

РОЛЬ ОКСИДА АЗОТА В РАЗВИТИИ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ ДИСФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

МАНУХИНА Е.Б., МАЛЫШЕВ И.Ю.

НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, г.Москва

Резюме. Эндотелий кровеносных сосудов играет ключевую роль в поддержании гомеостаза сердечно-сосудистой системы, синтезируя и высвобождая ряд паракринных и аутокринных вазоактивных факторов, которые регулируют тонус, рост и ремоделирование сосудов. Среди этих факторов особое место занимает оксид азота (NO), который обеспечивает нормальное функционирование сердечно-сосудистой системы в физиологических условиях и ее адаптацию в условиях патологии. Основные функции NO в сердечно-сосудистой системе связаны с его вазодилаторным действием, торможением пролиферации гладкомышечных клеток, а также агрегации и адгезии тромбоцитов. Ослабление этих NO-зависимых механизмов вносит существенный вклад в развитие гипертензии, ишемии, тромбозов и атеросклероза. При сердечно-сосудистых заболеваниях часто отмечается дисфункция эндотелия, т.е. уменьшение эндотелийзависимого расслабления артерий, опосредуемого NO. Вопрос о первичности дисфункции эндотелия или повышения АД при гипертензии до настоящего времени остается нерешенным. При эффективном гипотензивном лечении дисфункция эндотелия может быть частично обратима. Возможна также компенсация дефицита NO с помощью доноров NO, например нитровазодилаторов. В настоящее время активно изучается возможность стимуляции синтеза NO в организме фармакологическими и нефармакологическими методами.

Ключевые слова: оксид азота, дисфункция эндотелия, гипертензия, адаптация, гипоксия, кровеносные сосуды.

Abstract. Vascular endothelium plays a key role in maintaining the homeostasis of cardiovascular system by synthesis and release of paracrine and autocrine vasoactive factors which regulate tone, growth and remodeling of blood vessels. Among these factors, a special place belongs to nitric oxide (NO), which provides normal functioning of the cardiovascular system in physiological conditions and cardiovascular adaptation to pathological conditions. Major functions of NO in the cardiovascular system are related to its vasodilatory effect, inhibition of smooth muscle cell proliferation as well as platelet adhesion and aggregation. Disturbance of these NO-dependent mechanisms contributes to the development of hypertension, ischemia, thrombosis and atherosclerosis. These conditions are often associated with endothelial dysfunction, i.e. impaired endothelium-dependent (NO-dependent) relaxation of arteries. The question of what develops first in hypertension, endothelial dysfunction or increased blood pressure, remains open. Endothelial dysfunction can be partially reversed by efficient antihypertensive therapy. NO deficiency may also be compensated by means of NO donors such as nitrovasodilators. At present the possibility of stimulating NO synthesis by pharmacological and non-drug means is under serious consideration.

Эндотелий кровеносных сосудов играет ключевую роль в поддержании гомеостаза сердечно-сосудистой системы, синтезируя и высвобождая ряд паракринных и аутокринных вазоактивных факторов, которые регулируют тонус, рост и ремоделирование сосудов. Среди этих факторов особое место занимает оксид азота (NO), который обеспечивает нормальное функционирование сердечно-сосудистой системы в физиологических условиях и ее адаптацию в условиях патологии [52].

Синтез NO представляет собой процесс пятиэлектронного окисления азота терминальной гуанидиновой группы L-аргинина (рис. 1).

Эта кислород-зависимая реакция протекает в присутствии НАФН, тетрагидриобиптерина, ФАД и ФАМН в качестве кофакторов и катализируется гем-содержащим ферментом NO-синтазой (NOS), которая существует в трех изоформах. Изофермент NOS I конститутивно экспрессируется преимущественно в центральных и периферических нейронах и поэтому

Адрес для корреспонденции: Манухина Е.Б. НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Балтийская ул., 8, Москва 125315, Россия.

Тел.: +7(095) 1554744, +7(095) 1554748

e-mail: manukh@orc.ru

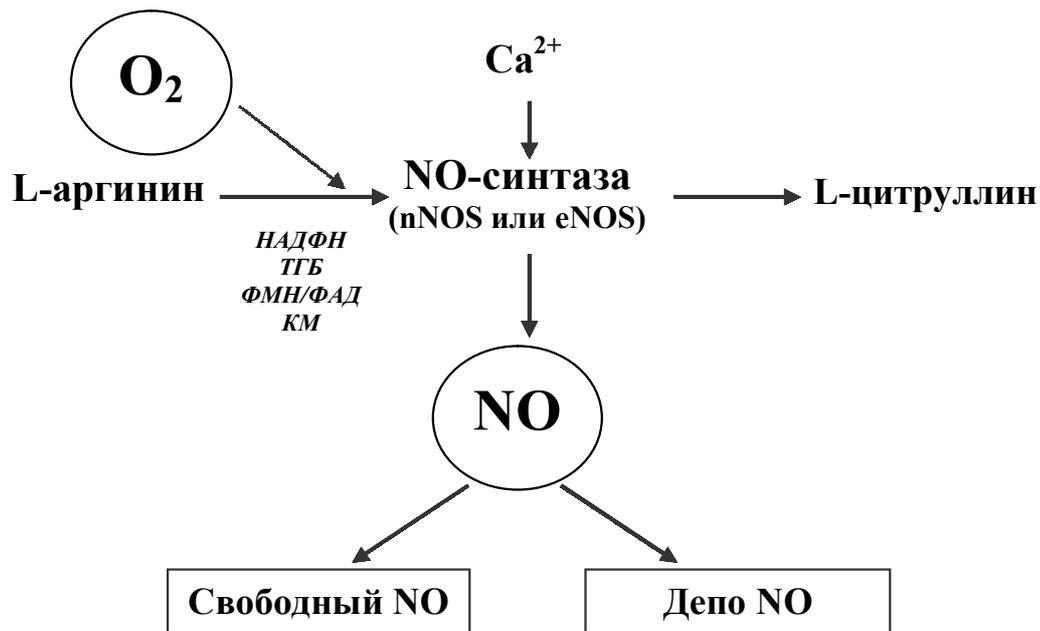


Рис. 1. Биосинтез NO. НАДФН - никотинамиддинуклеотидфосфат, ТГБ - тетрагидробиоптерин, ФМН - флавинаденинмононуклеотид, ФАД - флавинадениндинуклеотид, КМ - кальмодулин, ГЦ - гуанилатциклаза, цГМФ - циклический гуанидинмонофосфат, nNOS – нейрональная NO-синтаза, eNOS – эндотелиальная NO-синтаза.

