

УДК 615.47:616-072.7+615.2.03

И. И. Тютрин¹, В. В. Удут², О. А. Тарабрин³, Е. Ф. Малюгин¹

**НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ОЦЕНКИ
ФАРМАКОДИНАМИКИ АНТИАГРЕГАНТОВ**

¹ ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет,
Томск, Российская Федерация,

² ФГБУ «НИИ фармакологии им. Е. Д. Гольдберга» СО РАМН, Томск,
Российская Федерация,

³ Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

УДК 615.47:616-072.7+615.2.03

И. И. Тютрин, В. В. Удут, О. А. Тарабрин, Е. Ф. Малюгин
**НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ОЦЕНКИ ФАРМАКОДИНАМИКИ
АНТИАГРЕГАНТОВ**

Актуальность. Участие тромбоцитов в гемостазе является их основной функцией, будучи «триггерами» и одновременно ключевыми участниками процесса тромбообразования.

Цель работы — изучить влияние антиагрегантов на систему регуляции агрегатного состояния цельной крови у здоровых добровольцев с использованием теста низкочастотной пьезотромбоэластографии.

Материалы и методы. В исследовании приняли участие 30 здоровых добровольцев, средний возраст (25,0±3,1) года. Все обследуемые были разделены на три группы для оценки влияния трех антиагрегантов с различным механизмом действия.

Результаты. 1-я группа (n=10) получала блокаторы ЦОГ-1 (однократно кардиомагнил в дозе 150 мг, внутрь); 2-я группа (n=10) — блокаторы АДФ-рецепторов (Р2У12) тромбоцитов (однократно клопидогрель в дозе 150 мг, внутрь); 3-я группа (n=10) — блокатор фосфодиэстеразы (однократно пентоксифиллин в дозе 100 мг, внутрь).

Выводы. По данным «глобального» теста, на начальных этапах гемокоагуляции выраженный специфический антиагрегантный эффект блокаторов ЦОГ-1 и АДФ-рецепторов сопровождается усилением тромбиновой активности и формированием гиперкоагуляции. Блокатор фосфодиэстеразы, имея меньший антиагрегантный эффект, в меньшей степени влияет на изменение тромбиновой активности, с последующей гипокоагуляцией.

Ключевые слова: антиагреганты, низкочастотная пьезоэлектрическая тромбоэластография, фибриногенез.

A NEW TECHNOLOGY OF EVALUATING PHARMACODYNAMICS OF ANTIAGGREGANTS

Background. Participation of platelets in hemostasis is their main function, as “triggers” and at the same time the key participants in the process thrombogenesis.

Aim. Study the effect of antiplatelet agents on the system of regulation of the state of aggregation of whole blood from healthy volunteers using test low-frequency piezothromboelastography.

Materials and methods. The study included 30 healthy volunteers of an average age (25 ± 3.1) years. All the subjects were divided into three groups to evaluate the effect of three antiplatelet agents with different mechanisms of action.

Results. 1st group (n=10) was treated with COX-1 blockers (Cardiomagnil, once 150 mg, orally); the second group (n=10) received blockers ADP-receptor (P2Y₁₂) platelets (once clopidogrel 150 mg, orally); the third group (n=10) received a phosphodiesterase blocker (once pentoxiphyllin 100 mg, orally).

Conclusions. According to the “global” test in the initial stages of blood coagulation, pronounced specific antiplatelet effect of blockers of COX-1 and ADP receptor is accompanied by increased thrombin activity and the formation of a hypercoagulable. Blocker of phosphodiesterase having less antiplatelet effect is lesser influence on change in activity of thrombin, followed with anticoagulation.

Key words: antiaggregants, low-frequency piezothromboelastography, fibrinogenesis.

