

## КЛИНИКА И ФАРМАКОТЕРАПИЯ

## ДИНАМИКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ КЛЕТОК КРОВИ И ЭНДОТЕЛИЯ У БОЛЬНЫХ ГИПЕРТОНИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ НА ФОНЕ ТЕРАПИИ ЭНАЛАПРИЛА МАЛЕАТОМ

Моисеева О.М., Беркович О.А., Виллевалде С.В., Лясникова Е.А., Емельянов И.В.

Научно-исследовательский институт кардиологии им. В.А. Алмазова МЗ России, Санкт-Петербург

## Резюме

*В работе изучалось влияние терапии ингибитором ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) эналаприла малеатом (“Энам®”) на функциональную активность клеток крови и вазомоторную функцию эндотелия у больных гипертонической болезнью (ГБ).*

*Обследован 21 больной с ГБ II стадии и 17 практически здоровых лиц (все мужчины). Оценивались результаты ультразвукового исследования сердца, лучевой и сонных артерий, спонтанная агрегация эритроцитов и тромбоцитов, деформируемость эритроцитов, активность лейкоцитов. Повторное обследование больных ГБ выполнено через 12 недель терапии эналаприла малеатом в дозе 10–40 мг/сут. Обнаружено повышение спонтанной агрегации эритроцитов и тромбоцитов, “жесткости” эритроцитов, функциональной активности лейкоцитов у больных ГБ. Антигипертензивный эффект на фоне терапии эналаприла малеатом наблюдался у 15 больных (71%). Улучшение реологических свойств крови и снижение активности лейкоцитов сопровождалось увеличением объемной скорости кровотока в лучевой артерии при отсутствии изменений эндотелий-зависимой вазодилатации. Длительная терапия эналаприла малеатом сопровождалась улучшением реологических свойств крови, снижением функциональной активности лейкоцитов и увеличением объемной скорости кровотока в лучевой артерии. Положительная динамика функционального состояния клеток крови не зависела от выраженности антигипертензивного эффекта препарата.*

**Ключевые слова:** гипертоническая болезнь, реология крови, активация лейкоцитов, эндотелиальная дисфункция, эналаприл.

Новая волна интереса к реологическим исследованиям связана с возможным участием эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов в ремоделировании сердца и сосудов при гипертонической болезни (ГБ). Поэтому при выборе антигипертензивной терапии необходимо учитывать влияние лекарственного препарата на функциональное состояние клеток крови. Особый интерес в этом плане вызывают ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (иАПФ), обладающие отчетливым антигипертензивным эффектом и влиянием на обратное развитие ремоделирования сердца и сосудов [1]. Однако данные об изменении реологических свойств крови на фоне длительной терапии различными иАПФ при достижении хорошего антигипертензивного эффекта противоречивы [2, 3].

Цель настоящей работы — изучить влияние терапии иАПФ — эналаприла малеатом (“Энам”, Д-р Редди’с Лабораторис ЛТД, Индия) на функциональную активность клеток крови и вазомоторную функцию эндотелия у больных ГБ.

## Материал и методы

В открытое, проспективное, неконтролируемое исследование был включен 21 мужчина с ГБ II ста-

дии в возрасте от 30 до 58 лет (средний возраст —  $46,4 \pm 1,6$  года) с длительностью заболевания  $11,5 \pm 8,3$  года и индексом массы тела (ИМТ)  $27,5 \pm 0,8$  кг/м<sup>2</sup>. Среди обследованных 44% — курящие. Исходно среднее по группе клиническое систолическое АД (САДкл) составило  $151,1 \pm 2,3$  мм рт.ст., клиническое диастолическое АД (ДАДкл) —  $99,3 \pm 1,8$  мм рт.ст. АДкл определялось как среднее трех измерений АД ртутным сфигмоманометром по методу Короткова, в положении сидя, после 5-минутного отдыха. У обследованных больных индекс массы миокарда левого желудочка (ИММЛЖ) и толщина комплекса интима-медиа (КИМ) сонных артерий составили  $129,8 \pm 6,2$  г/м<sup>2</sup> и  $0,82 \pm 0,04$  мм, соответственно. Пациенты не имели сопутствующей патологии, потенциально влияющей на функциональную активность клеток крови.

