

СОСТОЯНИЕ ГЕМОСТАЗА ПРИ ВВЕДЕНИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ТРОМБОЛИТИКА "ТРИАЗА"

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем современной биологии и медицины является поиск новых фармакологических препаратов, направленных на активацию системы фибринолиза [1-10, 17-20]. Общеизвестно, что тромботические осложнения являются лидирующей причиной смерти от болезней системы кровообращения при ишемической болезни сердца и ишемической болезни мозга.

Этапным моментом следует считать 90-е годы прошлого века, когда был отмечен прогресс в углублении представлений о ключевых биохимических и биофизических механизмах, с помощью которых осуществляется взаимодействие отдельных компонентов системы гемостаза (особенно элементов ее клеточного звена), дискоординация которой является пусковым механизмом как атерогенеза, так и тромбообразования [3, 8, 10, 36].

В настоящее время из всего арсенала существующих тромболитиков в широкой клинической практике используют плазмин, уро- и стрептокиназу, некоторые их комбинированные производные и рекомбинантные препараты (актилизе, ретаваза) [32]. Однако, несмотря на показанную достаточно высокую эффективность их применение сопряжено с рядом проблем, прежде всего, связанных с возможными аллергическими и пирогенными реакциями [20, 28, 36]. В этой ситуации весьма перспективным представляется получение тромболитических препаратов из патогенных грибов [15].

Преимущество использования грибов в качестве источника тромболитического агента состоит в том, что они имеют короткий цикл развития, и способны расти в условиях глубинного культивирования на легкодоступной синтетической среде [7, 15]. Высокая фибринолитическая активность этих препаратов сочетается с отсутствием активирующего действия на систему гемостаза [7].

Цель работы состояла в оценке влияния препарата "Триаза" на систему гемостаза и реологические свойства крови.

МЕТОДЫ И МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовались следующие параметры гемостазиограммы:

1. сосудисто-тромбоцитарный гемостаз;
 - 1.1. количество тромбоцитов методом фазово-контрастной микроскопии;
 - 1.2. агрегация тромбоцитов с высокой концентрацией индуктора (АДФ 2 x 10-5 М) как тест визуальной экспресс-оценки изменения их функционального состояния (по Ч.С. Гусейнову, Т.А. Ремизовой, Г. Рахмаевой, 1971);
2. Состояние коагуляционного гемостаза исследовалось с помощью следующей серии тестов:
 - 2.1. 1-я фаза свертывания крови – активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ); кефалиновое (КВ) время (реагенты "Thrombosil", США, Ortho Diagnostic, и РТТ Automate, "Stago", Франция) [8-14];
 - 2.2. 2-я фаза свертывания крови: протромбиновый (ПТИ) индекс (реагент "Orthobrain", Ortho Diagnostic, США) [21-24];
 - 2.3. 3-я фаза свертывания крови: определение концентрации фибриногена (реагент "Fibrinomat", Ortho Diagnostic, США) с помощью модификации метода Clauss, позволяющего по тесту тромбинового времени в разведении определить содержание функционально активного (свертываемого) фибриногена; тромбиновое время (ТВ); концентрация патологических антикоагулянтов - растворимых комплексов мономеров фибрина (РКМФ) количественным седиментационным методом в капилляре (по Иванову Е.П. и соавт., 1980) при модификации следующих тестов: β -нафтолового (H.Commine, A.Lyons, 1948); этанолового (H.Godal et al., 1971) и протамин-сульфатного (Z.Latallo, 1971) [21-22];
 - 2.4. Посткоагуляционная фаза свертывания крови: ретракция кровяного сгустка [27-30];
 - 2.5. Фибринолитический потенциал: исследован с помощью следующих методов: тест спонтанного фибринолиза (Иванов Е.П., 1977, 1982), хагеман- (по Архипову А.Г., Еремину Е.Г., 1985) и эуглобулин-зависимый (Kowalsky et al., 1959) фибринолиз [31-33];
 - 2.6. С целью изучения возможных механизмов активации коагуляционного каскада проведено дополнительное исследование активности его отдельных факторов: II, V, VIII и X с помощью одностадийного теста парциального тромбопластинового времени (реактивы фирмы "Stago", Франция) [21].
 - 2.7. Для исследования степени выраженности эндогенной интоксикации, ишемии, тканевого повреждения, активации системы ограниченного протеолиза и оценки их влияния на состояние системы гемостаза [1-7, 15-24] у обследованных пациентов проводилось исследование содержания в плазме крови веществ со средней молекулярной массой ("средних молекул") кислотнo-основным методом с последующим спектрофотометрическим анализом.
3. Реологические свойства образцов крови (при стандартизированном гематокрите) исследованы на ротационном вискозиметре АКР-2 (МП "Комед", Москва) в широком диапазоне скоростей сдвига (300, 200, 100, 75, 50, 20, 10 с⁻¹) с оценкой деформируемости и агрегации эритроцитов. Значения вязкости при высоких уровнях скоростей сдвига (300-100с⁻¹) характеризуют кровоток по артериям крупного калибра, при средних уровнях (100-50 с⁻¹) – кровоток по сосудам резистивного типа, при низких значениях скоростей сдвига (20 и ниже) – характер кровотока по микроциркуляторному руслу [16-18].

