

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО БашГМУ Минздрава России)

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
ортопедической стоматологии
БашГМУ Минздрава России,
доктор медицинских наук,
профессор
_____ С.В. Аверьянов
«__» _____ 2024 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

ОЦЕНКА РАНОЗАЖИВЛЯЮЩЕЙ, АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ И
ВЛИЯНИЯ НА КОМПОНЕНТЫ СИСТЕМЫ ГЕМОСТАЗА ДЕЙСТВУЮЩИХ
КОМПОНЕНТОВ ГЕЛЯ «ФИТОДЕНТ® ПЕРИОГЕЛЬ®»

Соруководитель НИР,
Зав. кафедрой ортопедической стоматологии,
профессор, д.м.н. _____ С.В. Аверьянов

Ассистент кафедры
ортопедической стоматологии _____ Д.Х. Ахметова
подпись, дата

Уфа
2024

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Соруководитель НИР,
Заведующий кафедрой
ортопедической стоматологии,
д.мед.наук, профессор _____ С.В. Аверьянов
подпись, дата

Ассистент кафедры
ортопедической стоматологии _____ Д.Х. Ахметова
подпись, дата

РЕФЕРАТ

Отчет 32 стр.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, ранозаживляющая активность, биодоступность, острая токсичность, система гемостаза

Цель работы – исследование биологической активности стоматологического геля Фитодент® Периогель® (Fitodent® Periogel®) (ООО Стоматологический магазин «РОМАШКА», производитель ООО «Фитолон-мед»).

1) **Объекты исследований** - I - Пихта, II - Осина, III - ДКС, IV – Хлорофилл, V - Стоматологический гель (FITODENT® PERIOGEL®, ООО «Фитолон-Мед», г. Санкт-Петербург); VI – Декспантенол (мазь д/наружн. прим. 5% «Бепантен»®), АО Байер, Россия)

Задачи исследования:

1. Исследование влияния на систему гемостаза в условиях *in vitro*.
2. Исследование антиоксидантных свойств в условиях *in vitro*.
3. Оценка ранозаживляющего эффекта стоматологического геля в условиях модели линейных ран на лабораторных мышах.
4. Определение биологической доступности стоматологического геля для лечения хейлитов.
5. Определение острой токсичности стоматологического геля.

СОДЕРЖАНИЕ

Оглавление

РЕФЕРАТ.....	3
СОДЕРЖАНИЕ.....	4
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	5
I. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	6
1. Объекты исследования.....	6
2. Методы исследования.....	11
2.1 Эксперименты в условиях <i>in vitro</i>	11
2.1.1 Влияние на агрегацию тромбоцитов.....	12
2.1.2 Влияние на коагуляционный компонент гемостаза.....	13
2.1.3 Влияние на активацию тромбоцитов.....	13
2.1.4 Антиагрегационная активность.....	13
2.1.5 Оксидативные свойства.....	14
2.1.6 Влияние на инициацию активных форм кислорода.....	14
2.1.7 Влияние на перекисное окисление липидов.....	14
2.1.8 Влияние соединений на генерацию активных форм кислорода фагоцитами.....	14
2.2 Исследования в условиях <i>in vivo</i> . Оценка ранозаживляющей активности.....	15
2.3 Определение острой токсичности стоматологического геля.....	19
2.4 Определение биологической доступности стоматологического геля.....	19
3. Статистическая обработка.....	20
4. Валидация методик.....	20
II. РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	21
1. Влияние на агрегацию тромбоцитов в условиях <i>in vitro</i>	21
2. Влияние на коагуляционный компонент гемостаза в условиях <i>in vitro</i>	21
3. Оценка активации тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии <i>in vitro</i>	22
4. Исследование оксидативных свойств в условиях <i>in vitro</i>	23
5. Оценка ранозаживляющего эффекта стоматологического геля в условиях модели линейных ран на лабораторных мышах.....	24
6. Определение биологической доступности стоматологического геля для лечения хейлитов.....	30
7. Определение острой токсичности стоматологического геля.....	30
Заключение.....	31
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	32

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ВВЕДЕНИЕ

Клинические рекомендации по лечению заболеваний слизистой оболочки рта, красной каймы губ включают в себя средства, обладающие антисептическими, ранозаживляющими, иммуномоделирующими, антиоксидантными и другими свойствами, которые не лишены вероятности развития побочных и нежелательных реакций, снижающих эффективность препарата. Все это предполагает разработку и развитие новых лечебно-профилактических средств, которые будут дополнительно к основным свойствам оказывать положительное влияние на местный иммунитет полости рта, а также влиять на микрофлору полости рта. Такими свойствами обладают лекарственные средства на основе компонентов растительного происхождения [1,2,3,4,5]

Фармакологический рынок выпускает большое множество препаратов, созданных синтетически, но, тем не менее, в настоящее время имеется тенденция к расширению ассортимента лекарственных средств растительного происхождения [2]. Такие фитопрепараты обладают множеством положительных свойств - высокая терапевтическая активность, обладают хорошими антибактериальными свойствами, возможность использовать длительно в схемах лечения, меньшее количество побочных эффектов, низкая токсическая нагрузка, что в целом определяет их преимущество над синтетическими аналогами [2,5]. Синтетические же лекарственные средства, обладающие антимикробными, противовоспалительными свойствами, имеют достаточно широкий перечень побочных эффектов, некоторые из которых являются наиболее серьезными [1,3]

Нарушения в системе гемостаза обуславливают широкую распространенность тромбозов различного происхождения, являются ключевым звеном патогенеза многих заболеваний и критических состояний [6,7,8,9,10,11,12]. Необходимость применения средств фармакологической коррекции системы гемостаза и степень их эффективности является фактом, доказанным результатами более 280 мета-анализов по вторичной и 6 испытаний по первичной профилактике тромбозов. На сегодняшний день существуют схемы по лечению и профилактики тромбоза различной локализации, основанные на результатах клинических исследований. Распространенность тромбозов является следствием общего старения населения, роста онкологических заболеваний, увеличения числа пациентов с избыточным весом и сахарным диабетом, увеличения числа пациентов, требующих длительного пребывания в стационаре или/и пациентов, требующих экстренных хирургических вмешательств [8, 11]. Принимая во внимание факт роста пациентов, принимающих антитромботическую терапию, становится очевидным необходимость оценки влияния на систему гемостаза инновационных стоматологических продуктов [6,7,8,9,10,11,12].

I. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Объекты исследования

В качестве объектов исследования использовали I – экстракт пихты, II – экстракт коры осины, III - дигидрокверцетин, IV – медное производное хлорофилла, V - стоматологический гель с хлорофиллом, корой осины и дигидрокверцетином (FITODENT® PERIOGEL®, ООО «Фитолон-Мед», г. Санкт-Петербург), VI – Декспантенол (мазь д/наружн. прим. 5% «Бепантен»®, АО Байер, Россия).

Состав геля с хлорофиллом, корой осины и дигидрокверцетином (на 100 г готового продукта):

- экстракт осиновой коры 0,06 (в пересчете на абс. сух. массу)
- натрий медь хлорофиллин 0,02
- экстракт пихты сибирской 0,07
- дигидрокверцетин 0,3
- натриевая соль метилпарабена 0,2
- ароматизатор 0,05
- ментол 0,01
- эвгенол 0,05
- сорбит 70%-ый водный раствор 70,0
- эмульгатор 2,75
- метилсалицилат 0,1
- гидроксиэтилцеллюлоза 1,0
- лимонная кислота 0,04
- аллантоин 0,2
- Д-пантенол 0,3
- альгинат натрия 0,35
- касторовое масло 2,5
- вода – сколько необходимо до получения общей массы 100 г.

Экспериментальные данные были получены с использованием следующих приборов, оборудования:



- 1) система вакуумного забора крови BD Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, США)
- 2) Центрифуга Mikro 200
- 3) Агрегометр “АТ-02” (НПФ "Медтех", Россия).



