чаще, чем 1 раз в неделю**.



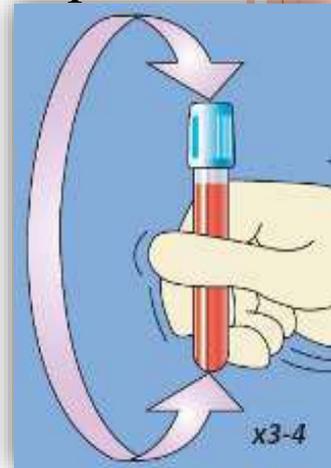
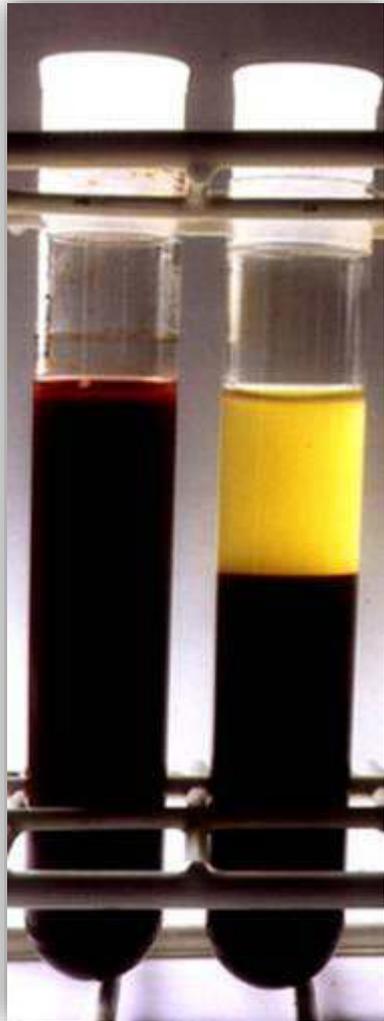
ПОЛУЧЕНИЕ ПЛАЗМЫ

➤ Стабилизировали полученную кровь 3,8 % раствором цитрата натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали в течение 10 минут при 1500 об/мин.

❖ Центрифугирование для получения богатой ТЦ плазмы (Platelet-Rich Plasma) – 5-10 мин при 1000-1500 об/мин (450-500 g) при комнатной t° . Сразу после ЦФ – перенос плазмы в пластиковые пробирки пипеткой с пластиковым наконечником. Замораживание не допускается.

❖ Центрифугирование для получения бедной ТЦ плазмы – 1700-1900 g / 15 мин при комнатной t° .

❖ Отделение плазмы от осадка – в течение 1 ч после взятия крови, перенос плазмы в пластиковые или силиконированные пробирки пипеткой с пластиковым наконечником.



Методы исследования агрегации

- Основным методом исследования агрегации тромбоцитов выбрана модель АДФ - индуцированной агрегации тромбоцитов по методу Born G, в модификации Габбасова В.А., которая воспроизводится на двухканальном лазерном анализаторе агрегации тромбоцитов «Биола» 220 LA (Россия)



Оптический метод, предложенный G.Born.

- Данный метод является самым распространенным как в клинической, так и в научно-исследовательской практике. О степени агрегации чаще всего судят по максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции по сравнению с исходной величиной. В качестве оптического контроля используют плазму, не содержащую тромбоцитов. Исследуемое вещество добавляют в кювету. Объемы вводимой в кювету агрегометра плазмы и проагреганта зависят от технических характеристик прибора.
- Объем исследуемого антиагреганта не должен быть большим, так как излишнее разведение плазмы или суспензии тромбоцитов может привести к заметному изменению оптических свойств реакционной смеси и повлиять на результаты эксперимента. Обычно раствор изучаемого вещества при использовании растворителей, не влияющих на физиологическую активность тромбоцитов (физиологический раствор, буферы для работы с клетками крови, аутологичная бестромбоцитарная плазма), не превышает 10% от общего объема реакционной смеси.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИАГРЕГАНТНЫХ СВОЙСТВ EX VIVO

- Для исследования влияния потенциального антиагреганта на функциональную активность тромбоцитов *in vivo* также наилучшим является метод регистрации агрегации тромбоцитов, предложенный G. Born. Так как чувствительность к проагрегантам тромбоцитов кроликов отличается от чувствительности человеческих тромбоцитов, наиболее информативными индукторами агрегации являются АДФ в конечной концентрации 10^{-5} М и коллаген.

