

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ РАЗВИТИИ АСПИРИНОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

В.И. Волков, О.Е. Запровальная, Т.Н. Бонгарь, Е.О. Крахмалова

ГУ «Институт терапии имени А.Т. Малой АМН Украины», Харьков

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, аспиринорезистентность, функциональное состояние эндотелия.

В последние десятилетия сформировался новый взгляд на механизмы развития атеросклероза. Хотя основные патогенетические звенья — дислипидемия и гемостатические нарушения — остаются неизменными составляющими атерогенеза уже около 100 лет, не менее значимыми признаны и недавно выявленные такие патогенетические механизмы, как эндотелиальная дисфункция, иммунновоспаление. Дисфункция эндотелия играет ключевую роль в патогенезе и клинической манифестации атеросклероза [11]. Под влиянием этиологических факторов (дислипидемия, артериальная гипертензия, сахарный диабет, курение) нарушается нормальное функционирование эндотелия, развивается дисбаланс между медиаторами, продуцируемыми эндотелием: вазоконстрикторами и вазодилататорами, проагрегантами и антиагрегантами. Новый взгляд на роль этих процессов в развитии ишемической болезни сердца (ИБС) привел к формированию концепции, согласно которой атеросклероз рассматривается как многофакторный патологический процесс, при котором происходят глубокие изменения сосудистого эндотелия, взаимосвязанные с нарушениями гемостаза и липидного обмена [13, 15].

Нарушения гемостаза вызывают особый интерес, поскольку являются главной мишенью антитромботической терапии, составляющей основу лечения ИБС. Во многих рандомизированных исследованиях доказано, что использование антиагрегантов при различных проявлениях атеросклероза существенно уменьшает риск развития осложнений ИБС [4]. Несмотря на широкое использование наиболее изученного антиагреганта — ацетилсалициловой кислоты (АСК) и активное распространение других классов антиагрегантов (тиенопиридины), далеко не всегда удается предупредить развитие атеротромбоза. Все большее количество работ о резистентности как к АСК, так и к другим антиагрегантам свидетельствует о том, что проблема выбора класса антиагреганта или их

комбинации остается одним из наиболее актуальных вопросов современной кардиологии [7—9]. В то же время остается неясным, насколько эндотелиальная дисфункция влияет на чувствительность к антиагрегационному и иным эффектам АСК.

Цель исследования — оценка функционального состояния эндотелия у больных ИБС, чувствительных и резистентных к АСК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обследовано 74 больных ИБС: 29 — с прогрессирующей стенокардией напряжения (ПСН) и 45 — со стабильной стенокардией напряжения (ССН) II—III функциональных классов. Контрольную группу составили 20 человек, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой, которые не имели признаков заболеваний сердечно-сосудистой системы. Всем пациентам было проведено комплексное клиническое обследование с учетом жалоб, данных анамнеза, объективных и дополнительных методов исследования.

Функциональное состояние эндотелия оценивали при помощи пробы с реактивной гиперемией (эндотелийзависимая реакция), которую проводили с использованием ультразвуковой системы LOGIC 5 с линейным датчиком в частотном режиме 10 МГц [6]. Рассчитывали потокозависимую дилатацию в процентах как отношение изменения диаметра плечевой артерии (ПА) в фазу реактивной гиперемии к диаметру ПА в состоянии покоя (ΔD , %). Также оценивали прирост скоростных характеристик кровотока, максимальной линейной и объемной скорости кровотока, рассчитанный в процентах от исходных значений.

Исследование агрегации тромбоцитов проводили турбидиметрическим методом с использованием агрегометра АТ-1 (Россия). Чувствительность к АСК оценивали собственным оригинальным экспресс-методом *in vitro* с использованием в качестве индуктора агрегации адреналина в конечной концентрации в кювете 2,5 мкг/мл [2]. Чув-

ствителю к антиагрегаціонному ефекту АСК считали достаточной при снижении суммарного индекса агрегации тромбоцитов (СИАТ), предварительно инкубированных с раствором АСК («Аспизол») в конечной концентрации в кювете 25 мМ, на более чем 15 % [1].

