

СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

Бахтияров Р.З.

Оренбургская государственная медицинская академия

Впервые о самостоятельной роли сосудистого эндотелия в регуляции сосудистого тонуса было заявлено в статье Furchgott и Zawadzki, опубликованной в журнале «Nature» в 1980 г. [12]. Авторы обнаружили способность изолированной артерии к самостоятельному изменению своего мышечного тонуса в ответ на ацетилхолин без участия центральных (нейрогуморальных) механизмов. Главная заслуга в этом отводилась эндотелиальным клеткам, которые были охарактеризованы авторами как «сердечно-сосудистый эндокринный орган, осуществляющий связь в критических ситуациях между кровью и тканями» [12].

Сегодня выделяют следующие функции сосудистого эндотелия [1]:

1. Высвобождение вазоактивных агентов: оксида азота (NO), эндотелина, ангиотензина 1 (и, возможно, ангиотензина II), простациклина, тромбосана.

2. Препятствие гемокоагуляции и участие в фибринолизе за счет тромборезистентной поверхности эндотелия (одинаковый заряд поверхности эндотелия и тромбоцитов препятствует «прилипанию» — адгезии — тромбоцитов к стенке сосуда), образование простациклина и NO — естественных дезагрегантов, образование тканевого активатора плазминогена, экспрессия на поверхности клеток эндотелия тромбомодулина — белка, способного связывать тромбин, и гепариноподобных гликозаминогликанов.

3. Иммунные функции: секреция интерлейкина-I (стимулятора Т-лимфоцитов)

4. Ферментативная активность: экспрессия на поверхности эндотелиальных клеток ангиотензинпревращающего фермента (АПФ).

5. Участие в регуляции роста гладкомышечных клеток: секреция эндотелиального фактора роста, секреция гепариноподобных ингибиторов роста.

6. Защита гладкомышечных клеток от вазоконстрикторных влияний: важность сохранения целостности эндотелия для ряда вазодилатирующих стимулов, например, ацетилхолина.

Эндотелиальные клетки, выполняя разнообразные функции, представляют конечное звено нейрогенной и гуморальной регуляции сосудистого тонуса, формирующего гемодинамические реакции [4, 27].

Сформировалось представление о дисфункции эндотелия (ДЭ), под которой понимают дисбаланс между факторами, обеспечивающими все эти процессы [3].

В последние годы довольно четко сформулирована концепция общего сосудистого риска, которая рассматривает атеросклероз с точки зрения прогностического значения процессов, происходящих в сосу-

дистой стенке [31]. Большинство основных осложнений атеросклероза — таких, как нестабильная стенокардия, инфаркт миокарда, внезапная смерть, мозговой инсульт, являются тромботическими [11]. Огромное значение в процессе атеротромбоза придается роли факторов риска атеросклероза, неблагоприятное воздействие которых во многом реализуется через нарушение функции сосудистого эндотелия и его взаимодействий с кровотоком [32]. В связи с этим, ряд авторов предлагает использовать показатели функции эндотелия в качестве маркеров ранних атеросклеротических изменений артерий и для определения риска тромботических осложнений атеросклероза [7, 20, 25, 26]. Эндотелиоциты могут вовлекаться и в инфекционные процессы [2, 6].

Отсюда ясна актуальность вопроса о методиках, позволяющих качественно и количественно оценить дисфункцию эндотелия, что позволило бы разработать пути ее коррекции.

Прогрессирование атеросклероза сосудов может быть оценено неинвазивным методом — при помощи ультразвукового сканирования определяется толщина интимы — медики средних сегментов общих сонных артерий. Результаты интерпретируют следующим образом: толщина менее 0,1 мм — отсутствие атеросклеротических изменений; 1,0-1,3 мм — локальное утолщение интимы; >1,3 мм — атеросклеротическая бляшка [34]. Оценку можно проводить до и после лечения.

Исследование эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса основано на измерении диаметра сосуда (с помощью ультразвуковых методик) и периферического сосудистого сопротивления (оклюзионная плетизмография).

