

## НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ОЦЕНКИ ФАРМАКОДИНАМИКИ АНТИАГРЕГАНТОВ

И. И. Тютрин<sup>1</sup>, В. Ф. Клименкова<sup>2</sup>, В. В. Удут<sup>3</sup>

С использованием “глобального” теста низкочастотной пьезотромбоэластографии изучено влияние антиагрегантов на систему регуляции агрегатного состояния цельной крови у здоровых добровольцев. Показано, что специфические эффекты антиагрегантов проявляются на всех этапах фибриногенеза (инициации/амплификации и пропации). По данным “глобального” теста на начальных этапах гемокоагуляции (инициации/амплификации) выраженный антиагрегантный эффект блокаторов ЦОГ-1 и АДФ рецепторов сопровождается усилением тромбиновой активности и формированием хронометрической гиперкоагуляции. Блокатор фосфодиэстеразы, проигрывая в антиагрегантном эффекте, в меньшей степени влияет на изменение тромбиновой активности, на последующих этапах фибриногенеза обеспечивая хронометрическую и структурную гипокоагуляцию. Таким образом, появляется возможность использования данного метода для осуществления контроля терапии на этапах лечения в режиме реального времени в программе персонализации антиагрегантной терапии с учетом влияния препаратов на все этапы фибриногенеза.

**Ключевые слова:** антиагреганты; низкочастотная пьезотромбоэластография; гемостатический потенциал; фибриногенез; персонализированная терапия

### 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 активностями, тромбоциты оказывают существенное влияние на процесс образования поперечно сшитого фибрина на всех этапах его формирования (инициации/амплификации, пропации, латеральной сборки) и последующего лизиса [2, 11]. В силу этих причин практически все схемы лечения или профилактики тромбозов и тромбоемболий содержат антиагреганты [1, 9]. Вместе тем существуют проблемы их применения, а именно: резистентность к препаратам, составляющая по данным ряда исследований от 5 до 40 % [4, 5, 9]; сложность оценки их фармакодинамики и, связанная с этим, сложность подбора оптимальной дозы и дискретности назначения [3].

Обычно “стандартные” схемы назначения антиагрегантов представляет “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 [6, 11]. Последний позиционируется как экспресс-метод оценки агрегационной активности тромбоцитов в цельной крови [7].

Методу импедансной агрегометрии присущи два недостатка: блокада ионов кальция, роль которых в процессе коагуляции невозможно переоценить, и исключение из оценки эффектов антиагрегантов их действие на весь процесс гемокоагуляции — от момента инициации/амплификации до образования поперечно сшитого фибрина с его последующим лизисом [7, 10].

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 оперативной оценки таргетного действия антиагрегантов (в отношении агрегационной функции тромбоцитов), но и их (опосредованного, или общего) влияния на фибриногенез.

Целью настоящего исследования явилась оценка фармакодинамики антиагрегантов в отношении системы регуляции агрегатного состояния крови у здоровых добровольцев с использованием “глобального” теста НПТЭГ цельной крови.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

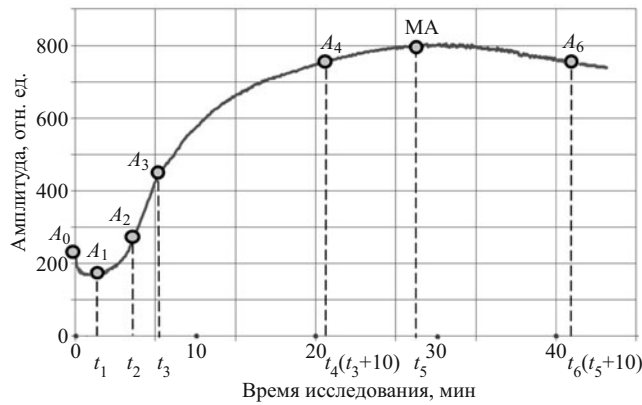
В исследовании приняли участие 30 здоровых добровольцев, средний возраст  $25 \pm 3,1$  года, после подписания добровольного информированного согласия (протокол заседания локального этического комитета № 19 от 01.11.2013 г.).

Все обследуемые были разделены на три группы для оценки влияния трех антиагрегантов с различным механизмом действия: 1-я группа ( $n = 10$ ) — пациенты получали блокаторы ЦОГ-1 (однократно кардиомагнил в дозе 150 мг, внутрь); 2-я группа ( $n = 10$ ) — пациенты получали блокаторы АДФ — рецепторов (P2Y<sub>12</sub>) тромбоцитов (однократно клопидогрель в дозе 150 мг, внутрь); 3-я группа ( $n = 10$ ) — пациенты

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет, 634050, Томск, Московский тракт, 2.

