ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ КЛОПИДОГРЕЛА ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Л.И. Бурячковская*, А.Б. Сумароков, И.А. Учитель, Е.М. Гупало

Российский кардиологический научно-производственный комплекс.
121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д.15а

Противовоспалительное действие клопидогрела при атеросклерозе
Л.И. Бурячковская*, А.Б. Сумароков, И.А. Учитель, Е.М. Гупало
Российский кардиологический научно-производственный комплекс. 121552, Москва, ул. 3-я Черепковская, д.15а

Цель. Анализ литературы и собственных данных о влиянии клопидогрела на тромбоциты при воспалении и выявление особенностей его использования у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) на фоне воспалительной реакции.
Материал и методы. У 110 больных стабильной стенокардией напряжения I-III функционального класса и у 18 здоровых добровольцев изучали форму тромбоцитов и количество циркулирующих в крови лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов (ЛТА) с помощью сканирующей электронной микроскопии. Спонтанную и АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов исследовали на лазерном агрегометре ООО «Биола». Средний объем тромбоцитов (СОТ) оценивали с помощью гемоанализатора. Все исследования у больных ИБС проводили до и через 2 мес лечения клопидогрелом в дозу 75 мг в день.
Результаты. У больных ИБС характерно появление в крови ЛТА, больших ретикулярных тромбоцитов, увеличение СОТ и спонтанной агрегации. АДФ-индуцированная агрегация повышается редко, что может быть связано с включением в исследование больных, находящихся на терапии аспирином. Такая картина связана с повышенным риском тромботических осложнений и коррелирует с уровнем маркеров воспаления. Через 2 мес терапии клопидогрелом в крови больных почти в 4 раза снижалось количество ЛТА, в 2,5 раза число больших ретикулярных тромбоцитов, уменьшался СОТ, приближались к нормальным значениям показатели спонтанной агрегации.
Заключение. Клопидогрел не только обладает антитромботическим эффектом, но и способен уменьшать характерные для воспаления изменения морфологии и функций тромбоцитов.
Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, воспаление, атеротромбоз, функции тромбоцитов, дезагрегантная терапия, клопидогрел.
РФК 2011;7(6):677–684

Anti-inflammatory effect of clopidogrel in atherosclerosis
L.I. Buriachkovskaia*, A.B. Sumarokov, I.A. Uchitel, E.M. Gupalo
Russian Cardiology Research and Production Complex. Tretya Cherepkovskaya ul. 15a, Moscow, 121552 Russia

Aim. To analyze the literary and own data about clopidogrel influence on platelets during inflammation and to reveal particularities of its usage in ischemic heart disease (IHD) patients with active inflammation.
Material and methods. The platelet morphology and a number of leukocyte-platelet aggregates (LTA) were investigated with scanning electron microscopy in 110 patients with stable angina pectoris of I-III functional class and 18 healthy volunteers. Spontaneous and ADP-induced platelet aggregation were assessed with laser aggregatometre manufactured by LLC "BIOLA". Mean platelet volume (MPV) was estimated with the hematological analyzer. All investigations were performed in IHD patients before and after 2 months of clopidogrel treatment 75 mg a day.
Results. IHD patients demonstrated appearance of LTA and big reticular platelets in the blood, increase in MPV and spontaneous aggregation. ADP-induced platelet aggregation was rarely increased probably due to acetylsalicylic acid therapy in all IHD patients. These platelet activity changes are connected with increased risk of thrombotic events and correlated with inflammation markers levels. After 2 months of clopidogrel treatment LTA number reduced in 4 times and big reticular platelets number decreased in 2.5 times as well as MPV and spontaneous aggregation achieved the normal ranges.
Conclusion. Clopidogrel has not only antithrombotic effect but also can diminish platelets morphological and functional changes connected with inflammation.
Key words: ischemic heart disease, inflammation, atherothrombosis, platelet function, antiplatelet therapy, clopidogrel.
Rational Pharmacother. Card. 2011;7(6):677–684

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): livbur@mail.ru

В последнюю декаду появились данные о том, что в развитии тромботических процессов значительную роль играет сосудистое воспаление. Активно участвующие в этом процессе тромбоциты способны реагировать как на провоспалительные, так и на протромботические стимулы и благодаря этому играют ключевую роль в атеротромбозе [1].

На тромбогенной поверхности атеросклеротической бляшки происходят активация, адгезия, агрегация и дегрануляция тромбоцитов, что приводит к образованию тромба, который может затруднить кровоток, вплоть до полной окклюзии сосуда. Выброс содержащихся в α-гранулах тромбоцитов провоспалительных цитокинов (IL-1β, ФНО-α) и хемокинов (ТФ-4, MCP-1, NAP-2, PBP, IL-8, SDF-1) ведет к росту активации Т-клеток, миграции моноцитов. Эти молекулы взаимодействуют со специфичными для них рецепторами, присутствующими на тромбоцитах (рис. 1), вызывают дальнейшую активацию тромбоцитов, экспрессию на них Р-селектина и CD40L. В результате происходит взаимодействие тромбоцитов с лейкоцитами и образование лейкоцитарно-тромбоцитарных агрегатов (ЛТА). После этого усиливается экспрессия тканевого фактора из моноцитов, который вызывает генерацию тромбина на поверхности тромбоцитов, что повышает прокоагулянтную активность крови и ее свертывание, а также усиление синтеза цитокинов и дальнейшее развитие как воспалительного процесса, так и атеротромбоза [2,3]. Запуск такого каскада реакций лежит в основе развития грозных осложнений ИБС, таких как острый коронарный синдром, инфаркт миокарда, ишемический инсульт, тромбозы периферических сосудов.