называется нейрональной NOS (nNOS), хотя, как было позже показано, присутствует в некоторых эпителиальных и сосудистых гладкомышечных клетках. Активность nNOS регулируется Ca^{2+} -зависимым связыванием кальмодулина. Изофермент NOS II в норме обычно не присутствует в клетках, а индуцируется различными факторами, связанными с процессами воспаления и свободнорадикального окисления, и поэтому называется индуцибельной NOS (iNOS). Регуляция этого изофермента происходит только на уровне экспрессии, и его активность не зависит от Ca^{2+} и кальмодулина. iNOS продуцирует NO в огромных количествах, на три порядка превышающих продукцию NO конститутивными NOS. Третья изоформа – NOS III, или эндотелиальная NOS (eNOS), присутствует в эндотелиальных и некоторых других типах клеток и регулируется как на уровне транскрипции и трансляции гена, так и на уровне активности самого фермента. Активность eNOS регулируется уровнем внутриклеточного Ca^{2+} и его связыванием с кальмодулином, фосфорилированием тирозина. NO начинает синтезироваться в течение нескольких секунд после поступления любого стимула, вызывающего повышение концентрации кальция в клетке. В число таких стимулов входят аце-

тилхолин, брадикинин, ангиотензин II, субстанция P, кальциевые ионофоры, а также эндогенные вещества, которые образуются при агрегации тромбоцитов в непосредственной близости от эндотелиальной клетки, например тромбин, АТФ и серотонин. Главными физическими факторами, которые регулируют как экспрессию гена eNOS, так и активность этого фермента, являются напряжение сдвига, т.е. смещение крови по отношению к эндотелиальному клеточному слою, и концентрация молекулярного кислорода [24].

Эффект NO зависит от его концентрации. В высоких концентрациях NO токсичен, что обеспечивает его цитотоксическое и цитостатическое действие на опухолевые и бактериальные клетки. Кроме того, избыток NO легко вступает в реакцию с кислородом и супероксиданионом и образует пероксинитрит, который еще токсичнее, чем сам NO. В сравнительно небольшой концентрации выполняет регуляторные функции, активируя растворимую гуанилатциклазу и вызывая тем самым повышение уровня цГМФ в клетках-мишенях. В сосудах NO синтезируется в эндотелии сосудов, а затем диффундирует в соседние гладкомышечные клетки, где вызывает активацию цГМФ-зависимой протеинкиназы (G-киназы),

последующее снижение концентрация Ca^{2+} , расслабление сосудистой гладкой мышцы и вазодилатацию [52].

Время жизни NO составляет несколько секунд. Однако NO может стабилизироваться для запасания и транспортировки путем включения его в комплексы, образующие депо NO в эндотелии и в гладкой мышце. Депо NO может связывать избыток NO и тем самым предупреждать токсические эффекты его избытка. С другой стороны, депо NO может служить дополнительным неферментативным источником NO в случае его дефицита. Депонирование NO происходит в стенках кровеносных сосудов и начинается при любом повышении его концентрации в плазме крови, а в базальных условиях депо NO не обнаруживается [5].

Основными формами депонирования и транспортировки NO в живом организме являются S-нитрозотиолы и ДНКЖ (рис. 2). Эти комплексы способны к взаимопревращениям в зависимости от уровня в клетке Fe^{2+} , низкомолекулярных тиолов и NO. По-видимому, S-нитрозотиолы выступают в качестве основной транспортной формы NO, переносящей его между клетками. Попадая в область с повышенным содержанием негемового железа и

тиолов, S-нитрозотиолы инициируют образование ДНКЖ, а распад ДНКЖ приводит к высвобождению NO. S-нитрозотиолы и ДНКЖ существуют в двух формах – высокомолекулярной, т.е. связанной с белками через их SH-группы, и низкомолекулярной, т.е. содержащей низкомолекулярные тиоловые лиганды (цистеин или восстановленный глутатион). Белковые комплексы гораздо более стабильны, чем низкомолекулярные, и рассматриваются как внутриклеточное депо NO [2].

Депо NO в форме ДНКЖ в сосудах удается выявить, используя метод электронного парамагнитного резонанса [53], гистохимическое окрашивание по двухвалентному железу [23], или фоторелаксацию [39]. Позже был разработан метод, позволяющий не только обнаружить депо NO, но и оценить его объем в стенке изолированных сосудов. Для этого используют вещества, которые реагируют с NO-содержащими комплексами с высвобождением из них вазоактивных продуктов [8, 42].

Основные функции NO в сердечно-сосудистой системе связаны с тем, что NO является самым мощным из всех известных эндогенных вазодилататоров. Сосуды малого диаметра синтезируют больше NO, чем крупные. За счет

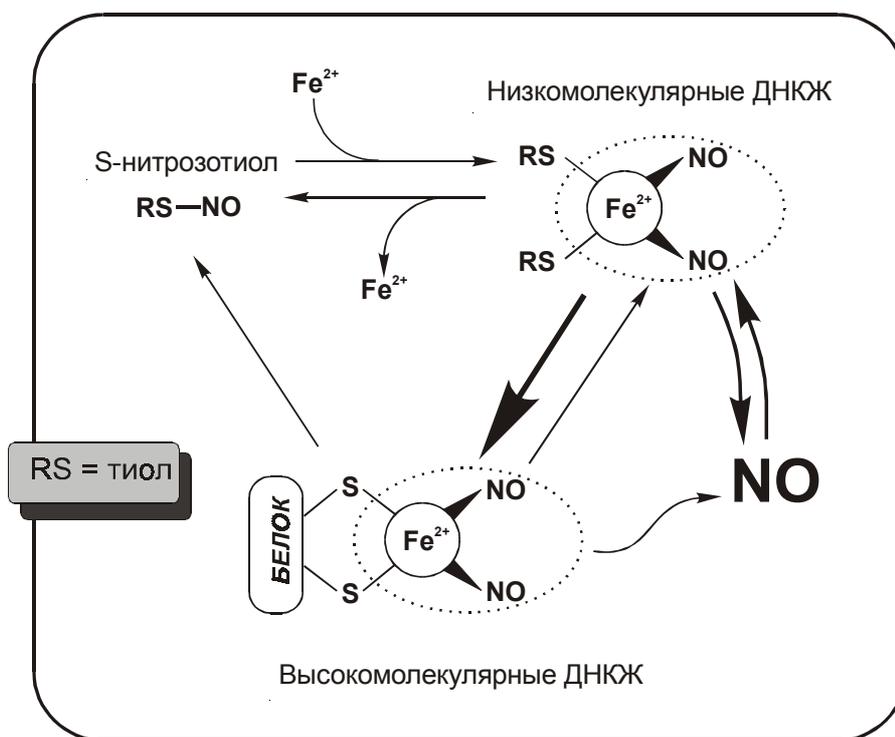


Рис. 2. Депонирование NO в форме S-нитрозотиолов (RS-NO), динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) с белковыми лигандами и низкомолекулярных ДНКЖ.

этого NO регулирует периферическое сопротивление, АД и распределение кровотока в сосудистой сети. Поскольку NO регулирует тонус сосудов, в том числе и резистивных, снижение синтеза или биодоступности NO приводит к вазоконстрикции и повышению периферического сосудистого сопротивления. При этом NO опосредует дилатацию почечных сосудов и, соответственно, диурез и натрийурез. Поэтому ослабление этих NO-зависимых механизмов вносит существенный вклад в развитие гипертензии [30].

Важная защитная роль NO состоит в том, что NO ингибирует высвобождение пептидных митогенов из тромбоцитов и тормозит пролиферацию гладкомышечных клеток, индуцированную гиперлипидемией и свободными радикалами. При дефиците эндотелиального NO ускоряется утолщение интимы и формирование атеросклеротических бляшек, что ведет к морфологическому повреждению эндотелия, дополнительным нарушениям эндотелийзависимого расслабления сосудов и ишемии [28].

