

Wpływ inhalacji drobnocząsteczkowej heparyny na wybrane parametry układu krzepnięcia u osób z astmą oskrzelową

ARTUR KWAŚNIEWSKI¹, MARYLA KRASNOWSKA², BEATA KORBUSZEWSKA-GONTARZ¹

¹ Oddział Chorób Wewnętrznych i Alergologii Szpitala ZOZ, ul. Bema 5, 59-300 Lubin

² Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Alergologii AM, ul. Traugutta 57/59, 50-417 Wrocław

U 11 chorych na astmę oskrzelową oraz u 10 chorych z prawidłowym układem oddechowym (grupa odniesienia) w ciągu 6 dni stosowano inhalacyjnie drobnocząsteczkową heparynę-nadroparynę. Dwukrotnie w ciągu dnia podawano ją przez nebulizator po 15 tys.j. Wyjściowo oraz w 3 i 6 dniu stosowania inhalacji wykonywano pomiary niektórych wskaźników układu krzepnięcia: APTT, fibrynogenu, płytek krwi, aktywności anty Xa. Podobne badania przeprowadzono w 7,8 i 9 dobie, gdy już nie stosowano heparyny. Nadroparyna nie wpływała na czas APTT, fibrynogen i płytki krwi w obu grupach, natomiast powodowała wzrost aktywności anty Xa w osoczu wszystkich badanych. W grupie chorych na astmę aktywność ta była niższa, lecz utrzymywała się dłużej niż w grupie kontrolnej. Różnice między grupami były statystycznie istotne. Autorzy przypuszczają, że stan zapalny śluzówki oskrzeli powoduje gorsze wchłanianie heparyny.

Słowa kluczowe: heparyna drobnocząsteczkowa w inhalacji, układ krzepnięcia, astma oskrzelowa

Heparyna (H) ma utrwaloną opinię co do skuteczności w profilaktyce i terapii szeregu schorzeń, opartą na jej działaniu przeciwkrzepliwym [15]. Od kilkunastu lat uczeni zajmują się badaniami eksperymentalnymi, w tym również klinicznymi, z zastosowaniem H, uwzględniającej jej wielorakie pozaantykoagulacyjne właściwości. Chodzi tu między innymi o wpływ na ścianę naczyń żylnych i tętniczych, śluzówkę oskrzeli, nowotworzenie naczyń, hamowanie przerzutów nowotworowych oraz wpływ na reakcje immunologiczne i procesy zapalne [4,7,14].

Bowler i wsp. [3] wykazali, że H stosowana dożylnie hamuje natychmiastową reakcję na antygeny w obrębie skóry oraz w płucach po stosowaniu w inhalacji. Ahmed i wsp. [1] stosując H w inhalacji u owiec, uzyskali prewencyjne działanie przed bronchospazmem wysiłkowym oraz w badaniach *in vitro* wykazali działanie hamujące IgE-zależną degranulację mastocytów [2]. Działanie przeciwzapalne H jest wielorakie, począwszy od hamowania uwalniania mediatorów z komórek efektorowych (mastocytów) poprzez wpływ na czynniki wzrostu, cząstki adhezyjne (hamowanie L- i P-selektyn [19]), angiogenezę i na koniec hamowanie akumulacji eozynofiliów [20].

Zgodnie z naszymi zainteresowaniami zajęliśmy się przeciwzapalnym i przeciwalergicznym działaniem tego proteoglikanu w astmie oskrzelowej. Ponieważ w astmie

terenem zapalnie zmienionym są oskrzela, uzasadnionym jest stosowanie heparyny dooskrzelowo, tj w inhalacji, podobnie jak w przypadku terapii inhalacyjnej innymi lekami.

Badania nad wpływem H na nadreaktywność oskrzeli i zmiany obturacyjne były już przeprowadzane wcześniej, zarówno u zwierząt jak i ludzi. Najczęściej jednak były to eksperymenty przeprowadzane „na ostro” z jednorazowym zastosowaniem H. Po badaniach doświadczalnych na zwierzętach [9,10,12], w których wykazano korzystne działanie H na zapalnie zmienione oskrzela, zastosowano ją również u ludzi z zadawalającym efektem klinicznym [18].

