

Функция эндотелия: фокус на оксид азота

Беловол А.Н., член-корресп., д.мед.н., профессор, Князькова И.И., д.мед.н., доцент кафедры внутренней медицины №1 и клинической фармакологии Харьковского национального медицинского университета

Эндотелий представляет монослой пограничных клеток, выстилающий внутреннюю поверхность сосудистой системы от сердца до капилляров, и отделяющий циркулирующую кровь от тканей. Его вес превышает вес печени, и сравним с массой нескольких сердец. Постулируется, что он является самой большой и наиболее важной железой организма [1]. Эндотелиальные клетки ведут себя как рецепторно-эффекторный орган, реагирующий на различные физико-химические или нейрогуморальные стимулы, происходящие внутри сосуда. Основными факторами, стимулирующими эндотелиальные клетки, являются [2]:

- 1) изменение скорости кровотока (увеличение напряжения сдвига);
- 2) тромбоцитарные факторы (серотонин, аденозиндифосфат, тромбин);
- 3) циркулирующие и/или «внутристеночные нейрогормоны» (катехоламины, вазопрессин, ацетилхолин, эндотелин, брадикинин, ангиотензин II);
- 4) гипоксия.

Эндотелий способен продуцировать большое количество различных молекул, как агонистов, так и антагонистов, и, таким образом, поддерживать вазомоторный баланс и сосудистый гомеостаз аутокринным, паракринным и эндокринным способами [3]. Регуляция сосудистого гомеостаза осуществляется посредством ряда паракринных факторов, действующих локально на стенку и просвет сосудов. В частности, осуществляется поддержание баланса образуемых вазодилататоров (оксид азота NO, простагландин PGI₂, брадикинин, натрийуретического пептида С-типа, эндотелиальный гиперполяризующий фактор) и вазоконстрикторов (эндотелин-1, тромбоксан TxA₂, ангиотензин, простагландин H₂, эндопероксиды). Эндотелиальные клетки также напрямую сообщаются с гладкомышечными клетками через миоэндотелиальные щелевидные соединения, которые не только позволяют поддерживать электротонический потенциал (опосредованный эндотелиальным фактором гиперполяризации), но и перемещение ионов или малых молекул, таких как кальций и циклические нуклеотиды [4]. Кроме того, эндотелий контролирует текучесть и коагуляцию крови посредством образования факторов, регулирующих активность тромбоцитов, каскад свертывания, а также состояние фибринолитической системы [5]. Эндотелию свойственна способность образования цитокинов и молекул адгезии, которые регулируют прямым способом процесс воспаления [6]. В нормально функционирующем эндотелии сохраняется равновесие между репаративными и повреждающими процессами, прооксидантным и антиоксидантным действием, а также регуляция сосудистой проницаемости, адгезии лейкоцитов, ремоделирование сосудов. Действие гормонов осуществляется с помощью расположенных на поверхности эндотелиальных клеток специфических рецепторов - адренорецепторов, мускариновых, гистаминовых, к вазопрессину, брадикинину, серотонину, эндотелину и тромбину.

Основные функции эндотелия [7]

Вазорегуляторная (высвобождение вазоактивных субстанций):

- вазодилататоры: оксид азота, аденозин, простагландин PGI₂, С-тип натрийуретического пептида, эндотелиальный гиперполяризующий фактор, эпоксиэйкозатриеновые кислоты
- вазоконстрикторы: эндотелин-1, простагландины (тромбоксан TxA₂, простагландин H₂) ангиотензин II, уридинаденозинтетрафосфат, изопростаны, 20-гидроксиэйкозатетраеновая кислота, супероксид анион (O₂⁻)

Участие в механизме свертывания крови и фибринолизе:

- антикоагулянтные факторы: оксид азота, простагландин PGI₂, тканевой активатор плазминогена, тромбомодулин;
- прокоагулянтные факторы: тромбин, ингибитор активатора плазминогена-1, фактор фон Виллебранда

<p>Регуляция процесса воспаления в сосудистой стенке:</p> <ul style="list-style-type: none"> - белка-хемоаттрактанта моноцитов-1 (MCP-1), - экспрессия молекул адгезии (VCAM-1, ICAM-1, селектинов), - интерлейкины 1, 6 и 18, - фактор некроза опухоли-α
<p>Ферментативная активность:</p> <ul style="list-style-type: none"> - экспрессия АПФ, протеинкиназы С
<p>Участие в регуляции факторов роста:</p> <ul style="list-style-type: none"> - эндотелиальный фактор роста, - тромбоцитарный фактор роста, - фактор роста фибробластов, - ангиотензин II, - гепариноподобные ингибиторы роста

Сокращения: VCAM-1 – молекула адгезии клеток сосудов 1; ICAM-1 – молекула межклеточной адгезии 1 типа

Таким образом, эндотелий играет ключевую роль в поддержании нормального тонуса, текучести крови, а также ограничении сосудистого воспаления и пролиферации гладкомышечных клеток (рис.) [2,8].

