

# Функциональные свойства нейтрофилов и тромбоцитов у больных диабетической нефропатией в динамике лечения с применением тиклопидина

А.Н. БЕЛОВОЛ, чл.-корр. НАМН Украины, д. мед. н., профессор; И.И. ТОПЧИЙ, А.Б. ТВЕРЕТИНОВ, А.Н. КИРИЕНКО, Т.Д. ЩЕРБАНЬ

/Институт терапии имени А.Т. Малой  
НАМН Украины, Харьков/

## Резюме

### Функциональні властивості нейтрофілів і тромбоцитів у хворих на діабетичну нефропатію в динаміці лікування із застосуванням тиклопідину

О.М. Біловол, І.І. Топчій, О.Б. Тверетинов, О.М. Кірієнко, Т.Д. Щербань

У ході дослідження було вивчено агрегацію тромбоцитів та адгезивні властивості нейтрофілів у 78 хворих на діабетичну нефропатію, 20 хворих на гіпертонічну хворобу і 10 здорових осіб у динаміці лікування тиклопідиним. Результати дослідження свідчать про якісну зміну стану тромбоцитарно-судинного гемостазу по мірі прогресування захворювання. Збільшення експресії молекул адгезії на нейтрофілах сприяє порушенню клітинної кооперації і може бути важливим чинником розвитку захворювання. Препарат тиклопідин має не лише дезагрегаційні, але й протизапальні властивості, знижуючи адгезивну здатність як тромбоцитів, так і нейтрофілів.

**Ключові слова:** діабетична нефропатія, тромбоцити, нейтрофіли, молекули адгезії

## Summary

### Functional Properties of Neutrophils and Platelets in Patients with Diabetic Nephropathy in the Dynamic of Ticlopidine Treatment

A.N. Belovol, I.I. Topchii, A.B. Tveretinov, A.N. Kirienko, T.D. Scherban

Platelets aggregation and neutrophils adhesive properties were studied in 78 patients with diabetic nephropathy, 10 patients with hypertension and 10 healthy volunteers in the dynamic of ticlopidine treatment. The results of our study indicate on qualitative change in platelet-vascular hemostasis state as the worsening of the disease. Increasing of adhesion molecules expression on neutrophils contributes the disturbances of cellular cooperation and may be an important factor in the disease progression. Ticlopidine has not only desaggregating but also anti-inflammatory properties by reducing adhesive properties as platelets as neutrophils.

**Key words:** diabetic nephropathy, platelets, neutrophils, molecules of adhesion

В повреждении сосудов при сахарном диабете (СД) принимает участие воспалительный компонент с нарушением структуры эндотелия, повышением его проницаемости и развитием альбуминурии [1, 2]. При развитии воспалительных процессов *in situ*, которые приводят к повреждению эндотелия, наряду с клетками белой крови большую роль играют и тромбоциты – при СД они не только непосредственно участвуют в развитии тромботических осложнений, но и способствуют распространению воспаления путем выделения специфических медиаторов [3]. Центральное место в антитромботической терапии занимает ацетилсалициловая кислота, но в связи с появлением у ряда пациентов аспиринорезистентности для профилактики тромбозов стали применять блокаторы АДФ-рецепторов тромбоцитарных мембран – тиклопидин и клопидогрель, которые блокируют GP1Ib/IIIa рецепторы тромбоцитов, противодействуют образованию больших стабильных тромбоцитарных агрегатов и препятствуют развитию ретинопатии при СД [4–7]. Более того, появились сообщения, что блокаторы АДФ-рецепторов тромбоцитов уменьшают активность воспаления в артериальной стенке и связанный с ним риск будущих атеротромботических событий [8]. Вместе с тем, немного известно о том, могут ли блокаторы АДФ-рецеп-

торов оказывать влияние на клетки крови при СД и какие маркеры повреждения должны использоваться для контроля за проводимой терапией у больных с риском сердечно-сосудистых осложнений.

В этой связи целью работы было изучить влияние тиклопидина на функционально-морфологические свойства нейтрофилов и тромбоцитов у больных диабетической нефропатией.