Содержание суммы стабильных метаболитов NO (NO₂ + NO₃) в цитратной плазме крови определяли фотометрическим методом по реакции Грисса после восстановления нитрата в нитрит цинковой пылью [3]. Депротенинизацию образцов плазмы проводили 55 мМ ZnSO₄ и 75 мМ NaOH в объемном соотношении 2:5. Оптическую плотность окрашенного комплекса измеряли на колориметре Specoll-11.

Математическую обработку результатов осуществляли при помощи программы Statistica (StatSoft Inc, США). Различия между сравниваемыми показателями считали достоверными, если значение уровня значимости было больше или равно 95 % (p < 0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Показатели агрегационной активности тромбоцитов у пациентов с ИБС были достоверно повышены по сравнению с контрольной группой.

В табл. 1 представлены результаты изучения влияния предварительной инкубации с АСК *in vitro* на суммарный индекс адреналин-индуцированной агрегации тромбоцитов в контрольной группе у больных ИБС.

Учитывая различную динамику уменьшения СИАТ у пациентов, они были условно разделены на чувствительных к антиагрегационному эффекту АСК — снижение СИАТ превышало 15 %, и резистентных — антиагрегационный эффект АСК был меньше 15 % (табл. 2). В соответствии с приведенными условными критериями, из всех наблюдаемых (94 обследованных) 73 пациента (75,5 %) могут быть отнесены к чувствительным. Достаточная чувствительность к антиагрегационному эффекту АСК выявлена в контрольной группе у 90 % пациентов, у 68,9 % — в группе больных с ССН и 75,8 % — в группе больных с ПСН.

Следует отметить, что антиагрегационный эффект АСК *in vitro* был сопоставимым у резистентных пациентов всех групп обследованных, тогда как процент снижения СИАТ у чувствительных оказался достоверно ниже, чем в контрольной

группе и у больных с ССН (на 18,5 %, p < 0,05), и у пациентов с ПСН (на 32,3 %, p < 0,05).

При исследовании содержания стабильных метаболитов азота оксида в плазме крови больных ИБС установлено, что у чувствительных пациентов с ССН содержание в плазме суммы NO₂ + NO₃ не отличалось от значения показателя контрольной группы, тогда как у резистентных пациентов был значительно снижен уровень NO₂ + NO₃ (на 22,5 % по сравнению с соответствующей группой контроля, p < 0,05; и на 19,3 % по сравнению с чувствительными пациентами с ССН, p < 0,05). При ПСН отмечено достоверное уменьшение уровня суммы (NO₂ + NO₃) как у чувствительных пациентов (на 24,2 %, по сравнению с чувствительными пациентами контроля, p < 0,05), так и у резистентных (на 36,5 % по сравнению с соответствующей группой контроля, p < 0,05) (табл. 3). Содержание NO₂ + NO₃ у резистентных больных с ПСН оказалось достоверно ниже, чем у чувствительных (на 14 %, p < 0,05), что свидетельствует о более значительной эндотелиальной дисфункции у этих пациентов.

Для оценки функционального состояния эндотелия у пациентов с ССН была проведена проба с реактивной гиперемией (табл. 4).

Анализ полученных результатов подтвердил наличие эндотелиальной дисфункции у этих больных. У всех пациентов с ССН отмечено достоверное снижение как прироста диаметра ПА, так и линейной и объемной скорости кровотока в сравнении с показателями контрольной группы. Однако для резистентных больных снижение ΔD было настолько значимым, что достоверно отличалось от показателей чувствительных к АСК пациентов с ССН (на 42,2 %, p < 0,05).

