

ЕФЕКТ И ИНТЕРАКЦИЈА АСПИРИНА И ТИКЛОПИДИНА НА ХЕМАТОЛОШКЕ ВАРИЈАБЛЕ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИХ ПАЦОВА

Станојевић З.¹, Митић Р.¹, Несторовић В.², Ваљаревић Д.³, Хаџистевић С.¹

¹Институт за фармакологију и токсикологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

²Институт за физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

³Одсек за математику, Природно-математички факултет Приштина, Косовска Митровица

THE EFFECT AND INTERACTION ASPIRIN AND TICLOPIDINE ON HEMATOLOGICAL VARIABLES IN RATS

Станојевић З.¹, Митић Р.¹, Несторовић В.², Ваљаревић Д.³, Хаџистевић С.¹

¹Institute of Pharmacology and Toxicology, Medical Faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

²Institute of Physiology, Medical Faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

³Department of mathematics, Faculty of Natural Sciences and mathematics Pristina, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

The combination of aspirin and ticlopidine has been proven to reduce the frequency of haemorrhagic and vascular complications after coronary artery stenting, but also can cause serious hematological side effects. The purpose of this study was to evaluate the effect and interactions aspirin and ticlopidine on hematological variables. Thirty two Wistar rats were divided in four groups and they received intraperitoneal one of the following treatments for 4 days: group I - control, group II - aspirin (50 mg/kg BM), group III - ticlopidine (125 mg/kg/day) and group IV - aspirin+ticlopidine combination (50 mg/kg/day+125 mg/kg/day). Hematological variables were determined at once after taking the sample of blood. Relationship between measured variables was determined by calculating linear correlation coefficient (r). The hematocrit, haemoglobin and red blood cell were significantly decreased in group treated with aspirin+ticlopidine combination compared to control ($p < 0,05$). Neutrophil and platelet count weren't significantly different in treated groups, but were slightly decreased in groups treated with ticlopidine and aspirin+ticlopidine combination. Between hematocrit and platelet count in control group of rats was noticed negative and medium correlation ($r = -0,41$), in groups treated with ticlopidine and aspirin+ticlopidine combination positive and medium correlation ($r = 0,52$; $r = 0,69$). Based on obtained results it can be observed significant decreased hematocrit, haemoglobin and red blood cell in group treated with aspirin+ticlopidine combination. The negative correlation between hematocrit and platelet count in control group becomes positive after the treatment with ticlopidine alone and aspirin+ticlopidine combination.

Key words: aspirin; ticlopidine; hematological variables; rats

САЖЕТАК

Комбинација аспирина са тиклопидином доказано смањује учесталост хеморагијских и васкуларних компликација после уградње коронарног стента, али такође може да изазове озбиљна хематолошка нежељена дејства. Циљ овог рада био је да испитамо ефекте и интеракције аспирина и тиклопидина на хематолошке варијабле. Испитивање је спроведено на белим лабораторијским пацовима соја Вистар. Тридесет две животиње, подељене у четири групе добијале су одговарајуће дозе испитиваних супстанци, интраперитонеално, континуирано током четири дана: I - контролна група, физиолошки раствор (1 мл/кг ТМ), II - група, аспирин (50 мг/кг ТМ), III - група, тиклопидин (125 мг/кг ТМ), IV - група, комбинацију аспирин+тиклопидин (50 мг/кг+125 мг/кг ТМ). Хематолошке варијабле одређиване су одмах након узимања узорка крви. Међусобна повезаност између две мерене варијабле одређивана је израчунавањем коефицијента линеарне корелације (r). Вредност хематокрита, концентрација хемоглобина и број еритроцита код животиња третираних комбинацијом аспирин+тиклопидин биле су статистички значајно смањене у односу на контролну групу ($p < 0,05$). Број неутрофила и тромбоцита је био незнатно смањен у групама третираним тиклопидином и комбинацијом аспирин+тиклопидин, али без статистичке значајности. Између вредности хематокрита и броја тромбоцита забележена је, код контролне групе пацова негативна и средња корелација ($r = -0,41$), код пацова третираних тиклопидином и комбинацијом аспирин+тиклопидин позитивна и средња корелација ($r = 0,52$) и ($r = 0,69$). На основу добијених резултата може се уочити значајно снижење вредности хематокрита, концентрације хемоглобина и броја еритроцита у групи третираној комбинацијом аспирин+тиклопидин. Негативна корелација између хематокрита и броја тромбоцита у контролној групи постаје позитивна након третирања тиклопидином и комбинацијом аспирин+тиклопидин.

