

## АКТИВНОСТЬ КАЛЬЦИЕВЫХ КАНАЛОВ В ТРОМБОЦИТАХ – КАК ПРЕДИКТОР ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ЭССЕНЦИАЛЬНОЙ ГИПЕРТОНИИ АНТАГОНИСТАМИ КАЛЬЦИЯ

*А.Г. Полупанов, А.С. Джумагулова, Т.А. Романова, Ч.У. Келгенбаева*

Изучена клиническая эффективность антагониста кальция амлодипина. Выявлено, что гипотензивная активность амлодипина переменна и находится в зависимости от степени активности кальциевых каналов.

*Ключевые слова:* эссенциальная гипертензия; антагонисты кальция; кальциевые каналы.

Взаимосвязь между обменом внутриклеточного кальция и патогенезом эссенциальной гипертензии (ЭГ) уже давно привлекает внимание исследователей, поскольку непосредственной причиной вазоконстрикции и повышения АД при ЭГ является увеличение концентрации внутриклеточного кальция в гладких мышцах сосудистой стенки [1–5]. Прогресс в этой области был достигнут после создания простых и надежных методов измерения концентрации внутриклеточного кальция и разработки приемлемых клеточных моделей для изучения активности кальциевых каналов. Так, было показано, что исследования, выполняемые на тромбоцитах, можно использовать для моделирования процессов обмена кальция в гладкомышечных клетках (ГМК) сосудов [6, 7]. В частности, важное значение в развитии вазоконстрикции отводят состоянию  $P_{2X}$ -пуринорецепторов, локализующихся на мембранах ГМК, которые идентичны тромбоцитарным  $P_{2X}$ -пуринорецепторам. Их стимуляция аденозиндифосфатом (АДФ) и аденозинтрифос-

фатом (АТФ) приводит к повышению концентрации цитоплазматического кальция как за счет его входа из внеклеточного пространства, так и за счет высвобождения депонированного кальция из внутриклеточных депо [8–10].

В последние годы все большее количество проведенных исследований подтверждают наличие нарушений мембранного транспорта кальция при ЭГ. Так рядом авторов [1–3, 11] было показано, что в цитоплазме тромбоцитов больных ЭГ повышена базальная концентрация ионов кальция, причем в части случаев это обусловлено гиперактивностью кальциевых каналов [4]. Повышение активности кальциевых каналов выявляется у части больных ЭГ с отягощенным семейным анамнезом и может играть основную роль в вазоконстрикции и развитии заболевания [12].

Препаратами, специфически воздействующими на структуры кальциевых каналов, являются антагонисты кальция (АК). Блокируя кальциевые каналы сосудистой стенки, АК угнетают вход кальция в ГМК, что приводит к их

расслаблению и снижению сосудистого тонуса. Благодаря вазодилатирующему действию АК вызывают значительную редукцию АД. Однако накопленный опыт показал, что при приеме АК у больных ЭГ наблюдается определенная вариабельность их гипотензивного эффекта, что может быть обусловлено особенностями регуляции активности кальциевых каналов ГМК сосудов. В свою очередь, изучение динамики активности кальциевых каналов под влиянием антигипертензивных препаратов, прежде всего АК, может быть использовано для прогнозирования эффективности этих лекарственных средств при лечении больных ЭГ.

Учитывая вышеизложенное, целью нашего исследования явилось изучение клинической эффективности антагониста кальция амлодипина с учетом активности кальциевых каналов в тромбоцитах.

**Материал и методы исследования.** Проведено исследование эффективности амлодипина при лечении мягкой и умеренной артериальной гипертензии в зависимости от исходной активности кальциевых каналов. В исследование было включено 25 больных эссенциальной гипертензией (ЭГ) мужчин в возрасте 40–60 лет (средний возраст –  $46,6 \pm 6,4$  года). Диагноз ЭГ устанавливался на основании комплекса клинико-инструментальных критериев, рекомендованных ВОЗ (1999). Длительность ЭГ на момент включения в исследование составляла в среднем 6,4 года. В исследование включались больные с уровнем систолического АД 140–179 мм рт. ст и диастолического АД – 90–109 мм рт. ст. (1-я и 2-я степень повышения АД).