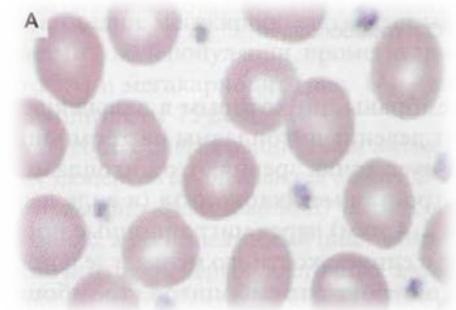


ПОДСЧЕТ КОЛИЧЕСТВА ТРОМБОЦИТОВ

❖ В камере Горяева – низкая точность, возможно занижение результатов (сорбция на стекле пипеток, меланжеров, пробирок, камеры). Точность выше при фазово-контрастной микроскопии. $CV = 7-15\%$.

❖ По Фонию – в мазке крови на 1000 эритроцитов. Низкая точность, но можно одновременно оценить морфологию тромбоцитов.

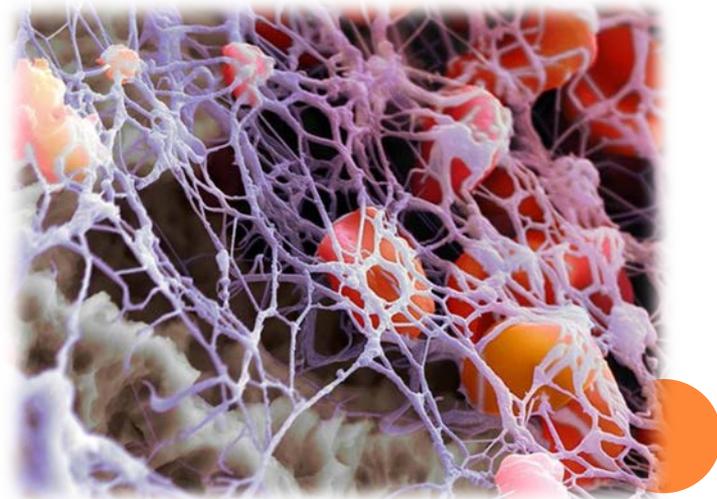
❖ На гематологическом анализаторе – точно, в стандартных условиях, быстро. Важно предотвратить агрегацию (постоянное перемешивание). $CV = 2-4\%$ - важно для оценки динамики.



ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ ТРОМБОЦИТОВ

1. Спонтанная и индуцированная агрегация тромбоцитов
(индукторы – АДФ, коллаген, адреналин, тромбин, ристомидин)
2. PF4 – тромбоцитарный фактор 4
3. β -TG – β -тромбоглобулин

ИФА-тесты



АНАЛИЗАТОРЫ АГРЕГАЦИИ ТРОМБОЦИТОВ

❖ Оптические агрегометры – метод Борна, флуктуация проходящего через PRP тонкого лазерного луча. Продолжительность анализа – 15-30 мин.

❖ Импедансные агрегометры – оценка изменений электропроводности разведенной цельной крови / PRP в ходе агрегации ТЦ. Продолжительность анализа – 5-7 мин.