Принцип методик клинической оценки сосудодвигательной функции эндотелия можно представить как измерение действия эндотелий-зависимого стимула (фармакологического или механического) на диаметр сосуда и/или кровотока по нему. Из фармакологических стимулов обычно используют ацетилхолин, из механических — временную окклюзию сосуда с измерением реакции крупного сосуда на реактивную гиперемия. Действие стимулов изучается во время прямой ангиографической (чаще всего коронарной) и ультразвуковой визуализации. Кровоток измеряют доплерографически, в том числе внутрисосудистыми датчиками [3].

Проба с ацетилхолином при коронарографии [3]. После катетеризации коронарных артерий и оценки исходных ангиограмм интраартериально вводится раствор ацетилхолина в последовательно нарастающих дозах (до создания локальных концентраций от 10⁻⁹ до 10⁻⁶

моль/л) со скоростью 0,8-1,0 мл/мин [14, 33]. Применение таких концентраций ацетилхолина при коронарографии показало отсутствие побочных действий, связанных с активацией периферической нервной системы – например, значимого изменения ЧСС и, в связи с этим, изменения кровотока [19]. После введения каждой дозы измеряется диаметр сосуда в выбранных, согласно цели исследования, сегментах и определенных проекциях [14, 33]. При одном из вариантов пробы скорость и объем кровотока в коронарных артериях исследуют доплеровским датчиком, расположенным на кончике интракоронарного катетера [22]. Он может выявить также начальные признаки атеросклероза в виде утолщения интимы еще до появления ангиографически значимых сужений. Интерес представляют возможности оценки функции эндотелия при увеличении кровотока: провокации психоэмоционального стресса [33], быстрой предсердной стимуляции [23] или введения папаверина, либо ацетилхолина дистальнее исследуемого сегмента [22]. Изменение диаметра сосуда в ответ на увеличение кровотока – это реакция на нагрузку или стресс.

Исследование функции эндотелия коронарных артерий может быть показано при выявлении минимальных поражений и отсутствии ангиографических признаков атеросклероза. В этих случаях выявление парадоксальной реакции на ацетилхолин может объяснить существующую клиническую картину. Особенно важными могут оказаться результаты у лиц с факторами риска ИБС. Коронароангиографическое исследование – дорогостоящий и не всегда доступный метод, который не подходит для наблюдения за изменениями функции эндотелия под влиянием проводимого лечения. Поэтому все большее распространение получают неинвазивные методы.

Известно, что при изменениях скорости кровотока изменяется просвет крупных артерий: артерии расширяются при увеличении кровотока и сужаются при его уменьшении. Эта регуляция диаметра артериальных сосудов чисто локальна и не определяется ни нервными, ни гуморальными влияниями на тонус гладких мышц. Чувствительность артерий к скорости течения крови объясняют способностью эндотелиальных клеток воспринимать действующее на них со стороны текущей крови напряжение сдвига, которое вызывает сдвиговую деформацию эндотелиальных клеток. Эту деформацию воспринимают чувствительные к растяжению ионные каналы эндотелия, что ведет к увеличению содержания кальция в цитоплазме и выделению NO. При атеросклерозе сосудов и факторах его риска происходит снижение деформируемости эндотелиальных клеток, эффективности действия ионных каналов, притупляется механочувствительность эндотелиальных клеток.

Изложенные механизмы стимуляции эндотелий-зависимой вазодилатации легли в основу метода, раз-

работанного в 1992 году D.S. Celermajer и коллегами [10], применяемого в клинических исследованиях для оценки вазодилатирующей функции эндотелия, когда с помощью ультразвука высокого разрешения (линейный датчик 7-8 МГц) определяется изменение диаметра артерии (чаще плечевой) при механической его стимуляции повышенным кровотоком. Изображение оценивается в одно- и двухмерном режимах. При этом получаемые данные сопоставляют с эндотелий-независимой вазодилатацией после сублингвального приема нитроглицерина (контроль). При измерении реакций сосудистого тонуса необходимо проводить контрольные пробы с эндотелий-независимыми вазодилататорами, к которым относятся экзогенные нитраты (нитроглицерин, нитросорбид, которые являются аналогами фактора релаксации эндотелия. Действуя непосредственно на гладкие мышцы сосудов, они во всех случаях вызывают расширение артерий. Сосудистая реакция рассматривается как патологическая в случаях, когда эндотелий-зависимая вазодилатация составляет менее 10% от исходного диаметра сосуда, а также в случаях, когда наблюдается вазоконстрикция.