Достоверность различий выборок устанавливались с помощью критерия t Стьюдента (критерий различий средних величин для связанных и независимых выборок с нормальным распределением).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика сосудисто-тромбоцитарного гемостаза. Количество тромбоцитов при инкубации крови с препаратом "Триаза", находилось в пределах нормы. Отмечены незначимые (в пределах статистической ошибки) колебания их количества.

Исследование первой фазы свертывания. Оценка внутренних факторов свертывания проводится при определении АЧТВ (активированное частичное тромбопластиновое время), которое, кроме того, позволяет охарактеризовать и факторы общего пути (рис. 1).

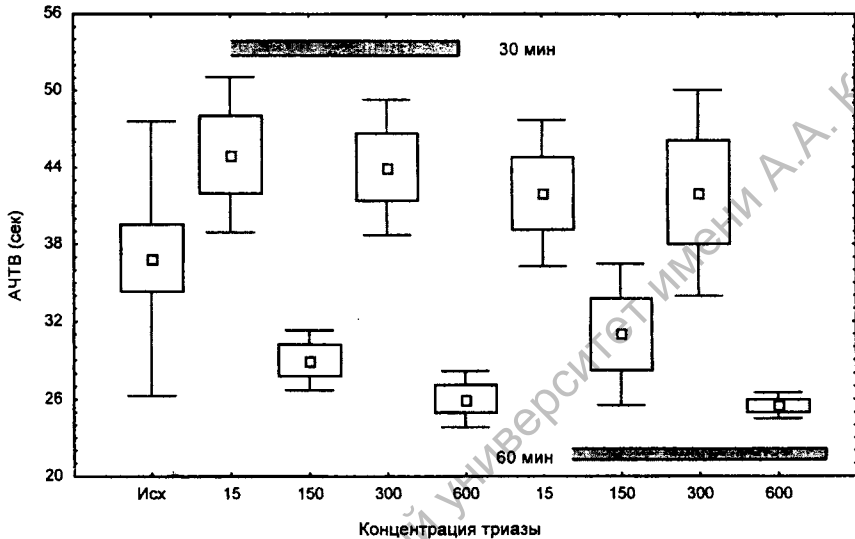


Рис 1. Активированное частичное тромбопластиновое время при введении Триазы

При введении препарата "Триаза" в концентрациях 15 и 300 Ед/мл отмечалось увеличение времени АЧТВ от 5 до 18%, что говорит об угнетении первой фазы свертывания. Однако при концентрации 150 и 600 Ед/мл происходит активация механизма свертывания (укорочение времени АЧТВ от 23 до 35%).