Необходимость медикаментозного снижения активации и агрегации тромбоцитов доказана результатами многих крупных исследований. Среди антиагрегантных препаратов важное место занимают тиенопиридины — селективные антагонисты P2Y12 пуринового рецептора к АДФ. Этот рецептор наиболее привле-

Сведения об авторах:
Бурячковская Людмила Ивановна *— д.б.н., ведущий научный сотрудник Института экспериментальной кардиологии РКНПК*
Сумароков Александр Борисович *— к.м.н., старший научный сотрудник Института клинической кардиологии РКНПК*
Учитель Ирина Александровна *— к.б.н., научный сотрудник Института экспериментальной кардиологии РКНПК*
Гупало Елена Михайловна *— лаборант-исследователь Института экспериментальной кардиологии РКНПК*

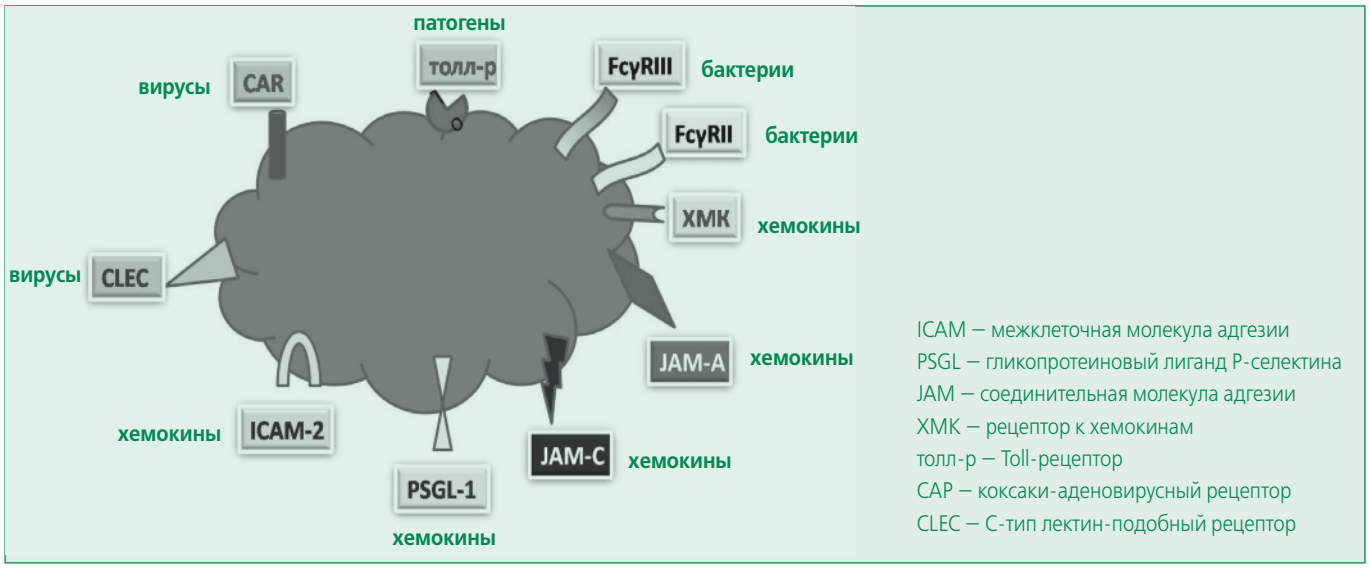


Рисунок 1. Рецепторы тромбоцитов, участвующие в иммунных реакциях

кателен как мишень для фармакологического воздействия из-за того, что он присутствует на ограниченном числе клеток человека и в то же время играет существенную роль в активации и агрегации тромбоцитов. С одной стороны, кроме тромбоцитов, он выявлен на лимфоцитах, моноцитах и дендритных клетках [4,5]. Активация P2Y12 на лимфоцитах и моноцитах способствует их миграции и выбросу цитокинов, а на дендритных клетках стимулирует иммунный ответ. Противовоспалительный эффект клопидогрела связывают не только с действием на тромбоциты, но и на клетки иммунной системы [6,7]. С другой стороны, активация P2Y12 рецептора приводит к экспрессии Р-селектина, участвующего в образовании ЛТА, которые являются неоспоримым компонентом любого воспалительного процесса. Образование ЛТА происходит на ранних стадиях развития воспалительного процесса в результате активации тромбоцитов появившимися в крови провоспалительными медиаторами, в том числе цитокинами, и играет важную роль в патогенезе воспаления, способствуя миграции лейкоцитов к поврежденной зоне, усилению синтеза цитокинов, нарушению апоптоза лейкоцитов. Из активированных тромбоцитов могут освобождаться антимикробные белки, участвующие в лизисе микроорганизмов и вирусов, а также цитокины, стимулирующие антипатогенные функции лейкоцитов (табл. 1). В то же время, блокада P2Y12 рецепторов значительно смягчает течение воспалительного процесса.