Кључне речи: аспирин; тиклопидин; хематолошке варијабле; пацови

УВОД

Према све већем броју спроведених епидемиолошких и клиничких студија, може се уочити да је интерес за тромбоемболијска збивања последњих деценија веома велик. Суочена са чињеницом да мождани удар, транзиторни исхемијски атак (ТИА), инфаркт срца, изненадна смрт срчаног порекла, као и друге последице везане за оштећење крвних судова представљају један од најактуелнијих медицинских проблема данашњице, наука тражи излаз у примени антиромбоцитних лекова.

Аспирин још увек влада као антиромбоцитни лек у многобројним протоколима, мада је његова антиромбоцитна активност ограничена јер инхибише мали број метаболичких супстанци (иреверзибилно инхибира синтезу тромбоксана А₂ од стране тромбоцита и ендотела крвних судова) које подстичу тромбоцитну активацију. Тиклопидин, слично аспирину, блокира само један пут активације тромбоцита (иреверзибилно инхибира систем рецептора за АДП-аденилциклаза-АТФ на мембрани тромбоцита), па такође спада у лекове уског спектра дејства. Међутим, дати у комбинацији показују већу ефикасност у односу на њихову појединачну примену због узајамног потенцирања антиагрегационих ефеката (1). Тако је нпр. комбинација аспирина са тиклопидином после уградње коронарног стента била изванредно ефикасна у смањивању учесталости хеморагијских и васкуларних компликација (2). Према истраживањима Rupprecht-а и сар. (1998), примена комбинације аспирина са тиклопидином, код 61 пацијента после уградње коронарног стента, била је изванредно ефикасна у спречавању компликација тромбозе у поређењу са њиховом појединачном применом (3). У складу са овим су и налази Berger-а и сар. (1999), који су такође код исте категорије болесника применили комбинацију аспирина са тиклопидином (n=827) и клопидогрелом (n=500), и установили високу и једнаку ефикасност оба третмана, али бољу подношљивост клопидогрела (4). Међутим, новија клиничка испитивања указују да, комбинација аспирина са тиклопидином значајно смањује кардиоваскуларни и укупни морталитет након уградње коронарног стента, у односу на комбиновану примену аспирина са клопидогрелом (5).

Иако се терапија аспирином и тиклопидином показала као врло захвална у терапији претходно наведених стања, комбинована примена ових лекова, с друге стране за собом повлачи одређене ризике и повећава учесталост нежељених дејстава (хематолошки поремећаји, гастро сметње, хепатотоксичност) (6). Највећа опасност од примене аспирина проистиче из могућности настанка крварења и још увек не постоји ни један предиктивни тест на основу којег би се предвидело да ли ће при једној одређеној дози болесник крварити или неће. Тиклопидин у терапијским дозама може да изазове веома опасну неутропенију и агранулоцитозу, због чега не може да се сврста у лек првог реда. Сматра се да неутропенија и агранулоцитоза настају као резултат директног токсичног деловања тиклопидина на прекурсорне гранулоцитне лозе у костној сржи (7).

Имајући у виду предности и мане наведених лекова, методолошку неуједначеност истраживања, чињеницу да су протективни ефекти досадашњих стратегија свега 20%, као и терапијске дилеме које се односе на дозирање и потенцијалне комбинације којима би се, евентуално, побољшали протективни ефекти у тромбоемболијској болести, потребно је спровести даља истраживања како би се многе недоумице разјасниле.

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ рада био је да испитамо ефекте и интеракције аспирина и тиклопидина на хематокрит, хемоглобин, број еритроцита, број тромбоцита и неутрофила, након њихове четвородневне апликације код пацова.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Испитивање је спроведено на белим лабораторијским пацовима соја Вистар, мушког пола, телесне масе 222-265 грама, старости 2-3 месеца. Пацови су били из окота узгојених на фарми лабораторијских животиња ВМА у Београду. Животиње су користиле храну коју производи Ветеринарски завод у Земуну.

