

РАМИПРИЛ ПОВЫШАЕТ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ТРОМБОЦИТОВ К ОКСИДУ АЗОТА. ЗНАЧЕНИЕ ЭТОГО ФЕНОМЕНА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ С ВЫСОКИМ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМ РИСКОМ

S.R. Willoughby, S. Rajendran, W.P. Chan, N. Procter, S. Leslie, E.A. Liberts, T. Heresztyn, Y.Y. Chirkov, J.D. Horowitz*

Отделение кардиологии, Институт Basil Hetzel, Больница Королевы Елизаветы, Факультет медицины, Университет Аделаиды, Аделаида, Австралия

Адаптированный перевод и публикация статьи осуществлены с разрешения Американской коллегии кардиологов (American College of Cardiology) под контролем экспертов ВНОК. Статья S.R. Willoughby, S. Rajendran, W.P. Chan, N. Procter, S. Leslie, E.A. Liberts, T. Heresztyn, Y.Y. Chirkov, J.D. Horowitz «Ramipril Sensitizes Platelets to Nitric Oxide. Implications for Therapy in High-Risk Patients» впервые опубликована в J Am Coll Cardiol 2012;60(10):887-94; doi:10.1016/j.jacc.2012.01.066. © 2012 by the American College of Cardiology Foundation

Перевод: Чилигина Н.С.

Рамиприл повышает чувствительность тромбоцитов к оксиду азота. Значение этого феномена для лечения больных с высоким сердечно-сосудистым риском

S.R. Willoughby, S. Rajendran, W.P. Chan, N. Procter, S. Leslie, E.A. Liberts, T. Heresztyn, Y.Y. Chirkov, J.D. Horowitz*

Отделение кардиологии, Институт Basil Hetzel, Больница Королевы Елизаветы, Факультет медицины, Университет Аделаиды, Аделаида, Австралия

Цель. Целями настоящей работы, в которую вошли 2 последовательных исследования в группе больных с высоким сердечно-сосудистым риском с критериями включения, аналогичными исследованию HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation), были: 1) проверка гипотезы о том, что рамиприл улучшает способность тромбоцитов реагировать на оксид азота (NO) и 2) изучение биохимических и физиологических эффектов лечения рамиприлом в когорте больных с резистентностью тромбоцитов к NO.

Введение. Рамиприл предотвращает сердечно-сосудистые события, но механизм(ы) этого эффекта остаются неопределенными. У значительной части пациентов с сахарным диабетом (СД) или ишемической болезнью сердца (ИБС) имеется резистентность к NO как на уровне тромбоцитов, так и на уровне сосудов, что является независимым фактором риска сердечно-сосудистых событий.

Методы. Исследование 1: двойное слепое рандомизированное сравнительное исследование рамиприла (10 мг) и плацебо в группе пациентов (n=119) с ИБС или СД и дополнительными факторами коронарного риска, в котором изучалось влияние препарата на способность тромбоцитов реагировать на NO. Исследование 2: последующее краткосрочное исследование влияния рамиприла в группе пациентов (n=19) с нарушенной реакцией тромбоцитов на NO, в котором изучали механизм его действия.

Результаты. В исследовании 1 терапия рамиприлом повышала способность тромбоцитов реагировать на NO по результатам оценки агрегации ($p<0,001$), но этот эффект наблюдался преимущественно у пациентов с исходным тяжелым нарушением реакции на NO (n=41). В исследовании 2 терапия рамиприлом также повышала способность тромбоцитов реагировать на NO ($p<0,01$), и это улучшение имело прямую связь с увеличением образования циклического гуанозинмонофосфата в NO-стимулированных тромбоцитах ($p<0,02$), но не было связано с изменением уровня тромбоспондина-1 в плазме.

Заключение. У больных с высоким сердечно-сосудистым риском (похожих на пациентов в исследовании HOPE) терапия рамиприлом уменьшает резистентность тромбоцитов к NO, что связано с увеличением образования растворимой гуанилатциклазы в NO-стимулированных тромбоцитах. Этот эффект, вероятно, может быть полезным при лечении больных, и результаты исследования позволяют выделить пациентов, у которых терапия рамиприлом особенно эффективна.

Ключевые слова: асимметричный диметиларгинин, циклический гуанидинмонофосфат, резистентность к оксиду азота, агрегация тромбоцитов, рамиприл.

РФК 2012;8(4):595-603

*Автор, ответственный за переписку: john.horowitz@adelaide.edu.au

Работа выполнена при поддержке грантов Aventis Pharmaceuticals и Национального совета здравоохранения и медицинских исследований (National Health and Medical Research Council) Австралии. Доктор Willoughby получил Премию профессионального развития Национального совета здравоохранения и медицинских исследований Австралии (APP1012729). Все остальные авторы сообщают, что не имели никаких финансовых взаимоотношений, имеющих отношение к теме работы, о которых следует представлять сведения. Доктора Willoughby и Rajendran внесли равный вклад в эту работу.

Рукопись поступила 21.11.2011; переработанная рукопись получена 20.01.2012, принята 23.01.2012.

Изучение влияния рамиприла в исследовании HOPE (Heart Outcomes Prevention Evaluation) [1] и периндоприла в исследовании EUROPA (European Trial on Reduction of Cardiac Events With Perindopril in Stable Coronary Artery Disease) [2] доказало, что ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента (АПФ) снижают риск сердечно-сосудистых событий в популяции пожилых людей с высокой степенью риска. Лечение ингибиторами АПФ также снижало частоту развития инфаркта миокарда, инсульта, остановки сердца, сердечной недостаточности и осложнений, связанных с сахарным диабетом. Тем не менее, механизмы, лежащие в основе этих благоприятных эффектов, ранее не были

определены и являются предметом множества гипотез [3-8]. Хотя ингибиторы АПФ снижают частоту возникновения летальных и не смертельных событий, связанных с атеротромбозом, как у пациентов с хронической сердечной недостаточностью [9, 10], так и при развитии сердечной недостаточности после острого инфаркта миокарда [11, 12], возможные механизмы воздействия ингибиторов АПФ на тромбоциты изучены недостаточно. Сообщалось, что эналаприл не влияет на агрегацию тромбоцитов [13], а лизиноприл не изменяет уровень растворимого Р-селектина [14].