Как известно, клопидогрел в виде монотерапии и в комбинации с аспирином снижает риск неблагоприятных событий у больных ИБС, подавляет активность тромбоцитов. Кроме того, он снижает экспрессию маркеров воспаления (табл. 2). В одном из ответвлений исследования ASCET) продемонстрировано сходное снижение маркеров воспаления – С-реактивного белка (СРБ), ФНО-α, IL-6, IL-10, MCP-1, CD40L, Р-селектина и TGF-β как после годичной монотерапии аспирином, так и клопидогрелом [8]. В исследовании на здоровых добровольцах [9] и больных с атеросклерозом периферических сосудов [10] клопидогрел подавлял образование ЛТА, экспрессию Р-селектина и активацию лейкоцитов. Клопидогрел снижает прокоагулянтную активность тканевого фактора, что может быть дополнительным объяснением достижения клинического эффекта [11]. При использовании двойной дезагрегантной терапии (аспирин+клопидогрел) наблюдается еще более выраженное снижение маркеров воспаления. У больных стабильной ИБС клопидогрел снижал выброс тромбоцитами sCD40L [12,13], уровень высокочувствительного СРБ (вчСРБ), RANTES и маркеров оксидативного стресса [14]. У больных ОКС без подъема ST двойная терапия более выраженно снижала показатели вчСРБ и ФНО-α, чем монотерапия аспирином [15]. У больных ОКС без подъема ST, имевших высокую активность тромбоцитов, показатели вчСРБ и уровень sCD40L снижались только на фоне двойной терапии [16]. Одновременно было выявлено, что через 8 ч после нагрузочной дозы клопидогрела значительно снижались экспрессия Р-селектина и активность тромбоцитов, что совпадало в последующем с уменьшением числа неблагоприятных событий. У больных, прошедших имплантацию коронарного стента, комбинированная терапия более эффективно снижает уровень маркеров. Обнаружено, что уровень СРБ был на 65% ниже среди получивших нагрузочную дозу клопидогрела (300 мг), чем у больных, не получивших ее [17]. Аналогичное снижение экспрессии CD40L и Р-селектина на тромбоцитах и уровень IL-6 в плазме до процедуры ЧКВ и после нее отмечено в работе [18]. В то же время в исследовании ELAPSE [19], несмотря на прием аспирина и клопидогрела до проведения процедуры, экспрессия Р-селектина как была высокой до процедуры, так и оставалась

Таблица 1. Компоненты, содержащиеся в α-гранулах тромбоцитов и участвующие в воспалении

Названия	Функции
Адгезия	
Р-селектин	Адгезия тромбоцитов к эндотелию и лейкоцитам
Фактор Виллебранда	Обеспечивает роллинг тромбоцитов
Хемокины	
Макрофагальный воспалительный белок MIP-1α	Хемотаксис моноцитов и Т-клеток
Регулятор активации процессов экспрессии и секреции нормальных Т-лимфоцитов RANTES	Хемотаксис моноцитов, эозинофилов и Т-клеток
Хемоаттрактантные белки моноцитов MCP-1, MCP-3	Хемотаксис моноцитов, эозинофилов и Т-клеток
Тромбоцитарный фактор ТФ-4	Хемотаксис моноцитов и Т-клеток
Нейтрофил-активирующий белок NAP-2	Хемотаксис нейтрофилов
Основной белок тромбоцитов PBP	Хемотаксис нейтрофилов
β-тромбоглобулин	Хемотаксис нейтрофилов
Интерлейкин IL-8	Хемотаксис нейтрофилов
Фактор стромальных клеток SDF-1	Хемотаксис лимфоцитов, прогениторных клеток
Цитокины	
Интерлейкин IL-1b	Активирует эндотелий и лимфоциты
Фактор некроза опухоли ФНО-α	Активирует эндотелиальные клетки и повышает сосудистую проницаемость
Трансформирующий фактор роста TGF-β	Пролиферация, дифференциация, апоптоз, фиброз
Тромбоцитарный фактор роста PDGF	Ангиогенез, фиброз
Защита от патогенов	
Матриксные металлопротеиназы MMP	Растворение белков матрикса
Тромбоцидины, киноцидины	Лизис бактерий
Лизосомальные ферменты	Лизис бактерий, вирусов, инородных частиц

такой же через 12 мес, в то время как sCD40L значительно снижался [19]. В обсуждении авторы показывают, что они получили противоречивые результаты, которые могут быть связаны с незначительным размером выборки (26 больных). Нагрузочная доза 600 мг клопидогрела более быстро и эффективно ингибирует агрегацию тромбоцитов, а также приводит к снижению ишемических осложнений [20]. В сравнительном исследовании действия нагрузочных доз клопидогрела 300 и 450 мг показано, что на фоне приема более высокой дозы наблюдалось более быстрое ингибирование агрегации тромбоцитов и снижение экспрессии Р-селектина, в то время как уровень растворимого sP-селектина практически не уменьшался [21]. В исследовании ALBION было показано, что показатели вчСРБ в первые 24 ч снижались при повышении дозы от 300 мг до 600 мг и 900 мг, но недостоверно [22]. В двух последних исследованиях DECADES (Discontinuation Effect of Clopidogrel After Drug Eluting Stent) и CESSATION исследовали влияние отмены клопидогрела через год приема после ЧКВ на активность тромбоцитов и маркеры воспаления [24,25]. В обоих исследованиях через 4 нед после отмены препарата повысился уровень растворимого CD40L, хотя по данным CESSATION эти изменения был недостоверны (p=0,32). В то же время, уровень вч CD40L в CESSATION постепенно снижался и достиг значимых величин только к 4-й нед, а в DECADES уже на 1-й нед он снизился на 21% (P=0,008), а к 4-й нед практически вернулся к первоначальному значению. Авторы предполагают, что длительный прием клопидогрела может приводить к нарушению выработки СРБ и CD40L. В то же время, в случае с СРБ это может быть связано с ростом активности тромбоцитов после отмены и с присоединением к тромбоцитам части СРБ-пентамера, который сам по себе может подавлять агрегацию тромбоцитов, то есть включается внутренняя регуляция активности тромбоцитов [26]. Кроме того, надо учитывать, что исследование маркеров воспаления проводилось через год после вмешательства, когда у большинства больных воспалительный процесс уже стихал, и здесь необходимо было проводить разделение на группы по первоначальным (до отмены) значениям маркеров воспаления. В исследовании ARMYDA через месяц после вмешательства, когда воспаление сохраняется у большинства