Таким образом, для больных ИБС со сниженной чувствительностью к антиагрегационному действию АСК характерны более глубокие нарушения функционального состояния эндотелия, о чем свидетельствует как снижение показателя, характеризующего эндогенный синтез NO, так и нарушение эндотелийзависимой вазодилатации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Наиболее важной характеристикой дисфункции эндотелия является нарушение баланса в системе вазоконстрикторы/вазодилататоры в сочетании с повышенной адгезивностью эндотелиального слоя сосудов, которые неразрывно связаны с нарушени-

Таблица 1. СИАТ у больных ИБС до и после инкубации с АСК *in vitro*

Группа обследованных	До инкубации	После инкубации	Снижение, %
ПСН (n = 29)	63,4 ± 2,1 ^{##}	47,4 ± 3,2 ^{**}	23,2 ± 4,1 ^{##}
ССН (n = 45)	55,3 ± 2,7 [#]	39,3 ± 2,3 ^{**}	27,8 ± 3,3 [#]
Контроль (n = 20)	43,4 ± 3,3	27,1 ± 3,1 ^{**}	38,9 ± 3,1

Примечание. ^{**} p < 0,01 по сравнению с показателем до инкубации с АСК;

[#] p < 0,05 по сравнению с показателем в контрольной группе;

^{##} p < 0,01 по сравнению с показателем в контрольной группе.

Таблиця 2. Антиагрегаційний ефект АСК

Група обстежених		Сниження СИАТ, %
ПСН (n = 29)	Резистентні (n = 7)	9,2 ± 3,3*
	Чувствительні (n = 22)	32,2 ± 5,2 [#]
ССН (n = 45)	Резистентні (n = 14)	9,9 ± 3,6*
	Чувствительні (n = 31)	38,7 ± 2,8 [#]
Контроль (n = 20)	Резистентні (n = 2)	13,5 ± 2,1*
	Чувствительні (n = 18)	47,5 ± 2,7

Примечание. * $p < 0,01$ по сравнению с чувствительными пациентами соответствующей группы;

[#] $p < 0,01$ по сравнению с соответствующим показателем контроля.

Таблиця 3. Содержание NO₂+NO₃ у больних ИБС

Група обстежених		NO ₂ +NO ₃
ПСН (n = 29)	Резистентні (n = 7)	24,02 ± 1,30* [#]
	Чувствительні (n = 22)	30,24 ± 1,75 [#]
ССН (n = 45)	Резистентні (n = 14)	29,33 ± 1,98* [#]
	Чувствительні (n = 31)	36,30 ± 1,87
Контроль (n = 20)	Резистентні (n = 2)	37,85 ± 2,22
	Чувствительні (n = 18)	39,89 ± 2,37

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с чувствительными пациентами соответствующей группы;

[#] $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем контроля.

Таблиця 4. Прирост діаметра ПА і скоростних характеристик кровотоку в фазу реактивної гіперемії у пацієнтів з ІБС і ССН

Група обстежених		Прирост діаметра ПА, %	Прирост лінійної швидкості кровотоку, %	Прирост об'ємної швидкості кровотоку, %
Контроль (n = 10)		16,56 ± 1,21	41,79 ± 4,33	20,31 ± 2,41
ССН (n = 45)	Резистентні (n = 14)	7,33 ± 0,82*	22,14 ± 1,87*	11,26 ± 1,84*
	Чувствительні (n = 31)	12,69 ± 1,06 [#]	24,56 ± 2,23*	13,05 ± 1,77*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой;

[#] $p < 0,05$ по сравнению с группой резистентных больных.

ем в системе синтеза и/или метаболизма NO [10, 11, 13—15]. По данным литературы известно, что уменьшение синтеза азота оксида в атеросклеротически пораженных сосудах обусловлено угнетением экспрессии гена eNOS и снижением активности этого фермента. Учитывая большое влияние NO, в частности тромбоцитарного, на возникновение резистентности к антиагрегантам, одним из тяжелых последствий эндотелиальной дисфункции при атеросклерозе может быть снижение ответа на активность терапии, особенно антитромбоцитарной.

