



УКРАЇНА

(19) UA (11) 11852 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 31/60
G01N 33/48

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ПРОЦЕС ДИФЕРЕНЦІЙОВАНОГО ПРИЗНАЧЕННЯ АНТИАГРЕГАНТІВ У ТЕРАПІЇ ХВОРИХ НА ІШЕМІЧНУ ХВОРОБУ СЕРЦЯ

1

(21) u200506355

(22) 29.06.2005

(24) 16.01.2006

(46) 16.01.2006, Бюл. № 1, 2006 р.

(72) Волков Володимир Іванович, Рябуха Владислав Валерійович, Запровальна Ольга Євгенівна, Ладний Андрій Іванович, Ченчик Тетяна Олександрівна

(73) ІНСТИТУТ ТЕРАПІЇ ІМ. Л. Т. МАЛОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ, Волков Володимир Іванович, Рябуха Владислав Валерійович, Запровальна Ольга Євгенівна, Ладний Андрій Іванович, Ченчик Тетяна Олександрівна

(57) Процес диференційованого призначення антиагрегантів у терапії хворих на ішемічну хворобу серця, який включає дослідження до лікування індивідуальної чутливості хворих до антиагрегантів з використанням методики агрегації тромбоцитів *in vitro*, визначення і оцінку інформаційного показника ступеня агрегації тромбоцитів до та після введення антиагрегаційного препарату та індуктора у паралельні проби крові, який **відрізняється** тим, що як антиагрегаційний препарат використо-

2

вують ацетилсаліцилову кислоту, як індуктор агрегації використовують адреналін, здійснюють кількісну оцінку інформаційного показника ступеня агрегації тромбоцитів за формулою $CIAT = (E_1 - E_2) / (E_1 - E_{бідн.})$, де:

CIAT - сумарний індекс агрегації тромбоцитів;

E_1 - оптична щільність багатої на тромбоцити плазми до агрегації;

E_2 - оптична щільність багатої на тромбоцити плазми після агрегації;

$E_{бідн.}$ - оптична щільність бідної на тромбоцити плазми;

та, якщо, у порівнянні з контрольною пробою крові, значення CIAT

зменшується більш, ніж на 25 %, то як антиагрегаційний препарат призначають ацетилсаліцилову кислоту, якщо CIAT зменшується менш, ніж на 10-15%, призначають комбінацію антиагрегантів: ацетилсаліцилову кислоту з тієнопіридином, якщо CIAT зменшується менш, ніж на 5 % або не змінюється зовсім, то призначають тієнопіридин, препарати призначають у ефективних терапевтичних дозах.

Корисна модель відноситься до галузі медицини, а саме до кардіології і може бути використана у клінічних умовах для індивідуального підбору антиагрегаційних лікарських препаратів та профілактики тромбозів і судинних катастроф у терапії хворих, зокрема хворих на ішемічну хворобу серця (ІХС).

Розвиток загострень ІХС (інфаркт міокарда, нестабільна стенокардія) на тлі призначення антиагрегаційних препаратів у терапії цієї категорії хворих - актуальна проблема, яка зумовлює необхідність розробки ефективних способів профілактики атеротромбозу та диференційного лікування.

Відомий спосіб профілактики тромбозів, у якому у якості антиагрегаційного препарату призначають ацетилсаліцилову кислоту (АСК). При цьому блокується агрегація тромбоцитів, пов'язана з синтезом тромбоксану Ag [Hayden M., Pignone M.,

Phillips C., Mulrow C. Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events: A summary of the evidence for the US Preventive Services Task Force // AN. Intern. Med. - 2002. - V.1. - P.157-172].

Відомо, що у деяких хворих відзначається відсутність чутливості до ацетилсаліцилової кислоти. Недоліком є те, що у способі не передбачається оцінка індивідуальної чутливості до призначення антиагрегаційного препарату. Резистентність до аспірину формується за допомогою активації альтернативних механізмів активуючих тромбоцити, яка не пов'язана з недостатнім пригніченням тромбоксанового шляху активації тромбоцитів [K.Andersen et al., 2003г.]. Дослідження резистентності до аспірину в значній мірі гальмується відсутністю в клініці методів її адекватної діагностики.

Відомий також „Способ исследования антиагрегационного действия препаратов с помощью

(13) U

(11) 11852

(19) UA

определения агрегации тромбоцитов in vitro" [патент РФ 2 188 419, МПК G01N 33/15,33/86, опубл.27.08.2002.], обраний нами за прототип.