Для характеристики **второй фазы коагуляционного гемостаза** (тромбинообразование) используют протромбиновое время, которое позволяет оценить внешний путь коагуляции и факторы общего пути. Но удобнее пользоваться протромбиновым индексом для достижения более точного контроля и для обеспечения сравнимости межлабораторных данных. В данном случае наблюдается обратная зависимость, так как значение индекса обратно пропорционально значению протромбинового времени.

При инкубации крови с фибринолитиком "Триаза" в концентрации 15 и 300 Ед/мл протромбиновый индекс уменьшается до 6%, следовательно протромбиновое время удлиняется, что говорит о незначительном угнетении внешнего пути коагуляции. При концентрациях препарата 150 и 600 Ед/мл происходит обратное явление – протромбиновое время укорачивается, индекс увеличивается на 4% активизируя коагуляционные свойства крови.

Исследование третьей фазы свертывания (фибринообразование) показало снижение концентрации фибриногена (с 4 до 23%), что можно объяснить разделением фибриногена на фрагменты с помощью плазмينا активированного "Триазой".

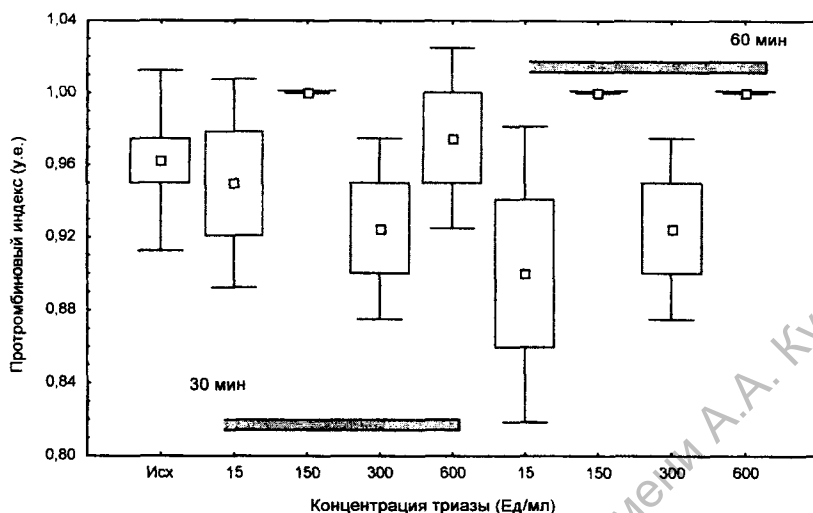


Рис 2. Протромбиновый индекс при введении Триазы

Следующим показателем, характеризующим третью фазу свертывания, являются РКМФ (растворимые комплексы мономеров фибрина). Их количество определяется тремя способами: β -нафтоловая, этаноловая и протамин-сульфатная проба. Результаты β -нафтоловой пробы неоднозначны при разных концентрациях: при 15 и 300 Ед/мл происходит снижение количества РКМФ от 11 до 26%, при концентрации 150 и 600 Ед/мл – обратное явление – увеличение на 15%.

Показания этаноловой пробы свидетельствуют об уменьшении РКМФ, так как количественные показатели снижаются до 25%. Однако данные протамин-сульфатной пробы указывают на снижение РКМФ от 7 до 36% при всех концентрациях "Триазы". Таким образом, в результате введения препарата происходит