На Институту за фармакологију и токсикологију Медицинског факултета - Приштина, боравиле су најмање седам дана пре почетка огледа. Животиње су биле смештене у просторији која је проветравана више пута у току дана и осветљавана 14 сати дневно. Током целог дана животиње су имале слободан приступ води и храни.

За реализовање постављених циљева употребљене су 32 животиње, подељене у четири групе. Свака група је добијала одговарајуће дозе испитиваних супстанци континуирано током четири дана:

I - контролна група, физиолошки раствор (1 мл/кг, и.п.)

II - група, аспирин (50 мг/кг ТМ и.п.)

III - тиклопидин (125 мг/кг и.п.)

IV - група, комбинацију аспирин+тиклопидин (50 мг/кг + 125 мг/кг и.п.).

Дозе употребљених супстанци утврђене су Кларк-овом формулом, као и на основу досадашњих публикованих података са сличним истраживањима.

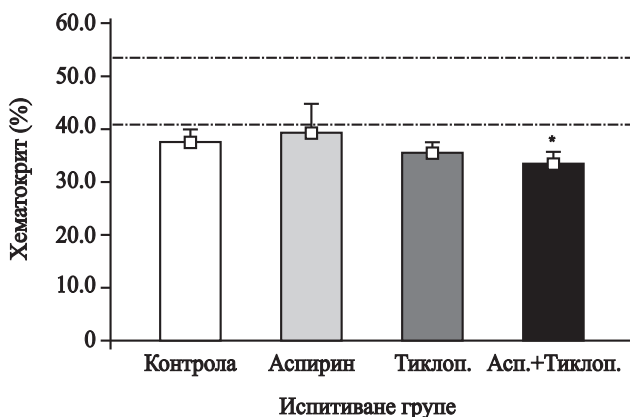
Аспирин и тиклопидин су претходно растварани у физиолошком раствору. Нови раствори прављени су свакодневно.

Након последње апликације лекова по унапред утврђеном протоколу, уследило је узимање узорка крви (под етар анестезијом). Узета крв је центрифугирана. Хематолошке варијабле одређиване су по референтним методама опште прихваћеним у експерименталној и клиничкој медицини.

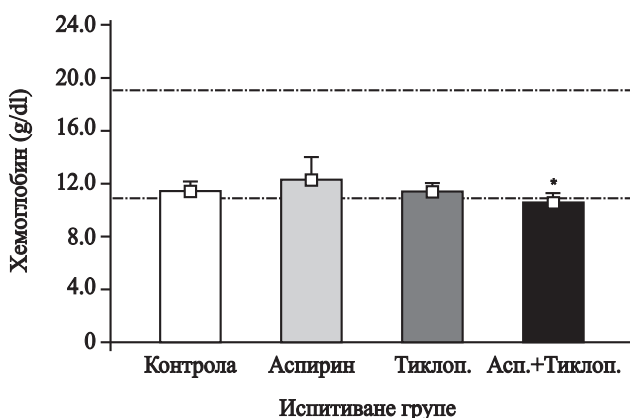
Тестирање статистичке значајности разлика између средњих вредности извршено је Студент т-тестом за мале и независне узорке. Међусобна повезаност између две мерене варијабле одређивана је израчунавањем коефицијента линеарне корелације (r). Критеријум за статистичку значајност био је $p < 0,05$; $p < 0,01$ и $p < 0,001$.

РЕЗУЛТАТИ РАДА

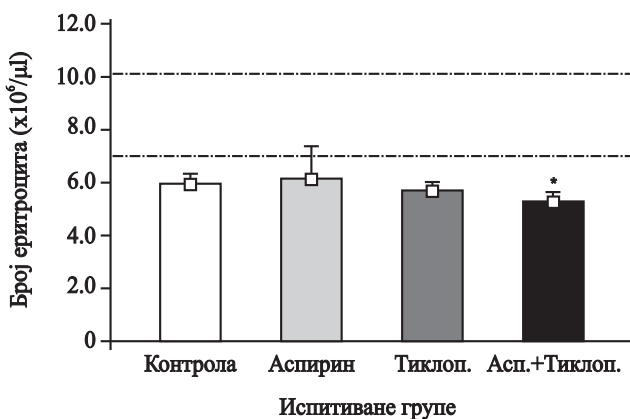
Вредност хематокрита код животиња третираних комбинацијом аспирина+тиклопидина била је статистички значајно смањена у односу на контролну групу ($p < 0,05$). (Графикон 1)