В нашем предыдущем исследовании эффектов периндоприла у пациентов с сердечной недостаточ-

ностью [15] не было выявлено значительного изменения агрегации тромбоцитов. Однако при лечении периндоприлом происходила нормализация исходно нарушенного ответа тромбоцитов на стимуляцию донаторами оксида азота (NO) (включая подавление агрегации тромбоцитов и увеличение концентрации циклического гуанозинмонофосфата [цГМФ] в тромбоцитах), что служит доказательством улучшения в сигнальной системе NO/цГМФ. Сниженная способность ответа тромбоцитов на NO, как часть общего феномена тканевой резистентности к NO [16], обычно встречается у пациентов с клиническими симптомами ишемической болезни сердца (ИБС) [17-19] и у пациентов с сахарным диабетом (СД) [20], и представляет собой самостоятельный маркер повышенного сердечно-сосудистого риска [21]. Сигнальный путь NO/цГМФ является важным физиологическим модулятором вазомоторного тонуса и функции тромбоцитов. Резистентность к NO определяется как нарушенный физиологический ответ на эндогенный и экзогенный оксид азота и может predisполагать к повышенному риску ишемических или тромботических событий [16].

Мы провели 2 последовательных исследования у больных с высоким сердечно-сосудистым риском (похожих на пациентов в исследовании HOPE): первое — для проверки гипотезы, что рамиприл улучшает способность тромбоцитов реагировать на NO у таких больных во всей когорте исследования; а второе — для изучения клеточных механизмов, лежащих в основе этого эффекта в предварительно выбранной подгруппе пациентов с резистентностью к NO. Результаты обоих исследований свидетельствуют о том, что восстановление способности реагировать на NO при лечении рамиприлом способствовало его полезным клиническим эффектам, выявленным в исследовании HOPE.

Методы

Исследование 1 – рандомизированное сравнение

Пациенты. В исследование 1 было включено 119 пациентов с высоким сердечно-сосудистым риском. Критерии включения больных были аналогичны критериям включения в исследование HOPE [1]. Соответствующими пациентами считались мужчины и женщины в возрасте ≥ 50 лет (в отличие от исследования HOPE, где возраст больных был ≥ 55 лет), у которых были ранее диагностированы ИБС, инсульт, болезни периферических сосудов и/или имелся СД в сочетании с еще одним фактором риска (артериальной гипертензией, повышенным уровнем холестерина, низким уровнем липопротеинов высокой плотности, курением или подтвержденной микроальбуминурией). Критериями исключения были симптомы сердечной недостаточности; прием ингибиторов АПФ, антагонистов рецепторов ангиотензина или антагонистов рецепторов аденозин

5'-дифосфата (АДФ); неконтролируемая артериальная гипертензия; клинически явная почечная недостаточность; инфаркт миокарда или инсульт, перенесенные в течение 4 нед перед включением в исследование. Также критерием исключения была сниженная способность тромбоцитов реагировать на стимуляцию АДФ (ответ < 4 Ом) (см. последующее обсуждение).

Дизайн исследования. Исследование было рандомизированной плацебо-контролируемой слепой оценкой воздействия рамиприла на способность тромбоцитов реагировать на нитропруссид натрия (НПН). Кроме того, для оценки влияния рамиприла на функцию эндотелия использовали определение уровня асимметричного диметиларгинина (АДМА) в плазме как маркера эндотелиальной дисфункции [22] и определение индекса аугментации (ИА) – как маркера жесткости артериальной стенки [23,24]. Изменения концентрации малонового диальдегида (МДА) в плазме использовали как показатели окислительного стресса [25].

Потенциально соответствующие пациенты ($n=202$) приняли участие в скрининговом исследовании, при котором у них были взяты образцы крови для измерения агрегации тромбоцитов. Пациенты, у которых результаты исследования АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов были более чем 4 Ом ($n=119$; см. «Исследования агрегации тромбоцитов») были распределены на основе программы рандомизации в группы лечения рамиприлом или соответствующим плацебо (препараты предоставлены Aventis Pharmaceuticals). Лечение рамиприлом было начато в дозе 5 мг/сут. Через 1 нед лечения всем пациентам доза рамиприла была повышена до 10 мг/сут при отсутствии противопоказаний (например, выраженного кашля или симптомов артериальной гипотензии). Образцы крови были взяты у всех пациентов перед началом лечения и через 4 и 12 нед терапии; ИА измеряли при каждом визите.

Взятие образцов крови. Образцы крови брали из локтевой вены в пластиковые пробирки, содержащие 1:10 объема кислого цитрата (2 части 0,1 моль/л лимонной кислоты на 3 части 0,1 моль/л тринатрия цитрата) и использовали для исследования агрегации тромбоцитов цельной крови.

Исследования агрегации тромбоцитов. Все исследования агрегации были выполнены с помощью двухканального импедансного агрегометра (модель 560, Chrono-Log), как было описано ранее [17]. Агрегацию индуцировали АДФ (конечная концентрация 1 или 2,5 $\mu\text{моль/л}$) и регистрировали ответ как изменение электрического сопротивления (Ом) с применением компьютерной системы для вывода данных (Aggrolink, Chrono-Log). В качестве показателя способности тромбоцитов реагировать на NO была использована реакция на нитропруссид натрия как донатор NO, а не на нит-

роглицерин, чтобы предотвратить любое потенциальное воздействие толерантности к нитратам на результаты оценки функции тромбоцитов [26]. НПН (с конечной концентрацией 10 $\mu\text{моль/л}$) добавляли в образцы крови за 1 мин до АДФ. Ингибирование агрегации НПН оценивали в процентах от максимальной агрегации, зарегистрированной в отсутствие добавления НПН. Необходимым требованием для минимизации погрешностей при расчете подавляющего агрегацию действия НПН был ответ на стимуляцию АДФ, по крайней мере, 4 Ом.

Аппланационная тонометрия. Оценка влияния рамиприла на жесткость артериальной стенки проводилась с использованием аппланационной тонометрии. Для определения ИА применялся импульсно-волновой анализ (AtCor Medical), как было описано ранее [23,24]. Регистрация пульсовых волн периферического давления проводилась на лучевой артерии доминирующей руки с использованием датчика микроманометра (SPT-301B, Millar Instruments) при сдавливании артерии, но без её окклюзии. Данные регистрировались непосредственно в системе SphygmoCor (AtCor Medical) и после записи 20 последовательных пульсовых волн генерировалась усредненная волна колебания периферического давления. Затем волна давления калибровалась в соответствии с артериальным давлением, определенным на плечевой артерии. Соответствующую центральную пульсовую волну (в восходящей аорте) получали автоматически преобразованием пульсовой волны, зарегистрированной на радиальной артерии с использованием валидированной трансформирующей функции; значение индекса аугментации определяли на основании прироста давления с поправкой на частоту сердечных сокращений.

