

УДК 615.47:616-072.7+615.2.03

И. И. Тютрин<sup>1</sup>, В. В. Удут<sup>2</sup>, О. А. Тарабрин<sup>3</sup>, Е. Ф. Малюгин<sup>1</sup>

**НОВАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ОЦЕНКИ  
ФАРМАКОДИНАМИКИ АНТИАГРЕГАНТОВ**

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет,  
Томск, Российская Федерация,

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

<sup>3</sup> 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 ( $25 \pm 3.1$ ) 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 (P2Y<sub>12</sub>) 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 (P2Y<sub>12</sub>) 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.

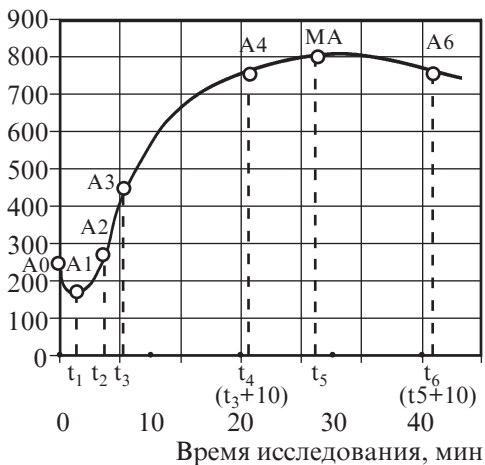


Рис. 1. Алгоритм определения и расчета анализируемых показателей низкочастотной пьезотромбоэластографии:

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

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  $t_2$  (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 MA 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]**

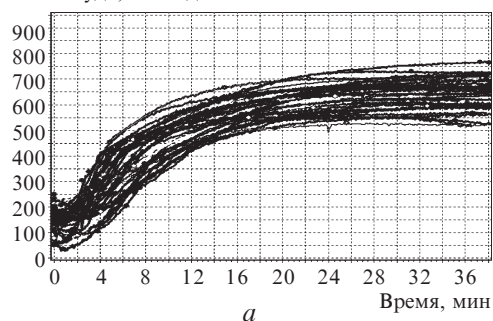
Показатель	Фон (до препарата), n=30	Кардио-магнил, n=10	Клопидогрель, n=10	Пентоксифиллин, n=10
A0, отн. ед.	187 [146; 212,5]	157 [129; 187]	156 [120; 235,5]	166 [130; 194]
A1, отн. ед.	148 [109; 177]	122 [115; 175]	130,5 [92; 168]	131 [113,5; 157]
t <sub>1</sub> , мин	0,7 [0,3; 0,9]	2,3 [1,5; 2,9]***	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 <sub>3</sub> (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 <sub>5</sub> (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.

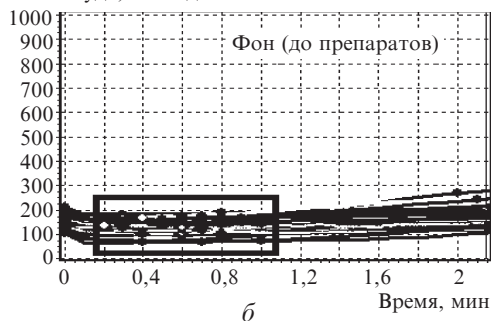
Таким образом, по результатам анализа «глобального» теста, реализованного в пробах цельной крови с использованием технологии НПТЭГ, получена информация об угнетении антиагрегантами начального этапа коагуляции собственно и представляющего специфическое действие препаратов. При этом выявлены различия их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

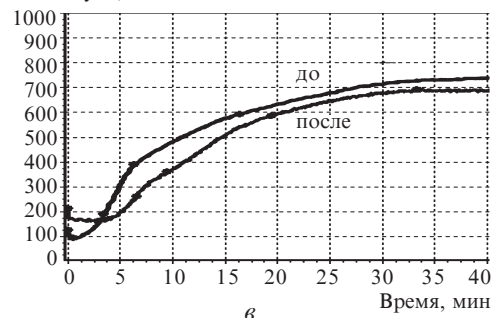
Амплитуда, отн. ед.



