

КОРЕЛАЦИЈЕ БИОХЕМИЈСКИХ ВАРИЈАБЛИ У УСЛОВИМА ПОЈЕДИНАЧНЕ И КОМБИНОВАНЕ ПРИМЕНЕ АСПИРИНА И ТИКЛОПИДИНА У ПАЦОВА

Станојевић З.¹, Митић Р.¹, Несторовић В.², Стевић С.¹, Букумирић З.¹, Булајић С.¹

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

²Институт за физиологију, Медицински факултет Приштина, Косовска Митровица

CORRELATIONS BIOCHEMICAL VARIABLES OF ASPIRIN AND TICLOPIDINE ADMINISTERED ALONE AND IN COMBINATION IN RATS

Станојевић З.¹, Митић Р.¹, Несторовић В.², Стевић С.¹, Букумирић З.¹, Булајић С.¹

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

²Institute of Physiology, Medical Faculty Pristina, Kosovska Mitrovica

SUMMARY

A combination of aspirin and ticlopidine has been proven to reduce the frequency of haemorrhagic and vascular complications after coronary artery stenting. Also, ticlopidine is often associated with hyperbilirubinemia and abnormal liver function test values. The purpose of this study was to evaluate the correlations between biochemical variables (serum total cholesterol levels, total bilirubin concentration, serum activities of alkaline phosphatase and alanine- ALT and aspartate- AST aminotransferases) of aspirin and ticlopidine administered alone and in combination. The experiment was conducted on white laboratory rats, type Wistar. Thirty-two rats were divided in four groups and they received one of the following treatments for three days: group I - control, saline (1 ml/kg, i.p.); group II - aspirin (50 mg/kg/day i.p.); group III - ticlopidine (125 mg/kg/day i.p.) and group IV - aspirin+ticlopidine combination (50 mg/kg/day+125 mg/kg/day i.p.). Biochemical variables were determined at once after taking the sample of blood. Relationship between two measured variables was determined by calculating linear correlation coefficient (r). Between total cholesterol level and AST activity in control group of rats was noticed negative and low correlation ($r=-0,27$); in group treated with aspirin negative, high and significant correlation ($r=-0,86$); in group treated with ticlopidine negative and low correlation ($r=-0,24$); and in group treated with aspirin+ticlopidine combination positive, high and significant correlation ($r=0,79$). Between other investigated variables were not noticed significant correlation in all treated groups. Based on obtained results it can be noticed that negative correlation between serum total cholesterol level and AST activity in control, aspirin and ticlopidine groups becomes positive and significant only after the treatment with aspirin+ticlopidine combination.

Key words: Aspirin, Ticlopidine, Correlations biochemical variables, Rats.

САЖЕТАК

Комбинација аспирина са тиклопидином доказано смањује учесталост хеморагијских и васкуларних компликација после уградње коронарног стента. Такође, тиклопидин се често повезује са хипербилирубинемом и поремећајима показатеља јетрине функције. Циљ овог рада био је да испитамо корелације биохемијских варијабли (концентрације укупног холестерола, укупног билирубина, активности алкалне фосфатазе, аланин - ALT и аспарат - AST аминотрансфераза у серуму) у условима појединачне и комбиноване апликације аспирина и тиклопидина. Испитивање је спроведено на белним лабораторијским пацовима соја Wistar. Тридесет две животиње, подељене у четири групе добијале су одговарајуће дозе испитиваних супстанци континуирано током три дана: I - контролна група, физиолошки раствор (1 ml/kg, i.p.); II - група, аспирин (50 mg/kg i.p.); III - група, тиклопидин (125 mg/kg i.p.) и IV - група, комбинацију аспирин+тиклопидин (50 mg/kg+125 mg/kg i.p.). Биохемијске варијабле одређиване су након узимања узорка крви. Међусобна повезаност између две мерене варијабле одређивана је израчунавањем коефицијента линеарне корелације (r). Између вредности укупног холестерола и активности AST забележена је, код контролне групе пацова негативна и ниска корелација ($r=-0,27$); код пацова третираних аспирином негативна, висока и значајна корелација ($r=-0,86$); код пацова третираних тиклопидином негативна и ниска корелација ($r=-0,24$); и код пацова третираних комбинацијом аспирин+тиклопидин позитивна, висока и значајна корелација ($r=0,79$). Између осталих варијабли нису забележене значајне корелације у испитиваним групама. На основу добијених резултата може се уочити да негативна корелација између укупног холестерола и активности AST у контролној, аспиринској и тиклопидинској групи постаје позитивна и значајна само након третирања комбинацијом аспирин + тиклопидин.