- 4) Турбидиметрический гемоагулометр Solar CGL 2110 (ЗАО "СОЛАР", Беларусь).
- 5) Проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, США),
- 6) Программное обеспечение «FACSDiva»



- 7) Хемилуминомер «ХЛМ-003» (Россия).
- 8) Программный комплекс «Image J» (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health)
- 9) Универсальная цифровая камера Zeiss Аxiосam 208 color
- 10) Прямой микроскоп ZEISS Аxiolab 5 для биологии
- 11) Автостейнер Epredia Autostainer 360
- 12) Аппарат для окрашивания препаратов Epredia Gemini AS



- 13) Морфометрическая программа ВидеоТест – мастер 4.0.
- 14) Гематологический анализатор Diatron ABACUS Junior EO
- 15) Станция заливки в парафин Epredia HistoStar
- 16) Гистологический процессор карусельного типа Leica TP1020



17) Ротационный микротом EpreDia HM 340E

Используемые расходные материалы включали:



1) Ацетилсалициловая кислота (Фармацевтическая фабрика Шандонг Ксинхуа Фармасьютикал Ко., ЛТД, Китай),

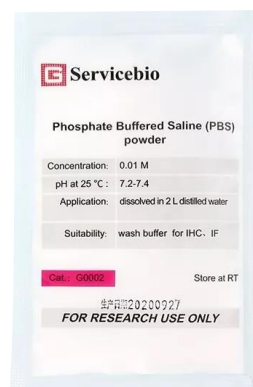


- 2) Гепарин натрия (р-р д/инъекц. 5000 МЕ/мл, ОАО «Синтез», Россия),
- 3) Этамзилат (р-р д/в/в и в/м введения 250 мг/2 мл, АО Биохимик, Россия),
- 4) Пентоксифиллин (р-р д/в/в введения 20 мг/ мл ОАО «Дальхимфарм», Россия),
- 5) Аскорбиновая кислота (Фармацевтическая фабрика Шандонг Ксинхуа

Фармасьютикал Ко., ЛТД, Китай),



- 6) Декспантенол (мазь д/наружн. прим. 5% «Бепантен»®), АО Байер, Россия)
- 7) Пробирки с ЭДТА (BD Vacutainer®), К2 EDTA 3,6 мг).
- 8) 3,8% раствор цитрата натрия



- 9) Аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл
- 10) Коллаген в концентрации 5 мг/мл
- 11) 0,15 М фосфатно-солевой буферный раствор (рН 7,0-7,5)
- 12) Мышиные моноклональные антитела CD62, меченые APC (алофикоцианином)
- 13) Антитела CD41a, меченые PE (фикоэритрином),
- 14) Антитела CD61, меченые FITC (флюоресцеинизотиоционатом)

15) люминол (5-амино-2,3-дегидро-4-фталазиндион)



16) Буфер: 2,72 г. KH_2PO_4 , 7,82 г. KCL , 1,5 г. цитрата натрия $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$ на 1 литр дистиллированной воды

17) 1 мл 50 мМ раствор сернокислого железа.



18) Куриный желток

19) Зимозан

20) 10% забуференный нейтральный формалин

Реактивы и остальные растворители имели степень чистоты ч.д.а. или х.ч.

2. Методы исследования

Вся экспериментальная работа выполнена на кафедре фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России в соответствии с рекомендациями "Руководства по доклиническому изучению новых фармакологических веществ" (Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. - М.: Гриф и К, 2012. - 944 с.).

2.1 Эксперименты в условиях *in vitro*

Эксперименты в условиях *in vitro* выполнены на крови здоровых доноров-мужчин в

возрасте 18-24 лет. Общее количество доноров составило 56 человек. Забор крови проводился из кубитальной вены с использованием систем вакуумного забора крови BD Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, США). В качестве стабилизатора венозной крови использовался 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1. Все тесты проводились на обогащенной и обедненной тромбоцитами плазмах. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугированием цитратной крови при 1000 об/мин в течение 10 минут, бестромбоцитарной плазмы - при 3000 об/мин в течение 20 минут. В работе использовалась центрифуга Mikro 200.



Рисунок - центрифуга Mikro 200.

2.1.1 Влияние на агрегацию тромбоцитов

Исследование влияния на агрегацию тромбоцитов проводили по методу Born (Born G.G.V.Nature (London).- 1962 .-V.194.) на агрегометре “АТ-02” (НПФ "Медтех", Россия). В качестве индукторов агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл и коллаген в концентрации 5 мг/мл производства “Технология-Стандарт” (Россия). Проводили оценку максимальной амплитуды агрегации, скорости агрегации, время достижения максимальной амплитуды и дезагрегацию в присутствии изучаемых соединений при агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ. При коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов оценивали латентный период, во время которого происходит активация фосфолипазы С (что приводит к образованию вторичных посредников, вследствие чего развивается секреция тромбоцитарных гранул и синтез тромбоксана А₂).



Рисунок - Агрегометр “АТ-02” (НПФ "Медтех", Россия) (указан стрелкой)

2.1.2 Влияние на коагуляционный компонент гемостаза

Исследование влияния на коагуляционный компонент гемостаза проводили общепризнанными клоттинговыми тестами на турбидиметрическом гемокоагулометре Solar CGL 2110 (ЗАО "СОЛАР", Беларусь). Изучались показатели активированного парциального тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового времени (ПВ) и концентрации фибриногена по А.Clauss. Исследование полимеров проводили в 1,0%, 0,1%, 0,01% и 0,001% массовой концентрации. В работе использовались реактивы производства “Технология-Стандарт” (г. Барнаул, Россия).

2.1.3 Влияние на активацию тромбоцитов

В качестве маркера активации тромбоцитов измеряли экспрессию Р-селектина на поверхности тромбоцитов при действии исследуемых растворов полимеров. Для этого образцы богатой тромбоцитами плазмы разводили в 100 раз 0,15 М фосфатно-солевым буферном растворе (рН 7,0-7,5), вносили исследуемые растворы полимеров и инкубировали в течение 5 минут. После инкубации образцы богатой тромбоцитами плазмы окрашивали 20 мин при комнатной температуре мышинными моноклональными антителами CD62, мечеными APC (алофикоцианином), CD41a, мечеными PE (фикоэритрином), и CD61, мечеными FITC (флюоресцеинизотиоционатом), согласно рекомендациям производителя (Becton Dickinson, США). Цитофлюориметрический анализ проводили на приборе BD FACSCanto II (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, США), используя программное обеспечение «FACSDiva». Параметры настройки прибора были одинаковы для всех измерений. Для каждой пробы собирали не менее 10000 событий. «Тромбоцитарное окно» выделяли по параметрам прямого (FCS) и малоугольного (SSC) светорассеяния в логарифмической шкале координат. Оценивали количество позитивных клеток (%).

2.1.4 Антиагрегационная активность

Для оценки фармакологической активности исследуемые настои вносили в плазму из расчета 5% от объема реакционной смеси. Антиагрегационная активность ацетилсалициловой

кислоты представлена для концентрации 1×10^{-3} М/л, антикоагуляционная активность гепарина натрия - для концентрации 5×10^{-4} г/мл.

2.1.5 Оксидативные свойства

Оксидативные свойства предоставленных образцов оценивали в простых модельных системах, имитирующих наиболее распространенные реакции свободно-радикального окисления в организме и в средах, в которых инициировалось образование активных форм кислорода и реакции перекисного окисления липидов. Регистрацию свечения проводили на хемиллюминомере «ХЛМ-003» (Россия). Антиоксидантная активность определялась по степени угнетения хемиллюминесценции и пересчитывалась в процентах от контроля. В качестве препарата сравнения была выбрана аскорбиновая кислота. Для выявления активных форм кислорода использовали люминол (5-амино-2,3-дегидро-4-фталазиндион), который окисляется и образует электронно-возбужденные карбонильные хромофоры с высоким квантовым выходом, в результате чего резко повышается интенсивность свечения, связанного с образованием активных форм кислорода. Хемиллюминесценцию регистрировали в течение 5 минут.

2.1.6 Влияние на инициацию активных форм кислорода

Для инициации активных форм кислорода (модель I) использовали 20 мл фосфатного буфера с добавлением цитрата и люминола. Состав буфера: 2,72 г. KH_2PO_4 , 7,82 г. KCl , 1,5 г. цитрата натрия $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 5,5\text{H}_2\text{O}$ на 1 литр дистиллированной воды. Величину pH полученного раствора доводили до 7,45 ед. титрованием насыщенным раствором КОН и добавляли 0,2 мл маточного раствора люминола (10^{-5} М). Образование АФК инициировали введением 1 мл 50 мМ раствора сернокислого железа.