Спосіб включає дослідження антиагрегаційної дії препаратів за допомогою визначення агрегації тромбоцитів in vitro. Визначення та оцінку інформаційного показника ступеня агрегації тромбоцитів здійснюють до та після введення антиагрегаційного препарату та індуктора агрегації у паралельні проби крові. У якості індуктора агрегації використовують аденозін дифосфат (АДФ). Записують криву агрегації тромбоцитів у агрегометрі на протязі 5 хвилин. Таким чином вимірюють АДФ-АТ у паралельних пробах до введення препарату та після його введення. Додатково при цьому використовують тест-систему з антиагрегаційних препаратів, які мають різні механізми антиагрегаційної дії на тромбоцити. Інформаційний показник розраховують по кожному тесту і за результатами розрахунку вибирають найбільш ефективний препарат для призначення хворому.

Недоліком є те, що індуктор АДФ доцільно використовувати для контролю за специфічними інгібіторами АДФ-агрегації тромбоцитів (тієнопірідинами), які суттєво блокують цей механізм агрегації, тоді як АСК блокує, насамперед, шлях, пов'язаний з метаболізмом арахідонової кислоти, що вивільнюється з мембран фосфоліпідів, та призводить до утворення тромбосану A_2 . Таким чином АДФ-індукована агрегація тромбоцитів недостатньо об'єктивно відображає дезагрегаційні можливості АСК.

В основу корисної моделі поставлена задача об'єктивізації дослідження дезагрегаційних можливостей АСК, що дозволить до лікування виявляти хворих з аспіринорезистентністю та здійснювати диференційований підхід до призначення антиагрегантів та їх комбінацій. Це, в свою чергу, забезпечить профілактику атеротромбозів та судинних катастроф у хворих, зокрема хворих на ІХС.

Ця задача вирішується у корисній моделі, яка включає дослідження до лікування індивідуальної чутливості хворих до антиагрегантів з використанням методики агрегації тромбоцитів in vitro, визначення і оцінку інформаційного показника ступеня агрегації тромбоцитів до та після введення антиагрегаційного препарату та індуктора у паралельні проби крові. Відрізняючими ознаками, у порівнянні з прототипом, є те, що:

- у якості антиагрегаційного препарату використовують ацетилсаліцилову кислоту;
- у якості індуктора агрегації використовують адреналін;

- здійснюють кількісну оцінку інформаційного показника ступеня агрегації тромбоцитів за формулою $CIAT = (E_1 - E_2) / (E_1 - E_{\text{бедн.}})$, де:

$CIAT$ - сумарний індекс агрегації тромбоцитів;

E_1 - оптична щільність багатоклітинних тромбоцитів плазми до агрегації;

E_2 - оптична щільність багатоклітинних тромбоцитів плазми після агрегації;

$E_{\text{бедн.}}$ - оптична щільність бідноклітинних тромбоцитів плазми;

- і якщо, у порівнянні з контрольною пробю

крові, значення $CIAT$ зменшується більш, ніж на 25%, то у якості антиагрегаційного препарату призначають АСК;

- якщо $CIAT$ зменшується менш, ніж на 10-15%, призначають комбінацію антиагрегантів: ацетилсаліцилову кислоту з тієнопіридином;

- якщо $CIAT$ зменшується менш, ніж на 5%, або не змінюється зовсім, то призначають тієнопіридин, при цьому препарати призначають у ефективних терапевтичних дозах.

Вибір у якості індуктора агрегації адреналіну, оцінка сумарного індексу агрегації та визначені у власних дослідженнях певні кількісні значення цього показника дозволяють виявити до лікування групу хворих з аспіринорезистентністю та розробити диференційований підхід до призначення антиагрегаційних лікарських препаратів у терапії хворих на ІХС, що забезпечить профілактику атеротромбозів та судинних катастроф.