В качестве контрольной группы для определения функционального состояния клеток крови и эндотелия обследованы 17 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по возрасту и ИМТ с основной группой (средний возраст —  $47,2 \pm 1,5$  года; ИМТ —  $25,9 \pm 0,7$  кг/м<sup>2</sup>).

Суточное мониторирование АД (СМАД) осуществляли автоматической системой “SpaceLabs

**Таблица 1**  
**Реологические показатели крови и маркеры функциональной активности лейкоцитов**

Показатели	Больные ГБ II ст. (n = 21)	Контрольная группа (n = 17)
Коэффициент деформируемости эритроцитов	0,720 ± 0,008***	0,636 ± 0,011
Агрегация эритроцитов, %	77,7 ± 0,8***	68,1 ± 1,6
Агрегация тромбоцитов, %	16,4 ± 0,1***	2,2 ± 0,9
Лейкоциты, × 10 <sup>9</sup> /л	7,3 ± 0,3***	5,6 ± 0,3
CD3 <sup>+</sup> , %	68,4 ± 1,9	72,9 ± 2,8
CD69 <sup>+</sup> , %	10,6 ± 1,3	5,5 ± 1,8
CD25 <sup>+</sup> , %	20,6 ± 1,7	21,7 ± 1,2
CD3 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup> , %	4,9 ± 0,8	4,7 ± 0,5
CD11b <sup>+</sup> на лимфоцитах, %	30,9 ± 1,3***	21,1 ± 1,3
CD11b <sup>+</sup> на моноцитах, %	92,1 ± 1,6***	80,8 ± 3,8
Vcl-2 <sup>+</sup> , %	24,0 ± 1,7**	10,6 ± 1,7
CD95 <sup>+</sup> , %	51,4 ± 1,6**	42,2 ± 1,8
Адгезия нейтрофилов к эндотелию	16,1 ± 0,8***	10,6 ± 1,7

**Примечание:** достоверность различий оценивалась по методу Манна-Уитни:

\* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001.

90207", США, с интервалами между измерениями: днем-15мин, ночью-30мин. Для эхокардиографического (ЭхоКГ) обследования использовали аппарат VINGMED, System Five (GE, США), стандартный протокол с расчетом ИММЛЖ по формуле Devereux. Исследование эндотелий-зависимой вазодилатации (ЭЗВД) лучевой артерии проводили в пробе с реактивной гиперемией с использованием ультразвука высокого разрешения с применением 8 МГц линейного датчика (VINGMED, System Five, США) [4].

Спонтанная агрегация эритроцитов оценивалась по методу Ашкинази И.Я. 1977г. [5], деформируемость эритроцитов — с помощью пробы на упаковку [6], расчетный коэффициент деформируемости отражал степень "жесткости" клеток. Спонтанная

**Таблица 2**  
**Динамика уровня АД на фоне терапии эналаприла малеатом**

Показатели	До терапии эналаприлом	На фоне терапии эналаприлом (через 12 недель)
САДкл, мм рт.ст.	151,1 ± 2,3	133,8 ± 2,9***
ДАДкл, мм рт.ст.	99,3 ± 1,8	88,6 ± 2,1**
САД, среднеедневное, мм рт.ст.	147,1 ± 2,9	134,8 ± 3,3***
ДАД, среднеедневное, мм рт.ст.	92,8 ± 2,3	89,2 ± 2,9**
САД, средненочное, мм рт.ст.	129,8 ± 2,5	116,5 ± 4,0**
ДАД, средненочное, мм рт.ст.	79,7 ± 2,8	74,7 ± 3,3

Примечание: \* – p < 0,05; \*\* – p < 0,01; \*\*\* – p < 0,001.

агрегация тромбоцитов определялась по методу Wu et Hoak [7].