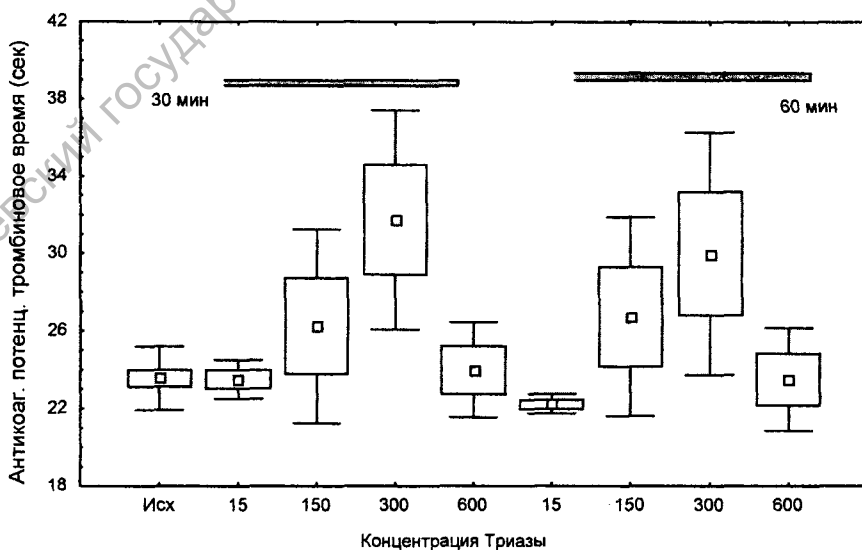


Рис 3. Тромбиновое время при введении Триазы

снижении количества РКМФ, что косвенно подтверждается уменьшением вязкости крови при реологических исследованиях.

Последним показателем третьей фазы является тромбиновое время (рис. 3). При концентрациях 15 и 600 Ед/мл оно стабильно. Однако при концентрации 150 и 300 Ед/мл наблюдается тенденция к его увеличению, особенно при концентрации 300 Ед/мл увеличение на 27-35%. При этом параметры находятся в пределах нормальных величин. Можно выделить наиболее приемлемые дозы препарата, эффект которых на гемостаз практически не выражен, эти дозы (15 и 300 Ед/мл), кроме того, обладают тромболитическим эффектом.

Исследование четвертой фазы (посткоагуляционной). Гемостатические свойства сгустка характеризуют фибриназа и гематокрит. Изменения фибриназы малозначительны и лишь в концентрации 300 Ед/мл отмечен небольшой фибринолитический эффект, так как происходит ее снижение на 7-15%.

Показания гематокрита при введении препарата снижаются, что согласуется со снижением вязкости крови обусловленной снижением количества эритроцитов. Таким образом, четвертая фаза практически стабильна, из всех концентраций можно выделить 300 Ед/мл, при которой происходит небольшое снижение фибриназы, не превышающее нормы.

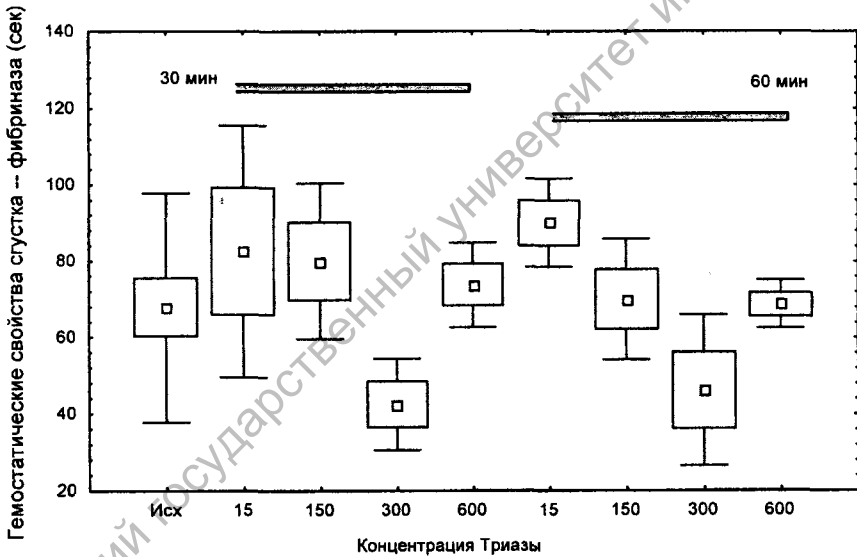


Рис 4. Концентрация фибриназы при введении Триазы

Исследование фибринолитического потенциала. При проведении зуглобулинового фибринолиза, при концентрации препарата 300 Ед/мл произошло явное укорочение зуглобулинового фибринолиза на 28-36%.