Биохимические маркеры. Концентрацию АДМА – эндогенного ингибитора NO-синтазы измеряли в соответствии с ранее описанной методикой [22] с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии. МДА определяли модифицированным тестом с тиобарбитуровой кислотой [25].

Исследование 2 – изучение механизмов действия

Исследование 2, выполненное после анализа результатов первого исследования, было разработано для оценки связи между эффектами лечения рамиприлом и выраженностью реакции растворимой гуанилатциклазы (рГЦ) тромбоцитов. В связи с неоднородностью результатов исследования 1 мы выбрали когорту больных, более резистентных к NO, путем исключения пациентов с исходным ответом на НПН >50%. В соответствии с ранее перечисленными критериями включения и исключения в это исследование было включено всего 19 пациентов. Лечение рамиприлом было начато в дозе 5 мг/сут, через 1 нед дозу повысили до

10 мг/сут. Образцы крови брали у пациентов в начале исследования и через 2 нед терапии. Исследования агрегации тромбоцитов проводили описанными выше методами.

Исследования цГМФ. Для исследований цГМФ кровь центрифугировали с относительным центробежным ускорением 250 g в течение 10 мин при комнатной температуре для получения обогащенной тромбоцитами плазмы (ОТП). Плазму, бедную тромбоцитами, получали при дальнейшем центрифугировании оставшейся крови с относительным центробежным ускорением 2500 g в течение 20 мин. Определение количества тромбоцитов проводили счетчиком STKS Coulter Counter (Coulter Electronics Inc), для получения плазмы с постоянным количеством тромбоцитов 250,000/ $\mu\text{л}$ ОТП была скорректирована плазмой, бедной тромбоцитами.

Для оценки влияния стимуляции NO донаторами на содержание цГМФ в тромбоцитах обогащенную тромбоцитами плазму (0,5 мл) предварительно инкубировали при 37°C с НПН (10 $\mu\text{моль/л}$) в течение 1 мин. Образование в тромбоцитах цГМФ в присутствии ингибитора фосфодиэстеразы 3-изобутил-1-метилксантина (0,5 ммоль/л, инкубация с ОТП в течение 5 мин до добавления НПН) определяли в качестве меры способности рГЦ-тромбоцитов реагировать на NO. Содержание цГМФ в тромбоцитах определяли, как было описано ранее [27]. Для выделения тромбоцитов после инкубации ОТП фильтровали через фильтры GF/C Glass Microfibre Filters (Whatman). Фильтры с абсорбированными тромбоцитами промывали физиологическим раствором и помещали в 0,5 мл 4 ммоль/л раствора этилендиаминтетрауксусной кислоты для дальнейшего извлечения цГМФ в кипящей водяной бане в течение 5 мин. После центрифугирования образцов с относительным центробежным ускорением 3000 g в течение 10 мин, в супернатанте оценивали концентрацию цГМФ с использованием наборов для радиоиммунного [^{125}I] анализа цГМФ (Biomedical Technologies).

Тромбоспондин 1 (ТСП-1). Концентрации ТСП-1, образующегося в тромбоцитах эндогенного ингибитора внутриклеточной передачи сигнала NO, в частности, активации рГЦ [28], исследовали до и после лечения рамиприлом. Для определения уровня ТСП-1 кровь центрифугировали с относительным центробежным ускорением 1800 g 15 мин при 4°C для получения супернатанта. Затем супернатант центрифугировали с относительным центробежным ускорением 10000 g в течение 10 мин, собирали и хранили при -70°C. Определение уровня ТСП-1 проводили с применением набора для иммуноферментного анализа «Quantikine Human TSP-1» (R&D Systems).

Оба исследования были одобрены Комитетом по этике исследований больницы Queen Elizabeth. Письмен-

ное информированное согласие больных было получено до включения в исследование.

Статистический анализ. Все данные были проанализированы в соответствии с назначенным вмешательством (intention to treat). Пациенты были классифицированы в зависимости от определенной при включении в исследование способности тромбоцитов реагировать на стимуляцию NO. Мощность исследования 1 при сравнении групп лечения позволяла выявлять вариабельность ответов тромбоцитов на стимуляцию НПН $>0,75$ стандартного отклонения (SD). В соответствии с ранее полученными результатами [21], для оценки потенциальной неоднородности реакции на рамиприл в качестве критерия выраженной резистентности тромбоцитов к NO, мы использовали подавление агрегации менее чем на 32% при стимуляции НПН. Ранее нами было показано [29], что ингибирование агрегации тромбоцитов НПН зависит от ответа на АДФ вследствие физиологического антагонизма. Таким образом, изменения ответа на стимуляцию НПН были проанализированы в сопоставлении с изменениями ответа на АДФ. В исследовании 1 для проверки основной гипотезы исследования (влияние рамиприла на отношение Δ НПН/ Δ АДФ во всей когорте) и основной вторичной гипотезы (эффекты рамиприла при резистентности тромбоцитов к стимуляции NO) был использован ковариационный анализ. При применении такого анализа усиливающее влияние рамиприла на способность тромбоцитов реагировать на стимуляцию НПН будет отражено в сдвиге конкурентного отношения между ответом на стимуляцию НПН и ответом на стимуляцию АДФ в сторону повышения чувствительности к НПН. Характеристики больных в различных группах сравнивали с помощью непарного t критерия (все данные имели нормальное распределение). Непарный t критерий был также применен для сравнения изменений других параметров (ИА, МДА, АДМА и цГМФ) в группах лечения рамиприлом и плацебо. Изменения изучаемых показателей после 4 нед лечения были использованы для оценки влияния времени лечения рамиприлом. В исследовании 2 все параметры были проанализированы с помощью парных t тестов. Все данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартное отклонение (SD), если не указано иное. Все статистические анализы проводили с использованием программы SPSS версии 12 (SPSS, Inc).