Количество лейкоцитов и гематокрит измеряли в пробах цельной венозной крови с помощью автоматического анализатора Sysmex, КХ-21 (Kobe, Япония). Фракции мононуклеарных лейкоцитов и нейтрофилов получали из богатой лейкоцитами плазмы методом дифференциального центрифугирования в градиенте плотности 1,077 (Histopaque, Sigma, США). Адгезивные свойства нейтрофилов исследовали с помощью эндотелиальной клеточной линии человека ECV304, полученной из Российской коллекции культур клеток позвоночных Института цитологии РАН [8]. После окраски препаратов по Майн-Грюнвальд-Романовскому, подсчитывалось среднее число нейтрофилов на 1мм монослойной культуры эндотелия в 10 полях зрения. Количество лимфоцитов, экспрессирующих антиапоптотический белок Bcl-2, оценивали методом непрямой иммуногистохимии с помощью моноклональных антител 1A4 и системы визуализации LSAB2 (DAKO, Дания). Панель моноклональных антител использовалась для изучения числа Т-лимфоцитов (CD3<sup>+</sup>), экспрессии ранних (CD69<sup>+</sup>) и поздних (CD25<sup>+</sup>, HLA DR<sup>+</sup>) маркеров активации лимфоцитов, интегриновых рецепторов на лимфоцитах и моноцитах (CD11b<sup>+</sup>) (CalTag, США), а также Fas-рецепторов (CD95<sup>+</sup>/APO-1) (DAKO, Дания) в цельной гепаринизированной крови методом проточной цитометрии (Becton Dickinson FACScan).

Статистическая обработка данных проведена с использованием пакета прикладных статистических программ Statistica for Windows ver 6.0. Корреляционные связи между парами количественных переменных оценивали, используя непараметрический ранговый коэффициент Спирмена. Для оценки динамики показателей на фоне лечения использовался парный непараметрический метод анализа по Вилкоксоу. Различия считались достоверными при p < 0,05. Результаты представлены в виде M ± m.

Через 14 дней после отмены предшествующей антигипертензивной терапии назначался эналаприла Малеат ("Энам") в дозе 10 мг/сут. Титрование дозы препарата (до 20-40 мг/сут) проводилось через 2-4 недели от начала терапии в зависимости от антигипертензивного эффекта и переносимости. Длительность терапии составила 12 недель, после чего больные были обследованы повторно.

За критерий эффективности терапии по АДкл принимали снижение ДАД на 10 мм рт.ст. от исходного, а целевой уровень ДАД — ниже 90 мм рт.ст.; по данным СМАД — снижение среднесуточного ДАД на 5 мм рт.ст. и более от исходного, а целевой уровень АД — 140/90 мм рт.ст. в дневное и 125/75 мм рт.ст. в ночное время.

## Результаты

В группе больных ГБ, по сравнению с контрольной группой, выявлено снижение деформируемости эритроцитов, а также увеличение агрегации эритроцитов и тромбоцитов (табл. 1). Установлена прямая зависимость между среднедневными САД, ДАД и показателями агрегации тромбоцитов при ГБ ( $r = 0,444$ ;  $p = 0,02$  и  $r = 0,497$ ;  $p = 0,008$ , соответственно), тогда как в контрольной группе подобной связи не обнаружено. Увеличение агрегации тромбоцитов у больных ГБ сопровождалось снижением ЭЗВД лучевой артерии ( $r = -0,478$ ;  $p = 0,007$ ). Однако достоверных различий в ЭЗВД ( $12,9 \pm 0,8\%$  и  $14,4 \pm 0,6\%$ , соответственно), степени прироста кровотока ( $126,7 \pm 17,0\%$  и  $111,1 \pm 10,9\%$ , соответственно) в лучевой артерии после 5-минутной ишемии в основной и контрольной группах не получено.