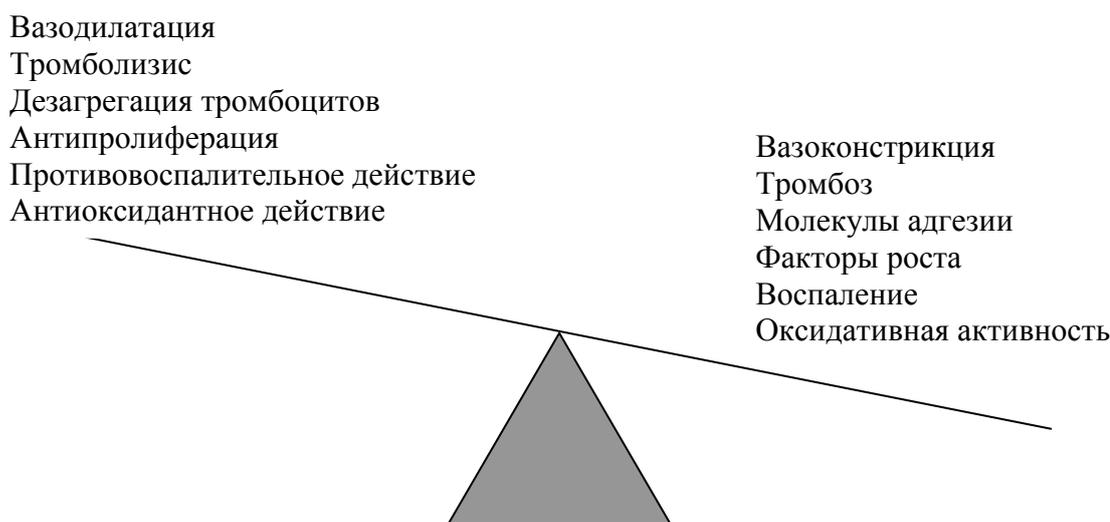


Рис. Регуляторные функции эндотелия. Нормальные или антиатерогенные эффекты против дисфункции или атерогенных свойств. Адаптировано из Espet RJ. [703].

Нарушение этого тонко регулируемого баланса приводит к развитию эндотелиальной дисфункции. Так, при наличии факторов риска сердечно-сосудистых заболеваний эндотелиальные клетки теряют способность поддерживать тонко регулируемый механизм: создаются условия для захвата эндотелием липидов и лейкоцитов (моноциты и Т-лимфоциты), стимулируется воспалительный ответ, и появляются жировые полосы, первая ступень формирования атероматозной бляшки. Если состояние сохраняется, наблюдается прогрессирование атеросклероза и превращение жировой полосы в атеромную бляшку, бляшка подвергается разрыву и создаются условия для тромбогенеза и окклюзии сосуда. Клинические синдромы, такие, как стабильная и нестабильная стенокардия, острый инфаркт миокарда, перемежающаяся хромота,

и инсульт связаны, в частности, с нарушением эндотелиального контроля сосудистого тонуса, тромбозом, и структурными изменениями сосудистой стенки.

Среди многочисленных биологически активных веществ, вырабатываемых эндотелием, важнейшим эндотелиальным фактором релаксации является оксид азота (NO) определяющийся практически во всех тканях [2]. В 1980 году Furchgott R.F. и Zavadzki J.V. впервые экспериментально установили, что присутствие эндотелиальных клеток сосудов вызывает релаксацию изолированной аорты кролика в ответ на стимуляцию ацетилхолином [10]. При удалении эндотелия из сосудов вазодилатация не отмечалась, но сохранялся ответ на нитроглицерин. Эта эндотелий-зависимая релаксация гладкой мускулатуры сосудов в ответ на ацетилхолин опосредуется эндогенным медиатором, первоначально названным эндотелиальным фактором релаксации, а впоследствии - оксидом азота [11]. Оксид азота является внутриклеточным мессенджером, способным регулировать физиологические функции, такие как активность нервной и сердечно-сосудистой систем.