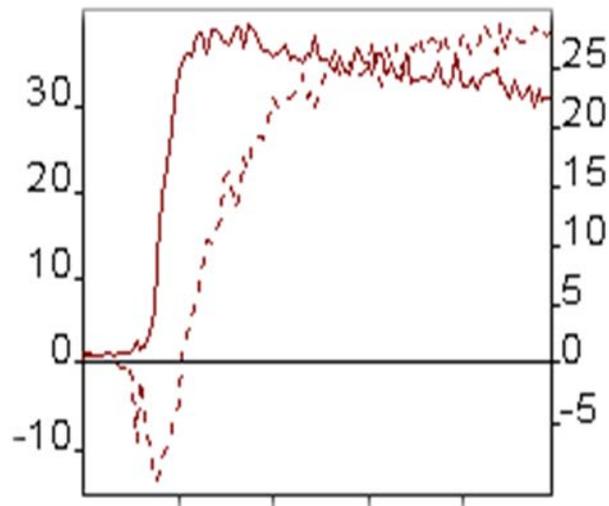
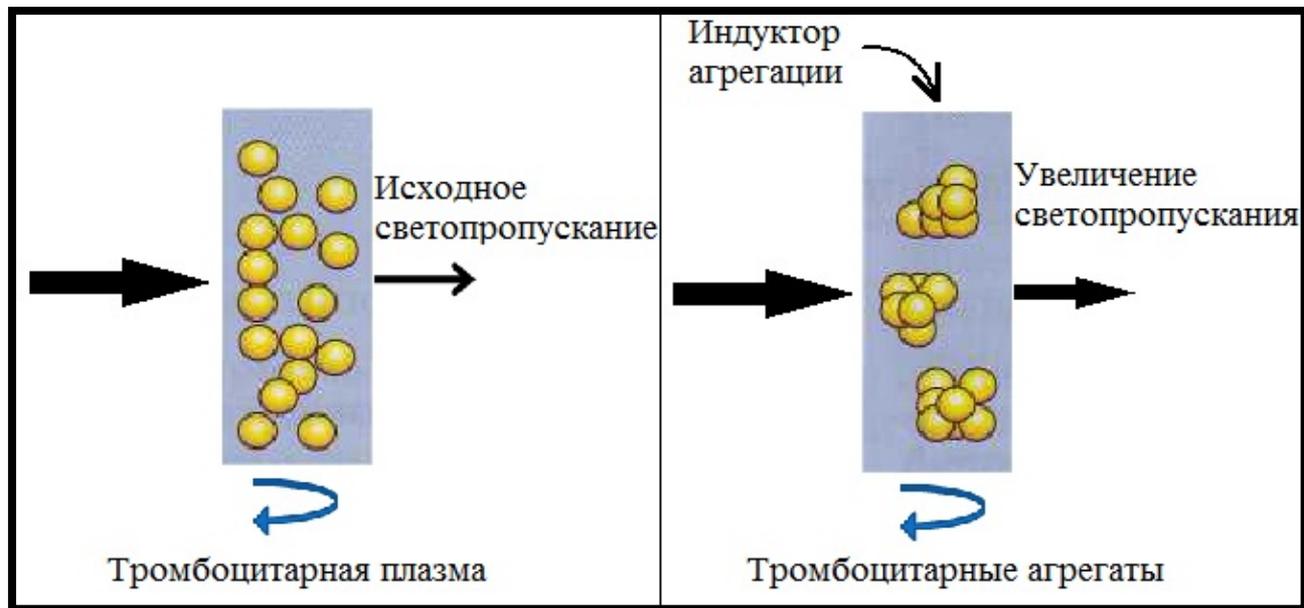
BIOLA – 230 LA