Наконец, NO тормозит агрегацию и адгезию тромбоцитов. При агрегации тромбоцитов NO высвобождается, прежде всего, из самих агрегирующих тромбоцитов. Кроме того, агрегирующие тромбоциты высвобождают АДФ, который активирует eNOS в эндотелии. Образующийся NO предупреждает агрегацию и тромбоцитов и противодействует вазоконстрикторному эффекту тромбоксана A₂ и серотонина, которые продуцируются тромбоцитами. В условиях дефицита эндотелиального NO этот защитный механизм не работает, и, соответственно, создаются условия, способствующие вазоконстрикции, тромбозам и ишемии [55].

Для оценки продукции NO в организме в настоящее время применяется только непрямой метод. В биологических системах NO представляет собой очень нестабильное соединение. В клеточных культурах NO быстро превращается в ион нитрита (NO₂⁻), но в присутствии гемового Fe²⁺ и некоторых других переходных металлов NO₂⁻ превращается в более стабильный ион нитрата (NO₃⁻). В условиях организма в качестве метаболитов NO преобладают нитраты.

Метаболизм эндогенного NO изучен недостаточно. В число возможных промежуточ-

ных продуктов входит целый спектр высоко- и низкомолекулярных тиолов – нитрозоглутатион, нитрозоальбумин, S-нитрозогемоглобин [29], - причем некоторые из них обладают собственными биологическими эффектами. Кроме того, NO реагирует с супероксиданионом с образованием пероксинитрита (ONOO⁻). Пероксинитрит изомеризуется с образованием иона нитрата или нитрозилирует тирозиновые остатки белков [18].

Измеряемая концентрация нитритов или нитрозотиолов зависит от скорости их синтеза и распада или выведения. Поскольку неизвестно, какая часть синтезированного NO метаболизируется по тому или иному пути, измерение этих промежуточных метаболитов не дает точного представления об общей продукции NO. Однако большинство интермедиатов в конце концов превращаются в нитриты, которые достаточно стабильны и, в отличие от других метаболитов, не подвергаются быстрым изменениям во время забора проб и хранения. Поэтому именно суммарная оценка нитритов (после их восстановления до нитратов) и нитратов является общепринятым методом оценки общего синтеза NO в биологических жидкостях [41]. Недостатком этого метода является то, что до 50% нитратов и нитритов, содержащихся в плазме крови, может поступать в организм с пищей. Более точная оценка продукции NO может производиться путем измерения образования ¹³NO₃⁻ из ¹⁵N^G-L-аргинина [25], но даже такой способ не позволяет установить клеточное происхождение NO [52].

При сердечно-сосудистых заболеваниях часто отмечается дисфункция эндотелия, т.е. уменьшение эндотелийзависимого расслабления артерий, опосредуемого NO (рис. 3). При этом обычно сохраняется нормальная дилаторная реакция на экзогенные эндотелийзависимые нитровазодилаторы, по крайней мере, на ранних стадиях дисфункции эндотелия. При тяжелой дисфункции, когда продукция эндотелием NO практически полностью отсутствует, эндотелийзависимые вазодилаторы – ацетилхолин, брадикинин, серотонин, аденозин, АДФ/АТФ, гистамин и др. – начинают вызывать вазоконстрикцию, обусловленную их прямым действием на гладкомышечные рецепторы, которое приводит к увеличению

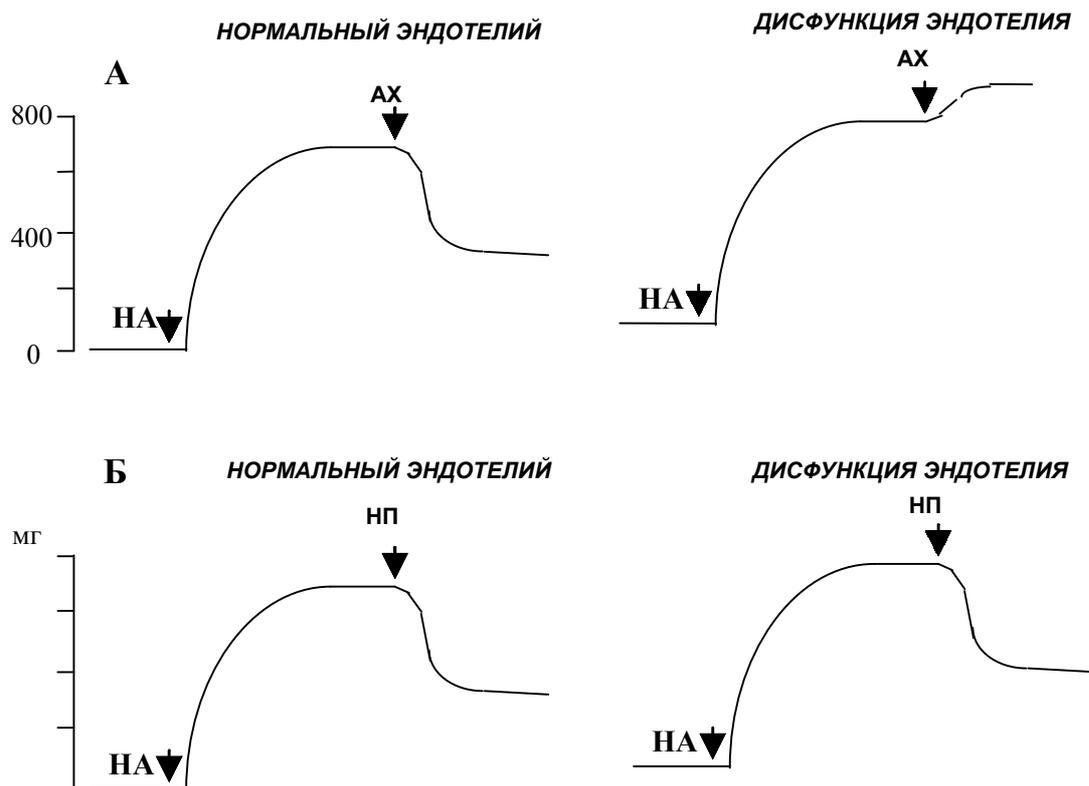


Рис.3. Выявление дисфункции эндотелия в эксперименте на изолированной артерии. А – Эндотелийзависимое расслабление, Б – эндотелийнезависимое расслабление. НА – норадреналин. АХ-ацетилхолин, НП – нитропруссид.

внутриклеточного Ca^{2+} . Это наблюдается при гипертензии, ишемической болезни сердца и сердечной недостаточности, атеросклерозе, гиперхолестеринемии, диабетической ангиопатии [12].