В группе больных ГБ зафиксировано увеличение количества лейкоцитов в периферической крови, адгезивные способности нейтрофилов, экспрессии бМ-субъединицы интегринового рецептора Мас-1 (CD11b<sup>+</sup>) на лимфоцитах и моноцитах, антиапоптотического белка Vcl-2 и Fas-рецепторов на лимфоцитах. Эти данные свидетельствуют о повышении функциональной активности лейкоцитов при ГБ. Активация лейкоцитов ассоциирована с увеличением продукции провоспалительных цито- и хемокинов, участвующих в ремоделировании сосудистой стенки и миокарда [9]. Степень адгезии нейтрофилов, экспрессия Vcl-2 в лимфоцитах были связаны с уровнем САДкл ( $r = 0,568$ ;  $p = 0,001$  и  $r = 0,492$ ;  $p = 0,001$ ). Существует параллелизм между степенью агрегации тромбоцитов и количеством CD11b<sup>+</sup>-позитивных лимфоцитов и моноцитов ( $r = 0,485$ ;  $p = 0,04$ ).

Антигипертензивный эффект на фоне терапии эналаприлом по АДкл наблюдался у 15 больных (71%), нормализация САДкл — у 52%, ДАДкл — у 48%. В целом, по группе, САДкл снизилось на 10,4%, ДАДкл — на 10,0% (табл. 2). По данным СМАД нормализация АД произошла у 57% больных, среди которых 60% составили пациенты с ГБ I степени и 40% — с ГБ II степени. Переносимость эналаприла малеата у большинства больных была хорошей, за исключением 1 (5%) пациента, появление кашля у которого потребовало отмены препарата.

Антигипертензивное действие эналаприла сопровождалось уменьшением спонтанной агрегации эритроцитов ( $p < 0,05$ ) и тромбоцитов ( $p < 0,001$ ) без изменений деформационных свойств эритроцитов (табл. 3). На фоне терапии эналаприла малеатом выявлено снижение адгезии нейтрофилов к эндотелию ( $p < 0,0001$ ), количества лейкоцитов, экспрессирующих адгезионные молекулы CD11b<sup>+</sup> ( $p = 0,003$ ), и числа Vcl-2 положительных клеток ( $p < 0,001$ ). Наряду

Таблица 3

## Динамика реологических показателей крови и маркеров функциональной активности лейкоцитов на фоне терапии эналаприла малеатом

Показатели	До терапии	На фоне терапии эналаприла малеатом (через 12 недель)
Коэффициент деформируемости эритроцитов	$0,720 \pm 0,008$	$0,705 \pm 0,007$
Агрегация эритроцитов, %	$77,7 \pm 0,8$	$75,4 \pm 0,7^*$
Агрегация тромбоцитов, %	$16,4 \pm 0,1$	$10,9 \pm 0,8^{***}$
Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	$7,3 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,5^*$
CD3 <sup>+</sup> , %	$68,4 \pm 2,0$	$69,4 \pm 2,1$
CD25 <sup>+</sup> , %	$20,6 \pm 1,7$	$16,1 \pm 1,2$
HLA-DR <sup>+</sup> , %	$16,3 \pm 1,3$	$14,9 \pm 1,4$
CD3 <sup>+</sup> DR <sup>+</sup> , %	$4,9 \pm 0,8$	$4,1 \pm 0,5$
CD69 <sup>+</sup> , %	$10,6 \pm 1,3$	$6,0 \pm 0,7^*$
CD11b <sup>+</sup> на лимфоцитах, %	$30,9 \pm 1,3$	$23,7 \pm 1,6^{***}$
CD11b <sup>+</sup> на моноцитах, %	$92,1 \pm 1,6$	$91,9 \pm 1,7$
Vcl-2 <sup>+</sup> , %	$24,0 \pm 1,7$	$16,5 \pm 2,1^{***}$
CD95 <sup>+</sup> , %	$51,4 \pm 1,6$	$59,1 \pm 1,4^{**}$
Адгезия нейтрофилов к эндотелию	$16,1 \pm 0,8$	$8,8 \pm 0,5^{***}$

Примечание: \* —  $p < 0,05$ ; \*\* —  $p < 0,01$ ; \*\*\* —  $p < 0,001$ .