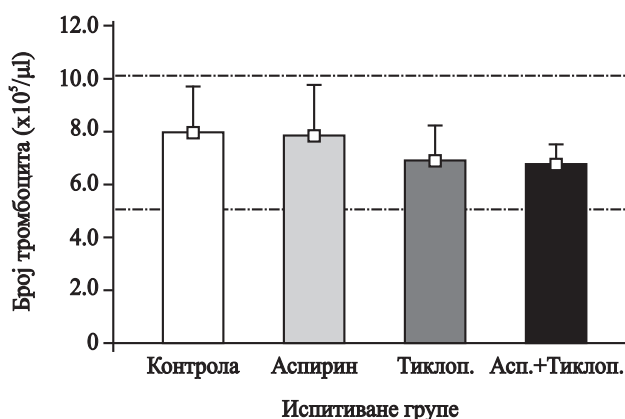
Графикон 1. Вредност хематокрита у испитиваним групама пацова.



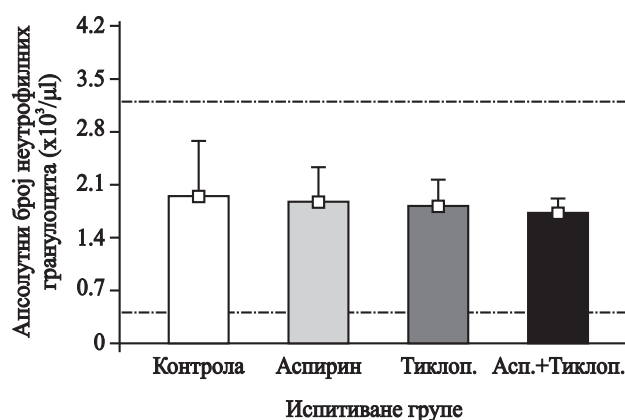
Графикон 2. Вредност хемоглобина у испитиваним групама пацова



Графикон 3. Вредност еритроцита у испитиваним групама пацова



Графикон 4. Вредност тромбоцита испитиваним групама пацова



Графикон 5. Вредност апсолутног броја неутрофилних гранулоцита у испитиваним групама пацова

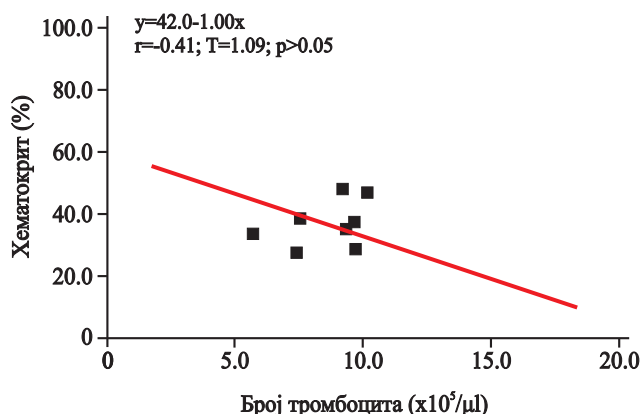
Концентрација хемоглобина код животиња третираних комбинацијом аспирина+тиклопидина била је статистички значајно смањена у односу на контролну групу ($p < 0,05$). (Графикон 2)

Код животиња третираних комбинацијом аспирина+тиклопидина забележено је статистички значајно смањење броја еритроцита у односу на контролну групу ($p < 0,05$), као и у односу на групу третирану тиклопидином ($p < 0,05$). (Графикон 3)

