

Механизмы влияния препарата «Озагрел» на агрегационную активность тромбоцитов

¹ Федеральный центр сердца, крови и эндокринологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург

² ЗАО «Вертекс», Санкт-Петербург

e-mail: lubov.vasina@gmail.com

Реферат

Целью данного исследования было изучение механизмов антиагрегантных свойств препарата «Озагрел» при воздействии различных индукторов агрегации на тромбоциты в цельной крови. Установлено, что ингибитор тромбосансинтазы «Озагрел» превосходит по своим антиагрегантным свойствам препарат сравнения аспирин в тестах коллаген- и эпинефрининдуцированной агрегации тромбоцитов. Таким образом, сочетание ингибиции тромбосансинтазы с подавлением ЦОГ-1 может иметь определенные клинические перспективы.

Ключевые слова: «Озагрел», аспирин, агрегация тромбоцитов, цельная кровь.

Vasina L. V.¹, Veselkina O. S.², Petrishchev N. N.¹

Mechanisms of the influence of «Ozagrel» on platelet aggregation

¹ V. A. Almazov Federal Center of Heart, Blood and Endocrinology

² ZAO «Vertex», Saint-Petersburg, Russia

e-mail: lubov.vasina@gmail.com

Abstract

Drug that inhibits thromboxane A₂ synthesis is used to reduce platelet aggregation. The aim of this study was to compare the effects of a thromboxane synthetase inhibitor («Ozagrel») and a cyclo-oxygenase (COX) inhibitor (acetylsalicylic acid) on platelet aggregation. The techniques used in this *in vitro* study were platelet aggregometry in whole blood. The effect of specific blockage of thromboxane synthetase «Ozagrel» can surpass the effect of acetylsalicylic acid in inhibiting the collagen and epinephrine-induced platelet aggregation. Thus, the combination of a thromboxane synthetase inhibitor and of a cyclo-oxygenase inhibitor may have some clinical perspective.

Keywords: «Ozagrel», acetylsalicylic acid, platelet aggregation, whole blood.

Введение

С 80 гг. прошлого века пристальное внимание исследователей привлекают со-азолилалкановые кислоты, обладающие высокой биологической активностью. Важное место среди антиагрегантов — препаратов, предупреждающих развитие тяжелых сердечно-сосудистых осложнений, снимающих бронхоспазм, занимают производные азолов, в первую очередь, имидазола, являющиеся агонистами ГАМК-рецепторов [13], ингибиторами тромбосансинтазы [6, 14], иммуномодуляторами [2]. В частности, к высокоселективным ингибиторам тромбосансинтазы относятся препараты «Озагрел» (2E)-3-[4-(1H-имидазол-1-илметил) фенил] акриловой кислоты натриевая соль (ММ 272,23) и дазоксiben [15].

В отношении дазоксибена в литературе имеются данные о его влиянии на АДФ-, коллаген-, тромбининдуцированную агрегацию тромбоцитов, а также агрегацию, индуцированную арахидоновой кислотой как в богатой тромбоцитами плазме, так и в цельной крови человека [11].

Влияние «Озагрел» на агрегацию тромбоцитов менее изучено, причем объектом исследования являлась только богатая тромбоцитами плазма [5, 10].

Цель исследования

Дальнейшее изучение механизмов антиагрегантных свойств препарата «Озагрел» при воздействии различных индукторов агрегации на тромбоциты в цельной крови, т. е. в присутствии других клеток и модуляторов гемостаза.

Материал и методы исследования

Исследование выполнялось на образцах крови практически здоровых доноров (n=6), лиц обоего пола в возрасте от 19 до 35 лет.

В пластиковую мерную центрифужную пробирку помещали 1,0 мл 3,8 %-го раствора трехзамещенного основного цитрата натрия с рН=7,4.

Пунктировали локтевую вену, собирали свободно вытекающую кровь, смесь немедленно перемешивали, не допуская образования воздушных пузырей.

Исследование индуцированной агрегации тромбоцитов проводили в течение 3-х часов после получения крови — это допустимый срок ее хранения при комнатной температуре для импедансного метода оценки функции тромбоцитов в цельной крови [8].

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты исследования влияния препарата «Озагрел» и аспирина на АДФ-, ристоцетин-, коллаген-, тромбин-, эpineфрининдуцированную агрегацию тромбоцитов, а также агрегацию, вызванную арахидоновой кислотой, приведены в табл. 1, 2.