Оксид азота присутствует во всех эндотелиальных клетках независимо от размера и функции сосудов. Нормально функционирующий эндотелий отличает непрерывная секреция оксида азота, необходимая для поддержания тонуса артериальных сосудов. Оксид азота синтезируется посредством окисления терминальной группы гуанидина аминокислоты L-аргинина. Основным катализатором этой сложной реакции выступает фермент синтаза оксида азота (NOS).

В настоящее время идентифицированы три изоформы NOS, которые названы согласно с тем типом клеток, где они были впервые обнаружены [2]:

- NOS-1 - нейрональная (nNOS) или мозговая (bNOS);
- NOS-2 - индуцибельная (iNOS) или макрофагальная (mNOS);
- NOS-3 - эндотелиальная (eNOS).

В норме образование оксида азота происходит в основном с помощью эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) (под влиянием nNOS продукция NO низкая). Эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) находится в кавеолах (колбообразные образования клеточных мембран). Белок кавеолин-1, связываясь с кальмодулином, ингибирует эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS), в то время как кальций при соединении с кальмодулином вытесняет кавеолин-1, что приводит к активации eNOS и повышению синтеза оксида азота. Для биосинтеза оксида азота необходимы несколько кофакторов: никотинамидадениндинуклетотидфосфат (NADPH), флавины (флавиномононуклеотид, флавинаденин-динуклеотид), тетрагидробиоптерин (BH₄) [20]. Фермент NOS представляет собой гомодимер, каждая из субъединиц которого состоит из редуктазного домена, окисляющего NADPH, и оксигеназного домена, содержащего гем. Окисление L-аргинина происходит в два этапа. Сначала, флавин NOS принимает электрон от NADPH и передает его железу гема, преобразовывая NOSFe³⁺ в NOSFe²⁺. На этом этапе, из L-аргинина образуется связанный с ферментом промежуточное соединение- N(омега)-гидроксил-L-аргинин. Затем, молекула кислорода связывается с атомом железа гема, а фермент расходует NADPH для окисления N(омега)-гидроксил-L-аргинина в L-цитруллин и оксид азота.

Синтезированный оксид азота диффундирует через мембраны клеток эндотелия и поступает в прилежащие гладкомышечные клетки сосудов, где происходит активация гуанилатциклазы вследствие взаимодействия оксида азота с железом гема, катализирующей превращение гуанизинтрифосфата (ГТФ) в циклический гуанозинмонофосфата (цГМФ), и повышение внутриклеточной концентрации последней [2] а также препятствует склеиванию тромбоцитов, находящихся в тесном контакте с эндотелием. Далее цГМФ взаимодействует с протеинкиназой G, которая фосфорилирует контрактильные протеины, снижает уровни ионов кальция в цитозоле, вызывает дефосфорилирование лёгких цепей миозина и стимулирует вазорелаксацию [21].

Следует отметить, что при синтезе оксида азота образуются реактивные формы азота – различные соединения, включающие нитроксил (анион), нитрозоний (катион), высшие окислы азота, S-нитрозотиолы и железосодержащие комплексы. Общеизвестно, что реактивные

соединения азота играют ключевую роль в физиологической регуляции многих, если не всех живых клеток, таких как, гладкомышечные клетки, кардиомиоциты, тромбоциты, нейроны и клетки юктагломерулярного аппарата. Им свойственны плеiotропные эффекты на клеточные мишени и посттрансляционные модификации и взаимодействия с реактивными соединениями кислорода (ROS). Повышенные уровни реактивных соединений азота влекут за собой клеточное повреждение и смерть посредством стимуляции «нитрозативного стресса». Их потенциальными клеточными мишенями являются липиды, ДНК и белки

Хотя хорошо известно вовлечение реактивных форм азота в передачу сигналов в сердце [22]. Однако многие важные вопросы все еще остаются неизученными. Так, большое число мишеней для реактивных форм азота установлено в кардиомиоцитах – в основном это ионные каналы и кальциевые насосы, участвующие в сокращении миоцитов [23]. Кроме того, оксид азота с помощью eNOS ингибирует L-тип кальциевых каналов посредством активации гуанилатциклазы [24] и снижает β -адренергическую контрактильность миокарда [741]. Напротив, оксид азота с помощью nNOS способствует перемещению Ca^{2+} между саркоплазматическим ретикуломом и цитозолем и увеличивает контрактильность миокарда [25]. Инфаркт миокарда и хроническая сердечная недостаточность ассоциируется с увеличением нитрозативного стресса. Последний при указанных состояниях генерируется воспалительными изменениями в кардиомиоцитах, сопровождаемыми контрактильной дисфункцией [26,27].