Хотя главной причиной дисфункции эндотелия считается снижение продукции эндотелиального NO, ослабление эндотелийзависимой вазодилатации может иметь и другие объяснения. Так, ослабление NO-зависимых сосудистых реакций может быть связано, в числе прочих факторов, с усиленным окислением NO во время его синтеза или перемещения к гладкой мышце. Другой причиной сниженного ответа сосуда на эндогенный NO может быть избыточный синтез эндотелийзависимых вазоконстрикторов, таких, как простаноиды, которые высвобождаются вместе с NO и противодействуют его вазодилататорному эффекту. Наконец, реакция гладкой мышцы на эндотелийзависимые вазодилататоры или вазоконстрикторы может измениться на уровне гуанилатциклазы, цГМФ-зависимых протеинкиназ, ионных каналов или рецепторов. Выяснение точной причины вазомоторной дисфункции

важно для разработки новых методов лечения, специфичных для той или иной сердечно-сосудистой патологии, связанной с нарушениями эндотелийзависимых реакций и метаболизма NO [22].

При экспериментальной гипертензии впервые нарушение эндотелийзависимого расслабления сосудов продемонстрировали Konishi и Su в 1983 г. [31] Позже уменьшение эндотелийзависимого расслабления было обнаружено в сосудах животных при разных моделях гипертензии и людей, страдающих эссенциальной, реноваскулярной и другими формами гипертензии. Такое нарушение вносит вклад в увеличение тонуса сосудов и, в конечном счете, в поддержание повышенного АД [33].

Уже на ранних стадиях гипертензии наблюдается избыточная продукция макрофагами цитокинов, обусловленная генетическим нарушением функции иммунной системы или другими факторами, например самим же повышенным АД (рис. 4). Цитокины индуцируют синтез iNOS. Индукция iNOS на ранних стадиях гипертензии имеет компенсаторное значение, поскольку ограничивает подъем АД, но

в дальнейшем избыток NO подавляет активность eNOS и повреждает клетки сосудов. В результате происходит прогрессирующее снижение продукции эндотелиального NO и эндотелийзависимого расслабления сосудов, что играет большую роль в повышении АД. Повышенное АД, в свою очередь, нарушает эндотелийзависимую вазодилатацию и таким образом замыкает “порочный круг” [44, 57].

Большинство исследований функционального состояния эндотелия у человека проводилось на сосудах предплечья и коронарного бассейна по реакции эндотелийзависимого расслабления на ацетилхолин и брадикинин [11, 14]. Эндотелийзависимое расслабление оценивают также путем внутриаартериальной инфузии нитропрусида натрия, который служит источником NO. Базальный синтез NO оценивают путем введения предшественника NO L-аргинина или инфузии ингибиторов NOS. После этого вклад базального синтеза NO можно определить

по изменению кровотока и повышению сосудистого сопротивления. При этом применяется окклюзионная плетизмография [34]. В коронарном бассейне применяется локальная инфузия ацетилхолина с последующей регистрацией изменений диаметра коронарных сосудов с помощью коронароангиографии или внутрисосудистой ультрасонографии [20].

Исследования с ингибитором NOS и L-аргинином показали, что причиной снижения эндотелийзависимого расслабления сосудов может быть дефект NO-продуцирующей системы эндотелия, не связанный с дефицитом L-аргинина [11, 32]. При этом поток-зависимое расслабление сосудов предплечья, опосредованное высвобождением из эндотелия NO и, возможно, гиперполяризующего фактора, у больных с тяжелой эссенциальной гипертензией нарушено. При легкой гипертензии и у лиц с другими факторами риска атеросклероза эта реакция может быть сохранена [10].



Рис. 4. Развитие дисфункции эндотелия при гипертензии. СРО – свободнорадикальное окисление, ГМК – гладкомышечные клетки.

Механизмы, лежащие в основе дисфункции эндотелия при гипертензии, могут различаться в зависимости от наличия гиперхолестеринемии. Действительно, у больных с гиперхолестеринемией было обнаружено нарушение активации метаболического пути L-аргинина [34]. Эксперименты *in vitro* также показали, что экзогенный L-аргинин улучшает эндотелийзависимое расслабление, нарушенное окисленными липопротеидами низкой плотности. Это позволило сделать вывод об инактивации продукции NO из L-аргинина избытком супероксидрадикалов [40]. Кроме того, введение L-аргинина способно ограничить дисфункцию эндотелия в коронарной микроциркуляции больных с гиперхолестеринемией [19]. Существует предположение, что дисфункция эндотелия при гипертензии может быть связана и с нарушением сигнального пути фосфатидилинозитол/ Ca^{2+} [15].

В настоящее время обсуждается вопрос о первичности дисфункции эндотелия или повышения АД при гипертензии [33, 36]. Было показано, что у молодых спонтанно-гипертензивных крыс линии SHR на предгипертензивной и ранней гипертензивной стадии NO-зависимая вазодилатация сохраняется [45]. У людей с эссенциальной гипертензией некоторые исследователи вообще не обнаруживают нарушений эндотелийзависимого расслабления сосудов предплечья в ответ на ацетилхолин и карбахол [16]. Это говорит в пользу предположения о том, что дисфункция эндотелия является скорее следствием, чем причиной повышенного АД [36]. Тем не менее, клинические наблюдения свидетельствуют, что у детей родителей, больных эссенциальной гипертензией, синтез NO в сосудах и эндотелийзависимая реакция сосудов на ацетилхолин могут быть снижены задолго до начала повышения АД, и, следовательно, недостаточный синтез NO может быть причинным фактором развития гипертензии [49].

Дисфункция эндотелия описана при заболеваниях и факторах риска, способствующих развитию артериальной гипертензии, таких, как атеросклероз, гиперхолестеринемия, гипергомоцистеинемия, ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет, ожирение, почечная недостаточность, пожилой возраст, курение [54]. В настоящее время эндотелийзависимое расслабление сосудов часто предлагается использо-

вать в качестве маркера риска сердечно-сосудистых заболеваний [17].

В некоторых ситуациях при эффективном гипотензивном лечении дисфункция эндотелия может быть частично обратима. В эксперименте эндотелийзависимые реакции сосудов удавалось улучшить с помощью ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, антагонистов ангиотензина II и других антигипертензивных препаратов. При этом нормализация АД сопровождается ограничением экспрессии iNOS и частичным восстановлением активности eNOS [57]. У человека достичь подобного эффекта значительно труднее: нормализация АД чаще всего не приводит к улучшению функционального состояния эндотелия, хотя имеются сообщения о положительном действии длительно применявшихся ингибиторов АПФ и Ca^{2+} -антагонистов на эндотелийзависимую регуляцию кровотока [33].

Считается, что повреждение сосудов, опосредованное окислительным стрессом, может служить связующим звеном между гипертензией и атеросклерозом [14]. Возможность применения антиоксидантов для предупреждения и лечения сосудистых нарушений при гипертензии привлекает большое внимание врачей и патофизиологов. В ряде исследований было показано, что витамины-антиоксиданты, миметики супероксиддисмутазы (СОД) и СОД-содержащие липосомы могут ограничивать дисфункцию эндотелия и ремоделирование сосудов при экспериментальной гипертензии. Данные метаанализа подтвердили, что хроническое применение антиоксидантов улучшает функцию эндотелия проводящих артерий. Положительного влияния антиоксидантов на резистивные артерии при этом обнаружено не было [9]. Интересно, что некоторые положительные эффекты известных гипотензивных препаратов, таких как антагонисты рецепторов ангиотензина I и блокаторы кальциевых каналов, могут быть, по крайней мере частично, опосредованы ограничением окислительного стресса [51].