Результаты

Исследование 1 – рандомизированное сравнение

Характеристики больных и клиническое наблюдение. 119 пациентов были рандомизированы в группы лечения исследуемыми препаратами (табл. 1). Группы больных, получавших плацебо (n=59) и рамиприл (n=60), были сопоставимы по всем демографическим и клиническим параметрам, за исключени-

Таблица 1. Демографические показатели в группах больных при включении в исследование

Показатель	Группа лечения плацебо (n=59)	Группа лечения рамиприлом (n=60)	Значение p
Мужчины	38 (64%)	35 (58%)	0,57
Возраст (лет)	66,4 $\pm$ 9,7	67,2 $\pm$ 10,6	0,65
Рост (см)	166,8 $\pm$ 12,0	165,1 $\pm$ 18,1	0,43
Вес (кг)	81,5 $\pm$ 18,7	81,3 $\pm$ 19,5	0,97
ИМТ (кг/м ²)	29,6 $\pm$ 9,0	30,2 $\pm$ 9,4	0,73
САД (мм рт. ст.)	144,7 $\pm$ 23,2	145,3 $\pm$ 24,5	0,88
ДАД (мм рт. ст.)	82,6 $\pm$ 8,9	80,6 $\pm$ 12,7	0,33
ЧСС (уд/мин)	68 $\pm$ 8,9	66 $\pm$ 11,0	0,25
ИМ в анамнезе	28 (48%)	20 (33%)	0,13
АКШ	14 (24%)	23 (38%)	0,11
ЧКВ	31 (53%)	22 (37%)	0,09
Сахарный диабет	9 (15%)	15 (25%)	0,25
Курение	19 (32%)	12 (20%)	0,15
Артериальная гипертензия	26 (44%)	21 (35%)	0,35
Уровень холестерина (ммоль/л)	4,2 $\pm$ 0,9	4,5 $\pm$ 0,9	0,05
Уровень креатинина (мкмоль/л)	0,092 $\pm$ 0,015	0,094 $\pm$ 0,019	0,53
Лечение			
Аспирин	51 (86%)	54 (90%)	0,58
Статины	57 (97%)	49 (82%)	0,02*
Бета-адреноблокаторы	9 (15%)	16 (27%)	0,18
Антагонисты кальция	41 (69%)	31 (52%)	0,06
Нитраты	22 (37%)	21 (35%)	0,85
Варфарин	5 (8%)	2 (3%)	0,27
Пергексиллин	1 (2%)	4 (7%)	0,36
Значения представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, или как n (%)			
*статистически значимое различие (p<0,05)			
АКШ – аортокоронарное шунтирование; ДАД – диастолическое артериальное давление; ИМ – инфаркт миокарда; ИМТ – индекс массы тела; САД – систолическое артериальное давление; ЧКВ – чрескожное вмешательство на коронарных артериях; ЧСС – частота сердечных сокращений			

ем применения статинов, которое было более частым в группе лечения плацебо. За 12-недельный период исследования из него выбыли 11 из 119 больных (9 больных – из группы активной терапии). Из них 3 больных, получавших рамиприл, были исключены из-за появления кашля и головокружения, и по 1 больному в каждой из групп выбыло в результате развития острого коронарного синдрома.

Агрегация тромбоцитов и подавление агрегации нитропруссидом натрия. Способность тромбоцитов реагировать на стимуляцию АДФ в образцах крови больных, взятых в начале исследования в группах лечения рамиприлом и плацебо, не отличалась (7,4 $\pm$ 2,4 и 7,6 $\pm$ 2,6 Ом, соответственно). Выраженность изме-

Таблица 2. Влияние рамиприла на изучаемые показатели при применении в течение 3 мес

Показатель	Группа лечения плацебо (n=59)	Группа лечения рамиприлом (n=60)	Значение р
ЧСС (уд./мин)	1,1±15,5	2,2±8,7	0,63
АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов (Ом)	-1,5±2,4	-0,9±2,6	0,22
Ингибция агрегации нитропруссидом натрия (%)	1,7±8,2	12,3±36,8	0,10
Индекс аугментации (%)	-1,3±8,1	-4,8±10,9	0,02
Малоновый диальдегид (мкмоль/л)	0,006±0,15	0,042±0,26	0,25
Асимметричный диметиларгинин (нмоль/л)	6,9±6,1	-15,9±5,9	0,05
Ответ внутритромбоцитарного цГМФ, индуцированный НПН (%)	-3,1±42,0	-3,0±41,7	0,99

Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение
 ЧСС – частота сердечных сокращений; АДФ – аденозиндифосфат;
 цГМФ – циклический гуанозинмонофосфат; НПН – нитропруссид натрия

нений АДФ-индуцированной агрегации через 3 мес лечения в обеих группах также не различалась (табл. 2). При включении больных в исследование способность тромбоцитов реагировать на антиагрегантное действие НПН в группах лечения рамиприлом и плацебо не различалась (подавление агрегации $42,4 \pm 28,9$ и $47,3 \pm 28,5\%$, соответственно; $p=0,35$). Ответ тромбоцитов на НПН через 3 мес терапии рамиприлом в среднем увеличился, но незначительно (табл. 2). Однако при коррекции изменений ответов на НПН, с учетом изменений ответа на АДФ [29], отношение $\Delta\text{НПН}/\Delta\text{АДФ}$ указало на увеличение способности реагировать на NO в группе лечения рамиприлом (ковариационный анализ, $p<0,001$) (рис. 1).

Неоднородность влияния рамиприла на способность тромбоцитов отвечать на стимуляцию NO.

В начале исследования тяжелую резистентность тромбоцитов к стимуляции NO (ответ на $\text{НПН} \leq 32\%$) наблюдали у 41 больного (23 из которых были рандомизированы в группу терапии рамиприлом). Различий в выраженности индуцированной АДФ-агрегации тромбоцитов у больных, резистентных к NO, и больных, нормально отвечающих на стимуляцию NO, выявлено не было. В каждой из этих подгрупп 3-х месячное лечение существенно не повлияло на АДФ-индуцированную агрегацию. Способность тромбоцитов реагировать на стимуляцию NO значительно возросла после лечения рамиприлом в подгруппе больных, резистентных

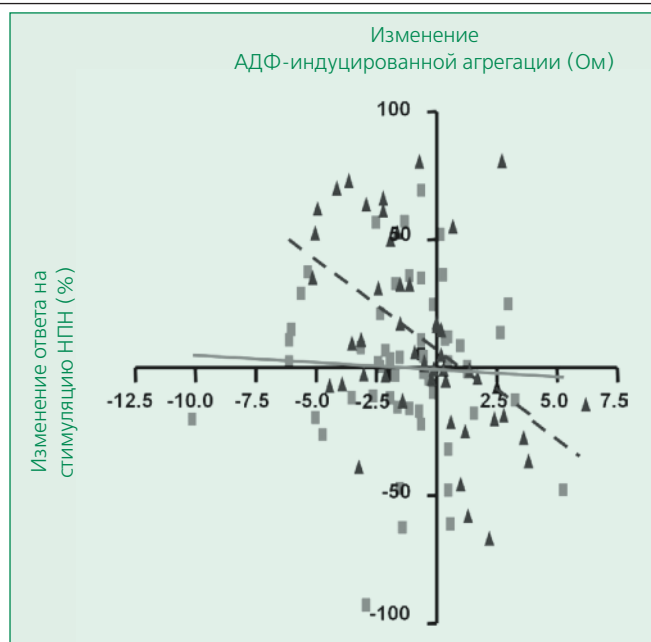


Рисунок 1. Влияние лечения рамиприлом на изменение отношения $\Delta\text{АДФ}/\Delta\text{НПН}$