Введение

Участие тромбоцитов в гемостазе является их основной функцией. Будучи «триггерами» и одновременно ключевыми участниками процесса тромбообразования, обладая адгезивно-секреторно-агрегационной, коагуляционной, ретрактивной и фибринолитической активностью, тромбоциты оказывают существенное влияние на процесс образования поперечно сшитого фибрина на всех этапах его формирования (инициации/амплификации, пропагации, латеральной сборки) и последующего лизиса [1; 9]. В силу этих причин практически все схемы лечения или профилактики тромбозов и тромбоземболий содержат антиагреганты [3; 8]. Вместе с тем существуют проблемы их применения, а именно:

— резистентность к препаратам, составляющая, по данным ряда исследований, от 5 до 40 % [2; 7; 8];

— сложность оценки их фармакодинамики и связанная с этим сложность подбора оптимальной дозы и дискретности назначения [6].

Обычно «стандартные» схемы назначения антиагрегантов представляют собой «нагрузочную» дозу с последующим ежедневным приемом «поддерживающей» дозировки, при этом эффективность препарата оценивается через 5–7 сут. в подавляющем большинстве исследований турбидиметрической агрегометрией в плазме, богатой тромбоцитами (цитратной), или импедансной агрегометрией цитратной крови [4; 9]. Последний позиционируется как экспресс-метод оценки агрегационной активности тромбоцитов в цельной крови [5].

Несмотря на очевидные преимущества метода импедансной агрегометрии, нам представляется, что последнему, как и всем другим методам, присущи два недостатка: блокада ионов кальция, роль которых в процессе коагуляции невозможно переоценить, и исключение из оценки эффектов антиагрегантов их действия на весь процесс гемокоагуляции — от момента инициации/амплификации до образования

поперечно сшитого фибрина с его последующим лизисом, где роль тромбоцитов неоспорима [5; 10].

В этой связи появление нового «глобального» теста-анализа всех фаз процесса гемокоагуляции цельной крови в режиме реального времени с использованием технологии низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ) открывает перспективы не только для оперативной оценки таргетного действия антиагрегантов (в отношении агрегационной функции тромбоцитов), но и их опосредованного или общего влияния на фибриногенез.

Цель настоящего исследования — оценка фармакодинамики антиагрегантов в отношении системы регуляции агрегатного состояния крови у здоровых добровольцев с использованием «глобального» теста НПТЭГ цельной крови.

Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 30 здоровых добровольцев, средний возраст ($25,0 \pm 3,1$) года, после подписания добровольного информированного согласия (протокол заседания локального этического комитета № 19 от 01.11.2013 г.).

Все обследуемые были разделены на три группы для оценки влияния трех антиагрегантов с различным механизмом действия: 1-я группа ($n=10$) получала блокаторы ЦОГ-1 (однократно кардиомагнил в дозе 150 мг, внутрь); 2-я группа ($n=10$) — блокаторы АДФ-рецепторов (P2Y₁₂) тромбоцитов (однократно клопидогрель в дозе 150 мг, внутрь); 3-я группа ($n=10$) — блокатор фосфодиэстеразы (однократно пентоксифиллин в дозе 100 мг, внутрь).

Стандартизация этапа пробоподготовки обеспечивалась забором крови из кубитальной вены без наложения жгута (1 мл) в трехкомпонентный силиконированный шприц ($V=2,5$ мл, производства SFM Hospital Products GmbH, Германия) для разовой кюветы из медицинского пластика ($V=0,45$ мл, производства «Меднорд», Россия) с немедленным (10–12 с) началом исследования.

Функциональное состояние системы гемостаза оценивали методом НПТЭГ на аппаратно-программном комплексе АРП-01М «Меднорд», Россия, регистрационное свидетельство ФРС № 2010/09767.

Гемостатический потенциал (ГП) — интегративную составляющую полного цикла гемокоагуляции, обеспечивающую необходимую текучесть крови и ограничение экстравазации компонентов крови при нарушении целостности или повреждении сосудистой стенки определяли с использованием компьютерной программы ИКС «ГЕМО-3», включающей следующую информацию:

- начальный этап коагуляции (инициация/амплификация, интенсивность контактной коагуляции (ИКК), отн. ед.);
- тромбиновая активность (константа тромбиновой активности (КТА), отн. ед.);
- интенсивность коагуляционного драйва (ИКД, отн. ед.);
- интенсивность полимеризации сгустка (ИПС, отн. ед.);
- время образования поперечно сшитого фибрина (t_5 , мин);
- максимальная плотность сгустка — точка максимальной амплитуды графика низкочастотной пьезотромбоэластографии (МА, отн. ед.);
- коэффициент суммарной противосвертывающей активности (КСПА, отн. ед.);
- интенсивности ретракции и лизиса сгустка (ИРЛС, отн. ед.);
- «точка желирования» (t_3 — время свертывания крови, мин).