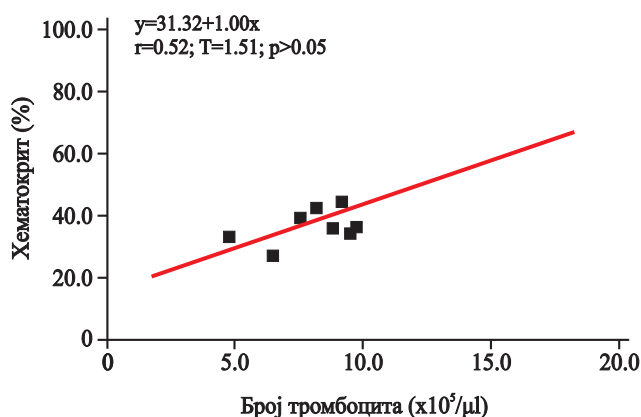
Број тромбоцита код животиња третираних аспирином, тиклопидином и комбинацијом аспирина+тиклопидина није био статистички значајно различит у односу на контролну групу. (Графикон 4)

Апсолутни број неутрофилних гранулоцита код животиња третираних аспирином, тиклопидином и комбинацијом аспирина+тиклопидина није био статистички значајно различит у односу на контролну групу. (Графикон 5)

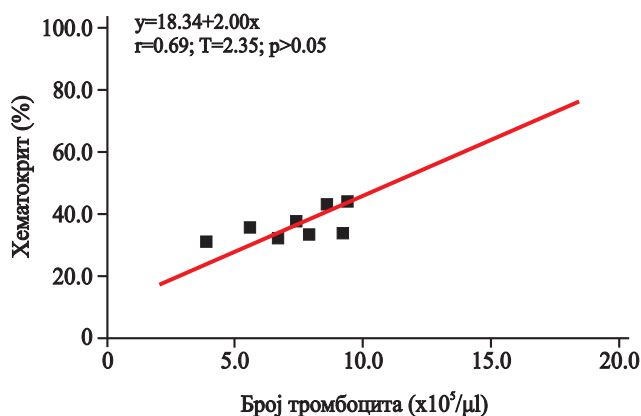
Између вредности хематокрита и броја тромбоцита забележена је, код контролне групе пацова негативна и средња корелација ($r = -0,41$) (Графикон 6), код пацова третираних тиклопидином и комбинацијом аспирина+тиклопидина позитивна и средња корелација ($r = 0,52$) (Графикон 7) и ($r = 0,69$) (Графикон 8).



Графикон 6. Корелација између броја тромбоцита и хематокрита код контролне групе пацова.



Графикон 7. Корелација између броја тромбоцита и хематокрита код пацова третираних тиклопидином.



Графикон 8. Корелација између броја тромбоцита и хематокрита код пацова третираних комбинацијом аспирина+тиклопидин.

ДИСКУСИЈА

Терапија тиклопидином се често доводи у везу са појавом неутропеније и агранулоцитозе, о чему постоје бројни литературни подаци. Током мултицентричне CATS (Canadian American Ticlopidine Study) и TASS

(Ticlopidine Aspirin Stroke Study) студије учесталост неутропеније код 2043 пацијената, била је веома ниска и кретала се око 2,4%. Неутропенија се обично јављала током другог и трећег месеца терапије тиклопидином, никада пре 26-ог дана и увек је била реверзибилна (8). Током десетодневне терапије тиклопидином смањење броја неутрофилних гранулоцита није било статистички значајно (9). Међутим, резултати истраживања Haulhofer-a са сар. који су пратили хематолошке варијабле код пацијената који су добијали комбинацију аспирина + тиклопидин (100 мг + 2x250 мг дневно) током четири недеља, указују да је мониторинг хелија крвне лозе неопходан и током краткотрајне терапије тиклопидином, као и да је због дугог полуживота тиклопидина (3,8 дана) мониторинг неопходан и након престанка узимања лека (10). Анализом добијених вредности може се уочити да је тиклопидин, сам и у комбинацији са аспирином током четвородневне примене, незнатно смањио број неутрофилних гранулоцита и број тромбоцита, али то смањење није било статистички значајно, што је у сагласности са литературним подацима. У проспективним, контролисаним клиничким студијама учесталост тромбоцитопеније била је изузетно ниска (0,4%) (11).