Для лечения и предупреждения патологических состояний, связанных с дефицитом эндотелиального NO, целесообразно попытаться компенсировать этот дефицит. В эксперименте и клинике это осуществляется с помощью доноров NO, т.е. лекарств, высвобождаю-

щих NO. К их числу относятся органические нитраты (нитроглицерин), нитриты (амилнитрит) и неорганические нитрозосоединения (нитропруссид натрия). Доноры NO применяются при стабильной и нестабильной стенокардии, инфаркте миокарда, застойной сердечной недостаточности [21]. Применение доноров NO основано главным образом на их вазодилататорных свойствах, поскольку они не ингибируют агрегацию и адгезию тромбоцитов. Однако имеется много данных об антиатерогенном действии этих препаратов [27].

В настоящее время активно изучается возможность фармакологической стимуляции синтеза NO. Например, ингибиторы АПФ, помимо блокирования образования ангиотензина II, предупреждают разрушение брадикинина, который стимулирует синтез NO [56]. Представляет интерес хроническая стимуляция синтеза эндотелиального NO прямыми активаторами, например бета-блокатором небивололом [46]. В экспериментах показано, что небиволол не только оказывает эффективное антигипертензивное действие, но и ограничивает дисфункцию эндотелия, развитие гипертрофии миокарда и ремоделирование сосудистого русла [1].

Другой подход к предупреждению и коррекции дисфункции эндотелия – это хроническая стимуляция продукции эндогенного NO нефармакологическими методами, которые имеют значительно меньше противопоказаний и побочных эффектов, чем фармакологические [4]. Такие методы особенно эффективны при легкой и умеренной артериальной гипертензии, а также в качестве вспомогательного средства в дополнение к лекарственной терапии.

К видам нефармакологической стимуляции синтеза NO, наиболее широко применяемым в эксперименте и клинике, относятся дозированная адаптация к умеренной физической нагрузке и к гипоксии. В основе стимулирующего действия адаптации к физической нагрузке на продукцию NO в эндотелии лежит увеличение напряжения сдвига. При непродолжительном (<1 мин.) увеличении напряжения сдвига происходит активация eNOS, а при длительном (от 1 мин. до 1 часа) – активация факторов транскрипции и синтеза eNOS [54]. Поскольку при гипертензии наблюдается не только снижение базального синтеза NO, но и ос-

лабление способности эндотелия реагировать высвобождением NO на напряжение сдвига (30), регулярная физическая тренировка оказывает выраженное гипотензивное действие и нормализует эндотелийзависимое расслабление сосудов [13, 50].

Другим физическим фактором, который модулирует продукцию NO в сосудах, является гипоксия. Как в эксперименте, так и в клинике было показано, что адаптация к гипоксии предупреждает развитие дисфункции эндотелия и снижает АД при артериальной гипертензии [3, 6].

В наших экспериментах мы использовали гипобарическую гипоксию, которая создавалась у крыс в барокамере при разрежении воздуха, соответствующем 4000 м над уровнем моря, на протяжении 40 дней по 5 часов в день. Продукцию NO оценивали спектрофотометрическим методом по суммарной концентрации в плазме стабильных метаболитов NO – нитритов и нитратов. Адаптация вызвала постепенное увеличение концентрации этих соединений, причем к концу полного курса адаптации она увеличилась почти в два раза по сравнению с контролем [38].

Защитный эффект 8-дневной адаптации к гипоксии проявлялся в достоверном увеличении продолжительности жизни крыс в условиях острой, тяжелой гипоксии в барокамере на симулированной высоте 11000 м над уровнем моря (рис. 5). Ингибитор NO-синтазы L-NNA сам по себе снижал устойчивость крыс к острой гипоксии и отменял защитный эффект адаптации. Данные, полученные в этом эксперименте, подтверждают роль адаптивного увеличения продукции NO в защитных эффектах адаптации к гипоксии [37].

Очевидно, что адаптирующийся организм, в котором продукция NO прогрессивно нарастает, должен обладать возможностью «детоксикации» его избытка путем связывания. Действительно, в процессе адаптации к гипоксии происходило формирование и увеличение депо NO. Величина депо NO в процессе адаптации достоверно положительно коррелировала с концентрацией нитритов и нитратов в плазме [38].

На рисунке 7 представлены возможные механизмы усиления синтеза и депонирования

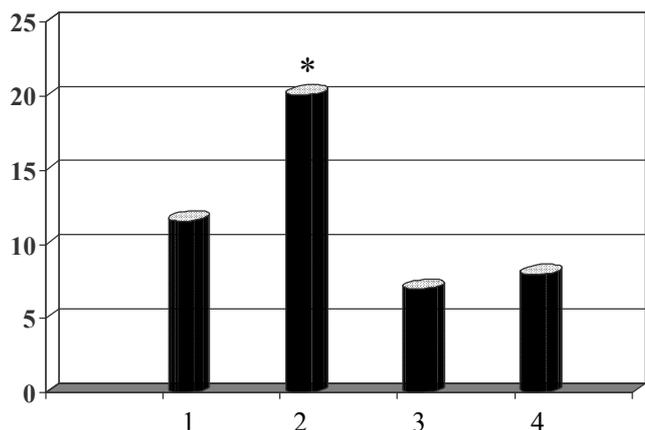


Рис. 5. Роль NO в повышении устойчивости крыс к острой гипоксии. Диаграммы отражают время выживания крыс в минутах на симулированной высоте 11000 м. 1 – контроль, 2 – адаптация к гипоксии, 3 – L-NNA, 4 – адаптация + L-NNA. *Достоверные отличия от контроля, $p < 0,05$.

NO при адаптации к гипоксии. Периодические кратковременные гипоксические воздействия умеренной интенсивности сопровождаются повышением внутриклеточного Ca^{2+} , который активирует эндотелиальную NO-синтазу [26]. Каждый сеанс гипоксии завершается возвратом

к нормальному поступлению кислорода, т.е. реоксигенацией. Эта реоксигенация приводит к некоторой активации свободнорадикальных процессов. Свободные радикалы активируют так называемый hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) – фактор-регулятор транскрипции ряда генов, в том числе генов NOS. HIF-1 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух компонентов – HIF-1a и HIF-1b [47]. Экспрессия HIF-1a дозозависимо возрастает при снижении концентрации O_2 ниже 20%, а HIF-1b экспрессируется конститутивно. Распад HIF-1 происходит менее, чем через 1 минуту после реоксигенации [58]. Считается, что именно HIF-1 за счет такой быстрой динамики обеспечивает адаптацию к периодической гипоксии на уровне транскрипции генов, которая лежит в основе гипоксического стимулирования не только синтеза NO, но и эритропоэза, ангиогенеза и гликолиза [43]. Благодаря активации HIF-1, по мере формирования адаптации в стенках сосудов нарастает экспрессия гена NO-синтазы, что делает адаптацию более надежной и долговременной.