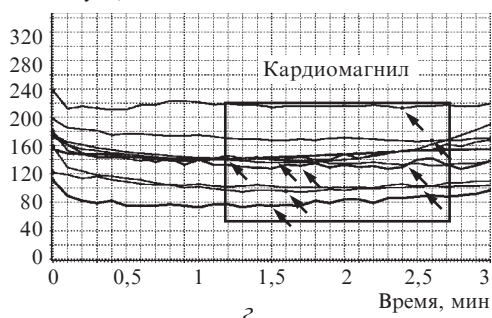
Амплитуда, отн. ед.



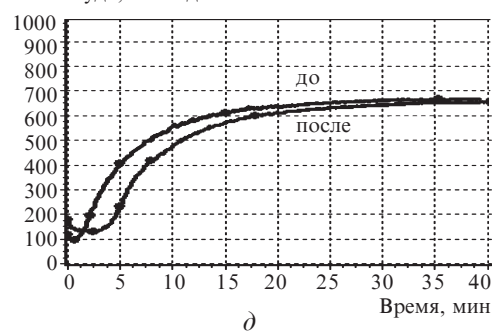
Амплитуда, отн. ед.



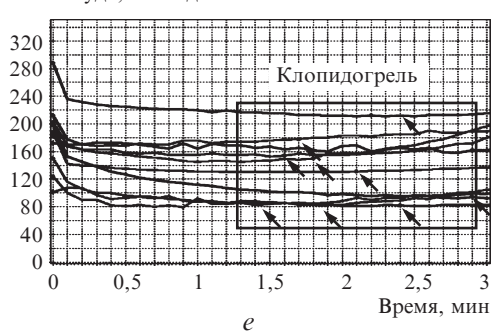
Амплитуда, отн. ед.



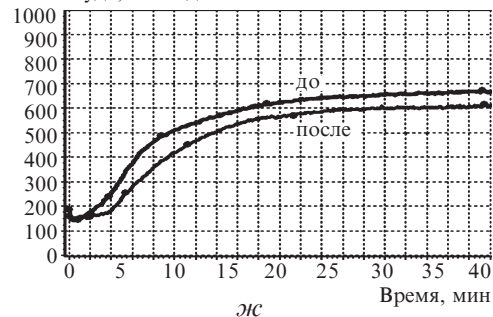
Амплитуда, отн. ед.



Амплитуда, отн. ед.



Амплитуда, отн. ед.



Амплитуда, отн. ед.

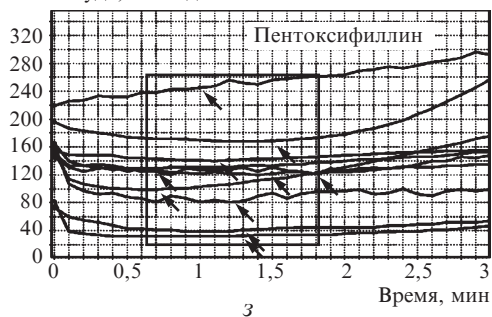


Рис. 2. Результаты низкочастотной пьезотромбоэластографии (а — фон до назначения препарата; в — до и после кардиомагнила; д — до и после клопидогреля; ж — до и после пентоксифиллина) и масштабированные участки низкочастотной пьезотромбоэластографии начальных этапов фибриногенеза (б — без препаратов; г — кардиомагнил; 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 претерпела изменений. В последующем, по результатам исследования агрегационной функции тромбоцитов, у него была выявлена аспиринорезистентность (рис. 3).

Амплитуда, отн. ед.

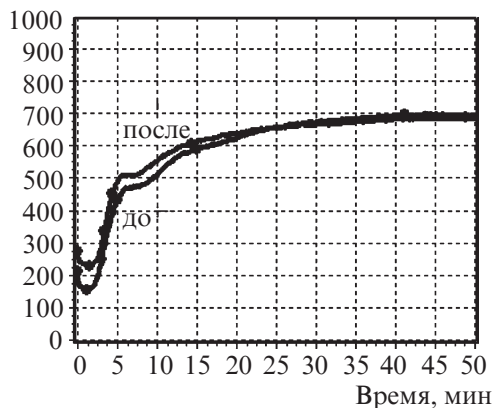


Рис. 3. Низкочастотная пьезотромбоэластография пациента до и после назначения кардиомагнила, демонстрирующая его аспиринорезистентность

## 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., Dzhaliilova 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*