## Материалы и методы исследования

Под наблюдением находилось 78 больных СД 2-го типа, осложненных диабетической нефропатией (ДН). Контрольную группу составили 10 практически здоровых лиц. Среди обследованных было 36 мужчин и 42 женщины, средний возраст пациентов – 52,8±8,6 года. Длительность заболевания СД колебалась в широких пределах от 3 до 28 лет, в среднем – 15,5 лет. Диагноз и стадию ДН устанавливали в соответствии с классификацией С.Е. Mogensen (1983) на основании общеклинических методов обследования: клинические анализы крови и мочи, гликемический профиль, среднесуточная глюкозурия, определение микроальбуминурии, уровня общего белка, определение уровня креати-

нина и мочевины в крови и моче, ультразвуковое исследование паренхимы почек, офтальмоскопическое исследование глазного дна, измерение артериального давления. Из исследования исключали лиц с декомпенсацией СД, наличием первичной патологии почек (мочекаменная болезнь, инфекции мочевыводящих путей, врожденные аномалии мочевыводящих путей и почек), тяжелыми заболеваниями печени, злокачественными заболеваниями, заболеваниями системы крови. Все больные получали базовую гипотензивную терапию с использованием ингибитора АПФ (квинаприл 20 мг один раз в сутки) или антагониста рецепторов к ангиотензину II (лосартана в дозе от 25 до 50 мг в сутки) в комбинации с антагонистом кальциевых каналов (амлодипин в дозе от 5 до 10 мг в сутки). У 26 больных ДН I–IV ст. исследования проводили в динамике лечения с применением тиклопидина: в течение 20 дней больные принимали тиклопидин по 250 мг в сутки. Больные СД получали таблетированные сахароснижающие препараты диабетон MR 30–60 мг в сутки.

Диагноз и стадию ДН устанавливали на основе проведения комплекса клинико-лабораторных, биохимических, бактериологических, ультразвуковых и рентгенологических исследований. Функцию почек оценивали с учетом скорости клубочковой фильтрации (СКФ), которую вычисляли по формуле Кокрофта. Изучение агрегационной активности тромбоцитов производили методом турбодиметрической агрегатометрии (Born G., 1962). В качестве индуктора агрегации использовали АДФ в конечной концентрации 5 мкм/л. В сыворотке крови определяли концентрации общего холестерина (ОХС), триглицеридов (ТГ) и холестерина липопротеидов высокой плотности (ХС ЛПВП) ферментативным методом на автоматическом анализаторе «HumaGate» (Германия) с использованием наборов фирмы «Huma» (Германия). Общие липиды разделяли на фракции на силиколовых пластинах (Merck). Нейтрофилы выделяли из периферической крови больных и здоровых лиц центрифугированием на двойном градиенте плотности фикола-верографина (1,076 и 1,12). Содержание рецепторов адгезивных молекул ICAM (CD-54), VCAM (CD 106) на поверхности нейтрофилов определяли с помощью моноклональных антител в соответствии с инструкцией фирмы изготовителя (eBioscience). Агрегацию нейтрофилов определяли по изменению световой трансмиссии с использованием индуктора агрегации формилового пептида FMLP (formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine), «Sigma», США.

Полученные данные были статистически обработаны параметрическим методом с применением t-критерия Стьюдента.

## Результаты и их обсуждение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о качественном изменении состояния тромбоцитарно-сосудистого гемостаза по мере усугубления тяжести заболевания (табл. 1). Так, если у больных ДН начальных стадий без нарушения азотовыделительной функции почек отмечалась повышенная активность тромбоцитов в виде увеличения скорости агрегации, без грубых изменений тромбоцитарного гемостаза

**Таблица 1.** Основные клинические и лабораторные показатели у больных диабетической нефропатией

Показатель	Контрольная группа (n=8)	Больные диабетической нефропатией (n=78)		
		Нормо альбуминурия (n=14)	Микроальбуминурия (n=48)	Протеинурия (n=16)
Наличие белка в моче				
Возраст, годы	28,4±0,5	36,9±0,8	42,9±1,3	49,7±1,9
Продолжительность сахарного диабета, годы	–	14,8±0,8	17,3±1,0	20,5±1,9
Общий холестерин сыворотки крови, ммоль/л	4,0±0,27*	4,82±0,78*	5,6±0,8*	6,4±0,87*
Триглицериды сыворотки крови, ммоль/л	0,99±0,02*	1,2±0,04*	1,78±0,02*	2,01±0,06*
ICAM-1 (CD-54)% клеток, на нейтрофилах	8,5±0,68	12,6±0,85*	18,6±0,87*	38,91±1,2*
VCAM (CD-106)% клеток, на нейтрофилах	10,6±0,23*	13,1±0,7*	18,4±0,86*	29,8±1,3*
L-selectin (CD-62)% клеток, на нейтрофилах	12,8±0,8	16,57±0,47	28,5±1,5	40,9±1,8
Спонтанная адгезия нейтрофилов, %	38±1,59	48±1,9*	62±2,9*	75±3,2*

Примечание: \* – достоверность  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля.