Таблица 2. Влияние клопидогрела на уровень некоторых маркеров воспаления, по данным исследований

Исследование	Популяция и длительность терапии	Терапия	Маркеры воспаления	Результаты
		Монотерапия клопидогрелом		
ASCET Проспективное рандомизированное открытое [8]	Стабильная ИБС (n=206) 1 год	Аспирин/клопидогрел	вчСРБ, TNF-α, IL-6, IL-10, MCP-1, P-селектин, CD4OL	Снижение TNF-α (p<0,001), показатели через месяц и через год не отличаются
Проспективное нерандомизированное [9]	Здоровые добровольцы (n=10) 6 дней	Клопидогрел/плацебо	P-селектин	Снижение ТРАП и АДФ-индуцированной экспрессии P-селектина (p<0,03)
		Аспирин + клопидогрел		
Проспективное нерандомизированное перекрестное [10]	Атеросклероз периферических артерий (n=44). Здоровые добровольцы (n=9)	Аспирин/клопидогрел/ аспирин + клопидогрел	ЛТА, P-селектин тромбоцитов, MAC-1, ICAM-1	Снижение ТРАП и АДФ-индуцированной экспрессии P-селектина, MAC-1, ЛТА и sICAM-1 (p<0,05) на клопидогреле
Проспективное нерандомизированное [11]	Атеросклероз периферических артерий (n=26) 2 нед	Аспирин/клопидогрел/ аспирин + клопидогрел	ЛТА, P-селектин, СРБ, sCD4OL	Снижение ЛТА и P-селектина на клопидогреле (p<0,001)
Проспективное рандомизированное двойное слепое [12]	Стабильная ИБС (n=73) 8 нед	Аспирин + плацебо/ аспирин + клопидогрел	sCD4OL, вчСРБ	Снижение sCD4OL на аспирине + клопидогреле (p=0,03), вчСРБ нет изменений
Проспективное нерандомизированное [13]	Стабильная ИБС (n=103) 5 нед	Аспирин + плацебо/ аспирин + клопидогрел	sCD4OL, RANTES, вчСРБ	Снижение sCD4OL (p<0,05), RANTES (p<0,01), вчСРБ (p<0,01) на аспирине + клопидогреле
Проспективное рандомизированное двойное слепое [15]	ОКС без ↑ST (n=115) 30 дней	Аспирин/аспирин + клопидогрел	вчСРБ, TNF-α	Снижение вчСРБ, TNF-α через 7 и 30 дней на аспирине и аспирине + клопидогреле (p<0,01). вчСРБ и TNF-α ниже на двойной терапии (p<0,05)
Проспективное рандомизированное [16]	ОКС без ↑ST (n=86) 36 нед	Клопидогрел/нет	P-селектин, вчСРБ, sCD4OL	Снижение вчСРБ, sCD4OL, P-селектина (p=0,018)
Проспективное нерандомизированное [17]	ЧКВ (n=833) 5 дней	Клопидогрел 300-600 мг	вчСРБ	Снижение вчСРБ (p=0,03)
Проспективное нерандомизированное [18]	ЧКВ (n=74) 24 ч	Клопидогрел/нет	ЛТА, CD4OL, P-селектин тромбоцитов, sCD4OL, IL-6	Снижение ЛТА (p=0,002), CD4OL (p=0,0007) до и после ЧКВ. P-селектин (p<0,0007), sCD4OL (p=0,04) после ЧКВ. IL-6 не менялся
ALBION Рандомизированное двойное слепое [22]	ОКС без ↑ST (n=103) 24 ч	Клопидогрел 300/600/900 мг	вчСРБ, sCD4OL, PAI-1, фактор Виллебранда	Нет отличий
Проспективное нерандомизированное [23]	ОКС без ↑ST (n=23) 24 ч	Клопидогрел 300 мг	ЛТА, P-селектин тромбоцитов, sCD4OL, sP-селектин	Снижение ЛТА (p<0,01), ТРАП и АДФ-индуцированной экспрессии P-селектина (p<0,01), sCD4OL, sP-селектина (p<0,001)

ОКС – острый коронарный синдром; ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство; ИБС – ишемическая болезнь сердца; вчСРБ – С-реактивный белок, измеренный высокочувствительным методом; TNF-α – фактор некроза опухоли; MCP-1 – хемоаттрактантный белок; CD40L – рецептор тромбоцитов, участвующий во взаимодействии с лейкоцитами; ЛТА – лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты; sP-селектин – растворимый P-селектин; PAI-I – ингибитор активатора плазминогена; RANTES – регулятор активации процессов экспрессии и секреции нормальных,Т-лимфоцитов; MAC-1 – мембран-аттрактантный комплекс; ICAM-1 – межклеточная молекула адгезии