Хагеман-зависимый фибринолиз изменяется мало, но в концентрации 600 Ед/мл происходит его увеличение (до 70%), превышающее норму. Время зуглобулинового фибринолиза укорачивается более выражено, так как считается, что зуглобулиновая фракция практически лишена ингибиторов фибринолиза.

Таким образом, при введении препарата в самой активной концентрации (300 Ед/мл) происходит увеличение АЧТВ, снижение величины протромбинового индекса, удлинения тромбинового времени при снижении концентрации РКМФ. Такая картина может быть расценена как снижение уровня гиперкоагуляционного

состояния. Более того отмечается усиление фибринолитического потенциала по тесту эуглобулин-зависимого фибринолиза. В целом динамика гемостазиологической картины является положительной, так как не сопровождается смещением и нарушением равновесия.

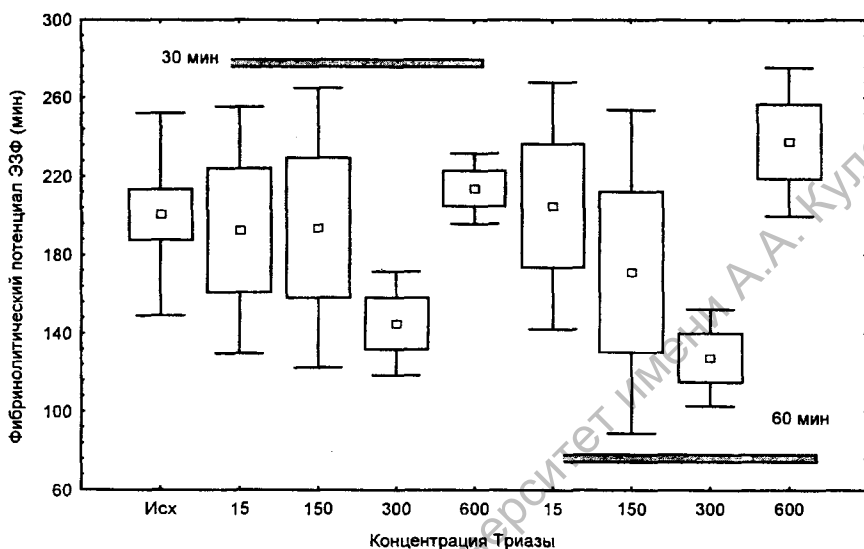


Рис 5. Эуглобулин-зависимый фибринолиз при введении Триазы

Исследования реологических свойств крови. Индекс агрегации тромбоцитов при введении препарата в концентрации 300 Ед/мг уменьшается на 9%, что говорит о снижении способности тромбоцитов к агрегации, что можно объяснить угнетением адгезионных свойств тромбоцитов. Таким образом, после воздействия препарата "Триаза" отмечается небольшое угнетение чувствительности тромбоцитов к малым концентрациям агрегационных индукторов, а также снижение степени и скорости агрегации, что является причиной некоторого удлинения времени агрегации. При этом следующая за адгезией фаза секреции содержимого тромбоцитарных гранул также указывается растянутой во времени. В остальных концентрациях индекс агрегации стабилен.

Индекс деформируемости эритроцитов при той же концентрации 300 Ед/мг увеличивается на 6%, что говорит о небольшой способности эритроцитов деформироваться. Во всех остальных концентрациях происходит снижение индекса деформируемости, что свидетельствует об увеличении способности эритроцитов к деформации. Вероятно, это является следствием мембранотропных эффектов, изменяющих структурно-функциональные параметры эритроцитов.