<sup>2</sup> ОГАУЗ Областной перинатальный центр, 634036, Томск, ул. Ивана Черных, 96/1.

<sup>3</sup> ФГБУ “НИИ фармакологии им. Е. Д. Гольдберга” СО РАМН, 634028, Томск, просп. Ленина, 3.



**Рис. 1.** Алгоритм определения и расчета анализируемых показателей низкочастотной пьезотромбоэластографии: ИКК (интенсивность контактной коагуляции) =  $(A_1 - A_0)/t_1$ ; КТА (константа тромбиновой активности) =  $100/t_2$ ; ИКД (интенсивность коагуляционного драйва) =  $(A_3 - A_0)/t_3$ ; ИПС (интенсивность полимеризации сгустка) =  $(A_4 - A_3)/t_4$  (const); КСПА (коэффициент суммарной противосвёртывающей активности) = ИКД/ИПС; ИТС (интенсивность тотального свертывания) =  $MA/t_5$ ; ИРЛС (интенсивность ретракции и лизиса сгустка) =  $[(MA - A_6) \cdot 100]/MA$ .

получали блокатор фосфодиэстеразы (однократно пентоксифиллин в дозе 100 мг, внутрь).

Кровь из кубитальной вены получали без наложения жгута (1 мл) в 3-компонентный 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.

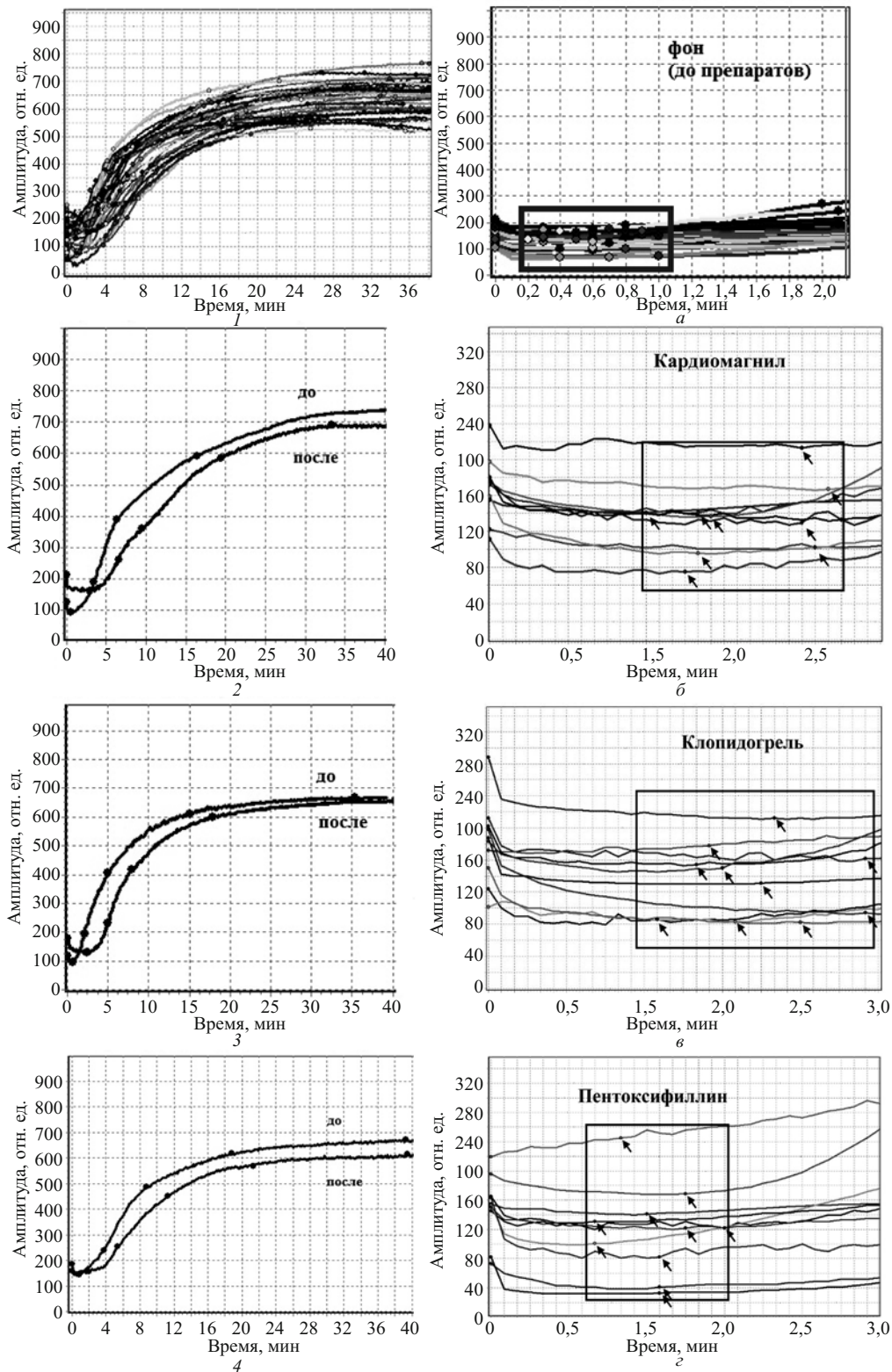
#### Основные показатели низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ) здоровых добровольцев до и после приема кардиомагнила, клопидогреля и пентоксифиллина, Me[LQ; UQ]