Метод удобен для повторных исследований динамики эндотелиальной дисфункции, а также для раннего выявления нарушенной функции эндотелия у лиц с факторами риска атеросклероза, еще до появления клинических признаков заболевания.

Применение неинвазивных методов возможно практически у всех пациентов как с доказанным атеросклерозом, так и лишь с его факторами риска. Данные, полученные в результате обследования, могут отражать распространенность процесса и даже, возможно, в какой-то степени позволяют косвенно судить о состоянии эндотелия коронарных сосудов. Кроме того, есть основания полагать, что степень дисфункции эндотелия будет учитываться при подборе адекватной терапии и контролироваться во время лечения.

Обнаружилось, что большинство веществ, влияющих на тонус сосудов, на самом деле вызывает выделение NO из эндотелия, который, в свою очередь, и расслабляет гладкую мускулатуру. В том случае, когда указанные вещества попадают непосредственно на гладкомышечную клетку, их действие может быть прямо противоположным, т.е. вызывать вазоконстрикцию. Оксид азота не только вызывает релаксацию гладкой мускулатуры сосуда, но и угнетает адгезию и агрегацию тромбоцитов и макрофагальную активность. L-NG-monomethyl-L-arginine (L-NMMA), антагонист NO-синтазы, применяется при исследовании реакций сосудистого тонуса с целью верификации эффектов эндотелиального NO. Введение этого вещества вызывает снижение кровотока и уменьшение диаметра артерии, тормозит дилатацию сосудов в ответ на стимулы, действующие через эндотелий [28]. Для дополнительной оценки функции эндотелия (образование и высво-

бождение NO) проводят измерение кровотока на фоне инфузии последовательно увеличивающихся концентраций L-NMMA [28].

Метод Грисса. Снижение синтеза NO играет ключевую роль в развитии эндотелиальной дисфункции. Поскольку молекула NO химически нестабильна и имеет короткий период жизни, прибегают к определению стабильных метаболитов NO в плазме или моче: нитрита (NO₂) — с помощью реактива Грисса [15], определение нитратов реактивом Грисса возможно после восстановления нитратов до нитритов.

Кровь для исследования берется натощак. За 3 дня до исследования пациенту назначается диета, исключающая продукты, содержащая большое количество экзогенных нитратов (копченые продукты, колбасные изделия, овощи, продукты, содержащие консерванты). Исследуемая моча смешивается с реактивом Грисса, инкубируется при комнатной температуре в течение 10 мин для получения окрашивания, спектрофотометрически исследуется интенсивность поглощения.

Реакция Грисса постепенно развилась в метод Грисса, позволяющий определять нитрит-ионы количественно. Это основано на спектрофотометрии образующегося красителя в видимой и ультрафиолетовой части спектра, так как образующийся азокраситель имеет оптическую плотность, пропорциональную концентрации нитрит-ионов.

Метод является косвенным, а изучение одних метаболитов оксида азота вряд ли позволит получить ценную информацию о состоянии нитрат-продуцирующих систем. Поэтому, при невозможности одновременного изучения активности NO-синтаз, наиболее реальным способом оценки состояния эндотелия в клинике является исследование эндотелий-зависимой дилатации плечевой артерии — проба с реактивной гиперемией.

Исследователи из клиники Johns Hopkins Hospital (Балтимор) [16] определяли содержание NO в выдыхаемом воздухе и выявили его увеличение у больных с хронической сердечной недостаточностью. Авторы предлагают использовать данный показатель как маркер эндотелиальной дисфункции. В аппаратуре для подобных исследований используется лазерный анализатор.

Оксид азота образуется под действием фермента NO — синтазы (NOS) путем окисления терминального атома азота гуанидина в L-аргинине под каталитическим влиянием Ca/кальмодулина-зависимой изоформы фермента NO- синтазы [24,9]. NO- синтаза существует в виде трех основных изоформ, которые получили свое название по типу клеток, в которых они были впервые обнаружены. Эти изоформы очищены, клонированы и охарактеризованы на молекулярном уровне: нейрональная NO-синтаза (nNOS), эндотелиальная NO-синтаза (eNOS) и NO-синтаза макрофагов или индуцибельная NO-синтаза (iNOS) [21]. Нейрональная и эндотелиальная NO-синтазы являются ферментами

со стабильной активностью (т.е. стационарными, конститутивными), в то время как активность макрофагальной или индуцибельной NO-синтазы в большей степени регулируется цитокинами. Эндотелиальная NO-синтаза стабильно экспрессируется в эндотелиальных клетках, помимо этого, она была обнаружена в клетках эпителия почечных канальцев, в пирамидных клетках гиппокампа и в других клетках [8,17,18]. Метод определения NO-синтазной активности связан с использованием моноклональных антител к эндотелиальной и индуцибельной пулам, соответственно (авидин — биотин — пероксидазный метод) [13].