2.1.7 Влияние на перекисное окисление липидов

Для оценки действия соединений на перекисное окисление липидов (модель II) из куриного желтка готовили липопротеиновые комплексы. Желток смешивали с фосфатным буфером в соотношении 1:5, затем гомогенизировали. Хемиллюминесценцию инициировали добавлением 1 мл 50 мМ раствора сернокислого железа, запускавшего процесс окисления ненасыщенных жирных кислот, входящих в состав липидов. По интенсивности развивающегося свечения судили о процессах перекисного окисления липидов.

2.1.8 Влияние соединений на генерацию активных форм кислорода фагоцитами

Для исследования влияния соединений на генерацию активных форм кислорода фагоцитами (модель III) использовали цельную гепаринизированную кровь (из расчета 50 ЕД гепарина на 1 мл крови) здоровых добровольцев. Соединения вносили в 0,1 мл крови в объеме 0,01 мл, инкубировали в течение 5 минут. Интенсивность генерации фагоцитами активных форм кислорода определяли с помощью регистрации уровня люминолзависимой

хемилюминесценции. Для этого добавляли 2,0 мл физиологического раствора с люминолом в концентрации 10-5 М и определяли хемилюминесценцию в течение 5 минут. «Кислородный взрыв» в фагоцитах стимулировали добавлением к 0,1 мл крови 0,01 мл 1% взвеси зимозана с последующим инкубированием в течение 5 минут при 37°C. Появление активных форм кислорода фиксировалось через 1-2 минуты после воздействия чужеродного материала на мембраны фагоцитов и достигало своего максимума за 5-6 минут, длилось в течение 20-30 минут. Данный процесс сопровождался свечением, интенсивность которого резко увеличивается в присутствии люминола. Спонтанное свечение представляет собой собственное излучение фагоцитирующих клеток. Крутизна нарастания свечения отображает скорость активации кислородозависимого метаболизма фагоцитов. Величина пика хемилюминесценции зависит от фагоцитарной активности клеток. Опсонизирующая способность крови определяется временем достижения максимума свечения и ее амплитудой. Показатели хемилюминесценции зависят от количества фагоцитирующих клеток, их активности, характера чужеродного материала, механизма его взаимодействия с фагоцитом, наличия в среде инкубации опсонизирующего фактора, состава среды, ее температуры и т.д. Светосумма свечения за время измерения зависит от потребления кислорода и является интегральным показателем генерации активных форм кислорода.

2.2 Исследования в условиях *in vivo*. Оценка ранозаживляющей активности

Исследование в условиях *in vivo* проведено на 100 белых мышах самцах в возрасте 2 месяцев со средней массой тела 20-21 г. Животные прошли карантин в течение 14 дней в условиях отдельного бокса вивария ЦНИЛ БГМУ. Температурный режим помещения вивария поддерживался от +18 до +22 С. Освещение вивария совмещенное (естественное и люминесцентное). Еженедельно в помещении вивария проводилась 20 мин. бактерицидная обработка стационарным настенным бактерицидным облучателем. Животные имели круглосуточный свободный доступ к поилкам, получали набор натуральных продуктов (овощи, зерно) и стандартную диету, представленную в виде экструдированного гранулированного корма для содержания лабораторных животных (мышей, крыс, хомяков) соответствующий Декларации о соответствии № РОСС RU. ПР 98, Д 00497 до 07.02.2016 г. и содержащий в своем составе пшеницу, ячмень, шрот соевый, муку рыбную, дрожжи, отруби, а также витамины и минеральные вещества, витаминно-минеральный комплекс, растительный жир, антиоксидант.

Исследования выполнялись в соответствии правилами лабораторной практики (GLP), со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (М., 2012).

Моделирование линейных ран. В условиях общей анестезии после подготовки операционного поля (бритье и асептическая обработка) наносили по трафарету рану при помощи скальпеля и ножниц посередине выстриженного участка. Площадь единого трафарета составляла 210,5 мм². Далее все животные были разделены на 7 опытных групп (по 12 животных в каждой): контрольная группа (физиологический раствор) животных, I, II, III, IV, V, VI (декспантенол - 5,0 г, мазь). Группа интактных животных включена в эксперимент для проведения сравнительной оценки состояния и поведения этих особей и подопытных животных. Дефект обрабатывали один раз в день в один и тот же временной период (10-11 часов дня) на протяжении 14 суток. Наблюдение за опытными группами проводилось в течение 14 суток.

Площадь раны оценивали ежедневно с помощью программного комплекса «Image J» (Research Services Branch of the National Institute of Mental Health) для обработки изображений после фотографирования [Chen L, Mirza R, Kwon Y, DiPietro LA, Koh TJ. The murine excisional wound model: Contraction revisited. *Wound Repair Regen.* 2015;23(6):874–877. doi:10.1111/wrr.12338]. Используя эти измерения, рассчитали процент общего закрытия раны (% TWC) как: $[(WA0 - WAT) / WA0] \times 100\%$, где WA0 = площадь раны в день нанесения и WAT = площадь раны в соответствующий день.

Гематологические исследования и гистологическую оценку ран проводили в 1, 3, 7 и 10-е сутки эксперимента. Кровь у мышей получали путем декапитации в пробирки с ЭДТА (BD Vacutainer®, K2 EDTA 3,6 мг). Количество эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов определяли на гематологическом анализаторе Diatron ABACUS Junior EO в соответствии с инструкциями производителя.



Рисунок 1 - Гематологический анализатор Diatron ABACUS Junior EO

В эксперименте забор лоскута кожи с подлежащими тканями у животных

осуществлялся на 1, 3, 7, 10 и 14-е сутки.

Фрагменты кожного покрова с подлежащими тканями крыс фиксировались в 10% забуференном нейтральном формалине с последующей вырезкой материала. Срезы выполнялись с помощью ротационного микротома EpreDia HM 340E.

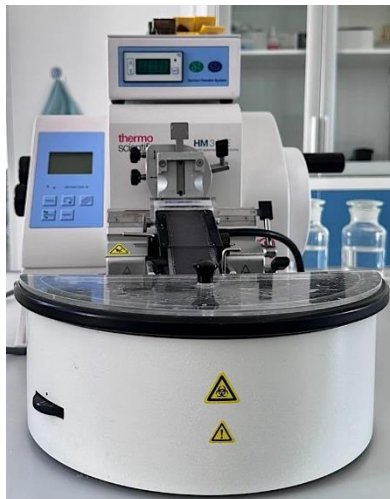


Рисунок 2 - Ротационный микротом EpreDia HM 340E

Далее выполняли стандартную гистологическую проводку по спиртам возрастающих концентраций с помощью гистологического процессора карусельного типа Leica TP1020, после чего препараты заключали в парафин с помощью станции заливки в парафин EpreDia HistoStar, затем изготавливали срезы толщиной 6–8 микрон и окрашиванием их гематоксилином-эозином с помощью аппарата для окрашивания препаратов EpreDia Gemini AS., Автостейнер EpreDia Autostainer 360.

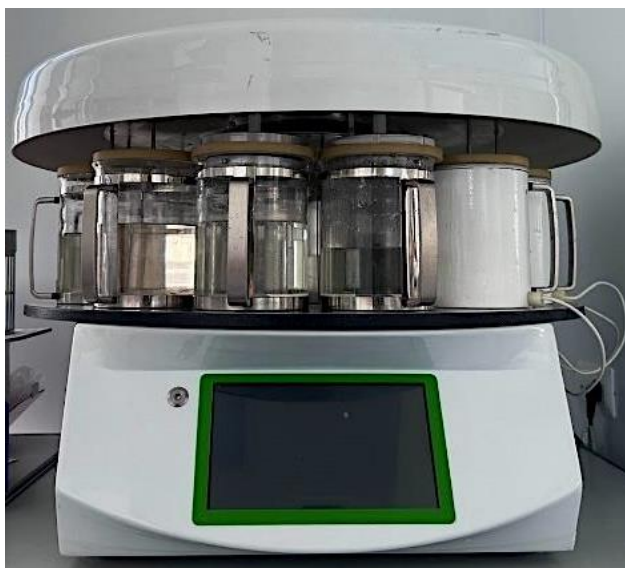


Рисунок 3 - Гистологический процессор карусельного типа Leica TP1020



Рисунок 4 - Станция заливки в парафин EpreDia HistoStar



Рисунок 5 – Аппарат для окрашивания препаратов EpreDia Gemini AS.