Образование депо NO в форме ДНКЖ при адаптации к гипоксии, по-видимому, стимули-

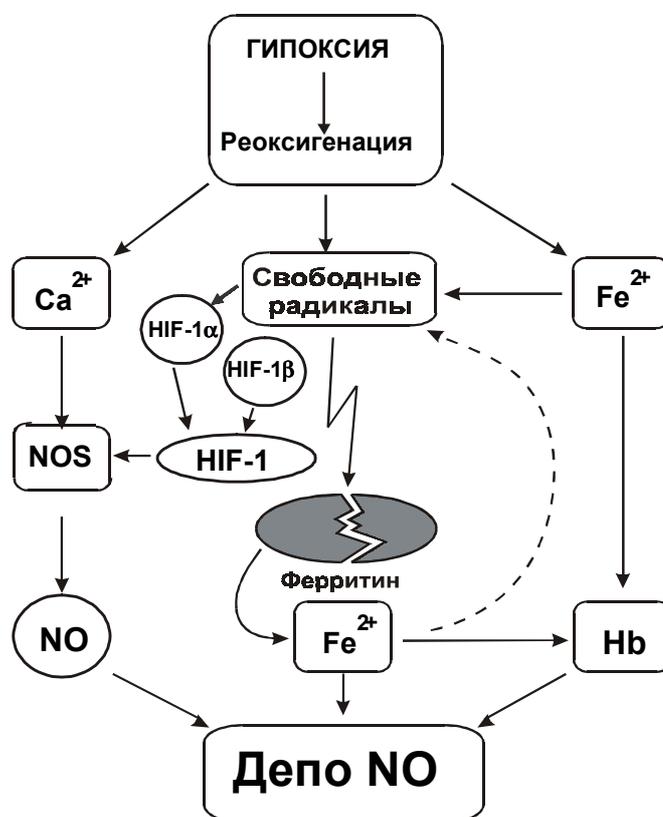


Рис. 6. Возможные механизмы усиления синтеза и депонирования NO при адаптации к гипоксии. СРО - свободнорадикальное окисление, NOS - NO-синтаза, Hb – гемоглобин, HIF – hypoxia inducible factor.

руется железом, которое поступает в организм при гипоксии [48], а при постгипоксической реоксигенации также высвобождается из железосодержащего белка ферритина под действием супероксиданиона [35]. Гемоглобин, синтез которого повышается при адаптации к гипоксии, также может связывать NO своим гемом и тиоловыми группами, образуя дополнительное депо NO [29].

Уровень продукции NO предопределен генетически. Существует наследственно обусловленное снижение продукции эндотелиального NO, например, у спонтанно-гипертензивных крыс линий SHR и SHRSP [57]. Имеются также линии животных с повышенной продукцией

цией NO, например крысы Август [7]. Мы изучили соотношение между продукцией и депонированием NO у крыс SHRSP в условиях стимулирования синтеза NO с помощью адаптации к гипоксии.

Адаптация к гипоксии крыс SHRSP и их генетического нормотензивного контроля – крыс Вистар-Киото (WKY) достоверно увеличивала продукцию NO, которую определяли по экскреции с мочой нитритов и нитратов (рис. 7). Адаптация к гипоксии снижала артериальное давление (АД) и существенно ограничивала дисфункцию эндотелия у спонтанно-гипертензивных крыс, однако у WKY АД при адаптации практически не изменялось [6].

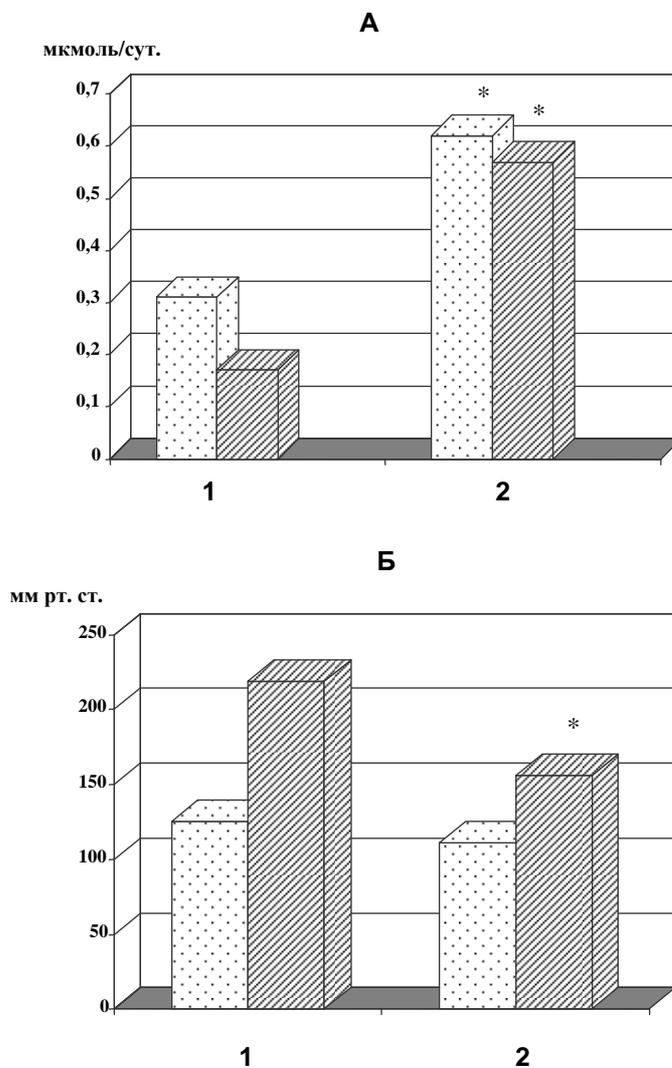


Рис. 7. Влияние адаптации к гипоксии на суммарную суточную экскрецию с мочой нитратов и нитритов в мкмоль/сут. (А) и артериальное давление в мм рт. ст. (Б) у спонтанно-гипертензивных (SHRSP) и нормотензивных крыс (WKY). 1 – неадаптированные крысы, 2 – адаптированные крысы. *Достоверные отличия от неадаптированных животных, $p < 0,05$.

В процессе адаптации к гипоксии в стенке аорты у крыс обеих линий формировалось депо NO, причем величина этого депо была значительно больше у WKY, чем у SHRSP (рис. 8). Потенциальная емкость депо NO определялась как максимальный объем депо, образовавшегося при инкубации изолированной аорты с избытком донора NO. Этот показатель, который характеризует способность сосудов к депонированию NO, у SHRSP был достоверно ниже, чем у WKY.

В обобщенном виде связь между уровнем NO, депонированием NO и АД для нормотензивных и спонтанно-гипертензивных крыс может быть представлена следующим образом. При повышении уровня NO в организме часть избытка

NO связывается в депо, а несвязанная часть NO проявляет свое биологическое действие, вызывая снижение АД. При высокой эффективности депонирования количество связанного NO, т.е. объем депо оказывается большим, а снижение АД незначительным. Эта ситуация имеет место у WKY. Напротив, при низкой эффективности депонирования остается много свободного NO, который оказывает более выраженное гипотензивное действие, что и наблюдалось у SHRSP. По-видимому, этим объясняется тот факт, что у WKY, в отличие от SHRSP, при адаптации к гипоксии, несмотря на усиление продукции NO, не происходит снижения АД.