Этот график иллюстрирует влияние трехмесячного лечения рамиприлом (черные треугольники) или плацебо (серые квадраты) на изменение отношения $\Delta\text{АДФ}/\Delta\text{НПН}$ у пациентов с высоким риском сердечно-сосудистых событий (похожих на пациентов в исследовании HOPE - Heart Outcomes Prevention Evaluation). Лечение рамиприлом (черная пунктирная линия) по сравнению с плацебо (сплошная серая линия) достоверно влияло на изменение отношения $\Delta\text{АДФ}/\Delta\text{НПН}$ ($p<0,001$, ковариационный анализ)

к NO, по сравнению с результатом в группе плацебо: изменение ответа на НПН ($\Delta\text{НПН}$) $36,5 \pm 31,9\%$ в сравнении с $15,9 \pm 22,7\%$, соответственно; $p=0,03$ (рис. 2Б). Напротив, способность тромбоцитов реагировать на стимуляцию NO в подгруппе с исходно нормальным ответом тромбоцитов после лечения рамиприлом не изменилась: $\Delta\text{НПН}$ $-4,6 \pm 22,2\%$ при лечении рамиприлом по сравнению с $-5,8 \pm 29,1\%$ при приеме плацебо; $p<0,05$ (рис. 2). Таким образом, эффекты рамиприла значительно варьировались в зависимости от наличия или отсутствия исходной тяжелой резистентности тромбоцитов к NO.

Влияние времени лечения рамиприлом. Данные, полученные через 4 нед лечения, позволяют предполагать, что к этому времени во всей когорте больных уже проявился эффект рамиприла со значительным увеличением чувствительности тромбоцитов (по оценке отношения $\Delta\text{НПН}/\Delta\text{АДФ}$) ($p<0,001$).

Вазомоторные эффекты. Терапия рамиприлом в течение 3 мес приводила к небольшому снижению как систолического артериального давления ($-11,7 \pm 20,9$ при лечении рамиприлом в сравнении с $-5,2 \pm 17,5$ мм рт. ст. при приеме плацебо; $p=0,07$), так и диастолического артериального давления ($-6,2 \pm 10,3$ при лечении рамиприлом в сравнении с $-1,8 \pm 10,0$ мм рт. ст. при приеме плацебо; $p=0,03$). Частота сердечных сокра-

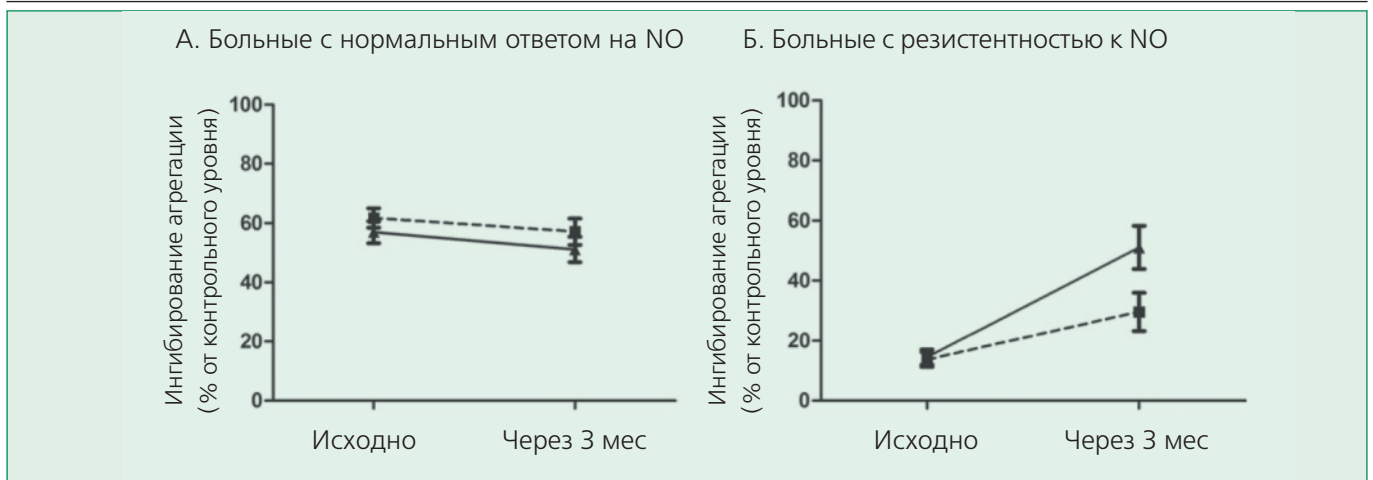


Рисунок 2. Влияние рамиприла на ингибирование агрегации в зависимости от исходной способности тромбоцитов реагировать на НПН

Эти графики иллюстрируют влияние 3-месячного применения рамиприла (треугольники) или плацебо (квадраты) на ингибирование АДФ-индуцированной агрегации цельной крови в образцах крови от пациентов с нормальным ответом на стимуляцию нитропруссидом натрия (нормальная способность реагирования на NO) (А) и резистентностью к NO (ответ на стимуляцию нитропруссидом натрия $\leq 32\%$) (Б) при включении в исследование. Рамиприл не влиял на способность реагировать на стимуляцию НПН в когорте больных с нормальным ответом на NO ($p < 0,05$). Напротив, рамиприл значительно повышал способность реагировать на стимуляцию НПН у пациентов, которые были резистентными к стимуляции NO при включении в исследование ($p < 0,002$). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего

щений в группах лечения рамиприлом и плацебо не различалась.

Мы также исследовали влияние терапии рамиприлом на ИА как показатель жесткости артерий [24,25]. При включении в исследование ИА не различался в группах лечения рамиприлом и плацебо ($24,9 \pm 9,3$ и $23,7 \pm 8,9\%$, соответственно). Терапия рамиприлом в течение 3 мес значительно снижала ИА ($-4,8 \pm 10,9\%$ при лечении рамиприлом в сравнении с $-1,3 \pm 8,1\%$ при приеме плацебо; $p = 0,02$) (табл. 2).