Таким образом, цГМФ, как вторичный мессенджер, опосредует ряд биологических эффектов оксида азота, включая контроль сосудистого тонуса и функцию тромбоцитов. Кроме того, оксид азота оказывает влияние и на иные молекулярные мишени, включающие гем или другие железосодержащие протеины, ДНК и тиолы. Эти дополнительные реакции могут опосредовать изменения функций некоторых ключевых ферментов или ионных каналов. Оксид азота также взаимодействует с ферментами дыхательной цепи, включающими комплекс I и II, аконитазу, и благодаря этому изменяет митохондриальное дыхание тканей. Взаимодействие оксида азота с супероксиданионом может ослаблять физиологические реакции, опосредованные оксидом азота, и приводить к необратимому ингибирующему действию на функцию митохондрий в результате образования пероксинитрита (ONOO) – сильного оксиданта (см. ниже).

Прямое действие оксида азота ограничивается коротким периодом полужизни (менее 4 секунд в биологических растворах) и сравнительно коротким расстоянием, на которое эта молекула может перемещаться. В просвете сосуда оксид азота быстро инактивируется (окисляется до нитритов и нитратов) растворенным кислородом, а также супероксидными анионами и гемоглобином и выводится с мочой [12]. Эти свойства предотвращают действие оксида азота на расстоянии от места его высвобождения, что делает его важным локальным регулятором сосудистого тонуса и функции тромбоцитов. При нарушении или невозможности его образования при дисфункции эндотелия не компенсируется высвобождением оксида азота здоровыми эндотелиальными клетками пограничной области.

Наиболее важным стимулятором секреции оксида азота является напряжение сдвига. Вследствие увеличения скорости кровотока стимулируется образование оксида азота, благодаря чему поддерживается длительная вазодилатация [2]. Эту вазодилатацию называют эндотелий-зависимой. Напряжение сдвига объясняет вклад гемодинамического фактора в процессе формирования и разрыва бляшки. Продемонстрировано, что в участках коронарных артерий, где напряжение сдвига низкое (<6 дин/см²), колеблющееся или ретроградное, секреция оксида азота снижена, а адгезия молекул повышена, при этом химические факторы и факторы роста создают «про-воспалительные» условия. С другой стороны, высокое напряжение сдвига (> 70 дин/см²) напротив вызывает эрозии эндотелия и агрегацию тромбоцитов, или является причиной разрыва или повреждения бляшки. Это означает, что низкое или ретроградное напряжение сдвига способствует формированию и прогрессированию атеросклеротического поражения, а высокое напряжение сдвига вызывает повреждение бляшки. Физиологические уровни напряжения сдвига, которые защищают эндотелий, находятся между этими двумя значениями (от 6 до 70 дин/см²) [30].

Кроме вазодилатирующего действия, оксид азота уменьшает проницаемость сосудов и оказывает многочисленные эффекты (табл.2). Оксид азота ингибирует экспрессию проатерогенных и провоспалительных цитокинов и поддерживает фибринолиз. Ингибитор ядерного фактора карра-В (NFκB) также экспрессируется оксидом азота. Все эти факторы уменьшают атерогенез и его осложнения. По этой причине оксид азота считается антиатерогенной молекулой [31].

Вазопротективные свойства оксида азота обусловлены ингибированием следующих механизмов: [32].

- 1) контрактильность гладкомышечных клеток
- 2) клеточный рост
- 3) пролиферация гладкомышечных клеток
- 4) агрегация и адгезия тромбоцитов
- 5) окисление липопротеидов низкой плотности
- 6) образование эндотелина
- 7) активация тромбогенных факторов
- 8) экспрессия молекул адгезии на моноцитах и нейтрофилах

Одним из главных стимуляторов синтеза оксида азота является брадикинин, который образуется в крови под действием ферментов калликреина и XII фактора свертывания. Блокада В₂-кининовых рецепторов на эндотелиальных клетках тормозит вазодилатацию и высвобождение оксида азота. Брадикинин наряду с оксидом азота рассматривают в качестве основного модулятора вазодилатации [2].