Определение и расчет анализируемых показателей представлен на рис. 1.

Амплитуда, отн. ед.

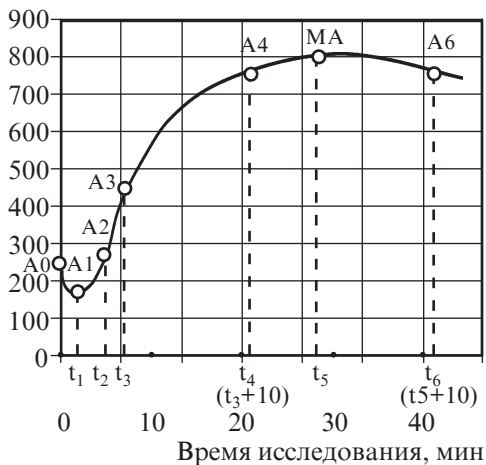


Рис. 1. Алгоритм определения и расчета анализируемых показателей низкочастотной пьезотромбоэластографии:

$$\begin{aligned} \text{ИКК} &= (A_1 - A_0)/t_1; \text{КТА} = 100/t_2; \\ \text{ИКД} &= (A_3 - A_0)/t_3; \\ \text{ИПС} &= (A_4 - A_3)/t_4 (\text{const}); \\ \text{КСПА} &= \text{ИКД}/\text{ИПС}; \text{ИТС} = \text{МА}/t_5; \\ \text{ИРЛС} &= [(MA - A_6) \cdot 100]/MA \end{aligned}$$

ля и пентоксифиллина может быть охарактеризован в алгоритме оценки НПТЭГ как «сдвиг вправо и вниз». При этом необходимо отметить, что, несмотря на отсутствие статистически значимых изменений показателя t_3 (точки желирования), интенсивность протеолитического этапа фибринообразования (ИКД) значительно снижается после приема кардиомагнила и клопидогреля на 30 % ($p < 0,01$) и на 18 % ($p < 0,05$) соответственно.

Ключевые изменения наблюдаются на начальных этапах гемокоагуляции (инициации/амплификации), оцениваемые показателями t_1 и ИКК. Время реакции (t_1) после приема кардиомагнила, клопидогреля и пентоксифиллина увеличивается с 0,7 мин [0,3; 0,9] до 2,3 мин [1,5; 2,9], $p < 0,001$; 2,1 мин [1,65; 3,2], $p < 0,001$; 1,05 мин [0,8; 1,5], $p < 0,05$ соответственно. Очевидным свидетельством антиагрегантного эффекта препаратов является динамика показателя ИКК, снижающегося в 4,5 ($p < 0,001$); 2,5 ($p < 0,01$) и 1,8 раза ($p < 0,05$) соответственно для сравниваемых антиагрегантов.

При этом обращают на себя внимание два ключевых момента: выявленная явная тенденция усиления тромбиновой активности после приема клопидогреля и пентоксифиллина — прирост КТА на 16 и 21 % соответственно и формирующаяся структурная и хронометрическая гипокоагуляция при приеме пентоксифиллина (увеличение t_5 на 12 %, $p < 0,01$; уменьшение МА на 13 %, $p < 0,01$). В ответ на однократный прием кардиомагнила и клопидогреля формируется хронометрическая гиперкоагуляция (уменьшение t_5 на 12 %, $p < 0,01$ и 10 %, $p < 0,01$ соответственно).

Полученные количественные данные обработаны с помощью программ Microsoft Excel и SPSS 13. 0. На первом этапе была проверена нормальность распределения количественных показателей с помощью критерия Колмогорова — Смирнова. Затем было проведено статистическое описание различных групп, включенных в исследование с использованием непараметрических методов. Оценивались количественные данные, представленные в виде $Me [LQ; UQ]$, где Me — медиана; LQ — нижний квартиль; UQ — верхний квартиль. Для проверки статистических гипотез о различии между исследуемыми группами использовали непараметрический критерий Манна — Уитни, где p — достигнутый уровень значимости.