Окислительный стресс и эндотелиальная дисфункция. Результаты исследования концентрации МДА и АДМА в плазме, использованные в качестве маркеров окислительного стресса и эндотелиальной дисфункции, соответственно, приведены в таблице 2. Терапия рамиприлом существенно не повлияла на концентрацию МДА. Уровень АДМА при лечении рамиприлом снизился ($p = 0,05$) (табл. 2).

Исследование 2 – изучение механизмов действия

Исследование 2 было разработано для определения связи улучшения чувствительности тромбоцитов к NO при лечении рамиприлом и увеличения реакции рГЦ при стимулировании NO. Из-за очевидной неоднородности ответа на терапию рамиприлом в исследовании 1 были отобраны пациенты с нарушенным ответом тромбоцитов на стимуляцию NO. Хотя 19 пациентов, включенных в исследование 2, были отобраны на основании тех же критериев, что и в исследовании 1, они были старше (средний возраст 70 ± 7 лет), и у 11 из них был сахарный диабет.

Агрегация тромбоцитов при стимуляции АДФ

и НПН. В течение 2-недельного периода лечения рамиприлом никаких существенных изменений выраженности индуцированной АДФ-агрегации тромбоцитов не было (данные не представлены). Среднее значение исходного торможения агрегации тромбоцитов НПН было $24 \pm 13\%$; как и ожидалось, исходная способность реакции тромбоцитов на стимуляцию НПН была существенно меньше, чем в исследовании 1. При лечении рамиприлом реакция на стимуляцию НПН увеличилась до $37 \pm 25\%$ ($p < 0,01$) (рис. 3А).

Образование цГМФ в тромбоцитах в ответ на стимуляцию НПН. Способность тромбоцитов к образованию цГМФ в ответ на стимуляцию НПН значительно возросла после 2 нед лечения рамиприлом (рис. 3Б), что указывает на улучшение реагирования рГЦ на стимуляцию NO. В начале исследования уровень цГМФ после стимуляции NO составлял $249 \pm 85\%$ от контрольного, а после лечения рамиприлом повысился до $317 \pm 114\%$ ($p < 0,02$). Выявлена значимая корреляция ($r = 0,63$; $p < 0,01$) между изменениями реакции системы цГМФ-тромбоцитов и модуляцией агрегации тромбоцитов НПН (рис. 3В).

Концентрация тромбоспондина. Лечение рамиприлом не индуцировало никаких существенных изменений концентрации ТСП-1 в плазме (исходный уровень $109,5 \pm 80,5$ нг/мл, после терапии рамиприлом $93,9 \pm 61,2$ нг/мл; $p = 0,50$).

Обсуждение

Исследование HOPE с рамиприлом [1] и исследование EUROPA с периндоприлом [2] показали, что эти

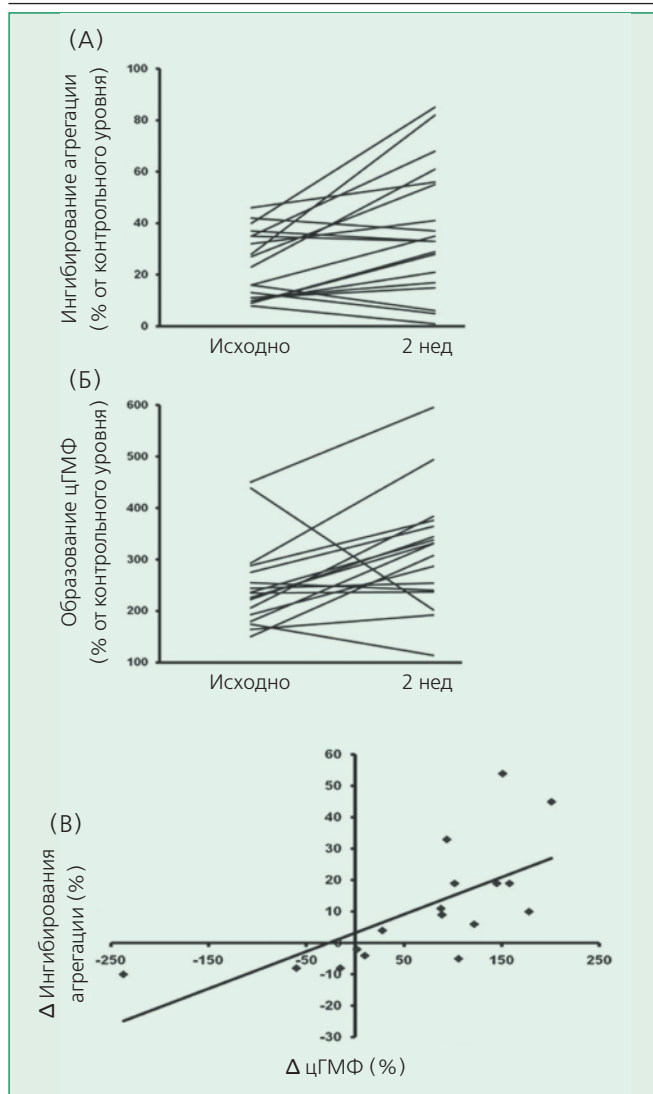


Рисунок 3. Влияние 2-недельной терапии рамиприлом на способность тромбоцитов отвечать на стимуляцию НПН и образование цГМФ

Эти графики иллюстрируют изменения ингибирующего влияния нитропруссид натрия (НПН) на АДФ-индуцированную агрегацию тромбоцитов (А) и стимулирующее действие НПН на образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) в тромбоцитах (Б) через 2 нед терапии рамиприлом. Наблюдалась достоверная корреляция ($r=0,63$, $p<0,01$) между этими двумя параметрами (В)

ингибиторы АПФ снижают риск сердечно-сосудистых осложнений у пожилых людей в популяции высокого риска. Тем не менее, механизм(ы), лежащие в основе этих положительных эффектов, ранее не были определены и оставались предметом обсуждения [3-8]. В настоящем исследовании получены доказательства того, что при лечении рамиприлом у больных с высоким сердечно-сосудистым риском (похожих на пациентов в исследовании HOPE) развивается полезный эффект, отличный от ранее описанного улучшения вазомоторной функции [14]. В частности, нами показано, что рамиприл, при одновременном снижении жесткости стенок артерий и концентрации АДМА плазмы (что соот-