в целом, то агрегатограмма пациентов с этой патологией, но с наличием хронической болезни почек III–IV ст., свидетельствовала о прогрессировании нарушений тромбоцитарного гемостаза. Угнетение дезагрегации в сочетании с повышенным агрегационным ответом может способствовать скорейшему переходу агрегации в необратимый процесс и, следовательно, тромбообразованию.

Применение комбинированной терапии с использованием тиклопидина привело к следующим изменениям (табл. 2).

Агрегация тромбоцитов снизилась на 19% ( $p < 0,05$ ) у больных ДН на начальных стадиях заболевания. В группе больных ДН с нарушением азотовыделительной функции наблюдали снижение агрегации тромбоцитов на 15%.

На фоне повышения агрегации тромбоцитов у больных ДН изменялись также агрегационные свойства нейтрофилов. Изменение адгезивных характеристик является, по-видимому, наиболее чувствительной реакцией нейтрофилов – как на воздействие патогенных факторов, так и на применение лекарств. Перемещение нейтрофилов из периферической крови в ткань

**Таблица 2.** Индекс агрегации тромбоцитов в динамике лечения, %

Группы больных	До лечения	После базовой терапии	После лечения тиклопидином
Контроль (n=14)	37,1±1,5		
ДН I–III ст. (n=36)	40,8±1,2*	38,8±2,3	32,4±2,5
ДН IV ст. (n=32)	44,3±2,1*	41,2±2,3	35,2±2,2

Примечание: \* – достоверность  $p < 0,05$  в сравнении с группой контроля.

почки обусловлено их защитной функцией, но вместе с тем является важным фактором развития поражения почечной ткани и артериальных сосудов. В настоящем исследовании адгезивную способность нейтрофилов оценивали, определяя агрегацию клеток в ответ на стандартный активатор FMLP. Результаты исследования представлены на рисунке.

По сравнению с контролем у больных ДН отмечено достоверное повышение количества агрегированных нейтрофилов на всех стадиях заболевания. Усиление агрегационной способности нейтрофилов у больных ДН может быть связано с развитием оксидантного стресса и активацией системы цитокинов и адгезивных молекул. Ранее авторами было показано, что адгезия нейтрофилов активируется при образовании супероксидов и может угнетаться оксидом азота [1]. Как показали результаты данного исследования, лечение больных ДН с применением тиклопидина приводило к незначительному, но достоверному снижению агрегационной способности нейтрофилов.

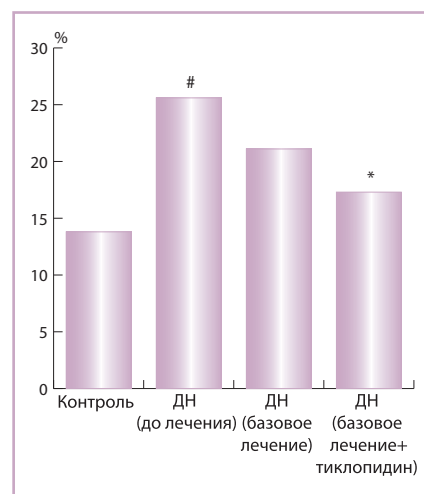
Таким образом, тиклопидин является не только эффективным средством коррекции повышенной агрегационной активности тромбоцитов у больных ДН, но и может влиять на адгезивные свойства нейтрофилов. Результаты исследования свидетельствуют о хорошей клинической переносимости тиклопидина больными ДН. Самочувствие всех обследованных больных в ходе курсового лечения препаратом в течение как 10 дней, так и 20 дней было удовлетворительным, изменения состава периферической крови, геморрагических явлений, кожной сыпи и других побочных эффектов не наблюдали.

В настоящее время в клинике внутренних болезней общепризнанным маркером вялотекущего воспаления является С-реактивный белок (СРБ), он же считается потенциальным диагностическим и прогностическим показателем атеротромботической болезни [7, 9]. Накопленные данные показали, что повышенные плазменные уровни СРБ играют роль в прогнозировании будущих кардиальных событий у больных с инфарктом миокарда, стабильной или нестабильной стенокардией и даже у практически здоровых лиц [10, 11]. Однако механизмы связи воспалительного процесса с тромбогенным потенциалом были недостаточны ясными. Экспериментальные исследования продемонстрировали, что ингибирование агрегации тромбоцитов при помощи клопидогреля и блокаторов гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa связано с уменьшением содержания СРБ [12]. Следовательно, существует определенная связь воспалительного потенциала крови с функциональными свойствами тромбоцитов. Полученные данные свидетельствуют, что в развитии воспаления сосудистой стенки принимают участие нейтрофилы и адгезивные молекулы, способствующие денудации эндотелия и повышению риска развития тромботических осложнений. У здоровых лиц для замещения апоптотных и отслоившихся эндотелиоцитов в зону повреждения тромбоциты рекрутируют эндотелиальные CD-34 клетки-предшественники (ЭКП) [13]. Однако согласно гипотезе [6] под воздействием оксидантного стресса модифицированные триглицериды и липопротеиды низкой плотности изменяют функциональные свойства тромбоцитов и способствуют трансформации CD-34 клеток в пенные. Установленная в ходе исследования связь этих процессов с выраженностью альбуминурии может