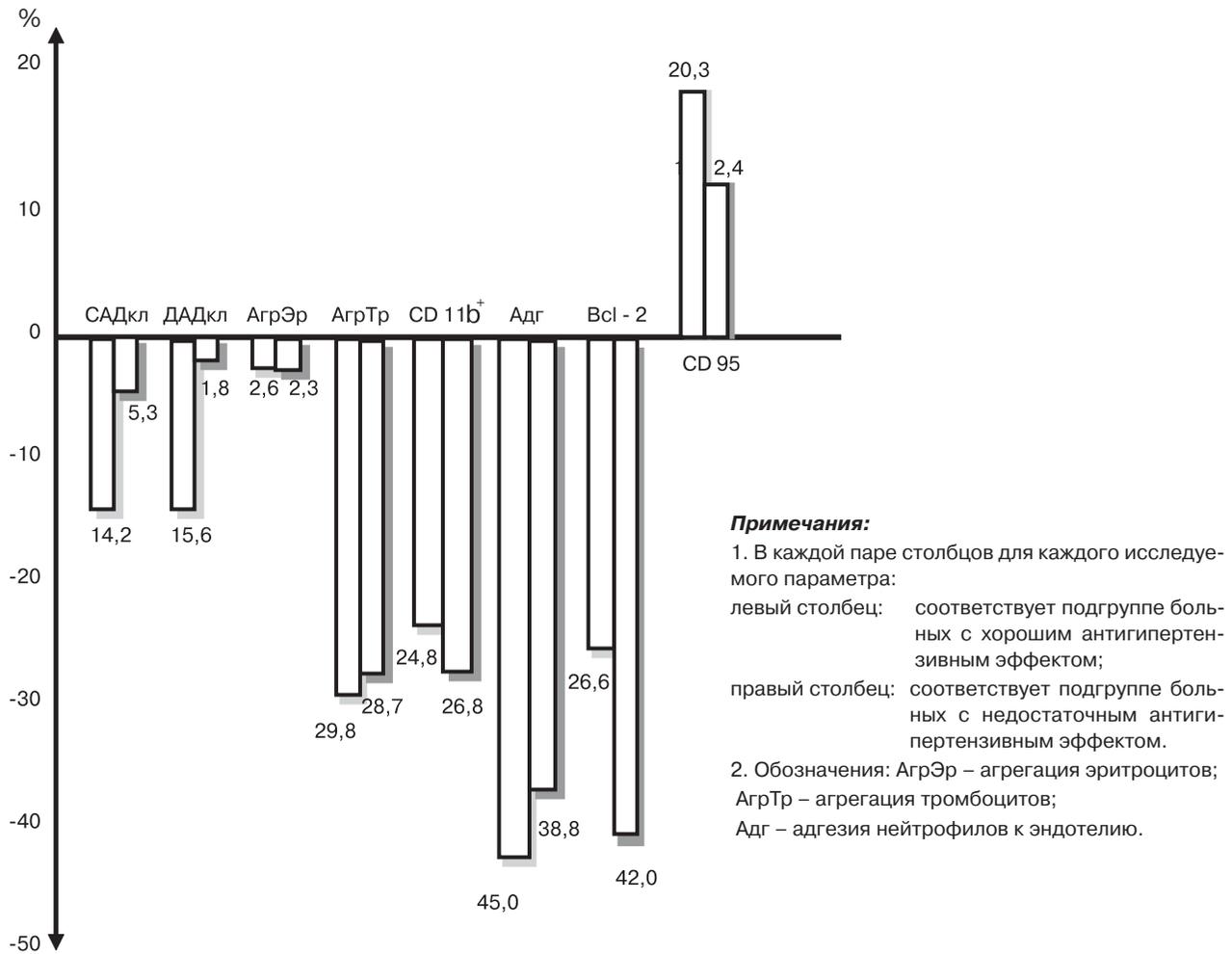
ду с этим, отмечалось увеличение экспрессии проапоптотических Fas-рецепторов ( $p = 0,001$ ).