ветствует предыдущим данным [8]), усиливает способность тромбоцитов реагировать на антиагрегантное влияние NO путем избирательного уменьшения резистентности к NO. Кроме того, наши данные указывают, что этот эффект коррелирует с чувствительностью рГЦ тромбоцитов к стимуляции NO. Предыдущие исследования [13,14] ясно показали, что ингибиторы АПФ не оказывают существенного влияния на чувствительность тромбоцитов к стимуляторам агрегации в эксперименте *in vitro*. Вместе с тем сохранение стабильной функции тромбоцитов в такой же мере зависит и от целостности реагирования на химически активные стимулы, тормозящие агрегацию. В основе развития резистентности тромбоцитов к стимуляции NO лежат несколько потенциальных биохимических механизмов (их обзор см. Chirkov и Horowitz [16]). «Очистка» от NO при реакции с супероксидом ($O_2^{\cdot-}$) и инактивация рГЦ, по-видимому, являются основными соответствующими биохимическими нарушениями. Резистентность к NO широко изучена как на уровне тромбоцитов [17], так и на уровне сосудов [30,31]. Резистентность к NO с наибольшей вероятностью возникает при остром коронарном синдроме [18], сахарном диабете [20], стабильной стенокардии [17], при острой сердечной недостаточности [15], а также была выявлена при аортальном стенозе [32], артериальной гипертензии [33] и поликистозе яичников [29]. Кроме того, ранее мы показали, что терапия, снижающая образование супероксида ($O_2^{\cdot-}$), например, пергексилином [34], и коррекция гипергликемии [35] могут уменьшить резистентность к NO. Мы также показали, что резистентность тромбоцитов к NO, аналогично ранее описанному прогностическому значению коронарной эндотелиальной вазомоторной дисфункции [36], представляет собой независимый фактор риска сердечно-сосудистых событий и смертности ($p<0,01$ для сердечно-сосудистых событий) [21].

В исследовании 1 мы выявили, что чувствительность тромбоцитов к NO была очень неоднородной в популяции больных с высоким сердечно-сосудистым риском (похожих на больных в исследовании HOPE), изменяясь от нормальной чувствительности до тяжелой резистентности к NO. Хотя в целом терапия рамиприлом значимо усиливала способность тромбоцитов отвечать на стимуляцию NO (эффект проявлялся в течение 4 нед), этот эффект, как показывают данные, представленные на рисунке 2, зависел от величины исходного ответа на стимуляцию НПН: увеличение способности реагировать произошло преимущественно в подгруппе пациентов с тяжелой резистентностью к NO.

Поэтому для проспективной оценки этого явления, мы провели исследование 2, выбрав из общей когорты больных с более слабым ответом на стимуляцию NO

(со средним исходным ответом на НПН 24%). Уже после 2 нед применения рамиприл усиливал способность реагировать на стимуляцию NO. Параллельное исследование механизмов этого эффекта показало, что 1) рамиприл увеличивал образование цГМФ в ответ на НПН; это позволяет предполагать, что основным механизмом эффекта является повышение чувствительности рГЦ к NO; 2) но при этом рамиприл не изменял уровень известного модулятора активности рГЦ ТСП-1 плазмы [28].

Эти результаты показывают, что рамиприл уменьшает резистентность к NO путем повышения чувствительности рГЦ независимым от влияния ТСП-1 образом. Учитывая вероятность того, что рамиприл оказывает аналогичные биохимические эффекты на тромбоциты и гладкие мышцы сосудов, эти данные показывают, что функция эндотелия при лечении рамиприлом улучшается как за счет увеличения выработки оксида азота, так и вследствие содействия образованию цГМФ. Эти результаты, наряду со снижением уровня АДМА плазмы (табл. 2), также объясняют механизмы ранее описанного полезного влияния ингибиторов АПФ на функцию эндотелия [8-14].

Ограничения исследования. Исследование имеет ряд ограничений. Дизайн исследования 2 был бы более строгим в научном плане, если бы исследование планировалось как рандомизированное контролируемое, но это привело бы к значительным трудностям при наборе больных.

Наиболее важным ограничением является то, что из-за трудностей параллельного выполнения физиологических и биохимических исследований сосудистой системы человека, способность реагировать на NO была изучена нами только в тромбоцитах, но не в мышцах сосудистой стенки. Тем не менее, выявленные из-

менения физиологии тромбоцитов, связанной с реакцией на NO, имеют независимое прогностическое значение [21]. Проведенное исследование также не позволяет определить, в какой степени эти изменения реакции тромбоцитов на NO способствовали выявленному в исследовании HOPE улучшению сердечно-сосудистых исходов и прогноза. Представляет интерес недавно проведенная у участников исследования EUROPA оценка генетических детерминант результата терапии периндоприлом [37], которая выявила 3 полиморфизма гена рецептора брадикинина 1 типа и вариации гена рецептора ангиотензина II 1 типа, которые модифицировали как риск развития сердечно-сосудистых событий в исследовании EUROPA, так и степень благоприятного влияния периндоприла. Наблюдалась обратная связь между фоновым риском сердечно-сосудистого события и степенью пользы лечения. Поскольку стимуляция рецепторов к ангиотензину II 1 типа увеличивает образование супероксида [38], в то время как стимуляция рецептора брадикинина 1 типа индуцирует вторичное высвобождение NO [39], эти наблюдения могут отражать дополнительные факторы, которые позволяют прогнозировать резистентность к NO.

Выводы

Данные настоящего исследования показывают, что рамиприл повышает чувствительность тромбоцитов к стимуляции NO в популяции больных с высоким сердечно-сосудистым риском (похожих на пациентов в исследовании HOPE). Этот эффект связан с зависимым от рГЦ уменьшением резистентности тромбоцитов к NO. Эти результаты дают возможные дополнительные объяснения снижения риска сердечно-сосудистых событий под влиянием рамиприла.