свидетельствовать о нарушении репарации эндотелия капилляров клубочков с сохраняющимися на неопределенное время участками десквамации в местах предполагаемого отслоения клеток эндотелия, подвергшихся апоптозу. Воспаление играет критическую роль в развитии неустойчивости эндотелия и изъязвления атеросклеротической бляшки с последующими неблагоприятными сердечно-сосудистыми событиями [11].

Кроме потенциального участия в образовании нестабильных атеросклеротических бляшек, другие факторы могут объяснить повышенный риск неблагоприятных сосудистых событий у больных ДН с повышенной активностью клеток белой крови. Повышенное воспалительное состояние вызывает устойчивость к тромболитической терапии [14], и это может способствовать тромботической окклюзии при накоплении сердечно-сосудистых факторов риска у больных СД с высоким воспалительным потенциалом [15]. Таким образом, можно было ожидать, что у больных с повышенной активностью нейтрофилов агрессивная добавочная антитромбоцитарная терапия может снизить количество случаев неблагоприятных клинических событий.

В конце XX века было показано, что аспирин уменьшал количество воспалительных цитокинов и уровень СРБ у больных со стабильной стенокардией. Было предположено, что это связано со снижением циклооксигеназной активности, пролиферации клеток и выделения цитокинов. Более поздние исследования у пациентов с болезнью периферических артерий продемонстрировали снижение тромбоцитарных воспалительных маркеров у пациентов, у которых для лечения применялся клопидогрель или его комбинация с аспирином [16]. Подобное снижение воспалительных маркеров не было замечено при лечении одним только аспирином. В другом, более свежем исследовании у пациентов с острым коронарным синдромом было отмечено снижение выделяемых тромбоцитами воспалительных медиаторов у пациентов с высоким уровнем СРБ при использовании клопидогреля в дополнение к аспирину. Превентивное назначение клопидогреля в дополнение к аспирину уменьшало экспрессию тромбоцитарных маркеров воспаления, включая лиганды CD40 и CD62 – Р-селектина [17]. Анализ результатов исследования CREDO (Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation) продемонстрировал, что у больных с коронарными металлическими



**Рисунок.** Уровень агрегации нейтрофилов у больных диабетической нефропатией (ДН) в динамике комбинированного лечения с использованием тиклопидина

Примечания: # – достоверность относительно контроля ( $p < 0,05$ ); \* – достоверность относительно группы больных до лечения ( $p < 0,05$ )

стендами уровни СРБ и связанного с беременностью плазменного белка-А (PAPP-A) были независимо связаны с существенно увеличенной встречаемостью неблагоприятных сердечно-сосудистых событий в течение 1 года после операции [4]. Необходимо отметить, что клиническая эффективность от добавления клопидогреля к аспирину была самой значительной у тех пациентов, у которых наблюдались высокие уровни этих воспалительных биомаркеров. Как показано в данном исследовании, у пациентов в группе с высокой активностью нейтрофилов применение тиклопидина способствовало улучшению не только функции тромбоцитов, но и показателей клеток белой крови. Механизм этого обнаружения не полностью ясен. Известно, что тиклопидин взаимодействует с гликопротеидом IIa/IIIa путем угнетения связывания фибриногена с мембраной активированных тромбоцитов, он не влияет на синтез простагландинов и, в отличие от аспирина, не ингибирует циклооксигеназу (ЦОГ). Остается неясным, относится ли противовоспалительный эффект тиклопидина, установленный в данном исследовании, полностью к его антитромбоцитарному эффекту, особенно с учетом новых доказательств о влиянии клопидогреля на геном тромбоцита [18]. К сожалению, авторы не смогли изучить влияние тиклопидина на содержание адгезивных молекул, однако полученные данные свидетельствуют о том, что препарат обладает не только дезагрегационными, но и противовоспалительными свойствами, снижая адгезивную способность нейтрофилов.