Celem obecnego badania było prześledzenie zachowania się niektórych czynników układu krzepnięcia u osób otrzymujących przewlekłe inhalacje H. Ponieważ wiadomo, że H reaguje zarówno z zapalnymi komórkami dróg oddechowych, jak i substancjami białkowymi (mediatory), stąd prawdopodobieństwo, że jej działanie ogólne po wchłonięciu się ze śluzówki oskrzeli, może być inne u osób z chorobami dróg oddechowych i bez nich. Dlatego celem pracy było również porównanie wskaźników ogólnego działania H, w tym wypadku przeciwkrzepliwego, u chorych z astmą i bez schorzeń płuc.

MATERIAŁ I METODY

Badaniami objęto 21 osób, w tym 16 mężczyzn i 5 kobiet w wieku od 24 do 61 lat (średnia wieku 45). Byli to chorzy leczeni w Oddziale Chorób Wewnętrznych i Alergologii Szpitala im. Jana Jonstona w Lubinie.

Zbadano dwie grupy chorych: pierwszą stanowiło 11 osób z rozpoznaną astmą oskrzelową (ao), drugą – 10 osób bez schorzeń układu oddechowego. W grupie I u 5 chorych astmę atopową rozpoznano na podstawie dodatnich testów skórnych i wywiadu osobniczego. Chorzy w jednej, jak i drugiej grupie nie mieli przeciwwskazań do leczenia heparyną.

W grupie pierwszej (I) były 3 kobiety i 8 mężczyzn z astmą oskrzelową o lekkim i średnio-ciężkim przebiegu. Do badań kwalifikowano osoby w stabilnej fazie choroby, u których FEV1 było większe od 70 % normy lub powyżej 1,5 litra. Również leczenie było ustabilizowane i nie ulegało zmianie w czasie doświadczenia, a opierało się na β_2 -mimetykach krótko działających i o przedłużonym działaniu; część osób stosowała inhalacyjne steroidy.

W grupie drugiej (II) wśród 10 osób ze schorzeniami układu sercowo-naczyniowego było 8 mężczyzn i 2 kobiety, w tym 4 osoby z miażdżycą zarostową tętnic kończyn dolnych, 2 osoby z chorobą niedokrwinną serca, 2 osoby z dwoma wymienionymi chorobami oraz 2 osoby z cukrzycą .

METODY BADAŃ

U wszystkich badanych podawano heparynę drobnocząsteczkową – nadroparynę – FRAXIPARINE firmy Sanofi w ampułko-strzykawkach po 0,6 ml czyli 15 000 j.

Heparynę stosowano w nebulizatorze PORTA-NEB rozcieńczając lek w 2,4 ml 0,9 % NaCl, 2 x w ciągu doby przez 6 dni; badani inhalowali w całości 3,0 ml roztworu. Dobowo otrzymywali 30 000j. H.

Badania układu krzepnięcia dokonywano w następujących dniach: 1, 3, 6, 7, 8, 9. Materiał pobierano zawsze rano na czczo o godz. 8.00. Wykonywano następujące badania: czas kaolinowo-kefalinowy czyli czas częściowej generacji tromboplastyny - APTT, stężenie fibrynogenu, ocenę liczby płytek krwi oraz aktywności anty Xa osocza.

Stosowano następujące metody:

- czas APTT mierzono manualnie według metodyki podanej przez Łopaciuka [16].
- poziom fibrynogenu oceniano metodą opisaną przez Clauss'a, Stosowano odczynnik – test FIBRIQUICK – ORGANON TEKNIKA, Pomiar automatycznym analizatorem koagulologicznym COAG-A-MATE-MTX ORGANON TEKNIKA.
- liczbę płytek krwi oznaczano metodą konduktometryczną, krew pobierano na EDTAK2, pomiar automatycznym analizatorem hematologicznym SYSMEX K-4500-3 DIFF

- Aktywność antyXa oznaczano w osoczu z cytrynianem używając zestaw COATEST LMW Heparin/Heparin firmy CHROMOGENIX używając analizatora koagulologicznego j/w zgodnie z oryginalnym firmowym przepisem.

U pacjentów z astmą oskrzelową prowadzono codzienny monitoring szczytowego przepływu wydechowego (PEF).

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej w oparciu o program STATISTICA wykorzystując test T-studenta oraz MANN WITHNEY'a.