Доцільність вибору у якості індуктора агрегації адреналіну обумовлена тим, що за допомогою адреналін-індукованої агрегації тромбоцитів виявляють функціональну активність тромбоцитів, основними параметрами якої є:

- підвищення ступеня та збільшення швидкості первинної агрегації;

- прискорення фази секреції;

У мембрані тромбоцитів під впливом адреналіну відбувається активація фосфоліпази, яка з фосфоліпідів мембрани звільняє арахідонову кислоту - попередника простагландинів, які викликають агрегацію тромбоцитів. Під впливом тромбосансинтети з арахідонової кислоти утворюється тромбосан A_2 (TXA_2) - один з найдужчих індукторів агрегації тромбоцитів, який володіє до того ж судинозвужувальним ефектом. АСК діє головним чином, впливаючи на біосинтез циклічних простагландинів: TXA_2 й ін. простагландинів. Він інгібує ЦОГ-1 шляхом ацетилювання серин-530 та індукує тривалий функціональний дефект у тромбоцитах. Виникаючи у результаті зниження продукції TXA_2 пояснює більшу частину антитромботичного ефекту АСК. Крім цього, пригнічення тромбоцитів, як показує агрегометрія, відбувається дуже швидко: протягом 5хв після прийому 320mg ацетилсаліцилової кислоти з їжею. Інгібування тромбоцитарної ЦОГ-1 підтверджує кардіозахисний ефект АСК [The antithrombotic profile of aspirin. Aspirin resistance, or simply failure? Thrombosis Journal 2004, 2:1].

Дослідження процесу, який пропонується, проведені в клініці Інституту терапії імені Л.Т. Малої АМН України, м. Харків на 40 хворих на ІХС (19 чоловіків та 21 жінка). Для порівняння використовують кров 15 здорових добровольців. Відтвореність дослідження складає 94,9%.

Корисну модель, що заявляють, здійснюють таким чином:

1. У процесі диференційованого призначення антиагрегантів у терапії хворих на ішемічну хворобу серця до лікування досліджують індивідуальну чутливість до антиагрегантів. При цьому використовують методику агрегації тромбоцитів in vitro. Визначають та оцінюють інформаційний показник ступеня агрегації тромбоцитів до та після введення

ня антиагрегаційного лікарського препарату та індуктора у паралельні проби.

Для цього венозну кров змішують з 3,8% розчином цитрату натрію у співвідношенні 9:1 (4,5мл крові з 0,5мл цитрату).

Далі готують збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) шляхом центрифугування на протязі 9 хвилин при 1000 обертів на хвилину (140-160g). Кількість тромбоцитів ЗТП не повинна перевищувати $200-300 \times 10^9$ /л. Готують бідну тромбоцитами плазму (БТП), яку центрифугують при швидкості 3000-4000 обертів на хвилину (1200-1400g). Проводять калібровку агрегометра А-1 згідно інструкції.

ЗТП (900мкл) вносять паралельно у 2 кювети агрегометра та прогрівують протягом 1 хвилини при постійному перемішуванні за допомогою електромагнітної мішалки (900 обертів на хвилину) при температурі 37°C.

2. Згідно корисної моделі, у якості антиагрегаційного лікарського препарату використовують АСК. У якості індуктора агрегації використовують адреналін.

Для визначення аспіринорезистентності в одну із кювет додають розчин ацетилсаліцилової кислоти у кінцевій концентрації в кюветі 25мМ з розрахунку її максимальної концентрації у плазмі після прийому 325мг аспірину та проводять інкубацію на протязі 10 хвилин у термостаті з електромагнітною мішалкою (900 обертів на хвилину) при температурі 37°C.

Агрегацію тромбоцитів вимірюють за відомим методом Борна [Born G.V.R., J. Physiol., 1963, v.168, p.178] послідовно у 1-й та 2-й кюветі. На початку запису (через 1-й хв.) вносять індуктор - адреналін, в кінцевій концентрації в кюветі 2,5мкг/мл та проводять реєстрацію агрегації тромбоцитів на агрегометрі протягом 10хв. Вимірюють оптичну щільність БТП.

3. Визначають та здійснюють кількісну оцінку сумарного індексу агрегації тромбоцитів (CIAT) за вищенаведеною формулою.

4. І якщо, у порівнянні з контрольною пробю крові, значення CIAT зменшується більш, ніж на 25%, то у якості антиагрегаційного препарату призначають ацетилсаліцилову кислоту.

Якщо CIAT зменшується менш, ніж на 10-15%, призначають комбінацію антиагрегантів: ацетилсаліцилову кислоту з тієнопіридином.

Якщо CIAT зменшується менш, ніж на 5% або не змінюється зовсім, то призначають тієнопіридин, при цьому препарати призначають у ефективних терапевтичних дозах.

Можливість здійснення запропонованої корисної моделі підтверджується прикладами.

Приклад №1

Хворий К., 51 рік, історія хвороби №379.