Из исследования исключались пациенты с коронарной болезнью сердца (стенокардия ФК II и выше), перенесшие острый инфаркт миокарда, лица, имеющие признаки сердечной недостаточности II–IV ФК по NYHA, мерцательную аритмию, клапанные пороки сердца, черепно-мозговую травму в анамнезе, а также страдающие вторичными формами артериальной гипертензии.

На момент включения больные ЭГ либо совсем не принимали гипотензивные средства, либо использовали их нерегулярно. После 2-недельного “отмывочного” периода, в течение которого пациенты не принимали гипотензивных средств, больным назначался амлодипин в виде монотерапии. Начальная доза препарата составляла 5 мг/сут. В случае недостаточной ее эффективности через четыре недели дозу препарата увеличивали до 10 мг/сут. Длительность

лечения амлодипином составляла шесть месяцев. До и после шестимесячного курса антигипертензивной терапии у больных ЭГ проводилось суточное мониторирование АД, эхо- и доплероэхокардиографическое исследование, а также изучение активности кальциевых каналов в тромбоцитах.

Мониторирование АД и частоты пульса в течение 24-х часов проводилось с помощью амбулаторного аппарата **Tonoport-IV** (фирма “Marquette Hellige”, Германия). Уровни АД и частоты пульса измерялись каждые 15 минут в дневное время и каждые 30 минут в ночное время. Результаты мониторирования подвергались компьютерной обработке. Артефакты выявлялись самим регистрирующим прибором и не выдавались в виде числовых значений. Оценивались среднесуточные величины систолического и диастолического АД, суточный индекс (степень снижения АД в ночное время) и временной индекс (доля измерений от общего их количества за сутки, при которых значение АД превышало норму).

Эхокардиографическое исследование проводилось на аппарате **Acuson Sequoia-256**, (Siemens, Германия). По стандартной методике определяли конечно-диастолический (КДР) и конечно-систолический (КСР) размеры полости левого желудочка, конечно-систолический (КСО) и конечно-диастолический (КДО) объемы ЛЖ, толщину задней стенки (ЗСЛЖ) и межжелудочковой перегородки (МЖП), фракцию выброса левого желудочка (ФВ), ударный объем ЛЖ (УО). Масса миокарда левого желудочка (ММЛЖ) рассчитывалась по формуле, предложенной Devereux и Reichek (1977). Индекс массы миокарда (ИММ) левого желудочка определялся делением ММЛЖ на площадь поверхности тела. Наличие ГЛЖ признавалось в том случае, если толщина задней стенки левого желудочка и/или толщина межжелудочковой перегородки составляла 12 мм и более, а величина индекса массы миокарда левого желудочка, соотношенная к площади поверхности тела равнялась или превышала  $125 \text{ г/м}^2$  у мужчин и  $110 \text{ г/м}^2$  у женщин.

О состоянии диастолической функции судили по кривым трансмитрального потока из апикального доступа в импульсно-волновом режиме. При оценке диастолической функции ЛЖ рассчитывали следующие показатели: максимальную скорость раннего диастолического наполнения – пик Е; максимальную скорость позднего диастолического наполнения – пик А; соотношение скоростей трансмитрального кровотока

Динамика показателей суточного мониторинга АД в процессе длительного лечения амлодипином

Показатели	1-я группа		2-я группа	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
САД, мм рт. ст.	153,7±3,7	126,0±2,4**	144,6±4,1	136,9±2,8
ДАД, мм рт. ст.	100,4±2,5	79,9±1,7**	93,9±3,6	90,8±1,0
ВИ <sub>САД</sub> , %	81,3±16,2	34,2±9,8**	58,3±10,3	43,4±9,6
ВИ <sub>ДАД</sub> , %	75,3±12,3	32,1±8,4**	66,7±3,9	65,4±3,8
СИ <sub>САД</sub> , %	8,9±4,2	10,1±5,2	8,2±1,3	8,3±2,7
СИ <sub>ДАД</sub> , %	7,4±3,6	8,9±3,1	10,6±1,6	13,0±3,6

Примечание: ВИ – временной индекс; СИ – суточный индекс; \*\* –  $p < 0,01$ .