Показатель	Фон (до препарата) ( $n = 30$ )	Кардиомагнил ( $n = 10$ )	Клопидогрель ( $n = 10$ )	Пентоксифиллин ( $n = 10$ )
$A_0$ , о. е.	187 [146; 212,5]	157 [129; 187]	156 [120; 235,5]	166 [130; 194]
$A_1$ , о. е.	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, о. е.	- 27,25 [- 36; - 16,15]	- 6 [- 11; - 31]***	- 12 [- 17,35; - 9,5]^^	- 15,65 [- 18; - 8,1]°°
КТА, о. е.	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, о. е.	37,6 [32,5; 43,5]	29 [23; 33,3]**	30,6 [20,5; 35,85]^	36,6 [23,2; 45,5]
$A_4$ , о. е.	602,5 [572; 631,5]	528 [487; 581]**	557 [482; 610]	480 [427; 549,5]°°
ИПС, о. е.	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, о. е.	502,5 [466,5; 560,5]	485 [455; 525]	469,5 [409,5; 489]^	435 [387; 467,5]°°
КСПА, о. е.	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, о. е.	0,9 [0,1; 2,5]	1,3 [0,8; 2,6]	0,25 [0,05; 1,5]	1 [0,45; 1,5]

**Примечание.** Статистически значимые различия показателей НПТЭГ здоровых добровольцев: \* —  $p_1 < 0,05$ ; \*\* —  $p_1 < 0,01$ ; \*\*\* —  $p_1 < 0,001$  — 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.

Определение гемостатического потенциала (ГП) — интегративной составляющей полного цикла гемокоагуляции, обеспечивающей необходимую текучесть крови и ограничение экстрavasации компонентов крови при нарушении целостности или повреждении сосудистой стенки образцов крови — производили с использованием компьютерной программы ИКС “ТЕМО-3”. ГП включает информацию: о начальном этапе коагуляции (инициация/амплификация, ИКК — интенсивность контактной коагуляции, о.е.); тромбиновой активности (КТА — константа тромбиновой активности, о.е., ИКД — интенсивность коагуляционного драйва, о.е.); интенсивности полимеризации сгустка (ИПС, о.е.); времени образования поперечно сшитого фибрина ( $t_5$ , мин.); максимальной плотности сгустка — точка максимальной амплитуды графика низкочастотной пьезотромбоэластографии (МА, о.е.); коэффициенте суммарной противосвёртывающей активности (КСПА, о.е.); интенсивности ретракции и лизиса сгустка (ИРЛС, о.е.); “точке желирования” ( $t_3$  — время свёртывания крови, мин). Определение и расчет анализируемых показателей представлен на рис. 1 [8].

Полученные 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. Оценивали 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).



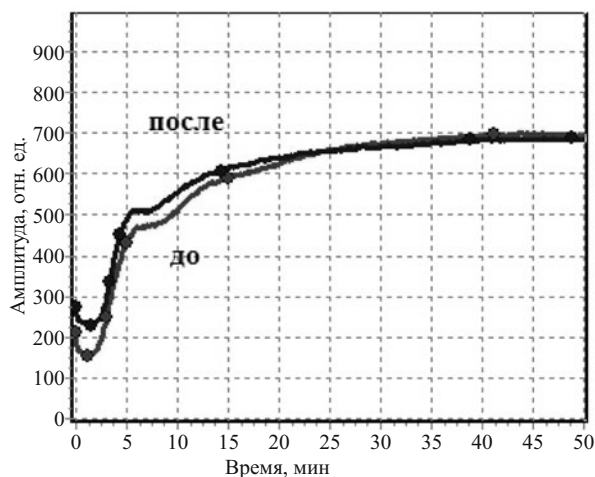
**Рис. 2.** Результаты низкочастотной пьезотромбоэластографии (1 — фон, до назначения препарата, 2 — до и после кардиомагнила, 3 — до и после клопидогреля, 4 — до и после пентоксифиллина) и масштабированные участки низкочастотной пьезотромбоэластографии начальных этапов фибриногенеза (а — без препаратов, б — кардиомагнил, в — клопидогрель, г — пентоксифиллин).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из представленных в таблице и на рис. 2 результатов, ГП после приема кардиомагнила, клопи-