WYNIKI

Lek był dobrze tolerowany przez wszystkich badanych. Nie obserwowano niekorzystnego działania ubocznego. Wartości czasu APTT, stężenia fibrynogenu oraz liczby płytek krwi były podobne w obu grupach, bez istotnych statystycznie różnic. Leczenie heparyną nie spowodowało zmian tych wyników (tab. I).

Tabela I. Czas APTT, poziom stężenia fibrynogenu oraz liczba płytek krwi u osób z astmą oskrzelową (Grupa I) i bez schorzeń obturacyjnych oskrzeli (Grupa II)

	Grupa I			Grupa II		
	1 doba	6 doba	9 doba	1 doba	6 doba	9 doba
APTT (sek.)	25,33 ± 5,15	26.88 ± 4,48	24.98 ± 3.42	24,57 ± 6,72	25.13 ± 5,76	23.98 ± 6,7
Fibrynogen (mg%)	362.68 ± 107.25	330,23 ± 128.43	378.57 ± 178.38	384.00 ± 143,30	398,89 ± 89.99	403.85 ± 154.98
Płytki krwi (tys./mm ³)	210 ± 146	178 ± 176	188 ± 146	176 ± 167	167 ± 143	180 ± 89

W czasie badania prowadzono codzienne oznaczanie wartości PEF (tab. II). Nie wykazano istotnych różnic tego wskaźnika w czasie i po leczeniu heparyną.

W tabeli III podane są średnie aktywności anty Xa osocza przed rozpoczęciem leczenia (doba pierwsza), w trakcie leczenia heparyną (doba 3 i 6) oraz w kolejnych dniach, gdy heparyna nie była już stosowana (7,8 i 9 dzień).

Aktywność anty Xa jest przyjętą miarą ilości zastosowanego leku. Poziom terapeutyczny zastosowanej heparyny drobnocząsteczkowej mieści się w przedziale od 0,05 do 0,20 jednostek anty Xa. Aktywność anty Xa zachowywała się odmiennie w obu grupach badanych. Aczkolwiek inhalacje H spowodowały wzrost aktywności tego czynnika w osoczu wszystkich badanych, to jednak

Tabela II. Wartości PEF rannego i zmienność w ciągu dnia w badanej grupie pacjentów z astmą oskrzelową.

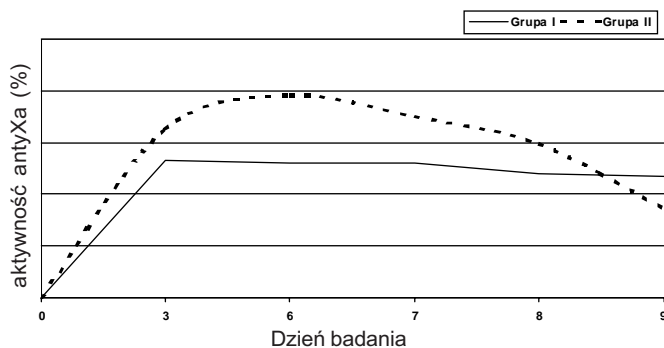
1 doba badania		6 doba badania		9 doba badania	
PEF	PEF	PEF	PEF	PEF	PEF
rano	zmienność (%)	rano	zmienność (%)	rano	zmienność (%)
293,46	20,43	298,34	64,34	305,00	41,28
±	±	±	±	±	±
74,96	38,90	121,02	57,16	84,43	60,32

Tabela III. Aktywność antyXa osocza u osób z astmą oskrzelową (grupa I) i w grupie odniesienia (grupa II)

Grupa	1 doba	3 doba	6 doba	7 doba	8 doba	9 doba
I	Poniżej 0,1	0,134 ±0,022	0,132 ±0,031	0,14 ±0,023	0,12 ±0,01	0,118 ±-0,01
II	Poniżej 0,1	0,164 ±0,51	0,196 ±0,11	0,176 ±0,69	0,15 ±0,03	0,086 ±0,03
Analiza statystyczna		p=0,03	NS	NS	p=0,0007	p=0,003

NS - różnice statystycznie nieistotne

u chorych na astmę aktywność ta była mniejsza, i to w sposób statystycznie znamienne, od grupy kontrolnej, natomiast utrzymywała się dłużej. Po 3 dniach od zaprzestania inhalacji H, tj. w 9 dobie doświadczenia, wartości anty Xa w grupie kontrolnej zmniejszyły się do wyjściowych; w grupie chorych utrzymywały się w zakresie poziomu terapeutycznego w odniesieniu do działań antykoagulacyjnych. Różnice między grupami były statystycznie istotne. Rycina 1 przedstawia zmiany aktywności anty Xa w obu badanych grupach w kolejnych dniach doświadczenia.