Таблица 3. Влияние лечения клопидогрелом 75 мг/день на тромбоциты у больных ИБС

Группа	Спонтанная агрегация (отн. ед)	5 μM АДФ (%)	Количество ЛТА (%)	Большие ретикулярные тромбоциты (%)	СОТ (фл)	Уровень вчСРБ (нг/л)
Здоровые, n=18	1,1±0,3	35,6±13,1	0	0	8,6±1,3	0,27±0,2
До клопидогрела						
Больные ИБС (ЛТА+), n=34	2,7±0,9	61,1±11,7	32,3±14,2	4,4±2,5	12,6±2,7	2,7±0,6
Больные ИБС (ЛТА-), n=76	1,5±0,6	48,4±12,3	0	0,9±0,6	9,2±1,9	0,54±0,4
Клопидогрел 75 мг/день (2 мес)						
Больные ИБС (ЛТА+)	1,7±0,8*	38,3±15,2*	8,9±6,7*	1,7±0,7	10,7±2,1*	1,7±0,9*
Больные ИБС (ЛТА-)	1,3±0,7*	22,7±12,1*	0	0,7±0,4	9,1±1,0	0,42±0,3

*p<0,05. АДФ – аденозиндифосфат; ЛТА – лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты; СОТ – средний объем тромбоцитов (показатель определяется с помощью гемоанализатора); вчСРБ – измеренный высокочувствительным методом уровень СРБ в крови

больных, влияние клопидогрела было значимым и зависело от дозы препарата [27]. Через месяц приема препарата вчСРБ значительно снизился (p=0,016), при этом он был почти в 2 раза ниже в группе принимавших 150 мг/день по сравнению с терапией 75 мг/день клопидогрела. Подавление высокой активности тромбоцитов также было более эффективным на высокой дозе (50±20% против 31±20%). Эти данные свидетельствуют о том, что в период выраженного воспалительного процесса двойная доза клопидогрела более эффективна, чем стандартная.

По данным литературы, клопидогрел обладает плейотропным эффектом, который выражается в противовоспалительном действии, опосредованном через ингибирование тромбоцитов. Однако данных о влиянии клопидогрела на морфологическую картину и функции тромбоцитов, характерных для воспалительного процесса, недостаточно. Поэтому целью нашего исследования был анализ литературных и собственных данных о влиянии клопидогрела на тромбоциты при воспалении и выявление особенностей его использования у больных ИБС.

Материал и методы

В исследование были включены 110 больных документированной ИБС, стабильной стенокардией напряжения I-III ф.к. (73 мужчины и 37 женщин) в возрасте 42-67 лет (в среднем 52,6±6,2 лет) и 18 здоровых добровольцев (11 мужчин и 7 женщин) в возрасте 29-53 года (в среднем 39,2±9,8 лет). Ранее 67 больных перенесли инфаркт миокарда, а 86 была выполнена эндоваскулярная реваскуляризация коронарных сосудов или операция АКШ. У 84 (76,3%) больных наблюдалась ГЛП согласно критериям ВОЗ. Артериальная гипертония была у 59 (53,6%) больных. Исследование проводилось на фоне базисной терапии, которая у большинства больных включала прием 75-125 мг/сутки аспирина. Для оценки функций тромбоцитов кровь собирали самотеком в 0,13 М раствор цитрата натрия в соотношении 9:1 и центрифугировали при 180g 17 мин.

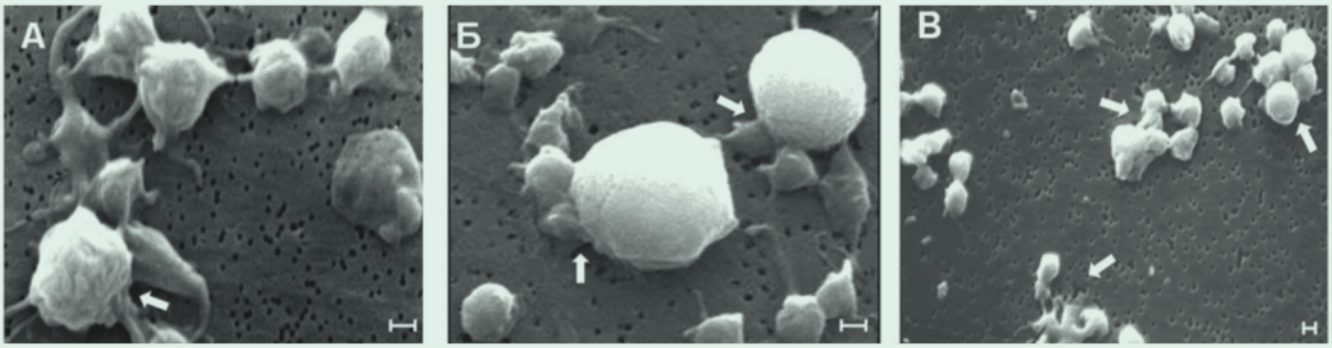
Агрегация. Способность к образованию агрегатов малого размера исследовали по спонтанной агрегации с помощью оценки среднего радиуса агрегатов, а 5.0 μM АДФ-индуцированную агрегацию регистрировали традиционным турбидометрическим способом на лазерном анализаторе агрегации «БИОЛА».