Результаты исследования и их обсуждение

Как видно из представленных в табл. 1 и на рис. 2 результатов, ГП после приема кардиомагнила, клопидогреля

**Основные показатели низкочастотной пьезотромбоэластографии
здоровых добровольцев до и после приема кардиомагнила,
клопидогреля и пентоксифиллина, Me[LQ;UQ]**

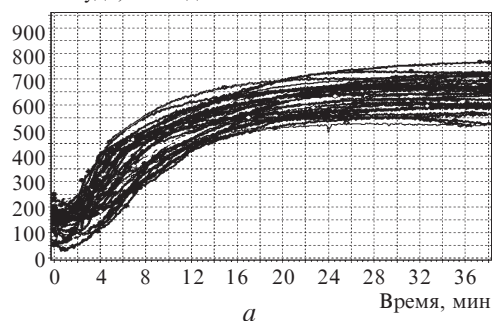
Показатель	Фон (до препарата), n=30	Кардио-магнил, n=10	Клопидогрель, n=10	Пентоксифиллин, n=10
A0, отн. ед.	187 [146; 212,5]	157 [129; 187]	156 [120; 235,5]	166 [130; 194]
A1, отн. ед.	148 [109; 177]	122 [115; 175]	130,5 [92; 168]	131 [113,5; 157]
t ₁ , мин	0,7 [0,3; 0,9]	2,3 [1,5; 2,9]***	2,1 [1,65; 3,2]^^^	1,05 [0,8; 1,5]°
ИКК, отн. ед.	-27,25 [-36; -16,15]	-6 [-11; -31]***	-12 [-17,35; -9,5]^	-15,65 [-18; -8,1]°°
КТА, отн. ед.	29,4 [25; 38]	29 [21,3; 33]	34 [26,3; 40,4]^	35,5 [24,5; 44,5]
t ₃ (мин)	7,6 [5,9; 9,2]	9,2 [6,2; 12,5]	8,55 [6; 9,4]	7,9 [6; 9,3]
ИКД, отн. ед.	37,6 [32,5; 43,5]	29 [23; 33,3]**	30,6 [20,5; 35,85]^	36,6 [23,2; 45,5]
A4, отн. ед.	602,5 [572; 631,5]	528 [487; 581]**	557 [482; 610]	480 [427; 549,5]°°°
ИПС, отн. ед.	16,75 [13,65; 19,65]	16,4 [15,3; 21,4]	21,35 [16,65; 26]	15,75 [12,45; 17,25]
t ₅ (мин)	34 [27; 38]	30 [25,6; 31]*	31,5 [26,5; 36,25]	38,15 [36,5; 42,35]°°
МА, отн. ед.	502,5 [466,5; 560,5]	485 [455; 525]	469,5 [409,5; 489]^	435 [387; 467,5]°°
КСПА, отн. ед.	2,35 [1,9; 2,8]	2,2 [1,94; 2,9]	2,4 [2,1; 3,05]	2,58 [2,19; 3,15]
ИРЛС, отн. ед.	0,9 [0,1; 2,5]	1,3 [0,8; 2,6]	0,25 [0,05; 1,5]	1 [0,45; 1,5]

Примечание. * — $p_1 < 0,05$; ** — $p_1 < 0,01$; *** — $p_1 < 0,001$ — статистически значимые различия показателей НПТЭГ здоровых добровольцев до и после приема кардиомагнила; ^ — $p_2 < 0,05$; ^^ — $p_2 < 0,01$; ^^ — $p_2 < 0,001$ — до и после приема клопидогреля; ° — $p_3 < 0,05$; °° — $p_3 < 0,01$; °°° — $p_3 < 0,001$ — до и после приема пентоксифиллина.