Вязкость крови исследовалась в широком диапазоне скоростей сдвига (300, 200, 100, 75, 50, 20, 10 обратных секунд). Значения вязкости при высоких уровнях скоростей сдвига (300-100) характеризуют кровоток по артериям крупного калибра, при средних уровнях (100-50) кровотока по сосудам резистивного типа, при низких значениях (20 и ниже) характер кровотока по микроциркуляторному руслу. Образцы крови характеризуются снижением вязкости крови во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига, что нашло отражение в характере реологической кривой.

Привлекает внимание не только динамика вискозиметрических параметров, но также и характер реологической кривой. Снижение вязкости крови во всем диапазоне скоростей сдвига приводит к тому, что кривая становится более уплотненной. Переход от высоких скоростей к средним приводит к формированию реологического плато. Высота этого плато есть не что иное, как характеристика суспензионной устойчивости крови. Понижение реологического плато, отмечаемое при исследовании, является показателем низкой суспензионной устойчивости крови, что обусловлено снижением концентрации коллоидов плазмы, которое расценивается как результат пониженного уровня фибриногена и его паракоагуляционных дериватов. Это продукты деградации фибриногена, фибрина и РКМФ. Кроме того, снижение вязкости крови косвенно обусловлено снижением гематокрита.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения исследования установлено, что инкубация цельной крови с тромболитиком "Триаза" приводит к угнетению адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов, что может быть обусловлено структурно-функциональной модификацией кровяных пластинок. Принимая во внимание значение состояния ионных каналов в адгезивной и агрегационной функции тромбоцитов, представляется вероятным изменение их электрохимического градиента.

При исследовании первой и второй фаз свертывания крови не отмечено как гипер-, так и гипокоагуляционных сдвигов. Поскольку новый тромболитик предполагает фибринолитическую направленность, то в нашей работе удалось установить ту концентрацию (300 Ед/мл), которая будет иметь наибольшую фармакологическую значимость.

Третья фаза свертывания крови при инкубации последней с тромболитиком характеризуется снижением концентрации фибриногена, что можно объяснить разделением фибриногена на фрагменты с помощью плазмينا активированного препаратом "Триаза". Отмечается также умеренное снижение количества РКМФ под действием препарата, что подтверждается снижением вязкости крови и суспензионной устойчивости при реологических исследованиях.

Четвертая (посткоагуляционная) фаза гемостаза при инкубации крови с тромболитиком "Триаза" находится в пределах нормы. Небольшие (в пределах статистической ошибки) изменения наблюдаются лишь в концентрации 300 Ед/мл. Обнаружены статистически достоверные изменения фибринолитического потенциала (укорочение времени эуглобулинового фибринолиза). В то же время, Хагеман-зависимый фибринолиз изменяется мало, что говорит об отсутствии контактной активации фибринолиза.

Влияние препарата может быть расценено как снижение уровня гиперкоагуляционного состояния по тестам, затрагивающим практически все фазы свертывания крови, а снижение уровня РКМФ указывает на уменьшение выраженности тромбинемии. Более того, отмечается усиление фибринолитического потенциала.

Проведенное исследование подтвердили наше предположение о том, что под влиянием препарата "Триаза" происходит изменение реологических свойств крови. Образцы крови характеризуются снижением вязкости во всем исследуемом диапазоне скоростей сдвига, что приводит к значительным изменениям реологической кривой (зависимость "скорость сдвига – вязкость").