При повторном обследовании не было получено изменений ЭЗВД лучевой артерии ( $12,9 \pm 0,8\%$  и  $12,5 \pm 1,1\%$ , соответственно;  $p > 0,05$ ) или прироста линейной скорости кровотока в пробе с реактивной гиперемией ( $126,7 \pm 17,0\%$  и  $137,6 \pm 17,6\%$ , соответственно;  $p > 0,05$ ). Однако улучшение реологических свойств крови и снижение функциональной активности лейкоцитов на фоне терапии эналаприла малеатом сопровождалось увеличением объемной скорости кровотока в лучевой артерии ( $489,0 \pm 40,5$  мл/мин и  $710,7 \pm 77,8$  мл/мин, соответственно;  $p = 0,005$ ) после 5-минутной ишемии.

В группе больных с отсутствием антигипертензивного эффекта на фоне терапии эналаприла малеатом также выявлено снижение функциональной активности лейкоцитов и улучшение реологических свойств крови (рис. 1).

## Обсуждение

Снижение деформируемости эритроцитов, повышение агрегации эритроцитов и тромбоцитов приводит к нарушению текучих свойств крови, прежде всего, на уровне микроциркуляторного русла. Повышенная агрегация тромбоцитов за счет высвобождения вазоактивных субстанций (тромбоксана А2, АДФ, серотонина) оказывает прямое действие на сосудистый тонус. Следовательно, вышеперечисленные факторы



**Рис. 1.** Динамика функционального состояния клеток крови на фоне терапии эналаприла малеатом.

могут принимать участие в увеличении периферического сопротивления при ГБ.

Активация тромбоцитов сопровождается не только увеличением их адгезии к эндотелию, но и образованием агрегатов с лейкоцитами. Этот процесс опосредуется через Пб/Ша рецепторы на тромбоцитах и интегриновые рецепторы на лейкоцитах (CD11b<sup>+</sup>/CD18, или Mac-1). Одновременно потеря антиадгезионных и дезагрегантных свойств эндотелием, как проявление его дисфункции при ГБ, приводит к адгезии пристеночного пула лейкоцитов. Опосредованно, путем нарушения процессов трансмиграции лимфоцитов и моноцитов через эндотелиальный барьер, развиваются воспалительные изменения в миокарде и стенке сосудов, что может способствовать ускорению атерогенеза и развитию фиброза [10].

Процесс фиброза при ГБ тесно связан с программируемой гибелью клеток или апоптозом. Основной механизм повреждения клеток при АГ — увеличение образования супероксидных анионов. Маркером свободнорадикального повреждения клеток при ГБ служит экспрессия Fas-рецепторов [11]. Белки семейства

Vcl-2, расположенные в митохондриях, участвуют в регуляции и блокаде Fas-связанного апоптоза. Через дисфункцию митохондрий опосредуется второй путь программируемой гибели клеток. Увеличение экспрессии Vcl-2 в лимфоцитах у больных ГБ следует рассматривать как адаптивную реакцию, направленную на защиту клеток от апоптоза в условиях повышенного образования ими супероксидных анионов [12].

Таким образом, рост числа Fas-позитивных лимфоцитов свидетельствует о готовности клеток к программируемой гибели и наряду с HLA-DR, IL-2-рецепторами (CD25), CD69 может рассматриваться как активационный маркер лимфоцитов [13].

Синтез коллагена в тканях сопряжен с высокой плотностью ангиотензиновых рецепторов и повышением содержания АПФ. Поэтому антигипертензивные препараты, подавляющие активность АПФ, могут рассматриваться как препараты выбора для коррекции нарушений эластических свойств сосудов и диастолической дисфункции миокарда при ГБ [14].

Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что длительная терапия эналаприла ма-

леатом сопровождается снижением функциональной активности лейкоцитов, агрегации эритроцитов и тромбоцитов. Тогда как величина поток-связанной ЭЗВД лучевой артерии на фоне проводимой терапии существенно не изменилась. Объяснение этому факту следует искать в исходном отсутствии различий ЭЗВД у больных ГБ и в контрольной группе. Отдель-

но были проанализированы результаты обследования больных с недостаточным антигипертензивным эффектом. У этих больных также наблюдалась положительная динамика функционального состояния клеток крови, что может свидетельствовать о роли негемодинамических эффектов терапии и блокирования тканевой ренин-ангиотензиновой системы.