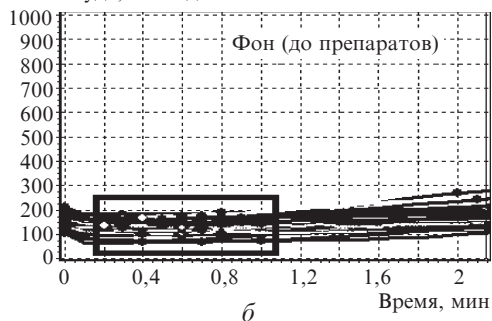
Таким образом, по результатам анализа «глобального» теста, реализованного в пробах цельной крови с использованием технологии НПТЭГ, получена информация об угнетении антиагрегантами начального этапа коагуляции собственно и представляющего специфическое действие препаратов. При этом выявлены различия их влияния на этапах пропагации и латеральной сборки процесса фибриногенеза.

Так, для эффектов пентоксифиллина характерно формирование структурной и хронометрической гипокоагуляции, оптимально дополняющих его антиагрегантное действие в силу замедления скорости образования полноценного фибринового сгустка (поперечно сшитый фибрин). Применение клопидогреля приводит к достаточно выраженной структурной гипокоагуляции, что свидетельствует о торможении процессов латеральной сборки фибрина и, следовательно, незавершенности фибриногенеза с формированием низкой устойчивости фибринового сгустка к эндогенным фибринолитикам. Вполне вероятно, что выявленное формирование хронометрической гиперкоагуляции в плейотропных эффектах кардиомагнила и кло-

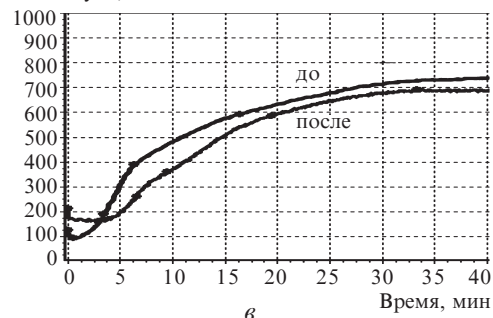
Амплитуда, отн. ед.



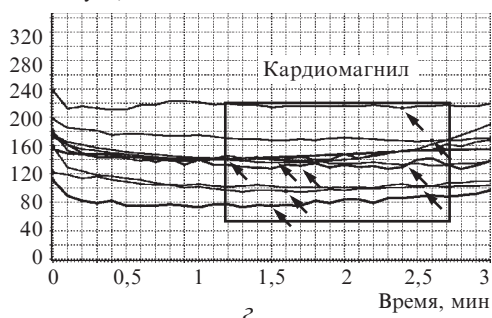
Амплитуда, отн. ед.



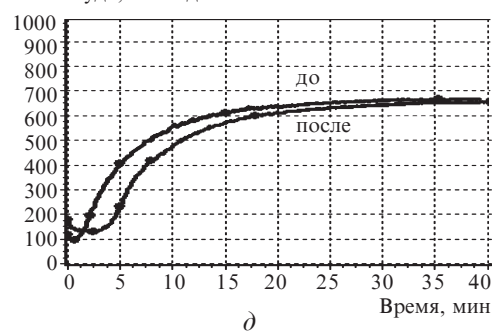
Амплитуда, отн. ед.



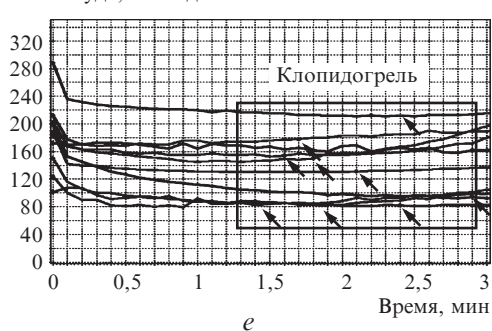
Амплитуда, отн. ед.



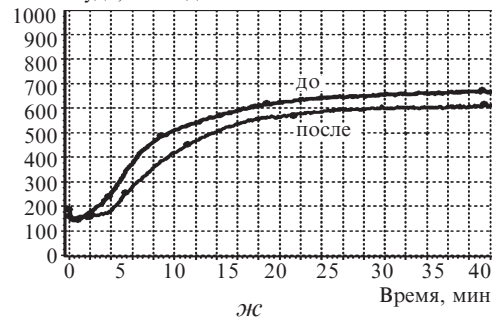
Амплитуда, отн. ед.