Литература

1. Yusuf S, Sleight P, Pogue J, Bosch J, Davies R, Dagenais G, for the Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. *N Engl J Med* 2000;342:145–53.
2. Fox KM. Efficacy of perindopril in reduction of cardiovascular events among patients with stable coronary artery disease: randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre trial (the EUROPA study). *Lancet* 2003;362:782–8.
3. Bakris GL, Bhandaru S, Akerstrom V, Re RN. ACE inhibitor-mediated attenuation of mesangial cell growth. A role for endothelin. *Am J Hypertens* 1994;7:583–90.
4. Soejima H, Ogawa H, Yasue H, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition reduces monocyte chemoattractant protein-1 and tissue factor levels in patients with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1999;34:983–8.
5. Beckwith C, Munger MA. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitors on ventricular remodeling and survival following myocardial infarction. *Ann Pharmacother* 1993;27:755–66.
6. Sihm I, Schroeder AP, Aalkjaer C, et al. Normalization of structural cardiovascular changes during antihypertensive treatment with a regimen based on the ACE-inhibitor perindopril. *Blood Press* 1995;4:241–8.
7. Winkler K, Wunsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH. Upregulation of the vascular NAD(P)H oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2001;31:1456–64.
8. Mancini GB, Henry GC, Macaya C, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) study. *Circulation* 1996;94:258–65.
9. The CONSENSUS Trial Study Group. Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987;316:1429–35.
10. The SOLVD Investigators. Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991;325:293–302.
11. Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, et al., for the SAVE Investigators. Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. *N Engl J Med* 1992;327:669–77.
12. The Acute Infarction Ramipril Efficacy (AIRE) Study Investigators. Effect of ramipril on mortality and morbidity of survivors of acute myocardial infarction with clinical evidence of heart failure. *Lancet* 1993;342:821–8.
13. Schieffer B, Bunte C, Witte J, et al. Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:362–8.
14. Gibbs CR, Blann AD, Watson RD, Lip GY. Abnormalities of hemorheological, endothelial, and platelet function in patients with chronic heart failure in sinus rhythm: effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor and beta-blocker therapy. *Circulation* 2001;103:1746–51.
15. Chirkov YY, Holmes AS, Martelli JD, Horowitz JD. Effect of perindopril on platelet nitric oxide resistance in patients with chronic heart failure secondary to ischemic left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol* 2004;93:1438–40.
16. Chirkov YY, Horowitz JD. Impaired tissue responsiveness to organic nitrates and nitric oxide: a new therapeutic frontier? *Pharmacol Ther* 2007;116:287–305.
17. Chirkov YY, Holmes AS, Chirkova LP, Horowitz JD. Nitrate resistance in platelets from patients with stable angina pectoris. *Circulation* 1999;100:129–34.
18. Chirkov YY, Holmes AS, Willoughby SR, et al. Stable angina and acute coronary syndromes are associated with nitric oxide resistance in platelets. *J Am Coll Cardiol* 2001;37:1851–7.
19. Willoughby SR, Stewart S, Chirkov YY, Kennedy JA, Holmes AS, Horowitz JD. Beneficial clinical effects of perhexiline in patients with stable angina pectoris and acute coronary syndromes are associated with potentiation of platelet responsiveness to nitric oxide. *Eur Heart J* 2002;23:1946–54.
20. Anfossi G, Russo I, Massucco P, Mattiello L, Trovati M. Platelet resistance to the antiaggregating effect of N-acetyl-L-cysteine in obese, insulin-resistant subjects. *Thromb Res* 2003;110:39–46.
21. Willoughby SR, Stewart S, Holmes AS, Chirkov YY, Horowitz JD. Platelet nitric oxide responsiveness: a novel prognostic marker in acute coronary syndromes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2661–6.
22. Heresztyn T, Worthley MI, Horowitz JD. Determination of L-arginine and NG, NG'- and NG, NG'-dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor fluorescent derivatives. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;805:325–9.
23. O'Rourke MF, Gallagher DE. Pulse wave analysis. *J Hypertens Suppl* 1996;14:S147–57.
24. Wilkinson IB, Fuchs SA, Jansen IM, et al. Reproducibility of pulse wave velocity and augmentation index measured by pulse wave analysis. *J Hypertens* 1998;16:2079–84.
25. Arstall MA, Yang J, Stafford I, Betts WH, Horowitz JD. N-acetylcysteine in combination with nitroglycerin and streptokinase for the treatment of evolving acute myocardial infarction. Safety and biochemical effects. *Circulation* 1995;92:2855–62.
26. Chirkov YY, Chirkova LP, Horowitz JD. Nitroglycerin tolerance at the platelet level in patients with angina pectoris. *Am J Cardiol* 1997;80:128–31.
27. Chirkov YY, Chirkova LP, Horowitz JD. Suppressed anti-aggregating and cGMP-elevating effects of sodium nitroprusside in platelets from patients with stable angina pectoris. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1996;354:520–5.
28. Miller TW, Isenberger JS, Roberts DD. Thrombospondin-1 is an inhibitor of pharmacological activation of soluble guanylate cyclase. *Br J Pharmacol* 1999;125:1542–7.
29. Rajendran S, Willoughby SR, Chan WP, et al. Polycystic ovary syndrome is associated with severe platelet and endothelial dysfunction in both obese and lean subjects. *Atherosclerosis* 2009;204:509–14.
30. Schachinger V, Zeiher AM. Quantitative assessment of coronary vasoreactivity in humans in vivo. Importance of baseline vasomotor tone in atherosclerosis. *Circulation* 1995;92:2087–94.
31. Adams MR, Robinson J, McCredie R, et al. Smooth muscle dysfunction occurs independently of impaired endothelium-dependent dilation in adults at risk of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:123–7.
32. Chirkov YY, Holmes AS, Willoughby SR, Stewart S, Horowitz JD. Association of aortic stenosis with platelet hyperaggregability and impaired responsiveness to nitric oxide. *Am J Cardiol* 2002;90:551–4.
33. Woods JD, Edwards JS, Ritter JM. Inhibition by nitroprusside of platelet calcium mobilization: evidence for reduced sensitivity to nitric oxide in essential hypertension. *J Hypertens* 1993;11:1369–73.
34. Liberts EA, Willoughby SR, Kennedy JA, Horowitz JD. Effects of perhexiline and nitroglycerin on vascular, neutrophil and platelet function in patients with stable angina pectoris. *Eur J Pharmacol* 2007;560:49–55.
35. Worthley MI, Holmes AS, Willoughby SR, et al. The deleterious effects of hyperglycemia on platelet function in diabetic patients with acute coronary syndromes: mediation by superoxide production, resolution with intensive insulin administration. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:304–10.
36. Schachinger V, Britten MB, Zeiher AM. Prognostic impact of coronary vasodilator dysfunction on adverse long-term outcome of coronary heart disease. *Circulation* 2000;101:1899–906.
37. Brugs JJ, Isaacs A, Boersma E, et al. Genetic determinants of treatment benefit of the angiotensin-converting enzyme-inhibitor perindopril in patients with stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2010;31:1854–64.
38. Rueckschloss U, Quinn MT, Holtz J, Morawietz H. Dose-dependent regulation of NAD(P)H oxidase expression by angiotensin II in human endothelial cells: protective effect of angiotensin II type 1 receptor blockade in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1845–51.
39. Whittle BJ, Lopez-Belmonte J, Rees DD. Modulation of the vasodepressor actions of acetylcholine, bradykinin, substance P and endothelin in the rat by a specific inhibitor of nitric oxide formation. *Br J Pharmacol* 1989;98:646–52.