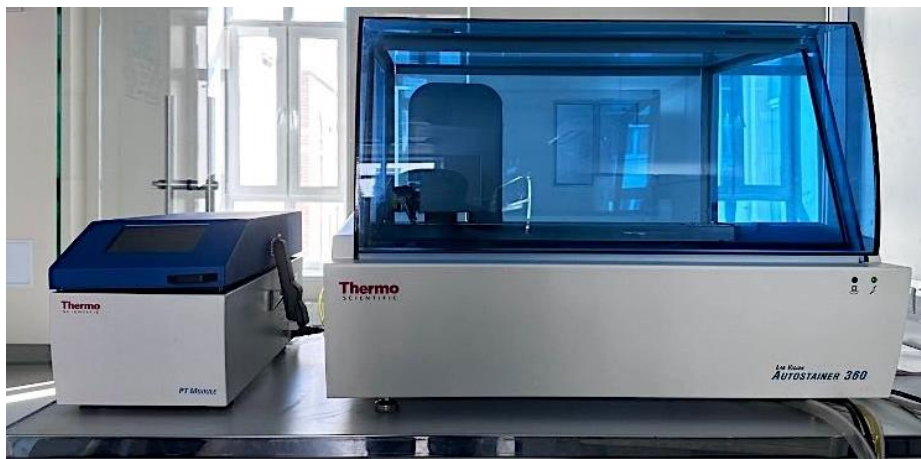
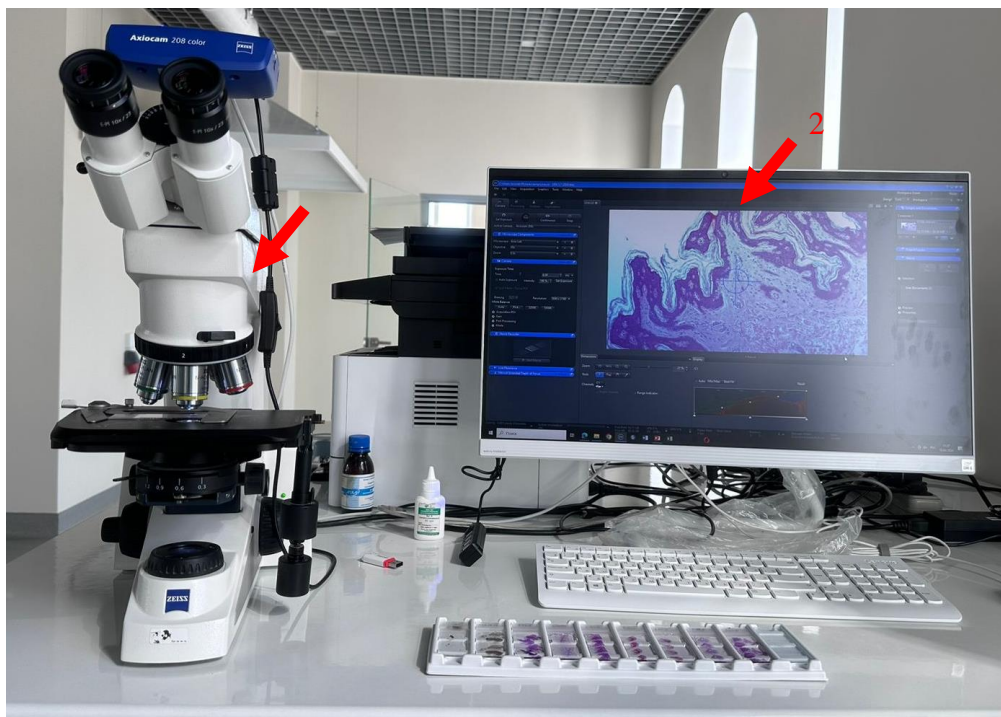


Рисунок 6 - Автостейнер EpreDia Autostainer 360



Препараты изучались под малым (*100) увеличением с помощью прямого микроскопа ZEISS Axiolab 5 для биологии с универсальной цифровой камерой Zeiss AxioCam 208 color и морфометрической программой ВидеоТест – мастер 4.0.

Рисунок 7 - Универсальная цифровая камера Zeiss AxioCam 208 color (1) и прямой микроскоп ZEISS Axiolab 5 для биологии (2).

2.3 Определение острой токсичности стоматологического геля

Острая токсичность стоматологического геля изучалась на 45 белых мышах обоего пола от 18,0 – 20,0 при введении внутрь в дозах 500, 1000, 1500, 2000, 2500 мг/кг в пересчете на сухой вес сырья. Сырье вводили в виде 10% водного раствора. Наблюдение вели в течение 14 дней.

2.4 Определение биологической доступности стоматологического геля

Определение относительной биодоступности исследуемого геля для определения влияния вспомогательных веществ на скорость высвобождения биологически активных веществ проводили *in vitro* методом диффузии через полупроницаемую мембрану по Кривчинскому. В качестве исследуемых образцов были взяты пять примеров исследуемого геля с различной концентрацией вспомогательных веществ (1-5). В качестве мембраны использовали диализную пленку марки «Купрофан» по свойствам и структуре близкой к натуральным мембранам с размером пор 45 мкм. На внутреннюю поверхность мембраны равномерным слоем наносили навеску исследуемого образца геля 1,0 г, которую прикрепляли к основанию диализной трубки. Диализную трубку опускали в химический стакан с облигатным раствором и погружали на глубину не более 3 мм. В качестве облигатного раствора использовали буферный раствор с pH 6,5, имитирующий среду в полости рта. Процесс диализа проводился при температуре $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ (на водяной бане с поддерживающей

температурой). Отбор проб диализата 2 мл осуществлялся через каждые 5 мин с немедленным возвращением в диализат взятого объёма растворителя. В качестве высвобождающейся группы биологически активных веществ исследовали содержание флавоноидов. Содержание флавоноидов определяли согласно патенту СССР № 1507394 «Способ количественного определения флавоноидов в растительном сырье» (В.В. Беликов, Н.Т. Колесник. 1989).

3. Статистическая обработка

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. Выявлено, что вид распределения полученных данных отличается от нормального, поэтому при дальнейшей работе использовались непараметрические методы. Данные представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса (для независимых наблюдений) и Фридмана (для повторных наблюдений). Критический уровень значимости p для статистических критериев принимали равным 0,05.

4. Валидация методик

Валидационная оценка методик количественного определения проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность (открываемость), прецизионность. Специфичность методики определялась по соответствию времен удерживания стандартных образцов и пиков, соответствующих этим стандартам на ГХ- хроматограмме испытуемого раствора. Определение линейности проводили на пяти уровнях концентраций растворов стандартных образцов. На основании полученных данных строили график в координатах «концентрация, мг/мл – высота пика» или «концентрация, мг/мл – площадь пика» и рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), значение коэффициента детерминации (r^2), стандартное отклонение с использованием программного обеспечения Microsoft Excel 2013. Правильность методики тестировали путем введения в навеску геля добавки стандартного образца в количестве от 80 % до 120 % от исходного содержания в пробе.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ ФИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Влияние на агрегацию тромбоцитов в условиях *in vitro*.

Показатели агрегации тромбоцитов под действием изученных растворов полимеров представлены в таблице 1.