(Е/А); переднезадний размер левого предсердия (ЛП); время изоволюмического расслабления ЛЖ (ВИР).

Активность АТФ/АДФ – зависимых кальциевых каналов ( $P_{2X}$ -рецепторов) – изучалась на свежевыделенных тромбоцитах крови здоровых лиц и больных ЭГ. Активность кальциевых каналов определялась по методике, основанной на изменении концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в тромбоцитах в ответ на воздействие индукторов. Концентрацию внутриклеточного кальция в тромбоцитах определяли с помощью флюоресцентного зонда Fura-2 на спектрофлуориметре “Hitachi-3000”. В качестве индуктора входа кальция в тромбоциты использовался аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 10 мкМ.

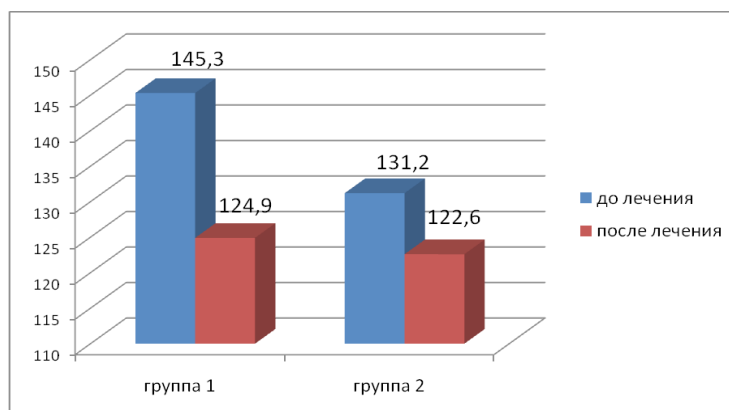
Статистическая обработка полученных данных проводилась при помощи программ STATISTICA 6.0 и BIOSTAT с использованием пакета стандартных статистических программ. Достоверность различий между группами определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни, а также параметрического t-критерия Стьюдента. Достоверность изменений показателей внутри групп оценивалась в случае нормального распределения показателей – с использованием парного t-критерия Стьюдента, в случае асимметричного распределения показателей – с использованием непараметрического критерия Вилкоксона (W). Различия считались достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** В зависимости от эффективности проведенного лечения все больные ЭГ были разделены на две группы. Первую группу составили 18 (72 %) больных ЭГ, у которых в процессе длительного лечения ам-

лодипином отмечался хороший терапевтический эффект и среднесуточные величины среднего АД снижались на 10 мм рт. ст. и более. Во вторую группу вошли 7 (28 %) пациентов с низкой терапевтической эффективностью амлодипина, у которых редукция среднесуточных величин среднего АД к концу курса лечения составляла менее 10 мм рт. ст. Выделенные группы больных не различались между собой по возрасту, длительности заболевания, исходным уровням систолического и диастолического АД, а также индексу массы миокарда левого желудочка ( $p > 0,05$ ).

В процессе шестимесячной терапии амлодипином у больных ЭГ с хорошим терапевтическим эффектом, помимо улучшения в клиническом течении заболевания, наблюдалась значительная редукция АД. Так, среднесуточные величины систолического АД уменьшились со  $153,7 \pm 3,7$  мм рт. ст. до  $126,0 \pm 2,4$  мм рт. ст. ( $p < 0,01$ ), а среднесуточные величины диастолического АД снизились со  $100,4 \pm 2,5$  мм рт. ст. до  $79,9 \pm 1,7$  мм рт. ст. ( $p < 0,01$ ). Значительно уменьшились в процессе лечения и показатели индекса времени систолического (с  $81,3 \pm 16,2$  до  $34,2 \pm 9,8$  %,  $p < 0,01$ ) и диастолического АД (с  $75,3 \pm 12,3$  до  $32,1 \pm 8,4$  %,  $p < 0,01$ ). **Несколько улучшился суточный профиль АД:** степень ночного снижения АД увеличилась как для САД, так и для ДАД, хотя выявленные изменения не достигали уровня достоверности (табл. 1).