В настоящее время участие нарушения генерации NO в развитии дисфункции эндотелия

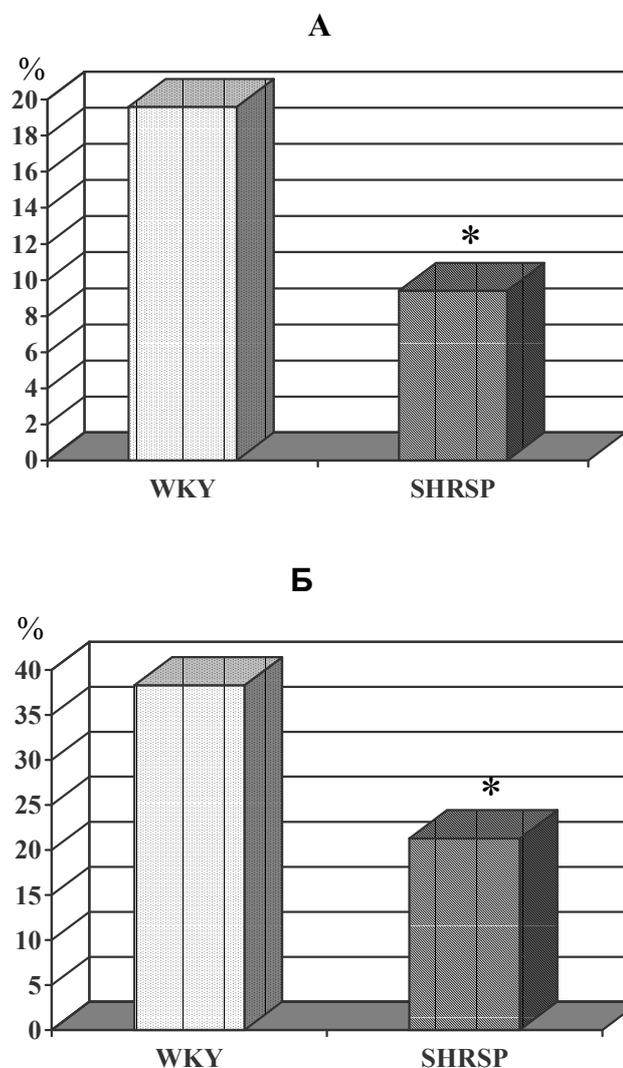


Рис. 8. Особенности депонирования NO у спонтанно-гипертензивных (SHRSP) и нормотензивных (WKY) крыс. А – объем депо NO, сформировавшегося в стенке аорты при адаптации к гипоксии. Б – потенциальная емкость депо NO. Объем депо NO выражен как расслабление сосуда под действием ДЭТК в % от величины сокращения, вызванного норадреналином. *Достоверные отличия от WKY, p<0,05.

и артериальной гипертензии может считаться доказанным. Однако механизм дисфункции эндотелия может различаться у разных больных и зависит от происхождения гипертензии. Поэтому до сих пор остается нерешенным ключевой вопрос: является ли снижение продукции и биодоступности эндотелиального NO причиной или следствием повышения АД? Ответ на этот вопрос позволит определить, насколько эффективной будет нормализация синтеза NO для снижения АД и, следовательно, разработать новые подходы к лечению и предупреждению гипертонической болезни.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 00-04-48485 и 00-04-48808) и Московского комитета по науке и технологии (грант 1.1.94).

Литература

1. Бувальцев В.И., Машина С.Ю., Покидышев Д.А., Смирин Б.В., Байда Л.А., Малышев И.Ю., Манухина Е.Б. Роль коррекции синтеза оксида азота в профилактике гипертонического ремоделирования сердечно-сосудистой системы // Росс. кардиол. журнал. - 2002. - № 5. - С. 36-43.
2. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы - две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах // Биохимия. - 1998. - № 7. - С.924-938.
3. Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б. Нарушение продукции NO у мужчин молодого возраста с артериальной гипертензией и немедикаментозный метод ее коррекции // Кардиология. - 2001. - № 9. - С.17-21.
4. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю., Архипенко Ю.В. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите // Вестник РАМН. - 2000. - № 4. - С.16-21.
5. Манухина Е.Б., Смирин Б.В., Малышев И.Ю., Стокле Ж.-К., Мюллер Б., Солодков А.П., Шебеко В.И., Ванин А.Ф. Депонирование оксида азота в сердечно-сосудистой системе // Известия РАН. Серия Биологическая. - 2002. - № 5. - С.595-606.
6. Машина С.Ю., Смирин Б.В., Малышев И.Ю., Лямина Н.П., Сенчихин В.Н., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б. Коррекция NO-зависимых сердечно-сосудистых нарушений с помощью адаптации к гипоксии // Российский физиол. журнал им. И.М. Сеченова. - 2001. - Т.87, № 1. - С.110-117.
7. Микоян В.Д., Кубрина Л.Н., Манухина Е.Б., Малышева Е.В., Малышев И.Ю., Ванин А.Ф. Различия в стимуляции синтеза NO при тепловом шоке у крыс генетически различных популяций // Бюлл. экспер. биол. и мед. - 1996. - Т.121, № 6. - С. 634-637.
8. Смирин Б.В., Ванин А.Ф., Малышев И.Ю., Покидышев Д.А., Манухина Е.Б. Депонирование оксида азота в кровеносных сосудах in vivo // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. - 1999. - № 6. - С.629-632.
9. Aminbakhsh A., Mancini G.B.J. Chronic antioxidant use and changes in endothelial dysfunction: a review of clinical investigations // Can. J. Cardiol. 1999. - V.15. - P. 895-903.
10. Anderson W.D., Klein J.L., Manoukian S.V. Coronary flow-mediated dilation is preserved in hypertensive patients. J. Am. Col. Cardiol. 1994. - V.23. - 107A.
11. Antony I., Lerebours G., Nitemberg A. Loss of flow-dependent coronary artery dilatation in patients with hypertension. Circulation 1995. - V. 91. -P.1624-1628.
12. Arnal J.-F., Dinh-Xuan A.-T., Pueyo M., Darblade B., Rami J. Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology. Cell. Mol. Life 1999. - V.55. -P.1078-1087.
13. Bode Boger S.M., Boger R.H., Schroder E.P., Frolich J.C. Exercise increases systemic nitric oxide production in men. J. Cardiovasc. Risk 1994. - V.1. - P.173-178.
14. Cai H., Harrison D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ. Res. 2000. - V.87. - P. 840-844.
15. Cardillo C., Kilcoyne C.M., Cannon R.O. III, Quyyumi A.A., Panza J.A. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not hypertensive patients. Hypertension 1997. - V.30. - P.57-63.
16. Cockcroft J.E.R., Chowienczyk P.J., Benjamin N., Ritter J.M. Preserved endothelium-dependent vasodilatation in patients with essential hypertension. N. Engl. J. Med. 1994. - V.330. - P.1036-1040.
17. Cohn J.N. Vascular wall function as a risk marker for cardiovascular disease. J. Hypertens. 1999. - V.17, Suppl 5. - S41-S44.
18. Darley-Usmar V., Halliwell B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. Pharm. Res. 1996. - V.13. - P.649-662.
19. Drexler H., Zeiher A.M., Meinzer K., Just H. Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolemic patients by L-arginine. Lancet 1991. - V.338. - P.1546-1550.
20. Egashira K., Suzuki S., Hirooka Y. et al. Impaired endothelium-dependent vasodilation of large epicardial and resistance coronary arteries in patients with essential hypertension. Hypertension 1995. - V.25. - P.201-206.
21. Feelisch M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. Naunyn Schmied. Arch. Pharmacol. 1998. - V.358. -P.113-122.
22. Feliciano L., Henning R.J. Coronary artery blood flow: physiologic and pathophysiologic regulation. Clin. Cardiol. 1999. - V. 22. - P.775-786.
23. Flitney F.W., Megson I.L., Flitney D.E., Butler A.R. Iron-sulphur cluster nitrosyls, a novel class of nitric oxide generator: mechanism of vasodilator action on rat isolated tail artery. Br. J. Pharmacol. 1992. - V.107. - P.842-848.
24. Förstermann U., Bissel J.-P., Kleinert H. Expressional