Знаходився на лікуванні у інфарктному відділенні Інституту терапії імені Л.Т. Малої АМН України з діагнозом:

ІХС. Стабільна стенокардія напруги, III функціональний клас. Постінфарктний (2002) кардіосклероз. СН II-A зі збереженою систолічною функцією лівого шлуночка, III ФК.

Діагноз ІХС підтверджувався перенесенням інфарктом міокарду, характерною клінічною карти-

ною, позитивним ВЕМ-тестом.

Згідно корисної моделі у хворого визначили CIAT, індукованої адреналіном, який дорівнював 65%. Після додання розчину ацетилсаліцилової кислоти CIAT зменшився на 37%. Цей факт засвідчує про високу індивідуальну чутливість до дезагрегаційної дії ацетилсаліцилової кислоти, тому у якості дезагреганту було призначено тільки ацетилсаліцилову кислоту у дозі 100мг/добу. Контрольне обслідування через 2 місяця показало високу ефективність монотерапії ацетилсаліциловою кислотою: показник CIAT, індукованої адреналіном, зменшився на 48% від початкового, та відповідав нормальному рівню. В подальшому, з метою профілактики тромботичних ускладнень ІХС рекомендовано постійний прийом ацетилсаліцилової кислоти в дозі 100мг/добу.

Приклад №2

Хворий Г., 67років, історія хвороби №3574.

Знаходився на лікуванні у інфарктному відділенні Інституту терапії імені Л.Т. Малої АМН України з діагнозом:

ІХС. Нестабільна стенокардія (прогресуюча стенокардія напруги) без підйому сегменту ST. Постінфарктний кардіосклероз. СН IIA, зі збереженою систолічною функцією лівого шлуночка, ПФК.

Діагноз ІХС підтверджувався перенесенням інфарктом міокарду, нестабільність стенокардії було встановлено на підставі характерної клінічної картини (зростання кількості та інтенсивності нападів стенокардії, збільшення потреби до нітрогліцерину у 3 рази, зниження толерантності до фізичного навантаження протягом останнього тижня).

Згідно корисної моделі, було оцінено CIAT, індукованої адреналіном, який дорівнював 74%. Після додання розчину ацетилсаліцилової кислоти CIAT зменшився на 17%. Це факт засвідчує про знижену індивідуальну чутливість до дезагрегаційної дії ацетилсаліцилової кислоти, тому у якості дезагреганту було призначено ацетилсаліцилову кислоту у дозі 100мг/добу у поєднанні з клопідогрелом 75мг/добу.

Контрольне обслідування через 2 місяця показало високу ефективність комбінованої терапії, показник CIAT, індукованої адреналіном, зменшився на 51% від початкового, та відповідав нормальному рівню. В подальшому, з метою профілактики тромботичних ускладнень ІХС рекомендовано постійний прийом ацетилсаліцилової кислоти у дозі 100мг/добу у поєднанні з клопідогрелом 75мг/добу.

Приклад №3

Хворий О., 53 роки, історія хвороби №3997.

Знаходився на лікуванні у інфарктному відділенні Інституту терапії імені Л.Т. Малої АМН України з діагнозом:

ІХС. Гострий Q-негативний задній інфаркт міокарду. СН IIA, зі збереженою систолічною функцією лівого шлуночка, ПФК.

Діагноз інфаркту міокарду верифікований за ЕКГ та біохімічними критеріями.

Згідно корисної моделі у хворого у перші часи було оцінено CIAT, індукованої адреналіном, який дорівнював 79%. Після додання розчину ацетилсаліцилової кислоти CIAT зменшився на 3%. Це

засвідчує про відсутність індивідуальної чутливості до дезагрегаційної дії ацетилсаліцилової кислоти. Цей факт також підтверджується анамнестичними даними, бо до надходження у клініку пацієнт постійно протягом року приймав ацетилсаліцилову кислоту у дозі 100мг/добу. Тому у якості дезагреганту призначаємо тільки клопідогрель у дозі 75мг/добу.

Технічний результат. Таким чином, викорис-

тання корисної моделі у клінічній практиці, у порівнянні з прототипом, дозволяє виявляти до лікування хворих з аспіринорезистентністю та здійснювати диференційований підхід до призначення антиагрегантів та їх комбінацій. Це забезпечить профілактику атеротромбозів та судинних катастроф у терапії хворих, зокрема хворих на ішемічну хворобу серця.