Сканирующая электронная микроскопия. 10 μл цельной крови непосредственно после забора фиксировали в 2,5% глутаровом альдегиде (1:30) для дальнейшего исследования морфологии тромбоцитов, микроагрегатов и ЛТА. Образцы фиксировали 1,5 ч при комнатной температуре, затем помещали на поликарбонатные мембраны с порами диаметром 0,22 μM, обезвоживали, высушивали и напыляли. Подсчет ЛТА, тромбоцитов различной формы и их микроагрегатов проводили на 25 полях сканирования при увеличении в ×2500 раз в сканирующем электронном микроскопе «PHILLIPS PSEM 550×» и выражали в % к общему количеству клеток в образце. В группе здоровых добровольцев на долю дисковидных тромбоцитов приходится 92,0±3,2%, сферических тромбоцитов обнаруживается 5,7±0,9%, биполярных протромбоцитов – 2,3±0,4%, и полностью отсутствуют большие или ретикулярные тромбоциты, микроагрегаты и ЛТА.

Средний объем тромбоцитов (СОТ). Измерение СОТ проводили на гемоанализаторе. На сегодняшний день этот показатель оценки тромбоцитов считается воспроизводимым и независимым от активации клеток, происходящей при выделении и обработке в условиях in vitro, показателем риска тромбоза у пациентов. Средний объем тромбоцитов считается нормальным, если он не превышает 10 фл.

Уровень СРБ в плазме оценивали высокочувствительным методом проточной нефелометрии на нефелометре «BN ProSpec».

Статистическую обработку выполняли с помощью программы Statistica 6.0 с использованием описательной и непараметрической статистики. Количественные



А – тромбоциты больного ИБС с ЛТА. Стрелкой показан большой ретикулярный тромбоцит размером 4 μМ; Б – циркулирующие в крови лейкоцитарно-тромбоцитарные агрегаты (показано стрелками); В – циркулирующие в крови микроагрегаты, состоящие не более чем из 10-15 тромбоцитов; Г – соотношение числа больных с ЛТА (34 человека, 30,8%) и без ЛТА (76 человек, 69,2%). Сканирующая электронная микроскопия. А, Б – увеличение х5000; В – увеличение ×2500. 1 бар=1 μМ

Рисунок 2. Особенности тромбоцитов при воспалении

данные представлены в виде М±σ, где М – среднее значение в выборке, а σ – стандартное отклонение от среднего.

Результаты

Нами выполнено исследование морфофункционального состояния тромбоцитов у больных ИБС с учетом субклинического воспаления, оцениваемого по повышению значений концентрации СРБ, регистрируемого высокочувствительным методом. При воспалении активация тромбоцитов приводит к образованию ЛТА, выявленных нами у 34 (30,8%) больных (рис. 2Б). Количество лейкоцитов, находящихся в агрегатах, составило 32,3±14,2% от общего числа лейкоцитарных клеток. У остальных 76 (69,2%) больных ЛТА отсутствовали, что характерно для здоровых лиц. При разделении больных по принципу присутствия или отсутствия ЛТА оказалось, что в группе с наличием ЛТА (ЛТА+) уровень СРБ был значительно выше (2,7±0,6), чем в группе ЛТА-, где его уровень 0,54±0,4 нг/л приближался к норме, соответствующей 0,27±0,2 нг/л (табл. 3). Такая картина свидетельствует о том, что на момент взятия крови у больных с повышенным содержанием СРБ был воспалительный процесс, а образование ЛТА еще раз подтверждает правомочность такого утверждения. У больных с ЛТА+ в крови наблюдали снижение числа дисковидных тромбоцитов и повышение количества активированных сферических форм (до 24,7±4,6%) по сравнению с контролем, а также появление больших ретикулярных тромбоцитов с повышенным протромботическим потенциалом, которых нет у здоровых лиц (рис. 2А). У 33% больных число ретикулярных тромбоцитов превышало 2% и коррелировало с повышенной спонтанной агрегацией (r=0,376). Повышенный СРБ наблюдался у больных с ЛТА, хотя их количество не коррелировало с числом ретикулярных тромбоцитов. Кроме того, у больных в группе ЛТА+ отмечено повышение СОТ до 12,6±2,7 фл по сравнению с 9,2±1,9 фл в группе ЛТА– и 8,6±1,3 фл в контроле. Можно предположить, что именно появление больших ретикулярных тромбоцитов приводит к повышению СОТ. Повышенный гемостатический потенциал ретикулярных тромбоцитов способствует агрегации тромбоцитов и появлению в крови циркулирующих агрегатов (рис. 2В), которые не были обнаружены ни у больных с ЛТА–, ни у здоровых лиц. В целом, активация тромбоцитов при воспалении сопровождается повышением функциональной активности. У большинства больных выявляется повышенная спонтанная агрегация, хотя почти у четверти больных агрегационный ответ сохраняется в пределах нормальных величин. Повышение способности тромбоцитов спонтанно агрегировать характерно для воспаления. В то же время, индуцированная агрегация на 5 μМ АДФ повышается редко. Возможно, это связано с тем, что большинство больных на момент исследования принимали аспирин, который снижает АДФ-индуцированную агрегацию, но в меньшей степени влияет на спонтанную агрегацию и не затрагивает образование ЛТА и ретикулярных тромбоцитов.

Клопидогрел оказывал действие как на морфологию тромбоцитов, так и на их функциональное состояние. Через 2 мес приема 75 мг/день клопидогрела в крови больных из группы ЛТА+ почти в 4 раза снижалось количество ЛТА (p<0,001), в 2,5 раз число больших ретикулярных тромбоцитов (p<0,01), с чем может быть связано уменьшение СОТ, и приближались к нормальным значениям показатели спонтанной агрегации (p<0,001). И хотя АДФ-индуцированная агрегация также снижалась почти в 2 раза (p<0,05), ее колебания были в пределах нормальных значений. В группе с ЛТА– клопидогрел также снижал практически все параметры, но эффект был менее выражен (табл. 3).