До недавнего времени механизм действия АСК связывали исключительно с необратимым ингибированием циклооксигеназы (ЦОГ) — ЦОГ-1 и ЦОГ-2 — приводящим к подавлению образования тромбоксана A₂ — мощного агониста агрегации тромбоцитов. Однако в настоящее время предложено несколько ЦОГ-независимых механизмов, связанных с влиянием на эндотелиальный синтез NO и объясняющих преимущества использования АСК при сердечно-сосудистых заболеваниях [12]. Первоначально большинство этих эффектов было продемонстрировано только с высокими концентрациями АСК *in vitro* (> 1 мМ/л), что подвергало

сомнению их клиническую значимость. Однако позднее было показано, что исключительно низкие концентрации АСК, даже ниже IC₅₀ 2—20 мкМ/л, необходимые для ингибирования ЦОГ-1 млекопитающих, стимулируют эндотелиальное выделение NO [14]. Представлены результаты исследований, свидетельствующих о том, что при поступлении в организм АСК воздействует на мускулатуру сосудов, где он ацетирует ЦОГ-2 в пределах эндотелия или циркулирующих лейкоцитов, что вызывает образование 15-эпилипоксина A₄, который, в свою очередь, стимулирует синтез NO эндотелиальной и индуцибельной изоформами NO-синтаз [10]. В конечном счете полагают, что индуцированный ацетилсалициловой кислотой NO опосредует как минимум противовоспалительный эффект АСК в микроциркуляции, отрицательно регулируя лейкоцитарно-эндотелиальное взаимодействие [5, 10]. В то же время данные о дисфункции эндотелия при атеросклерозе позволяют предположить, что снижение эффективности АСК может быть также связано и с утратой ее NO-опосредованных эффектов вследствие снижения NO-синтезирующей способности эндотелия.

ВИВОДИ

Таким образом, настоящее исследование свидетельствует о более глубокой эндотелиальной дисфункции у резистентных к ацетилсалициловой кислоте больных по сравнению с чувствительными,

что может быть одной из причин недостаточной эффективности антитромбоцитарной терапии, в том числе за счет ограничения потенциальной возможности реализации NO-опосредованных эффектов ацетилсалициловой кислоты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Волков В.И., Рябуха В.В., Запровальна О.Е., Лагуный А.И. Диагностика резистентности к аспирину у больных с ишемической болезнью сердца // УКЖ.— 2006.— № 6.— С. 36—40.
2. Волков В.И., Рябуха В.В., Запровальна О.Е. та ін. Процес диференційованого призначення антиагрегантів у терапії хворих на ІХС: Пат. № 11852 у: МПК: А61К31/60/; заявник Інститут терапії імені Л.Т. Малої АМН України та автори.— з. № u200506355; заявлено 29.06.2005; опубл. 16.01.2006. Бюл. № 1, 2006 р.
3. Кіселик І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів у крові хворих на вірусні гепатити та жовтяниці іншої етіології // Лабораторна діагностика.— 2001.— № 3.— С. 43—45.
4. Angiolillo D.J., Bhatt D.L., Gurbel P.A., Jennings L.K. Advances in antiplatelet therapy: agents in clinical development // Am. J. Cardiol.— 2009.— Vol. 103 (suppl. 13).— P. 40A—51A.
5. Bhattacharyya M., Karmohapatra S.K., Bhattacharya G. et al. The role of leucocytes in the acetyl salicylic acid (aspirin) induced nitric oxide synthesis in the production of interferon-alpha, a potent inhibitor of platelet aggregation and a thrombolytic agent // J. Thromb. Thrombolysis.— 2008, oct. 10. [Epub. ahead of prin].
6. Celestine D.S., Sorensen K.E., Gooch V.M. et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk atherosclerosis // Lancet.— 1992.— Vol. 340.— P. 1111—1115.
7. Foussas S.G., Zairis M.N., Tsirimpis V.G., et al. The Impact of aspirin resistance on the long-term cardiovascular mortality in patients with non-ST segment wlevation acute

coronary syndromes // Clin. Cardiol.— 2009.— Vol. 32 (3).— P. 142—147.