Кључне речи: Аспирин, Тиклопидин, Корелације биохемијских варијабли, Пацови.

УВОД

Формирање тромба последица је поремећеног баланса између протромботских и антитромботских механизма који утиче на ендотел крвних судова и контролише га, при чему, у случају тромбозе, преовлађују протромботски механизми. Зато је тромбоза последица првобитног чисто механичког оштећења крвног суда (атеросклероза) уз каснију активацију тромбоцита, антифибринских и прокоагулантних фактора (1).

На основу садашњих сазнања, тромбоцити имају најважнију улогу у формирању тромба својом адхезијом, активацијом и коначно агрегацијом. Употреба антитромбоцитних лекова, који онемогућавају ове процесе учинила их је стога једним од најзначајнијих у медицинаментном лечењу болести које су последица оштећења крвних судова.

Аспирин још увек суверено влада као анти-тромбоцитни лек у многобројним протоколима, мада је његова антитромбоцитна активност ограничена јер инхибише мали број метаболичких супстанци (иреверзибилно инхибира синтезу THA_2 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 ADP-аденилциклаза-ATP 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 (2). Тако је нпр. комбинација аспирина са тиклопидином после уградње коронарног стента била изванредно ефикасна у смањивању учесталости хеморагијских и васкуларних компликација (3). Према истраживањима Rupprecht-a 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 (4). У складу са овим су и налази Бергера 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 (5). Међутим, новија клиничка испитивања указују да, комбинација аспирина са тиклопидином значајније смањује кардиоваскуларни и укупни морталитет након уградње коронарног стента, у односу на комбиновану примену аспирина са клопидогрелом (6).

Резултати биохемијских испитивања говоре у прилог ставу да примена тиклопидина за собом повлачи и одређене ризике. Резултати велике мултицентричне CATS студије (Canadian American Ticlopidine Study) 1989. год. први су указали на већу учесталост поремећаја показатеља јетрине функције од 4,4% (23/525) код пацијената који су добијали тиклопидин у секундарној превенцији možданог удара, у односу на 1,5% пацијената плацебо групе (7). Међутим, исте године у другој великој мултицентричној TASS студији (Ticlopidine Aspirin Stroke Study) нису забележени наведени поремећаји (8). Иако су први резултати великих студија били кон-

традикторни, бројна истраживања која су уследила указала су на значајну повезаност тиклопидина са поремећајима показатеља јетрине функције (9,10,11,12). Као могући механизми који воде хепатотоксичности наводе се реакције преосетљивости и директно токсично дејство самог лека или његових метаболита. На могућу укљученост имунолошких механизма указује присуство ткивне еозинофилије, лимфоцитне инфилтрације у перипораталном простору, грануломатозни хепатитис (13). Резултати биопсије јетре показали су заступљеност оштећења типа холестазе и холестатског хепатитиса, са молекуларним променама у базолатералном и каналикуларном транспортном систему јетре. Биохемијске промене указују на умерено повећање концентрације укупног билирубина и активност алкалне фосфатазе, као и благо повећање активности аланин- (ALT) и аспартат- (AST) аминотрансфераза (14).

ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА

Циљ рада био је да испитамо корелације биохемијских варијабли (концентрације укупног холестерола и билирубина у серуму, серумске активности алкалне фосфатазе, аланин - ALT и аспартат - AST аминотрансфераза) у условима појединачне и комбиноване апликације аспирина и тиклопидина, након њихове тродневне апликације.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Испитивање је спроведено на белим лабораторијским пацовима соја Wistar, мушког пола, телесне масе 222-265 грама, старости 2-3 месеца. Пацови су били из окота узгојених на фарми лабораторијских животиња VMA 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 три дана:

I - контролна група, физиолошки раствор (1 ml/kg, i.p.)