Номер	Объект	Латентный период, % к контролю	Максимальная амплитуда, % к контролю	Скорость агрегации, % к контролю	Время достижения МА, % к контролю
1	I	-10,5 (8,7-12,3)*, #	-5,4 (3,2-7,5)*, #	+2,7 (1,3-2,9)*, #	-10,1 (9,2-12,1)*, #
2	II	+5,3 (3,7-6,4)*, #	-3,5 (2,9-5,2)#	+3,9 (2,7-4,4)#	+6,1 (4,7-7,3)*, #
3	III	+7,4 (6,2-9,7)*, #	-5,7 (6,4-10,2)*, #	-10,6 (9,4-11,5)*, #	-15,2 (14,1-17,1)*, #
4	IV	+3,2 (2,5-4,1)#	-7,3 (6,9-8,4)*, #	-12,1 (10,7-14,5)*	+12,1 (10,5-14,3)*
5	V	+4,2 (2,7-5,2)#	-3,8 (2,2-4,7)#	+3,2 (2,4-4,1)#	+6,8 (5,7-8,3)*
6	Ацетилсалициловая кислота	-2,1 (1,1-2,6)	-13,7 (10,8-16,4)*	-10,5 (7,6-12,3)*	+10,5 (8,7-13,4)*
7	Этамзилат	-6,3 (4,5-8,7)*, #	+3,6 (2,4-4,6)*, #	+ 8,5 (6,2-10,4)*, #	+21,9 (17,8-26,9)*, #

Таблица 1 – Влияние на показатели агрегации тромбоцитов в присутствии стоматологического геля и его компонентов, Me (0,25-0,75)

Примечание: * $p < 0,05$ - в сравнении с контролем; # $p < 0,05$ - в сравнении с ацетилсалициловой кислотой; $n=6$.

Растворы изученных образцов показали различной степени выраженности влияние на функциональную активность тромбоцитов. Однако выраженных изменений в агрегации тромбоцитов не регистрировалось.

2. Влияние на коагуляционный компонент гемостаза в условиях *in vitro*.

Результаты исследования влияния растворов образцов на коагуляционный компонент гемостаза представлены в таблице 2.

№	Объект	АПТВ, % к контролю	ПВ, % к контролю	Фибриноген, % к контролю
	I	+4,8 (4,1-7,6)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
	II	+7,2 (6,4-8,5)*	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
	III	+3,1 (2,9-4,3)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
	IV	+5,1 (4,6-6,9)*	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
	V	+2,7 (1,9-4,2)	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)
	Гепарин натрия	+20,3 (19,7-21,4)*	0,0 (0,0-0,0)	0,0 (0,0-0,0)

Таблица 2 – Показатели коагулограммы в присутствии стоматологического геля и его компонентов, Me (0,25-0,75)

Примечание: * $p < 0,05$ - уровень статистической значимости различий в сравнении с контролем; данные достоверны в сравнении с гепарином при $p < 0,05$; $n=6$.

Образцы показали различной степени выраженности влияние на плазменный компонент системы гемостаза, проявляющееся изменением показателя внутреннего пути свертывания крови – АПТВ. Стоматологический гель и его компоненты не влияли на показатель концентрации фибриногена и ПВ.

3. Оценка активации тромбоцитов методом проточной цитофлуориметрии *in vitro*.

№	Объект	CD62AДФ-	CD62AДФ+
	Контроль	1,3 (1,1-1,4)	17,8 (16,4-19,1)‡‡
	I	1,5 (1,2-1,6)*	1,2 (1,1-1,3)**; ‡
	II	1,3 (1,2-1,4)*	1,4 (1,2-1,4)**; ‡
	III	1,2 (1,1-1,3)*	1,2 (1,1-1,4)**; ‡
	IV	1,4 (1,3-1,4)*	1,3 (1,1-1,4)**; ‡
	V	1,3 (1,2-1,5)*	1,1 (1,1-1,5)**; ‡
	Ацетилсалициловая кислота	1,3 (1,1-1,4)*	16,4 (14,5-17,3)*; ‡‡
	Пентоксифиллин	1,2 (1,1-1,4)*	1,4 (1,2-1,5)**; ‡

Показатели экспрессии Р-селектина в присутствии изученных образцов представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Экспрессия CD62 тромбоцитов в присутствии стоматологического геля и его компонентов, Ме (0,25-0,75)

Примечание: Уровень статистической значимости различий признаков в сравнении с контролем: * - $p > 0,05$, ** - $p \leq 0,05$; уровень статистической значимости различий признаков групп после активации АДФ: ‡ - $p > 0,05$, ‡‡ - $p \leq 0,05$. CD62АДФ- - экспрессия CD62 до воздействия АДФ, CD62АДФ+ - экспрессия CD62 после воздействия АДФ.

По результатам проведенного исследования установлено, что предварительная инкубация растворов предоставленных образцов не приводит к активации тромбоцитов - значение экспрессии CD62 остаются на уровне контрольных значений.

Таким образом, на основании серии опытов 1-3 можно заключить об отсутствии влияния на систему гемостаза. Принимая во внимание рост пациентов с высокими рисками тромбозов, а также рост пациентов, принимающих препараты, направленных на коррекцию системы гемостаза, результаты свидетельствуют о потенциальной безопасности применения данного геля (и его компонентов), как у пациентов с высокими рисками кровотечений, так и у пациентов с риском тромбоза.

4. Исследование оксидативных свойств в условиях *in vitro*.

Результаты оценки оксидативных свойств растворов предоставленных образцов представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Показатели хемилюминесценции на модельных системах генерации активных форм кислорода (I), перекисного окисления липидов (II) и активности макрофагов крови (III) при добавлении исследуемых образцов, % к контролю, Ме (0,25-0,75)

№	Объект	Модель	Светосумма	Вспышка
	I	I	- 11,5 (10,3-13,5)*,a	- 14,5 (12,6-16,4)*,a
		II	- 9,7 (8,7-12,4)*,β	- 12,1 (10,3-13,2)*,β
		III	- 6,5 (5,4-8,3)*,γ	- 13,6 (12,4-14,7)*,γ
	II	I	- 14,8 (12,5-15,2)*,a	- 12,3 (10,7-14,4)*,a
		II	- 15,1 (13,9-18,3)*,β	- 10,8 (9,4-12,3)*,β
		III	- 16,7 (15,5-19,4)*,γ	- 11,5 (9,5-13,8)*,γ
	III	I	- 13,4 (12,6-15,8)*,a	- 12,7 (10,6-14,1)*,a
		II	- 11,7 (10,2-13,1)*,β	- 10,1 (9,8-12,7)*,β

		III	- 14,6 (12,1-15,3)*, γ	- 10,8 (9,7-13,5)*, γ
	IV	I	- 11,4 (10,3-14,2)*, α	- 14,5 (11,6-15,3)*, α
		II	- 16,3 (15,1-17,7)*, β	- 12,7 (10,4-14,9)*, β
		III	- 14,1 (11,6-16,5)*, γ	- 13,7 (11,9-14,6)*, γ
	V	I	- 16,4 (10,5-17,3)*, α	- 17,3 (16,8-19,6)*, α
		II	- 19,7 (17,2-20,5)*, β	- 19,5 (17,7-20,5)*, β
		III	- 21,4 (19,1-23,5)*, γ	- 21,4 (19,3-23,7)*, γ
Аскорбиновая кислота	I	- 84,5 (79,3-87,1)*	- 91,7 (82,3-95,2)*	
	II	- 78,1 (70,4-82,4)*	- 86,8 (80,3-92,1)*	
	III	+ 73,1 (66,7-75,2)*	+ 98,7 (94,8-100,3)*	

Примечание: в таблице значения представлены в виде разницы в % между значением опытной и контрольной групп; приведены медиана и межквартильный интервал по результатам 6 измерений; $p < 0,05$ - в сравнении с контролем для всех показателей; $^{\alpha}p < 0,05$, $^{\beta}p < 0,05$, $^{\gamma}p < 0,05$ – статистически значимые отличия от аскорбиновой кислоты для I, II и III модели соответственно.

Исследуемые образцы показали различной степени выраженности антиоксидантную активность на моделях генерации активных форм кислорода, перекисного окисления липидов и активности макрофагов крови.

5. Оценка ранозаживляющего эффекта стоматологического геля в условиях модели линейных ран на лабораторных мышах.

Динамика заживления ран в опытных группах представлена в таблице 5 и рисунках 9-13.