Проведенное исследование показало, что препарат «Озагрел», как и аспирин, оказывал выраженное ингибирующее действие на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой. В тесте ристоцетин-индуцированной агрегации действие «Озагрел» проявлялось в меньшей степени, чем у аспирина, при максимальной концентрации 5,0 мкМ; тенденция к угнетению агрегации отмечалась при концентрации препарата 0,1 мкМ, тогда как у аспирина ингибирующий эффект сохранялся при концентрации 0,025 мкМ.

Препарат «Озагрел» в отличие от аспирина, не проявлял антиагрегантной активности в тесте с АДФ (аспирин оказывал достоверное по сравнению с контролем ингибирующее действие в концентрации 0,5 мкМ).

В тесте эpineфрин- и коллагениндуцированной агрегации тромбоцитов «Озагрел» полностью блокировал агрегацию в концентрации 5,0 мкМ, тогда как аспирин менее заметно влиял на коллагениндуцированную агрегацию и не влиял на эpineфрининдуцированную агрегацию тромбоцитов.

Оба препарата практически не влияли на тромбининдуцированную агрегацию тромбоцитов.

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что «Озагрел» по сравнению с аспирином, демонстрировал меньший антиагрегантный эффект в тестах АДФ- и ристоцетининдуцированной агрегации тромбоцитов, превосходя аспирин только в тестах с коллагеном и эpineфрином.

Количество тромбоцитов определяли на гематологическом анализаторе Coulter LH500 (Beckman Coulter Inc., США).

Для исследования индуцированной агрегации тромбоцитов использовали агрегометр импедансный 4-канальный, модель 590 (Whole Blood Aggregometer, Chrono-Log corporation, USA). Температура в ячейках пробо-подготовки агрегометра — +37 °С, термостабируемой исследуемой ячейки — +37 °С, скорость вращения магнитной мешалки — 1200 об./мин.

Влияние препарата «Озагрел» на функцию тромбоцитов оценивали в тестах с АДФ-, коллаген-, тромбин-, эpineфрин-, ристоцетин-индуцированной агрегации, а также агрегации, индуцированной арахидоновой кислотой. Использовали реагенты фирмы CHRONO-LOG. В качестве препарата сравнения был использован аспирин, механизм действия которого хорошо изучен. Для растворения веществ применяли Трис-НСI-буфер, рН=7,4. Антиагрегантные свойства аспирина и «Озагрел» исследовали в конечной концентрации 5,0; 0,5; 0,1; 0,05 и 0,025 мкмоль/мл крови.

В кювете смешивали 100 мкл препарата и 900 мкл цельной крови, стабилизированной 3,8 %-м цитрата натрия, после чего инкубировали в ячейке агрегометра при +37 °С 5 мин. Через 5 минут инкубации в кюветы вносили индукторы агрегации в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя (100 мкл тромбина — конечная концентрация 1,0 Unit/ml, 10,0 мкл эpineфрина — конечная концентрация 100,0 мкМ, 10 мкл АДФ — конечная концентрация 10 мкмоль, 2 мкл коллагена — конечная концентрация 2 мкг/мл, 8 мкл ристоцетина — конечная концентрация 1 мг/мл, 10 мкл арахидоновой кислоты — конечная концентрация 0,5 ммоль). Агрегацию тромбоцитов регистрировали до выхода кривой на плато.

Влияние препарата «Озагрел» на агрегацию тромбоцитов в цельной крови

Таблица 1

«Озагрел» С, мкМ, индуктор	Амплитуда (Om)					
	Контроль	0,025	0,05	0,1	0,5	5,0
АДФ, N6–24 Om	10,5±1,04	10,0±1,12	9,0±1,54	8,4±1,27	8,0±1,67	7,8±1,60
Ристоцетин, N>5Om	11,0±0,89	9,7±1,24	7,5±1,22	5,9±0,68*	3,2±0,75*	0,0*
Коллаген, N15–27 Om	16,5±1,04	15,9±0,97	15,6±0,81	15,4±0,82	15,3±0,51	0,0*
Арах. кислота, N5–17 Om	11,2±0,89	2,1±0,59*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Тромбин, Om	14,0±1,73	13,7±1,56	13,5±1,94	13,1±1,64	12,0±1,73	11,6±0,57
Эpineфрин, Om	9,8±1,47	8,9±1,27	8,8±1,39	8,2±1,55	5,0±1,26*	0,0*

* — значимо по отношению к контролю (p<0,05).