Ryc. 1. Zmiana aktywności antyXa w kolejnych dniach stosowania nadroparyny w nebulizacji w dwóch grupach: grupa I (astma oskrzelowa), grupa II (schorzenia uk. sercowo-naczyniowego)

DYSKUSJA

W roku 1995 Martineau i Vaughan, dokonując przeglądu badań dotyczących zastosowania H w astmie postawili m. in. takie pytania: jaka jest optymalna dawka H w inhalacji? Jakie są długotrwałe niekorzystne skutki inhalacji H? [17]. Mimo, że upłynęło kilka lat, w czasie których utrzymywało się zainteresowanie stosowaniem H w leczeniu astmy, nie uzyskano satysfakcjonujących odpowiedzi na powyższe pytania. Dobrze znane są natomiast powikłania leczenia przeciwkrzepliwego, oprócz skazy krwotocznej, najczęściej występującej przy stosowaniu heparyny niefrakcjonowanej (standardowej -HS), dotyczy to również osteoporozy, trombocytopenii, hipoadsteronizmu, reakcji uczuleniowych czy przejściowego łysienia [15]. Poważnym problemem jest immunologiczna małopłytkowość (*HIT-heparin induced thrombocytopenia*), gdyż paradoksalnie łączy się ze zmianami zakrzepowo-zatorowymi [15]. Stany te, a głównie osteoporoza, występowały po długotrwałym, wielomiesięcznym stosowaniu H. Należy zanotować, że H drobnocząsteczkowa mająca wiele walorów, nie jest wolna od niekorzystnych następstw.

W trakcie przedstawianego doświadczenia u żadnego z badanych nie obserwowano efektów ubocznych stosowanej H. Chorzy bardzo dobrze znosili inhalacje, a nawet czuli się lepiej (mniejsza duszność). Jednak głównym celem badania była ocena działania ogólnego H po jej podaniu inhalacyjnym. Z badań naszych wynika, że H wchłania się z dróg oddechowych i wywiera działanie ogólne przeciwkrzepliwe. O wchłanianiu się H ze śluzówki oskrzeli wiadomo już od dawna. Pierwsze doniesienia o podawaniu heparyny drogą wziewną przedstawił Jaques [8], który stwierdził, że jednorazowa inhalacja HS w dawce 8mg/kg wagi ciała powoduje obniżenie krzepnięcia krwi w ciągu 7-10 dni.

Skuteczność heparyny podawanej w drodze inhalacji wykazali Zawilska i wsp. [21]. Udowodnili oni skuteczność jednorazowej inhalacji heparyny standardowej w dawce 800 UI/kg w.c. u pacjentów w profilaktyce zakrzepicy głębokiej żył kończyn dolnych.

Ta sama grupa badaczy pod kierunkiem Lewandowskiego [13] porównywała skuteczność jednorazowej inhalacji heparyny standardowej (w dawce 800 IU/kg m.c.) z heparyną drobnocząsteczkową (Fraxiparine) podawaną w dawce 720 U anty Xa IC/kg m.c. Skuteczność leku badano poziomem aktywności antyIIa w przypadku heparyny standardowej (HS) i aktywności antyXa dla H drobnocząsteczkowej (LMWH). Stwierdzono, że jednorazowe podanie leku w nebulizacji powoduje działanie przeciwkrzepliwe, które szybciej ujawnia się w przypadku HS, o dwa dni później w przypadku LMWH.

Wybór zastosowanej przez nas dawki H (30 tys j. *pro die*) wydaje się być dość arbitralnym, a wynika to z faktu, że nie znamy precedensowych badań, w których

drobnocząsteczkowa H byłaby stosowana przewlekle w inhalacji. Opieraliśmy się na pewnych wskazówkach z piśmiennictwa, jak też na własnych doświadczeniach. Z eksperymentu na szczurach wynika, że H działa przeciwzapalnie w dość dużym zakresie dawek. Ponieważ celem badania była ocena wskaźników układu krzepnięcia po inhalacyjnym podaniu leku, zastosowano go w stosunkowo dużej dawce.