## Выводы

1. У больных ДН на всех стадиях заболевания изменяется функциональное состояние тромбоцитов и нейтрофилов, в частности повышаются их агрегационные свойства.
2. Установлена эффективность препарата тиклопидин (Ипатон) при его назначении ежедневно внутрь в суточной дозе 250 мг больным ДН на разных стадиях заболевания.
3. Тиклопидин улучшает реологические свойства крови и имеет удовлетворительную переносимость.
4. Можно рекомендовать тиклопидин для коррекции повышенной агрегационной активности тромбоцитов и нейтрофилов у больных ДН.

## Литература

1. Топчий И.И., Кондаков И.К., Криворотко Ю.В., Гаргин В.В. Плотность капилляров, гистохимические особенности распределения NO-синтазы и лейкоцитов в почках больных гломерулонефритом и диабетической нефропатией // Укр. журн. нефрології та діалізу. – 2009. – №2. – С. 13–18.
2. Packard R.R., Libby P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction // Clin. Chem. – 2008. – Vol. 54. – P. 24–38.

3. Weyrich A.S., Lindemann S., Zimmerman G.A. The evolving role of platelets in inflammation // J. Thromb. Haemost. – 2003. – Vol. 1. – P. 1897–1905.
4. Best P.J., Steinhilber S.R., Berger P.B. et al. The efficacy and safety of short- and long-term dual antiplatelet therapy in patients with mild or moderate chronic kidney disease: results from the Clopidogrel for the Reduction of Events During Observation (CREDO) trial // Am. Heart J. – 2008. – Vol. 155. – P. 687–693.
5. Boos C.J., Lane D.A., Karpha M. et al. Circulating endothelial cells, arterial stiffness, and cardiovascular risk stratification in Hypertension // Chest. – 2007. – Vol. 132. – P. 1540–1547.
6. Daub K., Langer H., Seizer P. et al. Platelets induce differentiation of human CD34+ progenitor cells into foam cells and endothelial cells // The FASEB Journal. – 2006. – Vol. 20. – P. 2559–2561.
7. Huang P.H., Lu T.M., Wu T.C. et al. Usefulness of combined high-sensitive C-reactive protein and N-terminal-probrain natriuretic peptide for predicting cardiovascular events in patients with suspected coronary artery disease // Coron. Artery Dis. – 2008. – Vol. 19. – P. 187–193.
8. Ferrante G., Niccoli G., Biasucci L.M. et al. Association between C-reactive protein and angiographic restenosis after bare metal stents: an updated and comprehensive meta-analysis of 2747 patients // Cardiovasc. Revasc. Med. – 2008. – Vol. 9. – P. 156–165.
9. Gurbel P.A., Bliden K.P., Tantry U.S. Effect of clopidogrel with and without eptifibatid on tumor necrosis factor-alpha and C-reactive protein release after elective stenting: results from the CLEAR PLATELETS 1b study // J. Am. Coll. Cardiol. – 2006. – Vol. 48. – P. 2186.
10. Malarstig A., Eriksson P., Hamsten A. Raised interleukin-10 is an indicator of poor outcome and enhanced systemic inflammation in patients with acute coronary syndrome // Heart. – 2008. – Vol. 94. – P. 724–729.
11. Miyamoto S., Ueda U., Ikemoto M. et al. Increased serum levels and expression of S100A8/A9 complex in infiltrated neutrophils in atherosclerotic plaque of unstable angina // Heart. – 2008. – Vol. 94. – P. 1002–1007.
12. Simon D.I., Xu H., Ortlepp S. 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1 // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2007. – Vol. 17. – P. 528–535.
13. Wagner D.D., Burger P.C. Platelets in inflammation and thrombosis // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2003. – Vol. 23. – P. 2131–2137.
14. Vavuranakis M., Latsios G., Aggelis D. 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. – Vol. 28. – P. 860–871.
15. Pearson T.A., Mensah G.A., Alexander R.W. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association // Circulation. – 2003. – Vol. 107. – P. 499–511.
16. Klinkhardt U., Bauersachs R., Adams J. 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. – Vol. 73. – P. 232–241.
17. Quinn M.J., Bhatt D.L., Zidar F. et al. Effect of clopidogrel pretreatment on inflammatory marker expression in patients undergoing percutaneous coronary intervention // Am. J. Cardiol. – 2004. – Vol. 93. – P. 679–684.
18. Simon T., Verstuyft C., Mary-Krause M. et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 360. – P. 363–375.