ЛИТЕРАТУРА

1. **Андреевко Г.В.** Значение изменений гемостаза и фибринолиза в тромбообразовании при сердечно-сосудистых заболеваниях // Кардиология. – 1981. – № 8. – С. 120-125.
2. **Балуда В.П.** Радиационная гемостазиология, гемостатический гомеостаз при общем и местном облучении // Мед. радиол. – 1982. – Т. 27. – № 9. – С. 25-30.
3. **Баркаган З.С.** Очерки антитромботической фармакопрофилактики и терапии. – М.: “Ньюдиамед”, 2000. – 148 с.
4. **Берлов Г.А., Чешко Н.Н.** Малые дозы ионизирующей радиации: Противоречивость понятий и оценки их влияния (обзор литературы) // Медико-биол. асп. аварии на ЧАЭС. – 1998. – № 3.
5. Болезни системы кровообращения в районах, подвергшихся радиоактивному загрязнению / **Гайдук В.Н., Русецкая В.Г., Лазюк Д.Г.** и др. // Актуальные вопросы кардиологии: Тез. докл. 3-го республ. съезда кардиологов Беларуси совм. с Асоц. кардиологов СНГ. – Минск, 1994. – С. 8.
6. **Борец В.М., Гапонова В.П.** Изменения метаболизма у больных ишемической болезнью сердца после аварии на Чернобыльской АЭС // Здоровоохр. Беларуси. – 1993. – № 12. – С. 37-42.
7. **Бородкин П.А.** Отдаленные последствия хронического облучения человека: гематологическое исследование // Мед. радиол. и радиац. безоп. – 1996. – Т. 41. – № 1. – С. 28-30.
8. **Волошин П.В., Крыженко Т.В., Мищенко Т.С.** и др. Течение цереброваскулярных нарушений у лиц, подвергшихся радиационному воздействию в 1986 г. // Радиацион. поражения и перспективы развития средств индивидуальной защиты от ионизирующего излучения. – М., 1992. – С. 67-70.
9. **Гофман Д.** Чернобыльская авария: радиационные последствия для настоящих и будущего поколений / Пер. с англ. – Минск: Выш. шк., 1994. – 574 с.
10. **Гусев Е.И.** Ишемическая болезнь головного мозга // Вестн. РАМН. – 1993. – № 7. – С. 34-39.
11. **Давыдов Б.И., Жиляев Е.Г., Ушаков И.Б.** и др. Малые дозы ионизирующего излучения: сложность проблемы, неопределенность отдаленных последствий // Воен.-мед. журн. – 1994. – № 4. – С. 20-24.
12. **Денисевич Н.К., Малахова И.В., Поляков С.М.** Инвалидность вследствие болезни системы кровообращения населения Беларуси, пострадавшего от катастрофы на Чернобыльской АЭС // Медико-биол. аспекты аварии на ЧАЭС. – 2001. – № 2. – С. 3-8.
13. **Доценко В.Н.** Структура причин смерти после значительного профессионального хронического гамма облучения // Мед. радиол. – 1991. – № 8. – С. 38-40.
14. **Затейщиков Д.А., Аверков О.В., Деев А.Д.** и др. Прогностическое значение факторов системы гемостаза у больных ишемической болезнью сердца // Кардиология. – 1993. – № 3. – С. 9-11.
15. **Зербино Д.Д.** Экологическая патология и экологическая нозология: новое направление в медицине // Арх. патол. – 1996. – Т. 58. – № 3. – С. 10-15.
16. **Иванов Е.П.** Руководство по гемостазиологии. – Минск: Беларусь, 1991. – 302 с.
17. Инструментальные методы исследования в кардиологии (Руководство) / Под ред. **Сидоренко Г.И.** – Минск, 1994. – 272 с.
18. Клиническая биохимия ишемической болезни сердца / Под ред. **Блужаса И.Н., Грибаускаса П.С.** – Каунас, 1988. – 192 с.
19. **Когал Дж.** Биологические эффекты радиации; Пер. с англ. – М.: Энергоатомиздат, 1986. – 184 с.
20. **Козинец Г.И.** Экология и кроветворение // Гематол. и трансфузиол. – 1990. – № 12. – С. 7-11.
21. **Колб В.Г., Камышников В.С.** Справочник по клинической химии. – Мн.: Беларус, 1982. – 368 с.
22. Лабораторные методы исследования системы гемостаза / Под ред. **Е.Д. Гольдберга.** – Изд-во Томск. ун-та, 1980. – 314 с.
23. Медико-биологические аспекты аварии на Чернобыльской АЭС: Информац. бюлл. / Под ред. **В.Е.Кратенка и Е.В.Серебряковой.** – Минск, 1994. – Вып. 1. – 141 с.