Амплитуда, отн. ед.



Амплитуда, отн. ед.



Амплитуда, отн. ед.

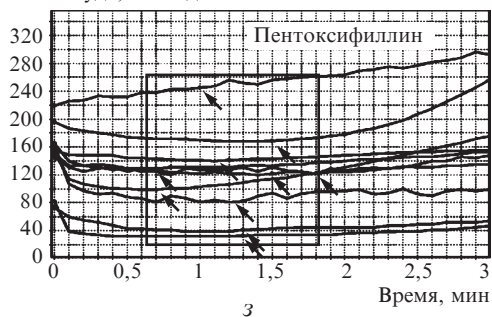


Рис. 2. Результаты низкочастотной пьезотромбоэластографии (а — фон до назначения препарата; в — до и после кардиомагниту; д — до и после клопидогреля; ж — до и после пентоксифиллина) и масштабированные участки низкочастотной пьезотромбоэластографии начальных этапов фибриногенеза (б — без препаратов; г — кардиомагнит; е — клопидогрель; з — пентоксифиллин)

пидогреля приводят, при использовании последнего, к активации противосвертывающей системы, обеспечивающей его структурный гипокоагуляционный эффект.

Полученные результаты наглядно демонстрируют участие анализируемых антиагрегантов (специфический эффект), в изменении гемостатического потенциала цельной крови (плейотропный эффект) неравнозначно влияя на его результирующую — фибриногенез, что должно учитываться при терапии.

Из исследования был исключен пациент, НПТЭГ которого после приема кардиомагнила не претерпевала изменений. В последующем, по результатам исследования агрегационной функции тромбоцитов, у него была выявлена аспиринорезистентность (рис. 3).

Амплитуда, отн. ед.

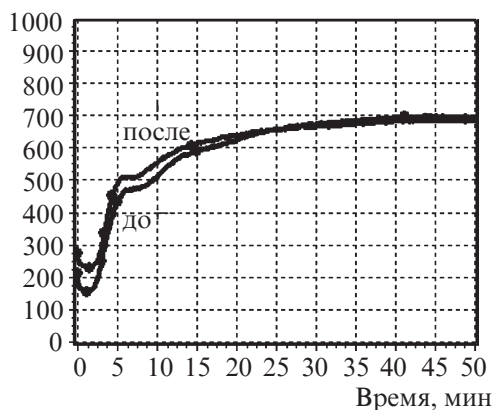


Рис. 3. Низкочастотная пьезотромбоэластография пациента до и после назначения кардиомагнила, демонстрирующая его аспиринорезистентность

Выводы

По результатам НПТГ на начальных этапах фибриногенеза (инициации/амплификации), специфический антиагрегантный эффект блокаторов ЦОГ-1 и АДФ-рецепторов сопровождается усилением тромбиновой активности и формированием хронометрической гиперкоагуляции на этапах пропации и латеральной сборки фибрина.

Блокатор фосфодиэстеразы, проигрывая в специфическом антиагрегантном эффекте блокаторам ЦОГ-1 и АДФ-рецепторов, в меньшей степени влияет на изменение тромбиновой активности, на последующих этапах фибриногенеза обеспечивая хронометрическую и структурную гипокоагуляцию.

Метод НПТЭГ может быть применен в оперативном мониторинге и контроле антиагрегантной терапии с оценкой специфических эффектов и определением ее влияния на гемостатический потенциал цельной крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баркаган З. С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза / З. С. Баркаган, А. П. Момот. – М. : Ньюдиамед, 2008. – 292 с.
2. Зиганшин А. У. Антагонисты P2-рецепторов тромбоцитов: успехи, проблемы, перспективы / А. У. Зиганшин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 4. – С. 38–43.
3. Клинико-патологоанатомический анализ послеоперационной тромбоэмболии легочной артерии / А. А. Баешко, А. Г. Крючок, С. И. Корсак [и др.] // Архив патологии. – 2001. – № 1. – С. 23–27.
4. Косарев В. В. Фармакотерапия артериальной гипертензии: место комбинированных препаратов / В. В. Косарев, С. А. Баранов // РМЖ. – 2012. – № 4. – С. 148–156.