Влияние аспирина на агрегацию тромбоцитов
в цельной крови

Таблица 2

Аспирин	Амплитуда (Om)					
	Контроль	0,025	0,05	0,1	0,5	5,0
С, мкМ, индуктор						
АДФ, N6–24 Om	11,6±0,51	9,4±1,18	9,3±1,03	8,2±0,98	5,0±0,63*	3,5±0,54*
Ристоцетин, N>5Om	12,0±0,63	2,4±1,09*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Коллаген, N15–27 Om	16,3±1,36	15,9±1,31	16,1±1,16	15,8±1,42	9,2±1,03*	7,3±0,81*
Арах. кислота, N5–17 Om	11,6±0,51	1,0±0,75*	0,0*	0,0*	0,0*	0,0*
Тромбин, Om	13,8±1,35	13,8±1,85	12,3±0,75	12,1±1,04	11,8±0,57	10,2±0,72
Эпинефрин, Om	10,8±0,72	10,7±1,33	10,4±1,41	10,0±0,59	8,2±1,18	8,0±0,62

* — значимо по отношению к контролю (p<0,05).

В настоящее время установлено, что под влиянием индукторов агрегации реализуются три взаимосвязанных пути внутриклеточной передачи сигналов активации тромбоцитов: тромбоксановый, полифосфоинозитидный и протеин-тирозинкиназный [4].

Общим для всех путей при действии на тромбоциты различных индукторов агрегации является повышение уровня свободного цитоплазматического Ca²⁺.

В механизме агрегации тромбоцитов, индуцированной арахидоновой кислотой, главное значение имеет образование тромбоксана A2 (ТХА2).

Препарат «Озагрел», как и аспирин, относится к препаратам, ингибирующим тромбоксановый путь активации тромбоцитов, который начинается со стимуляции Ca²⁺-зависимой фосфолипазы A2. При этом под влиянием аспирина снижается активность ЦОГ-1 и образование лабильных простагландиновых эндоперексидов PGG2 и PGH2, субстрата для образования ТХА2, а «Озагрел» является селективным ингибитором тромбоксансинтазы [12]. Накапливаемые при этом лабильные простагландины PGG2 и PGH2 обладают проагрегантными свойствами, усиливая секрецию и необратимую агрегацию. Показано, что PGH2 способен связываться с тромбоксановым рецептором на мембране тромбоцитов с большей эффективностью, чем ТХА2, ослабляя антиагрегантное действие «Озагрел» [9].

В механизме тромбининдуцированной агрегации тромбоцитов имеют значение активация фосфолипазы Сβ и включение полифосфоинозитидного пути передачи сигнала, активация протеинкиназы С, генерация ионофоров инозитолтрифосфата и диацилглицерола (DAG), мобилизация внутриклеточного Ca. Отсутствие ингибиторного влияния как «Озагрел», так и аспирина, на тромбининдуцированную агрегацию тромбоцитов свидетельствует о том, что оба препарата не оказывают заметного влияния на фосфатидилинозитидный путь передачи сигнала и поэтому не блокируют эффекты сильного агониста тромбина.

К основным рецепторам, которые обеспечивают непосредственную связь тромбоцитов с коллагеном и имеют большое функциональное значение, относятся GPIa-IIa и GPVI. В результате кооперативного эффекта связи лигандов с этими рецепторами происходит стимуляция протеин-тирокиназного пути, фосфорилирование и стимуляция фосфолипазы Cγ2. Активация тромбоцитов коллагеном с последующей агрегацией включает и две положительные обратные связи, осуществляемые через тромбоксановый и полифосфоинозитидный пути. Последний стимулируется в результате активации фосфолипазы Cγ2, завершается мобилизацией внутриклеточного Ca²⁺ и индуцированием секреторной реакции с высвобождением АДФ. Повышение цитоплазматического Ca²⁺ приводит к активации фосфолипазы A2, образованию фосфолипидов плазматической мембраны (фосфатидилхолина и фосфатидилинозитола).

Препарат «Озагрел», как и аспирин, ингибировал ТХА2-зависимый механизм, но не оказывал влияния на протеин-тирозинкиназный и полифосфоинозитидный пути передачи сигналов. В концентрации 5,0 мкМ/мл антиагрегантный эффект «Озагрел» превосходил таковой у аспирина, однако аспирин проявлял способность ингибировать коллаген-индуцированную агрегацию почти в 2 раза и в концентрации 0,5 мкМ/мл. Исходя из вышеизложенного, «Озагрел», подобно аспирину, в больших концентрациях угнетает агрегацию, индуцированную коллагеном, посредством снижения тромбоцитарной секреции.