II - група, аспирин (50 mg/kg i.p.)

III - група, тиклопидин (125 mg/kg i.p.) и

IV - група, комбинацију аспирин + тиклопидин (50 mg/kg i.p. + 125 mg/kg i.p.).

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

Аспирин и тиклопидин су претходно растворени 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.

Биохемијске варијабле одређиване су по референтним методама опште прихваћеним у експерименталној и клиничкој медицини. За њихово одређивање коришћен је спектрофотометар *Clinicon 4010*, са проточном термокиветом за одређивање активности ензима, односно без проточне термокивете за одређивање концентрације холестерола и билирубина у серуму пацова.

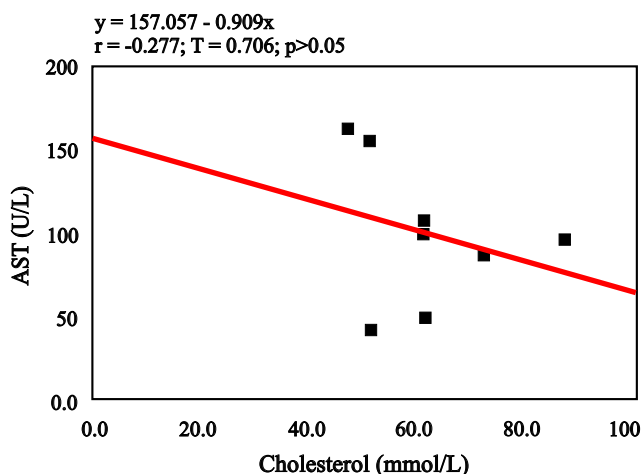
Међусобна повезаност између две мерене варијабле одређивана је израчунавањем коефицијента линеарне корелације (r). Критеријум за статистичку значајност био је $p < 0.05$; $p < 0.01$ и $p < 0.001$.

РЕЗУЛТАТИ ИСТРАЖИВАЊА

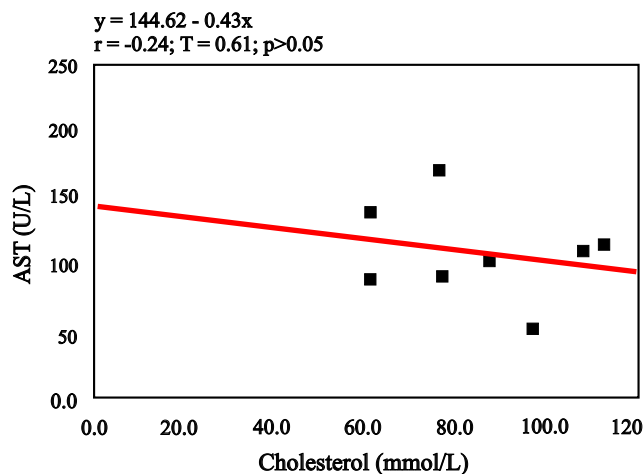
Између концентрације укупног холестерола у серуму и активности AST код контролне групе пацова забележена је негативна и ниска корелација ($r = -0,27$) (Графикон 1); код пацова третираних аспирином негативна, висока и значајна корелација ($r = -0,86$) (Графикон

2); код пацова третираних тиклопидином негативна и ниска корелација ($r = -0,24$) (Графикон 3); код пацова третираних комбинацијом аспирин+тиклопидин позитивна, висока и значајна корелација ($r = 0,79$) (Графикон 4).