#### Литература

- Schneider RE, Martus P, Klingbeil A. Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension: a meta-analysis of randomized double-blind studies//JAMA 1996; 275(19): 1507-13.
- Islim IF, Bareford D, Beevers DS. A single (investigator)-blind randomized control trial comparing the effects of quinapril and nifedipine on platelet function in patients with mild to moderate hypertension// Platelets 2001; 12 (5): 274-8.
- Muravyov AV, Meiselman HJ, Yakusevich VV, Zamishlayev AV. Effects of antihypertensive therapy on hemorheological profiles in female hypertensive patients with initially low or high whole blood viscosity//Clin. Hemorheol. Microcirc. 2002; 26 (2): 125-35.
- Agewall S, Doughty RN, Bagg W, et al. Comparison of ultrasound assessment of flow-mediated dilatation radial and brachial artery with upper and forearm cuff positions// Clin. Physiol. 2001; 21 (1): 9-14.
- Ашкинази И.Я. Эритроцит и внутреннее тромбопластинообразование// Ленинград "Наука" 1977.
- Моисеева О.М., Моисеев С.И., Гуревич В.С. Способ определения деформальности эритроцитов. Лаб. дело 1990; 10: 55-7.
- Wu KK, Hoak JC. A new method for the quantitative detection of platelet aggregates in patients with arterial insufficiency// Lancet 1974; 2: 924-6.
- Suda K, Rothen-Rutishauser B, Gunthert M. et al. Phenotypic characterization of human umbilical vein endothelial (ECV304) and urinary carcinoma (T24) cells: endothelial versus epithelial features. In vitro cell dev boil anim 2001; 37(8): 505-14.
- Dorffel Y, Latsch C, Stuhlmuller B, et al. Preactivated peripheral blood monocytes in patients with essential hypertension// Hypertens. 1999; 34(1): 113-7.
- Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. Endothelial function and hemostasis//Z. Kardiol. 2000; 89 (3): 160-7.
- Um HD, Orenstein JM, Wahl SM. Fas-mediated apoptosis in human monocytes by a reactive oxygen intermediate dependent pathway// J. Immunol. 1996; 156 (9): 3469-77.
- Schindowski K, Leutner S, Muller WE, Eckert A. Age-related changes of apoptotic cell death in human lymphocytes// Neurobiol. Aging 2000; 21(5): 661-70.
- Leucocyte typing white cell differentiation antigens. Proceedings of the fifth international workshop and conference// Oxford, New York, Tokyo: Oxford University Press; 1995.
- Frohlich ED, Horinaka S. Cardiac and aortic effects of angiotensin converting enzyme inhibitors//Hypertens. 1991; 18 (Suppl II): 2-7.

#### Abstract

*The influence of ACE inhibitor enalapril therapy on functional activity of blood cells and vasomotor function of endothelium in patients with essential hypertension (EH) was studied. 21 patients with EH II stage and 17 almost healthy persons (all males) were included. Ultrasound of heart, radial and carotid arteries, spontaneous platelet and erythrocyte aggregation, erythrocyte deformity and leukocyte activity were assessed. The second examination of patients with EH was carried out in 12 weeks following enalapril treatment with 10-40 mg a day. Baseline increase of spontaneous platelet and erythrocyte aggregation, erythrocyte hardness and leukocyte activity were revealed in patients with EH. Antihypertensive effect of enalapril was in 15 patients (71%). Hemoreology improvement and decrease of leukocyte activity were accompanied by increase of volume flow velocity in radial artery while endothelium-dependent vasodilation was unchanged. Long-term enalapril therapy was accompanied by improvement of hemoreology, decrease of leukocyte activity and increase volume flow velocity in radial artery. Positive dynamics of functional states of blood cells did not depend on severity of antihypertensive effect of enalapril.*

**Keywords:** essential hypertension, hemoreology, leukocyte activation endothelial dysfunction, enalapril.

Поступила 20/10-2003

\*Авторы выражают благодарность заведующему лабораторией проточной цитометрии Института цитологии РАН Зенину В.В. за техническую помощь в выполнении исследования.