Анализируя влияние амлодипина на структурные изменения миокарда, следует отметить, что у больных ЭГ 1-й группы к концу шестого месяца терапии обнаружена достоверная регрессия гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ). Так, в этой группе пациентов к концу курса исследо-



Динамика массы миокарда у больных эссенциальной гипертензией в процессе лечения амлодипином

Таблица 2

Динамика активности АДФ-зависимых кальциевых каналов у больных эссенциальной гипертензией первой и второй групп в процессе длительного лечения амлодипином

Показатели	1-я группа		2-я группа	
	до лечения	после лечения	до лечения	после лечения
Базальный $\text{Ca}^{2+}$ , нМ	135,8±4,5	125,0±4,1	123,4±5,6	120,4±4,8
Стимулированный $\text{Ca}^{2+}$ , нМ	404,1±10,1	326,6±14,1**	238,5±11,6	227,8±14,3

Примечание: \*\* –  $p < 0,01$ .

вания ИММ левого желудочка уменьшился со  $145,3 \pm 6,7 \text{ г/м}^2$  до  $124,9 \pm 7,4 \text{ г/м}^2$  ( $p < 0,01$ ) (см. рисунок) и происходило это как за счет уменьшения толщины задней стенки левого желудочка, так и межжелудочковой перегородки.

В то же время у больных ЭГ с низкой терапевтической эффективностью амлодипина (2-я группа) не отмечалось достоверной положительной динамики со стороны анализируемых показателей. Так, шестимесячное лечение амлодипином у этой группы больных ЭГ не сопровождалось достоверной редукцией как систолического АД ( $136,9 \pm 2,8 \text{ мм рт. ст.}$  против  $144,6 \pm 4,1 \text{ мм рт. ст.}$  до лечения,  $p > 0,05$ ), так и диастолического АД ( $90,8 \pm 1,0 \text{ мм рт. ст.}$  против  $93,9 \pm 3,6 \text{ мм рт. ст.}$  до лечения,  $p > 0,05$ ). Не изменились значительно показатели индекса времени и суточного индекса систолического и диастолического АД ( $p > 0,05$ ) (табл. 1). Со стороны индекса массы миокарда левого желудочка существенной динамики также не отмечалось ( $122,6 \pm 5,1 \text{ г/м}^2$  против  $131,2 \pm 5,7 \text{ г/м}^2$  до лечения,  $p > 0,05$ ) (см. рисунок).

Таким образом, лечение больных ЭГ амлодипином сопровождалось определенной вариабельностью гипотензивного эффекта препарата. У большей части пациентов амлодипин вызывал значимую редукцию АД, что сочеталось с существенным уменьшением постнагрузки на левый желудочек, что является одним из факторов, приводящих к обратному развитию ГЛЖ. В то же время у меньшей части больных ЭГ при лечении амлодипином отмечалась лишь тенденция к снижению АД и отсутствовала положительная динамика со стороны массы миокарда левого желудочка.

Учитывая, что вариабельность гипотензивного действия антагонистов кальция может быть обусловлена особенностями регуляции активности кальциевых каналов гладкомышечных клеток (ГМК) сосудов, мы исследовали состояние регуляции кальциевых каналов тромбоцитов в выделенных группах больных ЭГ до и после шестимесячной терапии амлодипином.

При изучении активности кальциевых каналов в анализируемых группах больных ЭГ уже в

фоновых условиях нами были обнаружены значимые различия по индукции входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку в ответ на АДФ. Так, у больных ЭГ 1-й группы максимальный прирост внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  при стимуляции АДФ был достоверно выше, чем у пациентов с низкой терапевтической эффективностью амлодипина ( $p < 0,01$ ), что свидетельствовало о гиперактивности кальциевых каналов у этой категории пациентов. Базальная концентрация свободного  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах в сравниваемых группах больных ЭГ не различалась ( $p > 0,05$ ) (табл. 2).

Шестимесячная терапия амлодипином у больных ЭГ 1-й группы приводила к значительному уменьшению прироста концентрации АДФ-индуцированного  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах ( $p < 0,01$ ), что свидетельствовало об эффективной блокаде входа  $\text{Ca}^{2+}$  в клетку через АТФ/АДФ-зависимые кальциевые препараты указанным препаратом.