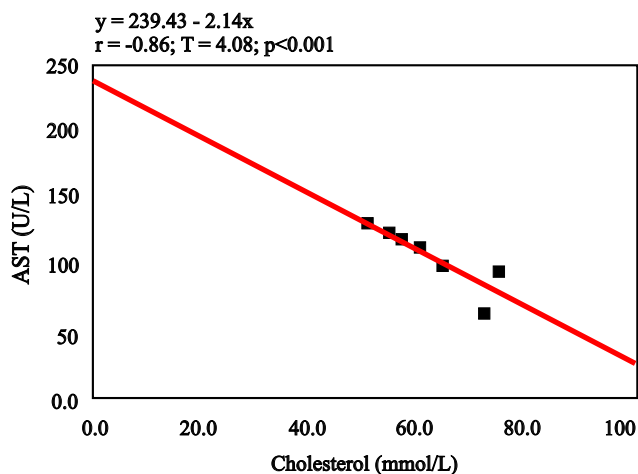
Између концентрације укупног билирубина у серуму и активности AST код контролне групе пацова забележена је негативна и ниска корелација ($r = -0,15$); код пацова третираних аспирином негативна и ниска корелација ($r = -0,28$); код пацова третираних тиклопидином негативна и средња корелација ($r = -0,43$); и код пацова третираних комбинацијом аспирин+тиклопидин позитивна и средња корелација ($r = 0,43$), без статистичке значајности. Између активности алкалне фосфатазе и ALT код контролне групе пацова забележена је негативна и ниска корелација ($r = -0,08$); код пацова третираних аспирином негативна и ниска корелација ($r = -0,21$); код пацова третираних тиклопидином позитивна и средња корелација ($r = 0,35$); и код пацова третираних ком-



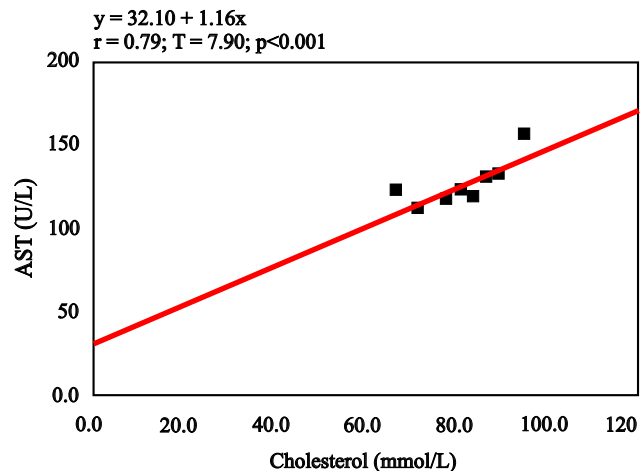
Графикон 1. - Корелација између концентрације укупног холестерола и активности AST код контролне групе пацова.



Графикон 3. - Корелација између концентрације укупног холестерола и активности AST код пацова третираних тиклопидином.



Графикон 2. - Корелација између концентрације укупног холестерола и активности AST код пацова третираних аспирином.



Графикон 4. - Корелација између концентрације укупног холестерола и активности AST код пацова третираних комбинацијом аспирин+ тиклопидин.

бинацијом аспирина+тиклопидина позитивна и средња корелација ($r=0,52$), такође без статистичке значајности.

ДИСКУСИЈА

Промене на јетри које изазивају лекови испољавају се многобројним клиничким и лабораторијским облицима, зависно од тога да ли је дошло до оштећења хепатоцита, билијарног система или су истовремено захваћени паренхим и каналикуларни систем јетре и други жучни путеви. Основни неспецифични параметри на основу којих се процењује оштећење јетре јесу аминоксидотрансферазе, алкална фосфатаза и билирубин. На оштећење хепатоцита указује пораст активности аланин аминоксидотрансферазе (ALT), док на постојање холестаза указује повећана активност алкалне фосфатазе. Однос између активности ALT и алкалне фосфатазе мења се зависно од типа оштећења (15).