Обсуждение

Тромбоциты кроме известного участия в образовании тромба играют важную роль в иммунных процессах и воспалении. Характерной реакцией тромбо-

цитов на воспаление служит образование ЛТА, которое происходит в результате их активации и приводит к запуску целого каскада провоспалительных реакций [28]. Появление ЛТА может служить диагностическим признаком воспалительного ответа организма, в частности при инфаркте миокарда [29]. Помимо ЛТА характерным признаком воспаления является появление в крови больших ретикулярных тромбоцитов и микроагрегатов, а также спонтанная агрегация. Ретикулярные тромбоциты рождаются из мегакариоцитов с высокой плоидностью ядра. Повышение плоидности совершается под действием цитокинов, уровень которых значительно возрастает при воспалении. Происходит образование цепочки, в которой в ответ на появление медиаторов воспаления активируются тромбоциты и лейкоциты, выделяющие в кровоток цитокины, а те, в свою очередь действуя на мегакариоциты, меняют тромбоцитопоэз. В результате рождаются большие ретикулярные тромбоциты с повышенным содержанием прокоагулянтных факторов, высокой функциональной активностью, увеличенным содержанием внутриклеточных цитокинов, что в конце концов усиливает и развитие воспалительного процесса, и риск тромбоза. Косвенным отражением появления в крови таких тромбоцитов может служить показатель СОТ, который предлагается использовать для прогнозирования риска развития тромботических событий у больных [30].

В настоящее время атеросклероз рассматривают как хроническое заболевание, при котором волны воспаления чередуются с волнами репарации. С учетом этого обстоятельства можно объяснить, почему среди больных со стабильной формой течения встречаются лица с разной выраженностью воспаления, а также понять различия в состоянии тромбоцитов при исследовании клинически однородных групп больных.

Воспаление может быть причиной возникновения резистентности к терапии антиагрегантами [30]. Нами выявлено, что клопидогрел не только обладает антитромботическим эффектом, но и способен снижать характерные для воспаления изменения морфологии и функций тромбоцитов. Выявленное в приведенных выше работах влияние клопидогрела на снижение уровня Р-селектина, CD40L, ряда цитокинов и других молекул, которые появляются в крови в результате провоспалительной активации тромбоцитов, может быть связано как с его прямым действием на продукцию этих клеток, так и на их функциональное состояние в кровотоке. В то же время, нельзя исключить, что использование дезагрегантов, подавляющих активность тромбоцитов, может негативно влиять на иммунную функцию тромбоцитов.

Заключение

Клопидогрел является одним из наиболее широко применяемых в мире сердечно-сосудистых препаратов. В настоящее время на фармацевтическом рынке РФ имеет обращение достаточно широкий круг воспроизведенных препаратов клопидогрела, терапевтически эквивалентных оригинальному, например Плагрил (Dr.Reddy's Laboratories, Индия) [33,34]. В данной статье представлены доказательства реального превентивного действия в отношении осложнений коронарного атеросклероза, которое определяется, по-видимому, не только чисто антиагрегантным эффектом, но и некоторыми более глубокими эффектами, в частности противовоспалительной направленности, что требует дальнейшего изучения.

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 09-04-01329-а и № 11-04-01332