CHRONO-LOG 590



ОЦЕНКА ФУНКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ



ИМПЕДАНСНЫЙ АГРЕГОМЕТР MULTIPLATE

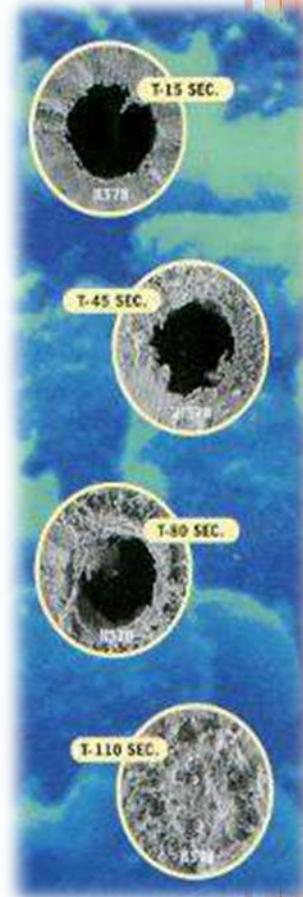
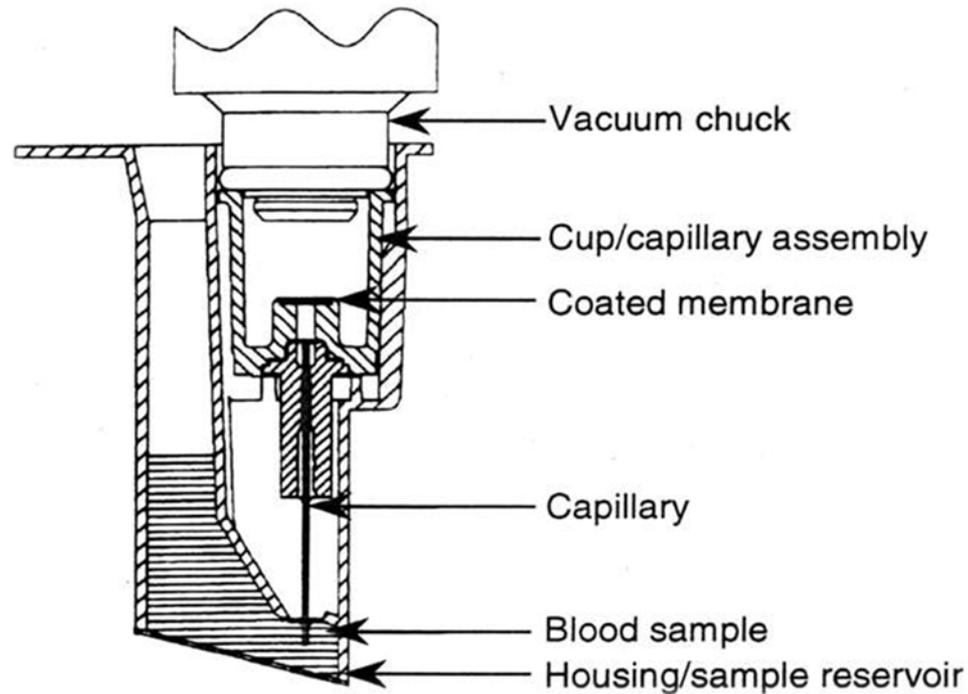
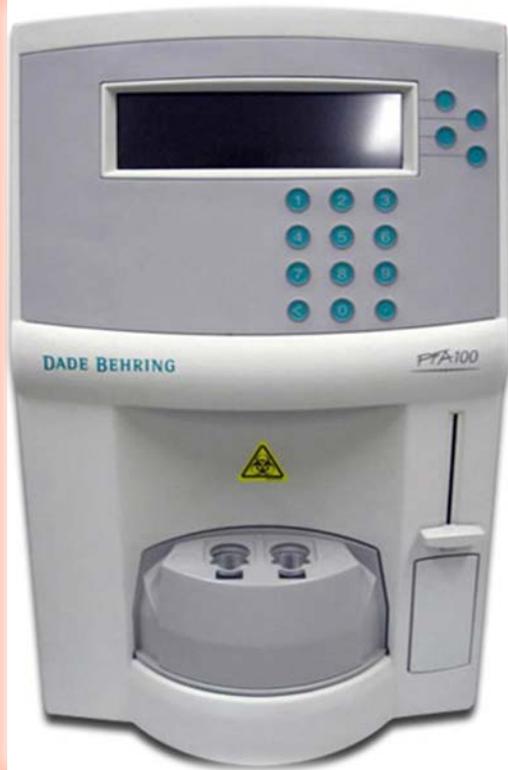


Прибор группы РОС

- ❖ работа с цельной кровью (300 мкл/тест)
- ❖ стандартизованный метод измерения агрегации тромбоцитов. Возможность работы непосредственно в оперблоке (Р.О.С. – у постели больного)
- ❖ тесты на действие различных антиагрегантов



АНАЛИЗАТОР ФУНКЦИИ ТРОМБОЦИТОВ PFA-100



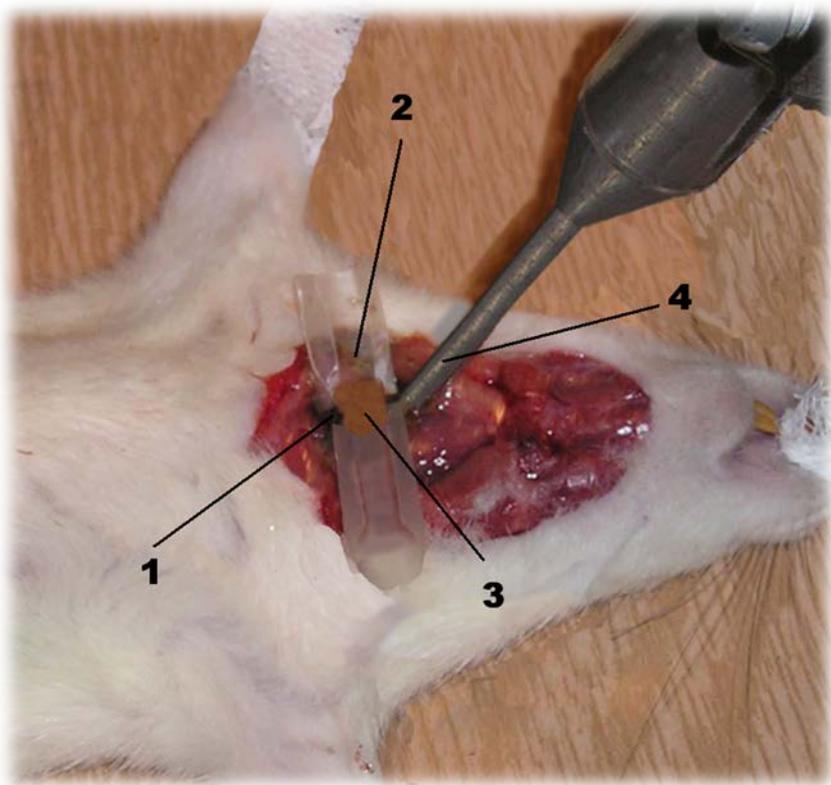
Оценивается время закупорки отверстия в коллагеновой мембране образующимся ТЦ тромбом (при протекании цельной крови)

МОДЕЛИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ

- ❖ Модель генерализованного тромбоза
- ❖ Модель артериального тромбоза, индуцированного хлоридом железа (III).
- ❖ Модель артериального тромбоза, индуцированного электрическим током
- ❖ Модель экспериментального сахарного диабета
- ❖ Определение времени кровотечения



МОДЕЛЬ АРТЕРИАЛЬНОГО ТРОМБОЗА, ИНДУЦИРОВАННОГО ХЛОРИДОМ ЖЕЛЕЗА (Ш).

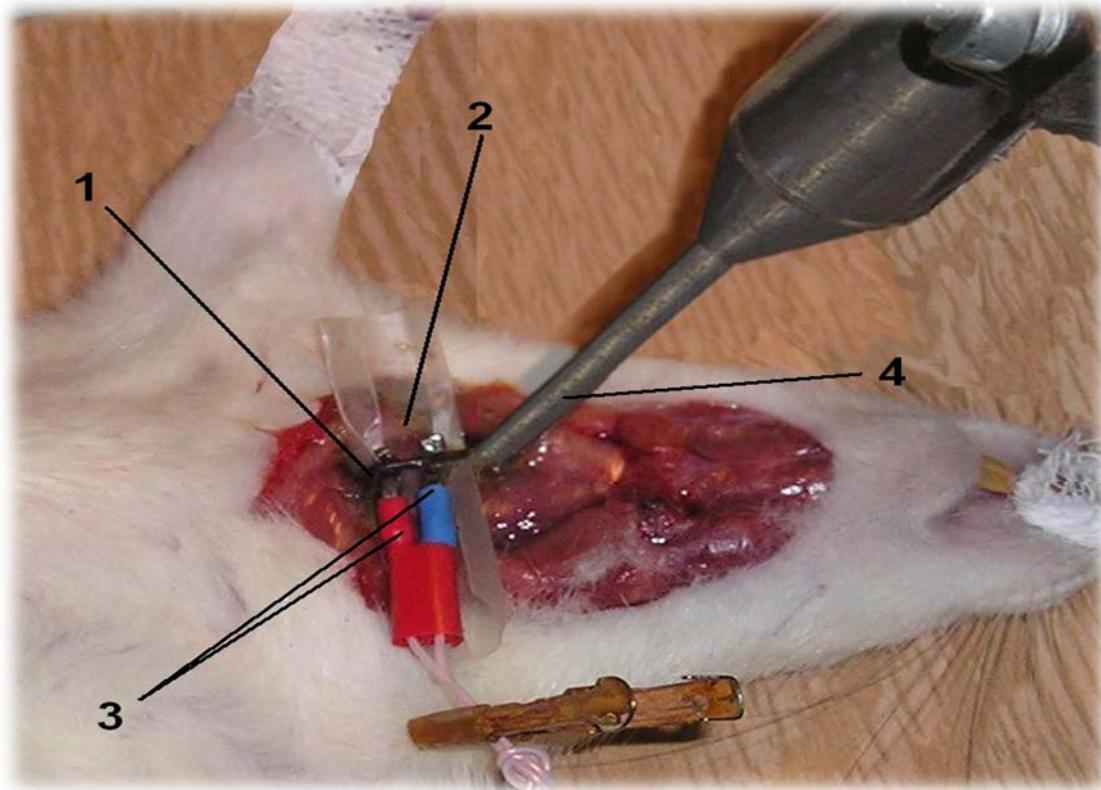


Принцип метода состоит в том, что наложение ватного диска, смоченного хлоридом железа на выбранный сосуд, вызывает в данном месте образование тромбоцитарного тромба.