Литературни подаци (16,17,18) указују на хепатотоксичност тиклопидина. Холестаза и холестатски хепатитис, јављали су се након једне недеље до три месеца од започете примене лека, променама у концентрацији укупног билирубина, активности алкалне фосфатазе, ALT и AST трансминаза. Анализом добијених вредности, може се уочити да је тиклопидин и након тродневне апликације код пацова довео до интересантних промена. Наиме, негативна корелација између концентрације холестерола и активности AST код контролне, аспиринаске и тиклопидинске групе постаје позитивна и значајна након третирања комбинацијом аспирина+тиклопидина. Такође, негативна корелација између концентрације билирубина и активности AST код контролне, аспиринаске и тиклопидинске групе постаје позитивна, иако не и статистички значајна, само након третирања комбинацијом аспирина+тиклопидина. Међутим, негативна корелација између активности алкалне фосфатазе и ALT код контролне и аспиринаске групе, иако не и статистички значајна, постаје позитивна након третирања тиклопидином и комбинацијом аспирина+тиклопидина, што иде у прилог резултатима досадашњих истраживања, иако су промене забележене и након тродневне апликације тиклопидина појединачно и у комбинацији са аспирином.

ЗАКЉУЧАК

На основу добијених резултата могу се извести следећи закључци:

Реципрочна (негативна) корелација између укупног холестерола и активности AST у контролној, аспиринаској и тиклопидинској групи постаје позитивна и значајна само након третирања комбинацијом аспирина+тиклопидина.

Реципрочна (негативна) корелација између укупног билирубина и активности AST у контролној, аспиринаској и тиклопидинској групи постаје позитивна након третирања комбинацијом аспирина+тиклопидина.

Реципрочна (негативна) корелација између активности алкалне фосфатазе и ALT у контролној и аспиринаској групи постаје позитивна након третирања тиклопидином и комбинацијом аспирина+тиклопидина.

ЛИТЕРАТУРА

- Ostojić M. i sar.: Preporuke za prevenciju ishemijske bolesti srca. Nacionalni vodič kliničke prakse, Beograd 2002.
- 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 placement of coronary-artery stents. *N Engl J Med* 1996; 334:1084-9.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gent M., Blacely J., Easton J.: The Canadian American Ticlopidine Study in thromboembolic stroke. *Lancet* 1989; 1215-20.
- Hass W.K., Easton J.D., Adams H.P. Jr., Pryse P.W., Molony B.A., Anderson S., Kamm B.: A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group. *N Engl J Med*. 1989; 321(8):501-7.
- Amaro P, Nunes A, Macoas F, Ministro P, Baranda J, Cipriano A, Martins I, Rosa A, Pimenta I, Donato A, Freitas D. Ticlopidine-induced prolonged cholestasis: a case report. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 1999; 11(6):673-6.
- Wu MS, Chan P, Lien GS, Cheng YS, Pan S. Ticlopidine-induced severe cholestatic hepatitis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)*. 2000; 63(8):663-6.
- Skurnik YD, Tcherniak A, Edlan K, Sthoeger Z. Ticlopidine-induced cholestatic hepatitis. *Ann Pharmacother*. 2003; 37(3):371-5.
- Gandolfi A, Mengoli M, Rota E, Tolomelli S, Zanghieri G, Bernini MV, Lusetti L. Ticlopidine-induced acute cholestatic hepatitis. A case report. *Recenti Prog Med*. 2004; 95(2):96-9.
- Valverde P.R.: Ticlopidine-induced granulomatous hepatitis. *Ann Pharmacother* 1995; 29: 633.
- Tsui P.T., Lai S.T., Leun W.S., Mok N.S., Wu C.W., Lau S.T., Choi Y.C. Prolonged jaundice following percutaneous coronary intervention and ticlopidine therapy. *HKMJ* 2002; 8:57-9.
- Jelenković A.: Neželjena dejstva lekova. Helenn J, Beograd 2002.
- Meyer MI, Kuhn M, Buhler H, Bertschinger P. Ticlopidine-induced cholestasis. *Schweiz Med Wochenschr*. 1999; 129(39):1405-9.
- Berent R, Hinterholzer G, Hobling W, Auer J, Haidenthaler A, Knoflach P. Cholestatic hepatitis as a rare side effect of therapy with ticlopidine. *Z Gastroenterol* 2000; 38(7):587-91.
- Tsai M.H., Tsai S.L., Chen T.C., Liaw Y.F. Ticlopidine-induced cholestatic hepatitis with antinuclear antibody in serum. *J Formos Med Assos* 2000; 99:866-9.