- control of the «constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 1998. - V.12. - P.773-790.
25. Forte P., Copland M., Smith L.M., Milne E., Sutherland J., Benjamin N. Basal nitric oxide synthesis in essential hypertension. *Lancet* 1997. - V. 349. - P.837-842.
26. Hampl V., Herget J. Role of nitric oxide in the pathogenesis of chronic pulmonary hypertension. *Physiol. Rev.* 2000. - V.80. - P.1337-1372.
27. Ikeda U., Maeda Y., Shimada K. Inducible nitric oxide synthase and atherosclerosis. *Clin. Cardiol.* 1998. - V.21. - P.473-476.
28. Jeremy J.Y., Rowe D., Emsley A.M., Newby A.C. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.* 1999. - V. 43. - P.580-594.
29. Jia L., Bonaventura J., Stamler J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 1996. - V.380. - P.221-226.
30. Klahr S. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001. - V.16 (Suppl 1). - P.60-62.
31. Konishi M., Su C. Role of endothelium in dilator responses of spontaneously hypertensive rat arteries. *Hypertension* 1983. - V. 5. - P. 881-886.
32. Li H, Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J. Pathol.* 2000. - V.90. - P.244-254.
33. Lind L., Granstam S.-O., Millgard J. Endothelium-dependent vasodilation in hypertension: a review. *Blood Pressure* 2000. - V.9. - P. 4-15.
34. Lind L., Sarabi M., Millgard J. Methodological aspects of the evaluation of endothelium-dependent vasodilatation in the human forearm. *Clin. Physiol.* 1998.-V.18.-P.81-87.
35. Lipinski P., Drapier J.-C. Interplay between ferritin metabolism, reactive oxygen species and nitric oxide. *JBIC.* 1997. - V. 2. - P. 559-566.
36. Luscher T.F. The endothelium in hypertension: bystander, target or mediator? *J. Hypertens.* 1994. - V.12(Suppl 10). - S105-S116.
37. Malyshev I.Yu., Zenina T.A., Golubeva L.Yu., Saltykova V.A., Manukhina E.B., Mikoyan V.D., Kubrina L.N., Vanin A.F. NO-dependent mechanisms of adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide* 1999. - V. 3. - P. 105-113.
38. Manukhina E.B., Malyshev I.Yu., Smirin B.V., Mashina S.Yu., Saltykova V.A., Vanin A.F. Production and storage of nitric oxide in adaptation to hypoxia. *Nitric Oxide.* 1999. - V.3. - P.393-401.
39. Megson I.L., Holme S.A., Magid K.S. Selective modifiers of glutathione biosynthesis and «repriming» of vascular smooth muscle photorelaxation. *Br. J. Pharmacol.* 2000. - V.130. - P.1575-1580.
40. Minor R.I., Myers P.R., Guerra R. Jr., Bates J.N., Harrison D.G. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. *J. Clin. Invest.* 1990. -V.86. - P.2109-2116.
41. Moshage H., Kok B., Huzenga R., Jansen P. Nitrite and nitrate determination in plasma: A critical evaluation. *Clin. Chem.* 1995. - V.41. - P.892-896.
42. Muller B., Kleschyov A.L., Stoclet J.-C. Evidence for N-acetylcysteine-sensitive nitric oxide storage as dinitrosyl iron complexes in lipopolysaccharide-treated rat aorta. *Brit. J. Pharmacol.* 1996. - V.119. - P.1281-1285.
43. Neubauer J.A. Physiological and pathophysiological responses to intermittent hypoxia. *J. Appl. Physiol.* 2001.- V.90. - P.1593-1599.
44. Puddu P., Puddu G.M., Zaca F., Muscari A. Endothelial dysfunction in hypertension. *Acta Cardiol.* 2000. - V.55. - P.221-232.
45. Radaelli A., Mircoli L., Mori I., Mancina G., Ferrari A.U. Nitric oxide-dependent vasodilation in young spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1998. - V. 32. - P. 735-739.
46. Ritter J.M. Nebivolol: endothelium-mediated vasodilating effect. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2001. - V.38 (Suppl.3). - S13-S16.
47. Semenza G.L. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001. - V.13.- P.167-171.
48. Simpson R.J. Effect of hypoxia on iron absorption in heterozygous hypotransferrinaemic mice. *Ann. Hematol.* 1992.- V.65. - P.260-264.
49. Taddei S., Virdis A., Mattei P., Natali A., Ferrannini E., Salvetti A., Effect of insulin on acetylcholine-induced vasodilation in normotensive subjects and patients with essential hypertension. *Circulation* .1995. - V. 92. - P.2911-2918.
50. Tanaka H., Bassett D.R., Howley E.T., Thompson D.L., Ashraf M., Rawson F.L. Swimming training lowers the resting blood pressure in individuals with hypertension. *J. Hypertens.* 1997. - V.15. - P.651-657.
51. Touyz R.M. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Hypertens. Rep.* 2000.-V.2.-P.98-105.
52. Vallance P. Nitric oxide in the human cardiovascular system – SKB lecture. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998.- V.45. - P.433-439.
53. Vanin A.F., Kleschyov A.L. EPR detection and biological implication of nitrosyl non-heme iron complexes. *Nitric Oxide in Transplant Rejection and Anti-Tumor Defense.* Eds. Lukiewicz S.J., Zweier J.L. Kluwer Academic Publ., Norwell, MA, 1998. - P. 49-82.
54. Vapaatalo H., Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function. *Med. Sci. Monit.* 2001.- V.7. - P.1075-1085.
55. Wever R.M.F., Luscher T.F., Consentino F., Rabelink T.J. Atherosclerosis and the twofaces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* .1998. - V.97.- P.108-112.
56. White M. Cardioprotective effect of angiotensin II receptor antagonists. *Can. J. Cardiol.* 1999. - V.15 (Suppl. F).- 10F-14F.
57. Wu C.-C., Yen M.-H. Nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Biomed. Sci.* 1997. - V.4.- P.249-255.
58. Yu A.Y., Frid M.G., Shimoda L.A., Wiener C.M., Stenmark K., Semenza G.L. Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung. *Am. J. Physiol.* 1998.- V. 275. - L818-L826.