Ультразвуковой доплерограф
«Минимакс-Допплер-К»
(С.-Петербург, Россия)

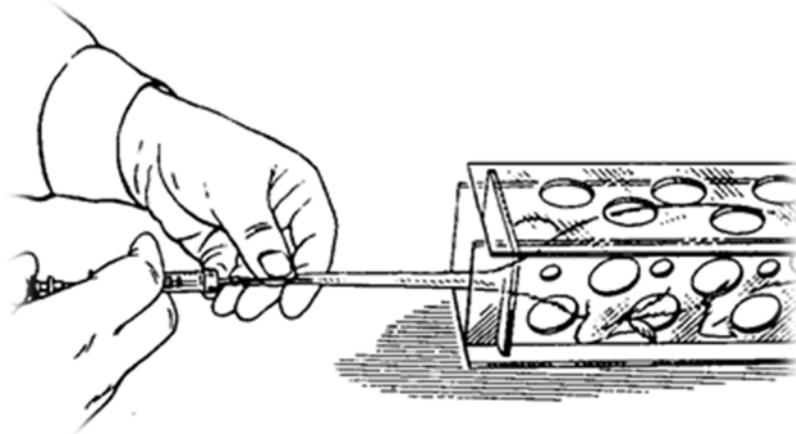
МОДЕЛЬ АРТЕРИАЛЬНОГО ТРОМБОЗА, ИНДУЦИРОВАННОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ТОКОМ



Отличие от предыдущей модели состоит в том, что в данном случае тромбоз индуцируется анодным током напряжением 100 В и силой 50 мА.

МОДЕЛЬ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ТРОМБОЗА

❖ В качестве тромботического агента используется смесь растворов коллагена (0,5 мг/кг) и адреналина (0,06 мг/кг), которая вводится в хвостовую вену животного.



❖ В качестве критерия образования тромбов фиксируется количество погибших животных и наличие тромбов в сосудах легких.



МОДЕЛЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА.

- ❖ В лечении сахарного диабета большое значение придается не только стабилизации углеводного обмена, но и профилактике ангиопатий
- ❖ Схемы назначения лекарственных средств помимо сахароснижающей терапии включают использование для профилактики диабетических ангиопатий антиагрегантных препаратов.
- ❖ Для комплексной оценки агрегатного состояния крови определяются различные параметры активации тромбоцитов, описанные выше.
- ❖ Материалом для исследования является плазма крови диабетных крыс.
- ❖ На животных с экспериментальным сахарным диабетом возможно создание некоторых моделей тромбозов. В данном случае время возникновения тромбоза у диабетных животных сравнивается с таковым у интактных крыс.



ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВРЕМЕНИ КРОВОТЕЧЕНИЯ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ФАРМАКОЛОГИИ

- ❖ Используют лабораторных животных – крыс или мышей.
- ❖ У животных отсекают конец хвоста на расстоянии от 3 до 10мм.
- ❖ Затем помещают хвост в раствор физиологического раствора при $t-37^{\circ}\text{C}$ и визуально оценивают время кровотечения.

Исследуемые соединения вводятся животным за определенное время до начала опыта. Для получения достоверных результатов одно соединение необходимо изучить не менее, чем на 20 животных.

ПРЕПАРАТЫ СРАВНЕНИЯ

- Основными группами антиагрегантов являются следующие:
- 1. Ингибиторы циклооксигеназы-1 тромбоцитов. К ним относится ацетилсалициловая кислота (аспирин), индобуфен.
- 2. Антагонисты тромбоцитарных рецепторов АДФ P2Y₁₂. В эту группу объединяют тиенопиридины — тиклопидин (тиклид), клопидогрель (плавикс)
- 3. Антагонисты рецепторов фибриногена — гликопротеинов IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). В клинической практике широко применяются препараты для внутривенного введения — абциксимаб (РеоПро), эписфибатид (интегрилин), тирофибан (агграстат).



МИШЕНИ ДЛЯ ДЕЙСТВИЯ АНТИАГРЕГАНТНЫХ СРЕДСТВ

- Рецепторы мембран тромбоцитов
- Простациклин-тромбоксановая система
- Внутриклеточный кальций
- Эндотелиальная дисфункция