Таблица 5. - Динамика уменьшения площади ран у мышей, Me (0,25-0,75)

Группа	Показатель	Сутки			
		1-е	3-е	7-е	10-е
Контроль	S, мм ²	210,4 (205,7- 217,9)	194,5 (187,3- 201,5)	157,4 (151,8- 161,3)	125,4 (122,7- 130,6)
	TWC, %	-	7,4 (6,9- 7,8)	24,8 (24,3- 27,6)	41,2 (36,4- 43,5)

I	S, мм ²	211,8 (201,2- 214,6)	185,9 (179,8- 192,3)	135,1 (130,6- 137,8)*	67,5 (63,8- 68,1)*
	TWC, %	-	10,5 (9,1- 12,3)	34,4 (31,7- 35,9)*	67,1 (64,3- 71,3)*
II	S, мм ²	213,8 (207,4- 216,9)	195,4 (181,3- 207,9)	159,1 (147,5- 160,4)	112,5 (105,8- 117,4)*
	TWC, %	-	9,7 (8,6- 10,5)	24,2 (23,9- 27,6)	47,1 (44,9- 49,6)*
III	S, мм ²	211,6 (207,3- 217,8)	195,7 (181,7- 201,3)	142,3 (141,4- 151,6)	110,3 (102,9- 116,5)*
	TWC, %	-	9,7 (7,9- 11,7)	25,4 (22,7- 27,1)	47,1 (43,8- 51,4)*
IV	S, мм ²	206,9 (198,3- 214,2)	185,7 (180,6- 192,7)	137,5 (128,4- 139,2)*	61,7 (58,3- 62,9)*
	TWC, %	-	8,4 (8,3- 9,1)	35,4 (34,1- 39,3)*	70,1 (67,8- 73,2)*
V	S, мм ²	218,3 (208,9- 217,6)	198,3 (183,4- 204,2)	153,7 (140,9- 155,8)*	94,7 (91,3- 98,5)*
	TWC, %	-	8,3 (7,4- 9,2)	31,7 (27,5- 32,9)*	58,4 (57,6- 64,1)*
VI	S, мм ²	211,5 (207,9- 216,7)	192,4 (181,2- 205,3)	156,7 (141,4- 160,8)	110,4 (103,9- 115,2)*
	TWC, %	-	9,1 (7,9- 11,4)	25,7 (23,1- 28,7)	46,4 (43,9- 50,2)*

Примечание: S – площадь раны, TWC - процент общего закрытия раны. Уровень статистической значимости между сутками для соответствующих групп животных $p < 0,05$. * $p < 0,05$ – в сравнении с контрольной группой (физиологического раствора).

Из данных таблицы 5 видно, что в первые трое суток экспериментальные раны у всех лабораторных животных были сопоставимы. Начиная с 7-х суток эксперимента наблюдали достоверное увеличение скорости закрытия ран в группах лечения (за исключением групп I и II) по сравнению с контролем. На 11-е сутки эксперимента установлено, что наиболее эффективно заживление линейных ран происходило в группах V (70,3% vs 40,2%) и VI (64,2%

vs 40,2%).

В первые сутки во всех группах исследований наблюдалось образование струпа по поверхности, под которым обнаруживали диффузный лейкоцитарный инфильтрат с лизисом клеточных ядер, отек стромы, полнокровие сосудов, нередко с тромбозом сосудов (рисунки 9-10).

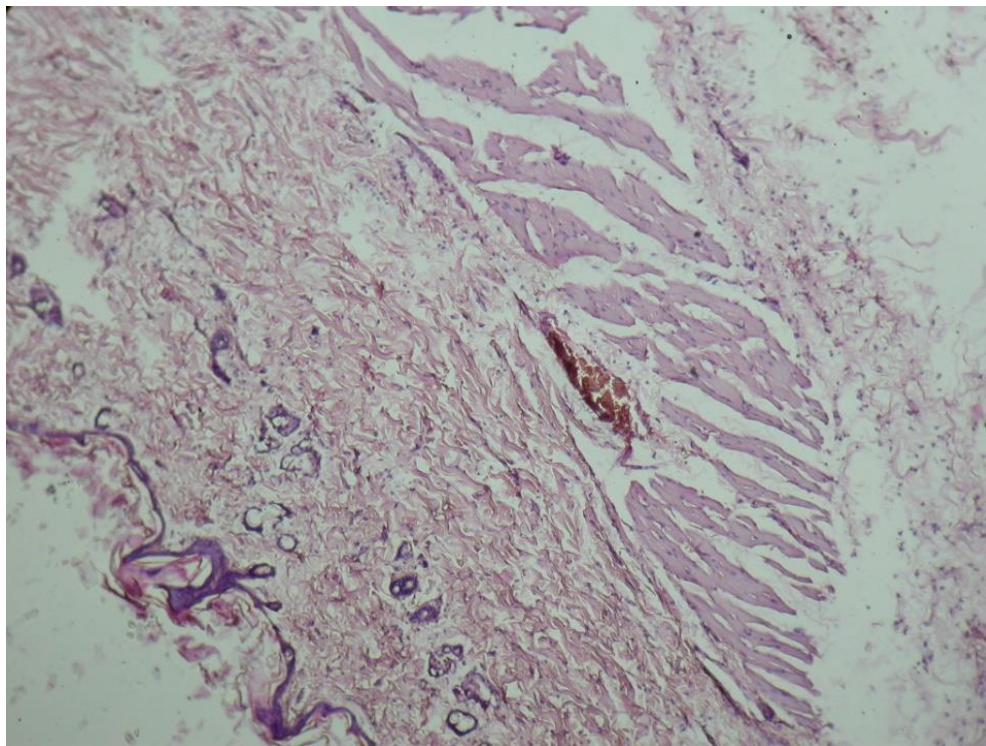


Рисунок 9 - Группа контроль. Микрофото зоны повреждения с образованием струпа по поверхности, вала из воспалительных клеток, выраженного отека стромы. Окр. Гематоксилин-эозин, ув. x100.

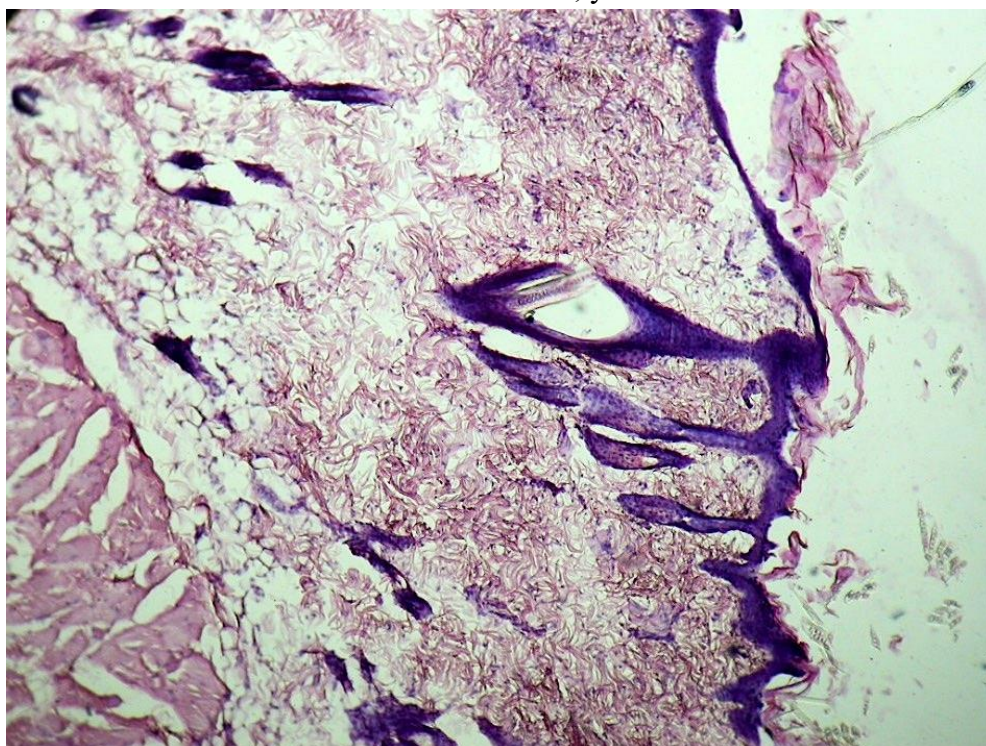


Рисунок 10. Группа контроль. Микрофото зоны около повреждения ткани. В строме визуализируется лейкоцитарный инфильтрат. Окр. Гематоксилин-эозин, ув. x100.

К третьим суткам выраженность зоны некроза и площадь воспалительной зоны были максимальными. При этом в V группе наблюдалось образование грануляционной ткани в сравнении с другими группами под струпом (рисунок 11).