H jest związkiem o wielorakim działaniu, różne mechanizmy jej aktywności mają również znaczenie w przypadku działań antykoagulacyjnych. Należą do nich: aktywacja antytrombiny III i kofaktora II heparyny, uwalnianie z endogennych glikozaminoglikanów na powierzchni śródbłonka inhibitora drogi krzepnięcia zależnej od czynnika tkankowego (TFPI) [1], jak i działania przeciwzapalne, przeciwuczuleniowe i przeciwastmatyczne [2,6,9,14].

Oceniając niektóre czynniki układu krzepnięcia u osób przewlekle inhalujących H, stwierdzono w przedstawionym badaniu różnicę w działaniu H między grupą kontrolną a chorymi z astmą oskrzelową. Nie wiemy jaka jest tego przyczyna. Wydaje się dość prawdopodobnym, że jest ona spowodowana procesem zapalnym toczącym się w oskrzelach, który to proces spowalnia i osłabia wchłanianie się H. Nadroparyna reaguje z komórkami zapalnymi obecnymi w drogach oddechowych – makrofagami, neutrofilami, limfocytami; stąd jej słabsze ogólne działanie antykoagulacyjne. Godnym zanotowania jest fakt, że w badaniach *in vitro* H miała inne działanie chemotaktyczne w stosunku do leukocytów krwi obwodowej u cho-

rych na astmę oskrzelową niż u osób zdrowych [11]. Wpływ H na komórki zapalne oskrzeli, mediatory, enzymy [6], warunkuje jej działanie miejscowo przeciwzapalne. Heparyna wpływa modyfikująco na różne czynniki wzrostu, cząstki adhezyjne, białka kationowe etc. Jej właściwości fizyko-chemiczne powodują, że „oblepia”, wyściela tkanki, ale też reaguje z różnymi strukturami na zasadzie przeciwnych ładunków elektrycznych. Heparyna drobnocząsteczkowa słabiej łączy się z komórkami (makrofagami, śródbłonkiem) niż standardowa [5], dlatego w inhalacji należy stosować większe jej dawki. Ale z kolei taki mechanizm w rezultacie może powodować lepszy efekt działania miejscowego HS. Zagadnienie to wymaga dalszych badań.

Podsumowując, przeprowadzone badania wskazują, że drobnocząsteczkowa heparyna-nadroparyna (Fraxiparine) podawana w inhalacji w dawce 30000j/dobę przez 6 dni nie wpływała na czas APTT, liczbę płytek krwi i poziom fibrynogenu zarówno u osób z astmą oskrzelową, jak i w grupie kontrolnej. Nadroparyna zwiększała aktywność anty Xa osocza w sposób znamienity w obu badanych grupach. U chorych na astmę działanie to było słabsze i utrzymywało się dłużej; różnice między grupami były statystycznie istotne. Nadroparyna podawana w drodze inhalacji była dobrze tolerowana przez osoby z astmą i nie obserwowano u nich zaburzeń wentylacji monitorowanych wartościami PEF.