24. **Мосолов В.В.** Протеолитические ферменты. – М.: Медицина, 1971. – 404 с.
25. **Николайчик В.В., Курковский В.В., Моин В.М.** и др. "Средние молекулы" – образования и способы получения и определения // Лаб. дело. – 1989. – № 8. – С. 31-33.
26. Радиация и гемостаз / Под ред. **В.П. Балуды.** – М.: Энергоатомиздат, 1986. – 160 с.
27. **Фермилен Ж., Ферстрате М.** Гемостаз; Пер. с франц. – М.: Медицина, 1984. – 192 с.
28. Фибринолиз: современные фундаментальные и клинические концепции; Пер. с англ. / Под ред. **П.Дж. Гаффни, С. Балкув-Улютина.** – М.: Медицина, 1982. – 240 с.
29. **Akkerman J.V.N., Nieuvenhuis H.K., Sixma J.J.** Thrombosis and Atherosclerosis. – Germany: Boehringer Ingelheim GmbH, 1986. – Vol. I-IV. – 516 p.
30. **Coller B.C., Anderson K., Weisman H.F.** New antiplatelet agents: platelet GP IIb/IIIa antagonists // Thromb. Haemost.- 1995.- V. 74.- № 1.- P. 302 - 308.
31. **Fareed J., Hoppensteadt D.A., Leya F.** et al. Useful laboratory tests for studying thrombogenesis in acute cardiac syndromes // Clin. Chem. – 1998. – V. 44. – N 8(B). – P. 1845-1853.
32. Role of Lipoprotein (a) in Fibrinolysis and Atherogenesis. – Netherland: Casper Bastian Leerinx, 1994. – 122 p.
33. **Thompson G.R.** A Handbook of hyperlipidemia. – London: Current Science Ltd, 1989. – 255 p.
34. **Tietz N.W.** Clinical Guide to Laboratory Tests. - Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sidney, Tokyo: W.B. Saunders Company, 1983. – 480 p.
35. **Tripodi A., Mannucci P.M.** Markers of Activated Coagulation and their Usefulness in the Clinical Laboratory // Clin. Chem. – 1996. – V. 42. – № 5. – P. 664-669.
36. **Verstraete M., Vermeylen J.** Thrombosis. - Belgium: University of Leuven, 1986. – 333 p.

SUMMARY

Subject of inquiry: a blood practically able-bodied 16 donors - volunteers.

The purpose of work: to estimate agency of a specimen "Triasa" on system of a hemostasis and rheologic properties of a blood.

As a result of the lead work for the first time it fixed, that the thrombolytic "Triasa" oppresses functional (the adhesion and an aggregation) properties of platelet, results in down stroke of concentration of fibrinogen, accompanying with decrease of quantity of solvable complexes of monomers of a fibrin. At application of a specimen "Triasa" shortening a time of a fibrinolysis that testifies to intensifying of fibrinolytic potential is revealed. Taking into account that the time of the fibrinolysis practically did not change, it is possible to speak about absence of contact activation during an incubation of a blood with a thrombolytic "Triasa". Application of a specimen in the most active (in the attitude of agency on a fibrinolysis) concentrations - 300 Unit/mg is accompanied by augmentation of the activated particulate thromboplastin time and a thrombin time, decrease of magnitude of a prothrombin ratio and concentration of solvable complexes of monomers of a fibrin. Samples of a blood under agency of a specimen "Triasa" are characterized by down stroke of viscosity in all researched velocity band of alteration; down stroke of an index of a deformability of erythrocytes is marked.