Током двоструко-слепе, укрштене студије код здравих добровољаца, једнодневна и вишедневна (14 дана) примена аспирина у различитим дозама (50, 100, 250, 1000 мг/дан) није испољила значајне ефекте у смислу снижења вредности хематокрита, концентрације хемоглобина и броја тромбоцита (12, 13). За хроничну примену тиклопидина се међутим везује утицај на наведене хематолошке варијабле у смислу њиховог смањења (14, 15). Анализом добијених вредности може се уочити да је ефекат тиклопидина након четвородневне примене, у смислу смањења хематокрита, хемоглобина и броја еритроцита значајан тј. потенциран кад се тиклопидин примењује у комбинацији са аспирином.

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

Четвородневна администрација појединачних доза аспирина и тиклопидина не остварује значајан ефекат на број еритроцита, вредност хематокрита и концентрацију хемоглобина, док њихова комбинована примена значајно снижава вредности истих.

Четвородневна појединачна и комбинована администрација аспирина и тиклопидина не испољава значајан ефекат у смислу смањења броја тромбоцита и неутрофилних гранулоцита.

Реципрочна (негативна) корелација између броја тромбоцита и хематокрита у контролној групи постаје позитивна након третирања тиклопидином и комбинацијом аспирина+тиклопидин.

ЛИТЕРАТУРА

- Bošković B.: Novosti u terapiji. Pregled literature o lekovima za 2000 godinu. VMA. Institut za naučne informacije. Informativni bilten 2001.
- Schoming A., Neumann F.J., Kastrati A. A randomised comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the pla-

- cement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996; 334:1084-9.
3. Rupprecht H. J., Darius H., Borkowski U., Voigtlander Th., Nowak B., Genth S., Meyer J. Comparison of antiplatelet effects of aspirin, ticlopidine, or their combination after stent implantation. *Circulation* 1998; 97:1046-1052.
 4. Berger PB, Bell MR, Rihal CS, Ting H, Barsness G, Garratt K, Bellot V, Mathew V, Melby S, Hammes L, Grill D, Holmes DR Jr. Clopidogrel versus ticlopidine after intracoronary stent placement. *J Am Coll Cardiol*. 1999; 34(7):1891-4.
 5. Mueller Ch., Roskamm H., Neumann F.J., Hunziker P., Marsch S., Perruchoud A., Buettner H.J.: A randomised comparison of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin after the placement of coronary artery stents. *J Am Coll Cardiol* 2003; 41(6):969-73.
 6. Stanojević Z.: Efekt i interakcija aspirina i tiklopidina na hematološke i biohemijske varijable u eksperimentalnih pacova. Magistarski rad, Kosovska Mitrovica 2003.
 7. Ono K., Kurohera K., Yoshihara M et al.: Agranulocytosis caused by ticlopidine and its mechanism. *Am J Hematol* 1991; 37:239-42.
 8. Neumann F.J., Hail D., Schoming A.: Neutropenia with ticlopidine plus aspirin. *Lancet* 1997; 349: 1552-3.
 9. Schoming A., Neumann F.J., Kastrati A.: A randomised comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996; 334:1084-9.
 10. Haushofer A., Halbmayer W.M., Pranhar H.: Neutropenia with ticlopidine plus aspirin. *Lancet* 1997; 349:474-5.
 11. Takishita S., Kawazoe N., Yoshida T.: Ticlopidine and thrombocytopenia (letter). *N Engl J Med* 1990; 323:1487-8.
 12. Lussier A., Elie R., Gareau J.: A placebo controlled trial of flotaferine (Idarac) against enteric coated acetylsalicylic acid in osteoarthritic patients. *Rheumatol Rehabil* 1980; 19:52-59.
 13. Nuotto E., Gordin A., Paasonen M.K., Metsa-Katela T., Lamminsivu U.: Effect of acetylsalicylic acid on plasma thromboxane B2 and platelet aggregation in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1983; 25:313-7.
 14. Palareti G., Poggi M., Torricelli P., Balestra V., Coccheri S.: Longterm effects of ticlopidine on fibrinogen and haemorrheology in patients with peripheral arterial disease. *Thromb Res*. 1988; 52 (6):621-9.
 15. Sablayrolles M., Wajcman H., Castaigne J.P., Labie D.: In vitro study of ticlopidine, as a model of antiaggregating action of platelet antiaggregant. *Haematologia (Budap)* 1984; 17(2):199-207.