Piśmiennictwo

- Ahmed T, Garrigo J, Danta. Prevention of bronchoconstriction in exercise - induced asthma with inhaled heparin. *N Engl J Med* 1993; 8(329): 90-95.
- Ahmed T i wsp. Inhibition of antigen-induced airway and cutaneous responses by heparin: a pharmacodynamic study. *J Appl Physiol* 1993; 74: 1492.
- Bowler SD, Smith SM, Lavercombe PS. Heparin inhibits the immediate response to antigen in the skin and lungs of allergic subjects. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147: 160-163.
- Clowes AW, Clowes MM, Vergel SC i wsp. Heparin and cilazapril together inhibit injury - induced intimal heperplasia. *Hypertension* 1991; 18(4 Supl.): 1165-1169.
- Czerchawski L. Patofizjologiczne podstawy zastosowania heparyn niskocząsteczkowych w profilaktyce choroby zakrzepowo-zatorowej. Wa-wa, 1996. Publikacja Medyczna Rhone-Poulenc-Rorer.
- Fath MA, WU X, Hileman RE i wsp. Interaction of secretory leukocyte protease inhibitor with heparin inhibits proteases involved in asthma. *J Biol Chem* 1998; 273: 13563.
- Folkman J. Regulation of angiogenesis : a new function of heparin. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 905-909.
- Jaques LB, Mahadoo J, Kavanagh LW. Intrapulmonary heparin. *Lancet* 1976; 2: 1157.
- Krasnowska M, Jankowska B, Kwaśniewski A i wsp. Wpływ heparyny na aktywność makrofagów i ekspresję endoteliny w zapaleniu oskrzeli u szczurów wywołanym dwutlenkiem siarki. *Pol Arch Med Wewn* (w druku).
- Krasnowska M, Kwaśniewski A, Rabczyński J, Fal A, Kuryszko J. Effect of heparin on the course of sulphur dioxide induced bronchitis in rats. *Archiv Immunol Ther Experim* 1998; 46: 17-24.
- Krasnowska M, Żak-Nejmark T, Krasnowski R. Wpływ drobnocząsteczkowej heparyny na chemotaksję leukocytów krwi obwodowej chorych na astmę oskrzelową. *Pneumonol Alergol Pol* 1999; 67: 409-413.
- Kwaśniewski A, Krasnowska M, Jaroszevska B. Tlenek azotu w powietrzu wydechowym szczurów z doświadczalnym zapaleniem oskrzeli. *Pneumonol Alergol Pol*.
- Lewandowski K, Tokarz A, Zozulińska P, Psuja P i wsp. Anticoagulant activity in plasma after a single administration of nebulized heparin or LMW Heparin fraction (fraxiparine) in patients undergoing abdominal surgery. *Thromb Res* 1990; 58: 525-530.
- Lucio J, D'Brot J, Guo CB i wsp. Immunological mast-cell-mediated responses are attenuated by heparin. *J Appl Physiol* 1992; 73: 1093.
- Łopaciuk S. Badanie układu krzepnięcia. Diagnostyka laboratoryjna w hematologii (red.) Pawelski S. PZWL W-wa 1977.
- Łopaciuk St. Leki hamujące krzepliwość krwi. W: Zakrzepy i zatory (red.) Łopaciuk S. PZWL 1996.
- Martineau P, Vaughan LM. Heparin inhalation for asthma. *Annals of Pharmacotherapy* 1995; 29: 71-73.

18. Miecielica J, Krasnowska M. Możliwości leczniczego zastosowania heparyny w astmie oskrzelowej. *Pneumonol Alergol Pol* 1996; 64: 829-833.
19. Nelson RM, Cecconi O i wsp. Heparin oligosaccharides bind L-and P-selectin and inhibit acute inflammation. *Blood* 1993; 82(11): 3253-3258.
20. Teixeira MM, Hellewell PG. Suppression by intradermal administration of heparin of eosinophil accumulation but not oedema formation in inflammatory reactions in guinea-pig skin. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1496.
21. Zawilska K, Tokarz A, Psuja P, Szymczak P i wsp. Nebulized heparin and anabolic steroid in the prevention of postoperative deep venous thrombosis. Department of Haematology and Department of Surgery, Academy of Medicine Poznań, Poland.

Effect of inhalation of low molecular weight heparin on some blood clotting parameters in patients with bronchial asthma

ARTUR KWAŚNIEWSKI, MARYLA KRASNOWSKA, BEATA KORBUSZEWSKA-GONTARZ

Summary

Low molecular weight heparin (nadroparin) in nebulization as an additional treatment was applied in 11 patients with bronchial asthma and chronic obstructive pulmonary disease as well as in 10 healthy controls. Heparin was nebulized twice a day, 15 kU per dose. At the beginning of the study and after 3 and 6 days of heparin treatment several parameters of the blood clotting were estimated both in treated and non-treated groups (e.g., APTT, fibrinogen, platelets, anti-Xa activity). Similar parameters were measured after 7, 8 and 9 days, although heparin was no longer administered at that time. Nadroparin increased serum anti-Xa activity in all subjects. This change was less pronounced in asthmatics, but tended to last longer than in controls ($p < 0.05$). No changes in other estimated parameters were observed. *Alergia Astma Immunol* 2000; 5(2): 123-127

Key words: *LMWHeparin inhalation, blood clotting, bronchial asthma*