АДФ и адреналин (эпинефрин) относятся к слабым агонистам, вызывающим генерацию ТХА2 тромбоцитами и снижение уровня цАМФ. АДФ на тромбоцитарной мембране соединяется с тремя пуриnergическими рецепторами (P2X1, P2Y1 и P2Y12). Первый из них, P2X1 (ионотропный рецептор), ответственен за вход в клетку экзогенного Ca²⁺ и Na⁺, два других P2Y-рецептора сцеплены с G-протеинами, передающими сигнал стимуляции внутрь клетки. Через P2Y1 АДФ вызывает включение полифосфоин-

нозитидного пути передачи сигналов активации и увеличение в комплексе GPIIb-IIIa доступности мест связи для фибриногена, а через P2Y₁₂ – активацию тромбоксанового пути и ингибицию аденилатциклазы. Для развития полной агрегации при действии на тромбоциты АДФ необходимо соединение этого агониста с обоими P2Y-рецепторами [16].

В результате взаимодействия АДФ с рецепторами P2X₁ и P2Y обеспечивается одновременное включение нескольких линий передачи сигналов активации тромбоцитов, чем объясняется незначительный ингибирующий эффект аспирина на TXA₂-зависимый механизм и отсутствие такового у «Озагрел». Возможно, усиление антиагрегантного эффекта аспирина по сравнению с «Озагрел» обусловлено его способностью снижать в комплексе GPIIb-IIIa доступность мест связи для фибриногена [3].

Эпинефрин через протеин Giβγ стимулирует фосфолипазу A₂ и тромбоксановый путь активации тромбоцитов.

Тромбоциты в плазмалемме имеют α₂- и β₂-адренергические рецепторы. После связи α₂-рецепторов с их лигандом эпинефрином развиваются две реакции – ингибиция аденилатциклазы и индуцирование доступности фибриногеновых мест связи в GPIIb-IIIa с последующей агрегацией при потенцировании эффекта эпинефрина АДФ. Напротив, связь данного агониста с β₂-адренергическими рецепторами стимулирует аденилатциклазу и увеличивает в тромбоцитах уровень цАМФ. При блокаде «Озагрел» TXA₂-синтазы из лабильных простагландинов PGG₂ и H₂ в тромбоцитах могут образовываться в достаточном количестве стабильные простагландиновые ингибиторы PGE₂ и PGD₂, которые после связи с рецепторами EP₂ и DP тромбоцитарной мембраны, через Gsα-протеин также активируют аденилатциклазу, повышают уровень цАМФ, снижают уровень свободного цитоплазматического Ca²⁺ и ингибируют многие другие реакции активации тромбоцитов. Аспирин, блокируя тромбоксановый путь активации на уровне ЦОГ-1, в изученных концентрациях не влиял на эпинефрининдуцированную агрегацию тромбоцитов, поскольку отсутствовало местное антиагрегационное действие простагландиновых ингибиторов PGE₂ и PGD₂. Ристоцетин индуцирует связь GPIIb с фактором Виллебранда *in vitro*, так как вызывает необходимые

для ее осуществления конформационные изменения в факторе Виллебранда и тромбоцитарном рецепторе GPIIb-V-IX. Взаимодействие фактора Виллебранда с GPIIbα приводит к активации тромбоцитов, стимулируя перестройку цитоскелета и изменение формы клеток, их распластывание, агрегацию, секреторные реакции, сокращение актомиозина. Весьма важно, что после активации комплекс GPIIb-IX-V действует далее как классический сигнальный рецептор для тромбоцитарных интегринов GPIIbIIIa, что ведет к стабилизации агрегации и адгезии кровяных пластинок. Развитие доступности GPIIbIIIa является основой не только связи тромбоцитов с фибриногеном, но и с фактором Виллебранда, это опосредует распластывание тромбоцитов [4]. Активация тромбоцитов через рецепторы GPIIb-IX-V и GPVI приводит к запуску тромбоксанового пути передачи сигнала стимуляции, реакции высвобождения и агрегации [16]. Как свидетельствуют полученные нами данные, «Озагрел» в тесте ристоцетининдуцированной агрегации проявлял менее выраженные по сравнению с аспирином антиагрегантные свойства. По всей видимости, это обусловлено способностью аспирина не только ингибировать тромбоксановый путь активации тромбоцитов на уровне ЦОГ-1, но и уменьшать доступность рецепторных мест в GPIIb-IIIa как для фибриногена, так и для фактора Виллебранда.

Таким образом, установлено, что ингибитор тромбоксансинтазы «Озагрел» превосходил аспирин в тестах коллаген- и эпинефрининдуцированной агрегации тромбоцитов.

В настоящее время одним из направлений повышения эффективности антиагрегантной терапии является сочетанное применение препаратов, влияющих на различные механизмы агрегации тромбоцитов [7].