догреля и пентоксифиллина может быть охарактеризован в алгоритме оценки НПТЭГ как “сдвиг вправо и вниз”. При этом необходимо отметить, что несмотря





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

на отсутствие статистически значимых изменений показателя  $t_3$  (точки желирования), интенсивность протеолитического этапа фибринообразования (ИКД) значимо снижается после приема кардиомагнила и клопидогреля на 30 % ( $p < 0,01$ ) и 18 % ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Ключевые изменения наблюдали 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 раз ( $p < 0,05$ ), соответственно, для сравниваемых антиагрегантов.

Выявлена 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).

Таким образом, нами получена информация об угнетении антиагрегантами начального этапа коагуляции собственно и представляющего специфическое действие препаратов. При этом выявлены различия их влияния на этапах пропации и латеральной сборки процесса фибриногенеза.

Так, для пентоксифиллина, характерно формирование структурной и хронометрической гипокоагуляции оптимально дополняющих его антиагрегантное действие, что выражается в замедлении скорости образова-

ния полноценного фибринового сгустка (поперечно сшитый фибрин). Клопидогрель приводит к 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 плеiotропных эффектах кардиомагнила и клопидогреля 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 (плеiotропный 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).

## ВЫВОДЫ

1. С помощью низкочастотной пьезотромбоэластографии (НПТЭГ) показано, что 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.

2. 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.

3. 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. А. А. Баешко, А. Г. Крючок, С. И. Корсак, В. А. Юшкевич, *Арх. патол.*, № 1, 23 – 27 (2001).
2. З. С. Баркаган, А. П. Момот, *Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза*, Ньюдиамед, Москва (2008).
3. Л. И. Бурячковская, И. А. Учитель, А. Б. Сумароков, Е. Г. Попов, *Тер. арх.*, **81**(5), 41 – 46 (2009).
4. А. У. Зиганшина, *Экспер. и клин. фармакол.*, № 4, 38 – 43 (2010).
5. А. Л. Комаров, Г. В. Джалилова, Ю. Я. Федоткина, *Болезни сердца и сосудов*, № 1, 12 – 20 (2010).

6. В. В. Косарев, С. А. Баранов, *Мед. совет*, № 8, 90 – 97 (2012).
7. А. П. Момот, *Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики*, Формат, Санкт-Петербург (2006).
8. М. А. Соловьев, И. И. Тютрин, В. В. Удут, В. Ф. Клименкова, *Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях*, № 4, 55 – 60 (2013).
9. D. J. Angiolillo, S. Suryadevara, P. Capranzano, et al., *Catheter Cardiovasc Interv*, **73**(1), 1 – 14 (2009).
10. S. Halimeh, Gd. Angelis, A. Sander, et al., *Klin. Padiatr.*, **222**(3), 158 – 163 (2010).
11. P. M. Vila, M. U. Zafar, J. J. Badimon, *Platelets*, **20**(8), 531 – 538 (2009).

Поступила 02.10.13

## A NEW TECHNOLOGY FOR EVALUATING PHARMACODYNAMICS OF ANTIAGGREGANTS

I. I. Tyutrin<sup>1</sup>, V. F. Klimenkova<sup>2</sup>, and V. V. Udut<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Siberian State Medical University, Moskovskii Trakt 2, Tomsk, 634050, Russia

<sup>2</sup> Regional Perinatal Center, ul. Ivana Chernykh 96/1, Tomsk, 634036, Russia.

<sup>3</sup> Goldberg Institute of Pharmacology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Lenina 3, Tomsk, 634028, Russia.

The effect of antiaggregants on the system of regulation of the aggregative state of the whole blood in healthy volunteers has been studied using the global test of low-frequency piezothrombelastography. It is established that specific effects of antiaggregants are manifested in all stages of fibrinogenesis (initiation/amplification and propagation). According to the results of the global test at initial stages of hemocoagulation (initiation/amplification), a pronounced specific antiaggregative effect of COX-1 blockers and ADP receptors is accompanied by the intensification of thrombin activity and the formation of chronometric hypercoagulation. The blocker of phosphodiesterase, while losing a specific antiaggregative effect, has a lower influence on the change of thrombin activity, thus ensuring chronometric and structural hypocoagulation at the subsequent stages of fibrinogenesis. The proposed method can be used for real-time monitoring of the results of pharmacotherapy and drug effects at various stages of fibrinogenesis in the program of personalized antiaggregant therapy.

**Keywords:** antiaggregants; low-frequency piezothrombelastography; hemostatic potential; fibrinogenesis; personalized therapy