Имеются указания о разнообразных и даже противоположных эффектах оксида азота или донаторов оксида азота на функцию миокарда. В настоящее время принят консенсус, согласно которому оксид азота в целом участвует в оптимизации насосной функции сердца [19]. Экспериментально установлено, что низкие (субмикромольные) дозы оксида азота вызывают незначительный положительный инотропный эффект [33]. Продемонстрировано, что чрезмерное образование оксида азота может оказывать отрицательный инотропный эффект и стимулировать апоптоз кардиомиоцитов [34].

У здоровых добровольцев при катетеризации сердца внутрикоронарное введение ингибитора NO-синтазы (NOS) - L-NMMA приводило к незначительному уменьшению пиковой скорости снижения внутрижелудочкового давления (dP/dT макс.ЛЖ) независимо от изменения нагрузки на сердце [35]. Имеются данные, подтверждающие участие оксида азота, полученного с помощью эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS), расположенной в кавеолах сарколеммы, и нейрональной (nNOS), находящейся в саркоплазматическом ретикулуме кардиомиоцитов, в модуляции процесса возбуждения – сокращения посредством влияния на вход ионов кальция через L-тип кальциевых каналов сарколеммы, секрецию и обратный захват кальция саркоплазматическим ретикулумом [36].

Точную физиологическую роль этих эффектов предстоит еще определить, однако имеются доказательства ауторегуляторного влияния оксида азота на циркуляцию кальция в кардиомиоцитах. В несколько более высоких, но еще физиологических концентрациях, оксид азота улучшает релаксацию кардиомиоцитов и диастолическую функцию. В эксперименте продемонстрировано, что оксид азота, секретлируемый эндотелием, увеличивает скорость релаксации и снижает диастолический тонус [37]. Предполагается, что основной механизм такого действия обусловлен цГМФ-индуцированным снижением чувствительности миофиламентов к кальцию [38]. Подобные эффекты отмечены у здоровых людей при катетеризации сердца и внутрикоронарном введении препарата-донатора оксида азота – нитропруссид натрия, или субстанции P, стимулирующей секрецию оксида азота эндотелиальными клетками [39].

Установлено, что аналогично влиянию на сократительную функцию, оксид азота, образующийся локально в миокарде, модулирует сердечный ритм. В частности, отмечено, что оксид азота оказывает двухфазное действие на автоматизм предсердий через модуляцию пейсмекерной активности синусового узла (I_f каналы) [40]. Низкие концентрации донаторов

оксида азота увеличивают частоту сокращений предсердий, тогда как более высокие концентрации оказывают отрицательный хронотропный эффект.

Значение кардио- и вазопротекторных свойств оксида азота при сердечно-сосудистых событиях остается предметом дискуссий. Продемонстрированы протективные свойства донаторов оксида азота и ингибиторов NOS при ишемическом/реперфузионном повреждении миокарда [48-50]. Оксид азота оказывает кардиопротективное действие посредством увеличения коронарного кровотока, уменьшения накопления нейтрофилов, поддержания функции эндотелия, сохранения чувствительности кальция и сократительной функции без увеличения энергетических потребностей и снижения потребления миокардом кислорода [51-53]. Вместе с тем значение этих кардиопротективных механизмов остается окончательно не ясным. Парадоксально, но ингибирование синтазы оксида азота (NOS) оказывает позитивное воздействие при ишемическом/реперфузионном повреждении миокарда имитированием ишемического прекондиционирования, снижением образования пероксинитрита (ONOO-), а также подавлением повреждения производными оксида азота [54]. В то же время в двух экспериментальных исследованиях у мышей с генетическими модификациями получены отличающиеся результаты. Flogel U. и соавт. [55] сообщили, что постишемическое восстановление креатинфосфата и давление в левом желудочке увеличивались в сердцах с дефицитом eNOS по сравнению с дикими мышами. И наоборот, Brunner F. и соавт. [56] сообщили, что миокард трансгенных мышей с повышенной экспрессией eNOS был более устойчив к ишемическому/реперфузионному повреждению, чем у мышей дикого типа.