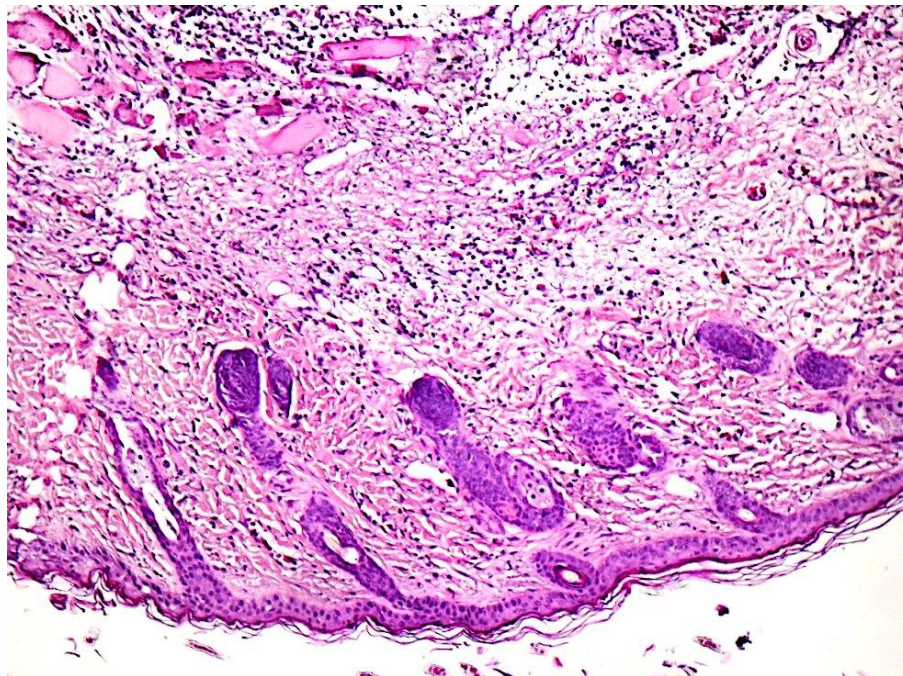


Рисунок 11 - Микрофото 3-и сутки. Визуализируется образование грануляционной ткани (стрелка) под струпом. Окр. Гематоксилин-эозин, ув. x100.

Через 7 суток во всех группах дефект покровных тканей был покрыт струпом, под которым обнаруживали слой грануляционной ткани с крупными фибробластами и тонкими пучками коллагеновых волокон. В нем наблюдали капилляры с умеренно полнокровным просветом, также умеренную макрофагально-лимфоцитарную инфильтрацию с примесью нейтрофильных лейкоцитов. В V группе исследуемых наблюдалась эпителизация по краям дефекта (рисунок 12).

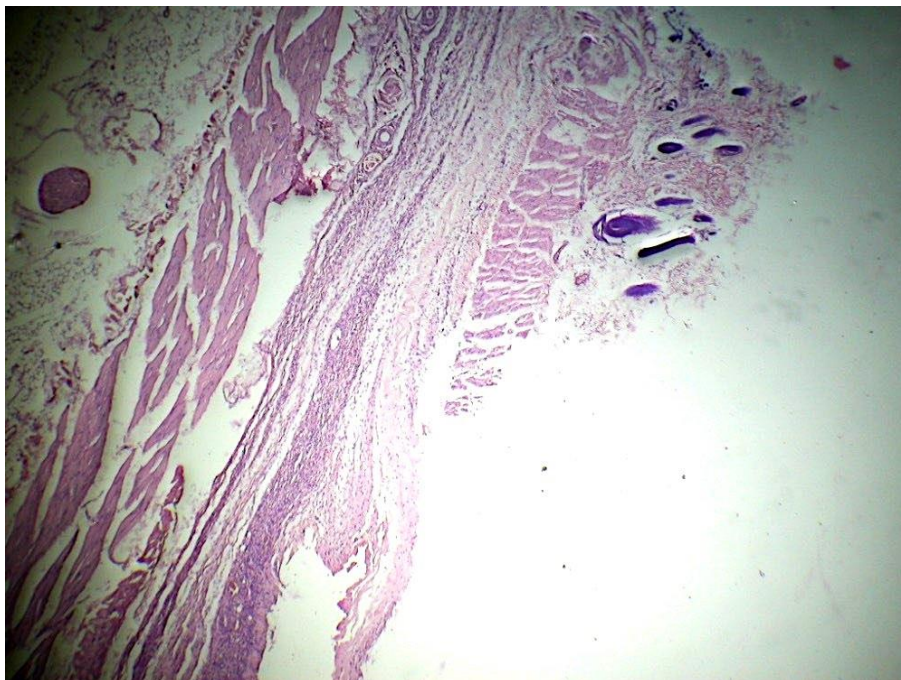


Рисунок 12 - Микрофото 7-е сутки. Замещение слоем грануляционной ткани зоны повреждения, макрофагально-лимфоцитарный инфильтрат, полнокровные капилляров. Активная зона эпителизации дефекта с края раны. Окр. Гематоксилин-эозин, ув. x100.

На 10-е сутки во всех группах раневой дефект очищается от воспалительного инфильтрата с отторжением струпа, эпидермизацией по краям, пролиферацией плоского эпителия и всех слоев кератиноцитов, включая роговой слой. В то же время в V группе наблюдается эпидермизация дефекта по поверхности, по периферии видны волосяные фолликулы и сальные железы, что указывает на восстановление морфофункциональных свойств кожи. Субэпидермально регистрируется тонковолокнистый слой фиброзной ткани (рисунок 13).

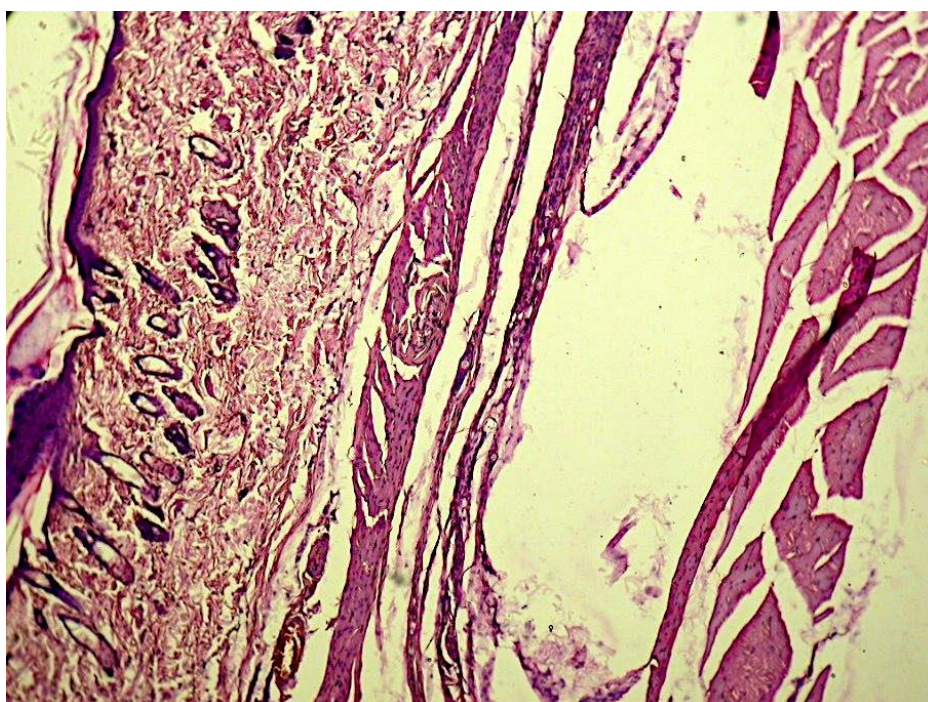


Рисунок 13 - Микрофото 10-е сутки V группы. Эпидермизация дефекта по поверхности с замещением фиброзной тканью. По периферии отмечаются волосяные фолликулы и сальные железы. Окр. Гематоксилин-эозин, ув. x100.

Таким образом, морфологическая оценка полноценности регенерации кожи показала, что заживление лоскутной раны происходит наиболее активно в V группе, в сравнении с другими исследуемыми. Это связано с ранним формированием и созреванием грануляционной ткани и более эффективным ремоделированием регенерата кожи. В результате чего к 10-м суткам наблюдается эпидермизация по поверхности дефекта с регенерацией придатков кожи в краях дефекта, восстановлением морфофункциональных свойств органа.