8. Krasopoulos G., Brister S.J., Beattie W.S. et al. Aspirin «resistance» and risk of cardiovascular morbidity: systematic review and meta-analysis // BMJ.— 2008.— Vol. 336.— P. 195—198.

9. Kuliczkowski W., Witkowski A., Polonski L. et al. Inter-individual variability in the response to oral antiplatelet drugs: a position paper of the Working Group on antiplatelet drugs resistance appointed by the Section of Cardiovascular Interventions of the Polish Cardiac Society, endorsed by the Working Group on Thrombosis of the European Society of Cardiology // Eur. Heart J.— 2009.— Vol. 30 (4).— P. 426—435.

10. Gilroy D.W. New insights into the anti-inflammatory actions of aspirin — induction of nitric oxide through the generation of epi-lipoxins // Mem. Inst. Oswaldo Cruz.— 2005.— Vol. 100 (suppl. 1).— P. 49—54.

11. Grover-Paez F., Zavalza-Gomez A.B. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors // Diabetes. Res. Clin. Pract.— 2009.— Vol. 84 (1).— P. 1—10.

12. Schröder H. Nitric oxide and aspirin: a new mediator for an old drug // Am. J. Ther.— 2008, dec. 15. [Epub ahead of print].

13. Steffel J., Lüscher T.F. Predicting the development of atherosclerosis // Circulation.— 2009.— Vol. 119 (7).— P. 919—921.

14. Taubert D., Berkels R., Grosser N. et al. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: a novel mechanism of action // Br. J. Pharmacol.— 2004.— Vol. 143.— P. 159—165.

15. Vanhoutte P.M. Endothelial dysfunction // Circ. J.— 2009.— Vol. 73 (4).— P. 595—601.

ФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ЕНДОТЕЛІУ У РАЗІ РОЗВИТКУ АСПІРИНОРЕЗИСТЕНТНОСТІ У ХВОРИХ НА ІШЕМІЧНУ ХВОРОБУ СЕРЦЯ

В.І. Волков, О.Е. Запровальна, Т.М. Бондар, О.О. Крахмалова

У хворих на ІХС з прогресуючою та стабільною стенокардією вивчено зв'язок між антиагрегаційним ефектом ацетилсалицилової кислоти *in vitro* та показниками, які характеризують функціональний стан ендотелію. Встановлено, що для пацієнтів з ІХС та зниженою чутливістю до антиагрегаційної дії «Аспірину» характерні глибші порушення функціонального стану ендотелію, про що свідчить як зниження показника, що характеризує ендогенний синтез NO (сума (NO₂ + NO₃)), так і порушення ендотеліозалежної вазодилатації (проба з реактивною гіперемією).

ENDOTHELIAL FUNCTIONAL STATE IN THE CASE OF ASPIRIN RESISTANCE DEVELOPMENT IN PATIENTS WITH ISCHEMIC HEART DISEASE

V.I. Volkov, O.E. Zaproválnaja, T.N. Bondar, E.O. Krahmalova

The study has been held for the relationship of anti-aggregative effects of acetylsalicylic acid *in vitro* and indices characterizing endothelial functional state of patients with ischemic heart disease (IHD) and progressing and stable angina. It has been established, that patients with IHD and lowered sensitivity to anti-aggregative Aspirin effects are characterized by the deeper endothelial functional disturbances that are evident both as depression of the indicator of endogenous NO synthesis (the sum (NO₂ + NO₃)), and disturbances of endothelium-dependent vasodilatation (reactive hyperaemia probe).