Литература

1. Rex S. et al. Immune versus thrombotic stimulation of platelets differentially regulates signalling pathways, intracellular protein-protein interactions, and alpha-granule release. Thromb Haemost 2009; 102: 97–110
2. Kuznik B.I. Cellular and molecular mechanisms of regulation of the hemostatic system in health and disease. Chita: Ekspress-Izdatel'stvo; 2010. Russian (Кузник Б.И. Клеточные и молекулярные механизмы регуляции системы гемостаза в норме и патологии. Чита: Экспресс-издательство; 2010).
3. Nurden A.T. Platelets, inflammation and tissue regeneration. Thromb Haemost 2011; 105 (Suppl 1): S13–S33
4. Wang L., Jacobsen S.E., Bengtsson A., Erlinge D. P2 receptor mRNA expression profiles in human lymphocytes, monocytes and CD34+ stem and progenitor cells. BMC Immunol 2004; 5:16-21
5. Myrtek D., Idzko M. Chemotactic activity of extracellular nucleotides on human immune cells. Purinergic Signal 2007; 3: 5–11
6. Graff J., Harder S., Wahl O. et.al. Anti-inflammatory effects of clopidogrel intake in renal transplant patients: effects on platelet-leukocyte interactions, platelet CD40 ligand expression, and proinflammatory biomarkers. Clin Pharmacol Ther 2005; 78(5): 468-476
7. Angiolillo D.J., Fernandez-Ortiz A., Bernardo E. et.al. Clopidogrel withdrawal is associated with proinflammatory and prothrombotic effects in patients with diabetes and coronary artery disease. Diabetes 2006;55(3): 780-784
8. Solheim S. et al. No difference in the effects of clopidogrel and aspirin on inflammatory markers in patients with coronary heart disease. Thromb Haemost 2006; 96: 660–664
9. Klinkhardt U. et al. Clopidogrel, but not abciximab, reduces platelet leukocyte conjugates and P-selectin expression in a human ex vivo in vitro model. Clin Pharmacol Ther 2002; 71: 176–185
10. Klinkhardt U. et al. Clopidogrel but not aspirin reduces P-selectin expression and formation of platelet-leukocyte aggregates in patients with atherosclerotic vascular disease. Clin Pharmacol Ther 2003; 73: 232–241
11. Rao A.K. et al. Effect of antiplatelet agents clopidogrel, aspirin, and cilostazol on circulating tissue factor procoagulant activity in patients with peripheral arterial disease. Thromb Haemost 2006; 96: 738–743
12. Azar R.R. et al. Effects of clopidogrel on soluble CD40 ligand and on high-sensitivity C-reactive protein in patients with stable coronary artery disease. Am Heart J 2006; 151: 521.e1–521.e4
13. Heitzer T. et al. Clopidogrel improves systemic endothelial nitric oxide bioavailability in patients with coronary artery disease: evidence for antioxidant and anti-inflammatory effects. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2006; 26: 1648–1652.
14. CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). Lancet 1996; 348: 1329–1339
15. Chen Y.G. et al. Effect of aspirin plus clopidogrel on inflammatory markers in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome. Chin Med J 2006; 119: 32–36
16. Vavuranakis M. et al. Randomized comparison of the effects of ASA plus clopidogrel versus ASA alone on early platelet activation in acute coronary syndromes with elevated high-sensitivity C-reactive protein and soluble CD40 ligand levels. Clin Ther 2006; 28: 860–871
17. Vivekananthan D.P. et al. Effect of clopidogrel pretreatment on periprocedural rise in C-reactive protein after percutaneous coronary intervention. Am J Cardiol. 2004; 94: 358–360
18. Quinn M.J. et al. Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory marker expression in patients undergoing percutaneous coronary intervention. Am J Cardiol 2004; 93: 679–684
19. Saw J. et al. The ELAPSE (Evaluation of Long-Term Clopidogrel Antiplatelet and Systemic Anti-Inflammatory Effects) study. J Am Coll Cardiol 2008; 52: 1826–1833
20. Jeffrey L., Anderson J. et.al., 2011 ACCF/AHA Focused Update Incorporated Into the ACC/AHA 2007 Guidelines for the Management of Patients With Unstable Angina/Non–ST-Elevation Myocardial Infarction. Circulation 2011; 123: e426-e579
21. Seyfarth H.J. et al. Effect of 300– and 450-mg clopidogrel loading doses on membrane and soluble P-selectin in patients undergoing coronary stent implantation. Am Heart J 2002; 143: 118–123
22. Montalescot G. et al. A randomized comparison of high clopidogrel loading doses in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: the ALBION (Assessment of the Best Loading Dose of Clopidogrel to Blunt Platelet Activation, Inflammation and Ongoing Necrosis) trial. J Am Coll Cardiol. 2006; 48: 931–938
23. Xiao Z., Theroux P. Clopidogrel inhibits platelet-leukocyte interactions and thrombin receptor agonist peptide-induced platelet activation in patients with an acute coronary syndrome. J Am Coll Cardiol 2004; 43: 1982–1988
24. Wykrzykowska J. et.al. Effect of clopidogrel discontinuation at 1 year after drug eluting stent placement on soluble CD40L, P-Selectin and CRP levels: DECADES (Discontinuation Effect of Clopidogrel After Drug Eluting Stent): a multicenter, open-label study. J Thromb Thrombolysis 2009;28:410–17
25. Sambu N. et.al. Effect of clopidogrel withdrawal on platelet reactivity and vascular inflammatory biomarkers 1 year after drug-eluting stent implantation: results of the prospective, single-centre CESSATION study. Heart. 2011;97:1661-1667
26. Eisenhardt S., Thiele J., Bannasch H. C-reactive protein How conformational changes influence inflammatory Properties. Cell Cycle 2009; 8(23): 3885-3892
27. Patti G. et.al. High Versus Standard Clopidogrel Maintenance Dose After Percutaneous Coronary Intervention and Effects on Platelet Inhibition, Endothelial Function, and Inflammation. J Am Coll Cardiol 2011; 57:771-778
28. Linden M., Jackson D. Platelets: pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis. Int J Biochem Cell Biol 2010; 42(11): 1762-1766
29. Michelson A., Barnard M., Krueger L. et.al. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin: studies in baboons, human coronary intervention, and human acute myocardial infarction. Circulation 2001; 104(13): 1533-1537
30. Chu S., Becker R., Berger P. et.al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. J Thromb Haemost 2010; 8(1):148-156
31. Pitchford S.C. Novel uses for anti-platelet agents as anti-inflammatory drugs. British J Pharmacol 2007; 152: 987–1002
32. Muhlestein J. Effect of antiplatelet therapy on inflammatory markers in atherothrombotic patients. Thromb Haemost 2010; 103: 71–82
33. Approved drug products with therapeutic equivalence evaluations. 31th ed. U.S. Department Of Health And Human Services FDA, 2011. Available at: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApproval-Process/UCM071436.pdf
34. Yakusevich VV Petrochenko AS, Simonov, VS, etc. The effect on platelet aggregation activity of the original (Plavix, Sanofi-Aventis, France) and generic (Plagril, Dr.Reddy 's, India) drug clopidogrel (results of a randomized comparative crossover study). Clinician 2012; (1): (in press). Russian (Якусевич В.В., Петроченко А.С., Симонов В.С., и др. Влияние на агрегационную активность тромбоцитов оригинального (Плавикс, Sanofi-Aventis, Франция) и генерического (Плагрил, Dr.Reddy's, Индия) препаратов клопидогреля (результаты рандомизированного сравнительного перекрестного исследования). Клиницист 2012; (1): (в печати)).

Поступила 12.12. 2011

Принята в печать 13.12.2011