При изучении гематологических показателей установлена закономерность – подъем содержания лейкоцитов на 3-и сутки эксперимента во всех группах животных. Однако уже на 7-е сутки воспалительный ответ купировался и на 10-е сутки уровень лейкоцитов в крови был в пределах референтных значений (таблица 6).

Показатель	Интактные	Контроль	I	II	III	IV	V	VI
Лейкоциты ×10 ⁹ /л	8,6 (7,5-10,3)	8,5 (7,1-9,8)	8,4 (7,8-9,2)	7,2 (7,8-10,2)	10,5 (8,4-11,3)	9,1 (7,5-10,2)	7,4 (7,9-10,1)	9,2 (7,3-10,1)
Эритроциты ×10 ¹² /л	4,1 (3,5-4,3)	3,7 (3,5-4,2)	3,9 (3,4-4,4)	3,9 (3,4-4,8)	4,2 (3,8-4,3)	3,5 (3,3-3,8)	3,8 (3,7-4,4)	2,9 (2,8-3,2)
Гемоглобин, г/л	116 (105-123)	108 (103-119)	126 (117-132)	128 (115-133)	134 (127-139)	127 (117-132)	129 (116-131)	125 (116-134)
Гематокрит, %	32,5 (30,4-36,2)	34,1 (30,1-33,9)	34,8 (31,2-36,5)	36,7 (32,1-38,4)	36,6 (34,8-38,2)	31,9 (29,4-34,2)	35,7 (32,8-38,4)	32,1 (29,5-33,9)
СОЭ, мм	2,1 (1,9-2,4)	2,3 (2,0-2,4)	2,2 (2,1-2,4)	1,9 (1,6-2,1)	2,1 (1,7-2,3)	2,0 (1,8-2,2)	1,9 (1,6-2,3)	2,1 (1,9-2,3)
Тромбоциты , ×10 ³	354 (330-367)	341 (332-359)	365 (353-371)	342 (338-356)	355 (336-360)	343 (322-351)	341 (331-358)	349 (327-352)

Таблица 6 – Гематологические показатели мышей в условиях заживления модельных ран на 14-е сутки, Me (0,25-0,75)

Примечание: Уровень статистической значимости в сравнении с группой интактных животных $p \geq 0,05$.

При изучении числа эритроцитов, СОЭ, тромбоцитов и уровня гемоглобина не наблюдали статистически значимых отклонений от референтных значений нормы.

Таким образом, в результате первичной экспериментальной оценке установлено, что

наиболее эффективными в качестве средств, стимулирующих заживление ран, являются V и VI.

6. Определение биологической доступности стоматологического геля для лечения

хейлитов

Результаты исследования представлены на рисунке 14.

Как видно из результатов, представленных на рисунке, наибольшее высвобождение флавоноидов за исследуемый промежуток времени (45 мин) произошло из составов 1 ($68,1 \pm 2,1\%$), 3 ($66,2 \pm 1,7\%$) и 4 ($68,4 \pm 2,8\%$). Между данными значениями нет достоверных отличий, однако, состав 1 имеет лучшие технологические характеристики, поэтому в качестве лекарственной формы выбран состав 1.

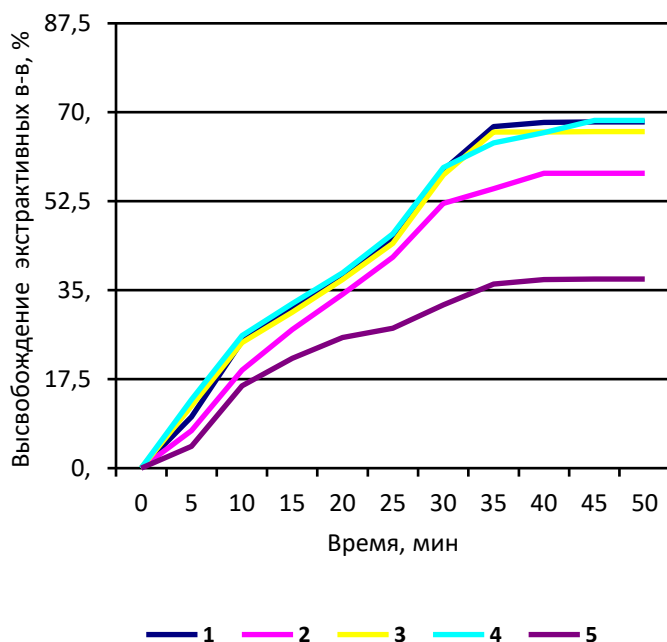


Рисунок 14 – График высвобождения активных веществ в зависимости от времени

7. Определение острой токсичности стоматологического геля

При введении геля в дозах 3500-4000 мг/кг подвижность и аппетит животных уменьшились, однако летальности не наблюдалось (таблица).

Доза, мг/кг	Путь введения	Наблюд. Эффект	Наблюд. Эффект, %	Ожид. Эффект, %	Разница	Слагаемое для X ₂
500	внутри	0/6	0	-	-	-
1000	внутри	0/6	0	-	-	-
1500	внутри	0/6	0	-	-	-
2000	внутри	0/6	0	-	-	-
2500	внутри	0/6	0	-	-	-
3000	внутри	0/6	0	-	-	-
3500	внутри	0/6	0	-	-	-
4000	внутри	0/6	0	-	-	-
контроль	внутри	0/6	0	-	-	-

Таблица 7 - Определение острой токсичности стоматологического геля

По классификации ГОСТ 12.1.007.76, стоматологический гель был отнесен к классу малотоксичных соединений, что позволяет судить о безопасности данного геля, и дает возможность дальнейших исследований.

Заключение

Результаты исследования свидетельствуют о безопасности использования стоматологического геля у пациентов с заболеваниями слизистой полости рта и высокими рисками развития кровотечений, а также с COVID-19 в анамнезе, увеличивающие риски тромбозов. Стоматологический гель обладает хорошими ранозаживляющими, антиоксидантными свойствами, является малотоксичным средством, обладающим хорошей биодоступностью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Булаев В.М., Ших Е.В., Сычов Д.А. Современная фитотерапия. – М.: МЕДпресс-информ, 2011. – 144 с.
2. Исаева А.И., Аверьянов С.В., Исхаков И.Р. Свойства стоматологического геля для лечения воспалительных заболеваний пародонта. // Dental Forum. – 2021. – №4. – С.34.
3. Никитина Н.В. Разработка состава и технологии стоматологических противовоспалительных пленок. // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. трудов. – Пятигорск, 2016. – №71. – С.123-124.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. Под ред. Миронова А.Н., Бунатян Н.Д. и др. М.: «Гриф и К», 2012; - 944 с.
5. Соповская А.В., Сампиев А.М., Никифорова Е.Б. Актуальные вопросы номенклатуры, состава и технологии стоматологических гелей. // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – №1. – С.1858.
6. Antithrombotic Trialists' (ATT) Collaboration. Aspirin in the primary and secondary prevention of vascular disease: collaborative meta-analysis of individual participant data from randomised trials. // Lancet. – 2009. – №373. – P.1849–1860.
7. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high-risk patients. // BMJ. – 2002. – №324. – P.71-86.
8. Heit J.A., O'Fallon W.M., Petterson T.M. et al. Relative impact of risk factors for deep vein thrombosis and pulmonary embolism: a population-based study. // Arch. Intern. Med. – 2002. – V.162, №11. – P.1245-1248.
9. Patrono C., Andreotti F., Arnesen H. Antiplatelet agents for the treatment and prevention of atherothrombosis. // European Heart Journal. – 2011. – V.32. – P.2922-2932.
10. Patrono C., Bachmann F. et al. Expert consensus document on the use of antiplatelet agents. // European Heart Journal. – 2004. – V.25. – P.166-181.
11. Piazza G., Goldhaber S.Z., Kroll A. et al. Venous thromboembolism in patients with diabetes mellitus. // Am. J. Med. – 2012. – V.125, №7. – P.709-716.
12. Timp J.F., Braekkan S.K., Versteeg H.H., Cannegieter S.C. Cancer-associated thrombotic disease. Epidemiology of cancer-associated venous thrombosis. // Blood. – 2013. – V.122, №10. – P.1712-1723.