В то же время у больных ЭГ с низкой терапевтической эффективностью амлодипина курсовое лечение препаратом не сопровождалось достоверным уменьшением прироста концентрации внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в тромбоцитах в ответ на стимуляцию АДФ ( $p > 0,05$ ), что свидетельствовало об отсутствии влияния амлодипина на активность кальциевых каналов у этой категории больных ЭГ. Базальная концентрация внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  в обеих исследуемых группах при лечении амлодипином существенно не изменилась ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, у больных ЭГ с хорошим гипотензивным эффектом от приема антагонистов кальция прирост внутриклеточного кальция в ответ на АДФ был гораздо выше, чем у пациентов с низким эффектом лечения, свидетельствуя о гиперактивности кальциевых каналов у первых. У них же длительная терапия амлодипином приводила к выраженному снижению концентрации АДФ-стимулированного кальция в тромбоцитах, что сочеталось с большей эффективностью гипотензивной терапии. Можно считать, что у этой категории пациентов гипертензия связана с гиперактивностью кальциевых каналов и применение блокаторов кальциевых каналов у них обеспечивает эффективную блокаду входа кальция в ГМК и дает стойкий гипотензивный эффект.

#### Литература

1. Poch E., Fernandez-Liama P., Botey A et al. Parathyroid hormone and platelet cytosolic calcium concentration in essential hypertension // *Nephrology, Dialysis, Transplantation*. 1995. V. 10(3). P. 366–371.
2. Manninen A., Wuorela H., Laippala P. et al. Intraplatelet free calcium and calcium-regulating hormones in plasma are not related to the antihypertensive effect of nifedipine in hypertensive pregnancy // *Pharmacol. and Toxicol.* 1995. V. 77(5). P. 327–332.
3. Barbagallo M., August P.A., Resnick L.M. Altered cellular calcium responsiveness to insulin in normal and hypertensive pregnancy // *J. of Hypertens.* 1996. V. 14 (9). P. 1081–1085.
4. Gruska S., Ihrke R., Stolper S. et al. Prevalence of increased intracellular signal transduction in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension normotensive subjects // *J. of Hypertens.* 1997. V. 15(1). P. 29–33.
5. Duner E., Di Virgilio F., Trevisan R. et al. Intracellular free calcium abnormalities in fibroblasts from non-insulin-dependent diabetic patients with and without arterial hypertension // *Hypertens.* 1997. V. 29(4). P. 1007–1013.
6. Авдонин П.В. и др. Механизм увеличения концентрации кальция в цитоплазме тромбоцитов при действии фактора агрегации / П.В. Авдонин, М.Ю. Меньшиков, С.Н. Орлов и др. // *Биохимия*. 1985. № 50. P. 1241–1248.
7. Меньшиков М.Ю. Биохимические и фармакологические аспекты обмена ионов кальция в тромбоцитах при сердечно-сосудистых заболеваниях: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М., 1995. 45 с.
8. Matsumoto T., Nakane T., Chiba S. Pharmacological analysis of responses to ATP in the isolated and perfused canine coronary artery // *Eur. J. Pharmacol.* 1997. V. 334 (2–3). P. 173–180.
9. Mattiasson I., Endre T., Berglund G. et al. Insulin sensitivity, sodium-insulin countertransport and platelet free calcium concentrations in normotensive men with a family history of hypertension // *J. of Hum. Hypertens.* 1998. V. 12. P. 259–264.
10. Gachet C., Hechler B., Leon C. et al. Purinergic receptors on blood platelets // *Platelets*. 1996. V. 7. P. 261–267.
11. Орлов С.Н. и др. Внутриклеточная концентрация свободного кальция в тромбоцитах: особенности, выявляемые при спонтанной гипертензии / С.Н. Орлов, Н.И. Покудин, Ю.В. Постнов // *Кардиология*. 1984. № 4. P. 93–98.
12. Шхвацабая И.К. и др. Рецепторзависимая регуляция концентрации кальция в цитоплазме тромбоцитов больных гипертонической болезнью / И.К. Шхвацабая, А.Н. Кравченко, П.В. Авдонин и др. // *Кардиология*. 1988. № 5. P. 72–77.