Анализ 92 исследований [48], в которых изучали влияние оксида азота на ишемическое/реперфузионное повреждение миокарда без прекондиционирования, показал, что в 73% эндогенный и экзогенный оксид азота проявлял кардиопротективные свойства, и только в 12% исследований сообщено о неблагоприятном действии оксида азота. Пропорция исследований, в которых показано протективное влияние оксида азота, была аналогична в исследованиях *in vivo* и *in vitro*. Остается объяснить, почему в некоторых исследованиях обнаружено неблагоприятное действие оксида азота. Приемлемым объяснением является то, что эффекты оксида азота являются дозозависимыми. Предполагается, что существует оптимальная концентрация оксида азота для реализации протективных свойств, а слишком малая или слишком высокая может быть неблагоприятной. Несмотря на многочисленные исследования с ингибиторами синтазы оксида азота (NOS), оксид азота имеет важнейшее значение в кардиоваскулярной протекции [56,58]. Вместе с тем в этих исследованиях не исключается возможность неблагоприятного действия высоких концентраций оксида азота. Чрезмерное образование оксида азота может быть результатом увеличения количества индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) в макрофагах и/или гладкомышечных клетках сосудов или чрезмерной активации эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) в эндотелии коронарных, церебральных и периферических сосудов [59,60].

Острая гипотония является важным результатом чрезмерного образования оксида азота при септическом, анафилактическом, тепловом, геморрагическом и кардиогенном шоке [61,62]. При указанных состояниях обе синтазы оксида азота iNOS и eNOS приводят к гипотонии. Преимущественное ингибирование индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS) низкими (невазоактивными) дозами ингибиторов оксида азота ограничивается снижением артериального давления при септическом шоке и тепловом ударе. Продемонстрировано, что полное ингибирование синтеза оксида азота значительно повышает артериальное давление, но не улучшает выживаемость крыс с тепловым ударом [63]. Кроме того, ингибирование синтазы оксида азота (NOS) сопровождалось повышением смертности крыс с септическим шоком вследствие ишемии миокарда, микрососудистого тромбоза. Установлено повышение уровней оксида азота в плазме крови [64] и аорте [65] у крыс с тепловым ударом и с острым инфарктом миокарда. Это повышенное образование оксида азота сопровождалось чрезмерной эндотелий-зависимой релаксацией изолированных кровеносных сосудов [65], которая обратно коррелировала с артериальным давлением [66]. Эти исследования подтверждают важный вклад эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) в развитие NO-индуцированной острой гипотонии.

Основной механизм, с помощью которого чрезмерное образование оксида азота способствует клеточному повреждению, по-видимому, включает реакцию оксида азота с супероксидным радикалом O_2^- с образованием цитотоксического пероксинитрита ($ONOO^-$).

Наибольшая токсичность пероксинитрита ($ONOO^-$) предполагается при образовании оксид азота и супероксидного радикала O_2^- примерно в равном количестве в одном месте [68]. Чрезмерные количества обоих предшественников могут приводить к образованию $ONOOH$ [69]. Кроме того, оксид азота может нарушать функцию основных белков нитрозилированием групп сернистого железа и остатков тиолов. Оксид азота легко вступает в реакцию с сульфгидрильными радикалами, с образованием окисленного тиола или более агрессивного вида реактивного азота [70]. В результате ингибирования ключевых ферментов цикла трикарбоновых кислот и дыхательной цепи митохондрий, происходит нарушение метаболизма кальция митохондрий или повреждение ДНК, приводящие к гибели клеток путем апоптоза и/или некроза через активацию поли-АДФ-рибозилполимеразы и последующего ингибирования гликолиза и уменьшения АТФ. В связи с этим считается перспективным фармакологическое ингибирование поли-АДФ-рибозилполимеразы при состояниях, связанных с повышенным образованием оксида азота.

Таким образом, в эндотелии синтезируется большое количество биологически активных веществ, участвующих в регуляции сосудистого тонуса, процессах клеточного роста, воспаления и тромбообразования/гемостаза, особое место среди которых занимает оксид азота. Дисфункция сосудистого эндотелия является ранним маркером развития сердечно-сосудистых заболеваний и ассоциируется с последующими клиническими событиями. Знание механизмов ее развития позволяет проводить фармакологическую коррекцию, ориентированную на эндотелиальную дисфункцию, направленную на профилактику прогрессии сердечно-сосудистых заболеваний, так и их осложнений.