По данным литературы [1], до сих пор не удалось превзойти аспирин в его угнетающем действии на тромбоксан A₂, хотя в работе [17] продемонстрирована целесообразность одновременного использования малых доз аспирина и ингибитора тромбоксансинтазы «Озагрел» у больных с ишемическим инсультом. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что сочетание ингибиции тромбоксансинтазы с подавлением ЦОГ-1 может иметь определенные клинические перспективы.

Литература

1. Бокарев, И. Н. К 125-летию ацетилсалициловой кислоты / И. Н. Бокарев, Л. В. Попова // *Rational Pharmacother. Card.* — 2011. — Vol. 7. — № 4. — P. 492–500.
2. Сибиряк, С. В. Иммунотропная активность производных азолов и их конденсированных гетероциклических систем: обзор / С. В. Сибиряк [и др.] // *Хим. фарм. журн.* — 1990. — Т. 24. — Вып. 11. — С. 19–24.
3. Шутикова, А. С. Механизм действия ацетилсалициловой кислоты на процессы гемостаза / А. С. Шутикова // *Мед. акад. журн.* — 2003. — № 1. — С. 23–35.
4. Шутикова, А. С. Тромбоцитопатии, врожденные и приобретенные / А. С. Шутикова; под ред. Л. П. Папаян, О. Г. Головиной. — СПб.: ИИЦ ВМА, 2008. — 320 с.
5. Antithrombotic effects of FK41 novel nonpeptide platelet GP IIb/IIIa antagonist, in a guinea pig photochemically induced middle cerebral artery thrombosis model: comparison with ozagrel and argatroban / A. Moriguchi [et al] // *JPET.* — 2004. — Vol. 308. — № 3. — P. 1094–1101.
6. Ariei, K. The effect of ozagrel sodium on photochemical thrombosis in rat: therapeutic window and combined therapy with heparin sodium / K. Ariei, H. Igarashi, T. Ariei, Y. Katayama // *Life Sciences.* — 2002. — Vol. 71. — № 25. — P. 2983–2994.
7. Bhatt, D. L. Scientific and therapeutic advances in antiplatelet therapy / D. L. Bhatt, E. J. Topol // *Nature Reviews Drug Discovery.* — 2003. — № 2. — P. 15–28.
8. Cardinal, D. C. The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood / D. C. Cardinal, R. J. Flower // *J. Pharm. Meth.* — 1980. — № 1. — P. 135–158.
9. Defreyn, G. A thromboxane synthetase inhibitor reorients endoperoxide metabolism in whole blood towards prosta-cyclin and prostaglandin E2 / G. Defreyn, H. Deckmyn, J. Vermylen // *Thromb Res.* — 1982. — № 26. — P. 389–400.
10. Effect of ozagrel, a selective thromboxane A2-synthetase inhibitor, on cerebral infarction in rats. Comparative study with norphenazone, a free-radical scavenger / T. Imamura [et al] // *Arzneimittel-Forschung.* — 2003. — Vol. 53. — № 10. — P. 688–694.
11. Effects of the selective inhibition of platelet thromboxane synthesis on the platelet-subendothelium interaction / J. P. De La Cruz [et al] // *British. J. Pharm.* — 2002. — № 137. — P. 1082–1088.
12. Effects of thromboxane A2 synthase inhibitors (CV-4151 and ozagrel), aspirin, and ticlopidine on the thrombosis caused by endothelial cell injury / Z. Terashita [et al] // *Thromb Res.* — 1995. — Vol. 77. — № 5. — P. 411–421.
13. Heterocyclic GABA analogues. Displacement of radiolabelled 3H-GABA from rat brain membrane preparations / M. Varasi [et al] // *Farmacology.* — 1987. — Vol. 42. — № 6. — P. 425–435.
14. Iizuka, K. Highly selective inhibitors of thromboxane synthetase. 1. Imidazole derivatives / K. Iizuka [et al] // *J. Med. Chem.* — 1981. — Vol. 24. — № 10. — P. 1139–1148.
15. Kamijo, T. An improved and convenient procedure for the synthesis of 1-substituted imidazoles / T. Kamijo [et al] // *Chem. Pharm. Bull.* — 1983. — Vol. 31. — № 4. — P. 1213–1221.
16. Lefkovits, J. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine / J. Lefkovits, E. F. Plow, E. J. Topol // *N. Engl. J. Med.* — 1995. — Vol. 332. — P. 1553–1559.
17. Thromboxane A2 synthetase inhibitor plus low dose aspirin: can it be a salvage treatment in acute stroke beyond thrombolytic time window / G. Hwan An [et al] // *J. Korean. Neurosurg. soc.* — 2011. — № 50. — P. 1–5.