5. *Момот А. П.* Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики / А. П. Момот. – СПб. : ФормаТ, 2006. – 208 с.
6. *Проблемы* оценки эффективности дезагрегантной терапии в клинической практике / Л. И. Бурячковская, И. А. Учитель, А. Б. Сумароков [и др.] // *Терапевтический архив.* – 2009. – № 81 (5). – С. 41–46.
7. *Комаров А. Л.* Резистентность к клопидогрелу у больных ишемической болезнью сердца: лабораторный феномен или серьезная клиническая проблема? / А. Л. Комаров, Г. В. Джалилова, Ю. Я. Федоткина // *Актуальные вопросы болезней сердца и сосудов.* – 2010. – Т. 5, № 1. – С. 12–20.
8. *Antiplatelet* drug response variability and the role of platelet function testing: a practical guide for interventional cardiologists / D. J. Angiolillo, S. Suryadevara, P. Capranzano [et al.] // *Catheter Cardiovasc Interv.* – 2009. – Vol. 73 (1). – P. 1–14.
9. *Platelet* reactivity and nonresponse to dual antiplatelet therapy: a review / P. M. Vila, M. U. Zafar, J. J. Badimon // *Platelets.* – 2009. – Vol. 20 (8). – P. 531–538.
10. *Multiplate®* whole blood impedance point of care aggregometry: preliminary reference values in healthy infants, children and adolescents / S. Halimeh, Gd. Angelis, A. Sander [et al.] // *Klin Padiatr.* – 2010. – Vol. 222 (3). – P. 158–163.

REFERENCES

1. Barkagan Z.S., Momot A.P. *Diagnostica i kontroliruemaya terapiya narushenii gemostasa* [Diagnosis and controlled treatment of hemostatic disorders]. Moscow, Njudiamed, 2008. 292 p.
2. Ziganshin A.U. P2-receptor antagonists, platelet: successes, problems and prospects. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya* 2010; 4: 38-43.
3. Baeshko A.A., Kryuchok A.G., Korsak S.I., Jushkevich V.A. Clinico-pathoanatomical analysis of postoperative pulmonary embolism. *Arhiv patologii* 2001; 1: 23-27.
4. Kosarev V.V., Baranov S.A. Farmakoterapiya arterial'noy gipertenzii: mesto kombinirovannykh preparatov. *RMZh*, 2012; 4: 148-156.
5. Momot A.P. *Patologiya sistemy gemostasa. Printsipy i algoritmy kliniko-laboratornoi diagnostiki* [Pathology of hemostasis. Principles and algorithms for clinical and laboratory diagnostics] St-Peterburg, FormaT, 2006. 208 p.
6. Buryachkovskaya L.I., Uchitel I.A., Sumarokov A.B., Popov E.G. Problems of assessing the effectiveness of antiplatelet therapy in clinical practice. *Terapevticheskii arkhiv* 2009; 81 (5): 41-46.
7. Komarov A.L., Dzhaililova G.V., Fedotkina Yu.Ya. Resistance to clopidogrel in patients with coronary heart disease: laboratory phenomenon or serious clinical problem? *Aktual'nye voprosy bolezney serdtsa i sosudov* 2010; 1: 12-20.
8. Angiolillo D.J., Suryadevara S., Capranzano P., Zenni M.Z., Guzman L.A., Bass T.A. Antiplatelet drug response variability and the role of platelet function testing: a practical guide for interventional cardiologists. *Catheter Cardiovasc Interv* 2009; 73 (1): 1-14.
9. Vila P.M., Zafar M.U., Badimon J.J. Platelet reactivity and nonresponse to dual antiplatelet therapy: a review. *Platelets* 2009; 20 (8): 531-538.
10. Halimeh S., Angelis Gd., Sander A., Edelbusch C., Rott H., Thedieck S., Mesters R., Schlegel N. Multiplate® whole blood impedance point of care aggregometry: preliminary reference values in healthy infants, children and adolescents. *Klin Padiatr* 2010; 222 (3): 158-163.

Поступила 3.09.2014