Манжеточная проба [5] может быть использована для определения антиагрегационной активности эндотелия. Кровь собирается в 3,8%-й цитрат натрия (соотношение кровь-антикоагулянт 9:1) до наложения манжеты. Далее на плечо испытуемого накладывается манжета сфигмоманометра, в которой создается давление, превышающее систолическое АД на 10 мм рт.ст. Подобная локальная ишемия ведет к освобождению из эндотелия сосудов в кровь простациклина и других естественных антиагрегантов [5]. После наложения манжеты кровь берется вновь. В обоих образцах измеряется АДФ-индуцированная агрегация тромбоцитов. Подсчитывается индекс — отношение максимальной степени агрегации тромбоцитов до и после окклюзии сосудов плеча.

Эндотелины являются мощными сосудосуживающими веществами. Их семейство состоит, по крайней мере, из трех сходных по структуре пептидов — эндотелина-1, эндотелина-2 и эндотелина-3, при этом только первый тип синтезируется эндотелиальными клетками. В физиологических концентрациях он действует на эндотелиальные рецепторы, вызывая высвобождение факторов релаксации, а в более высоких активизирует рецепторы на гладкомышечных клетках, стимулируя стойкую вазоконстрикцию [29, 30]. Кроме указанного действия, эндотелин обладает выраженной митогенной активностью в отношении клеток эндотелия и гладкомышечных клеток. Из многих других эффектов эндотелина следует отметить его способность вызывать экспрессию, так называемых, адгезивных молекул. Определение содержания эндотелина-1 в плазме проводится при помощи радиоиммунологического (набор реактивов RIC-6901, DRG, США) и иммуноферментного (Endothelin-1 ELISA System, Pharmacia Biotech, Англия) методов.

В настоящее время актуальна проблема дальнейшей стандартизации методик, внедрения рутинного использования некоторых из них, в первую очередь — неинвазивных — в клинике для выявления ранних, доклинических признаков эндотелиальной дисфункции, а также разработки методов целенаправленной коррекции эндотелиальной дисфункции, контроля адекватности проводимого лечения.

Литература

- Беленков Ю.Н., Мареев В.Ю., Агеев Ф.Т. Ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента в лечении сердечно-сосудистых заболеваний (Квинаприл и эндотелиальная функция) // Издательство «ИНСАЙТ», Москва, 2002; 21-22.
- Гогин Е.Е., Груздев А.К., Лазарев И.А. и др. Варианты нестабильной стенокардии в свете современных представлений о механизмах повреждения эндотелия // Тер. арх. 1999; 4: 21 - 28.
- Затейщикова А.А., Затейщиков Д.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение // Кардиология. 1998; 9: 68-80.
- Патарая С.А., Преображенский Д.В., Сидоренко Б.А. и др. Биохимия и физиология семейства эндотелинов // Кардиология. - 2000. - №6. - 78-85.
- Соколов Е.И., Балуда В.П., Балуда М.В. и др. Противотромбогенные свойства стенки сосудов и внутрисосудистая активация тромбоцитов при ишемической болезни сердца // Кардиология. 1986; 12: 44-48.
- Яковлев В.М., Новиков А.И., Кондратьев А.И. и др. Роль регуляторной и гемостазиологической функции эндотелия в формировании сифилитических васкулитов // Материалы V Всероссийской конференции «Тромбозы, геморрагии, ДВС-синдром. Проблемы лечения». М 2000; 180-181.
- Biegelsen E.S., Loscalzo J. Endothelial function and atherosclerosis // Coron. Artery. Dis., 1999. Vol.10, N.4. - 241-256.
- Boulanger CM. Endothelial NO synthase // C R Scieances Soc Biol Fil 1995; 189(6):1069-79.
- Bredt D.S., Snyder S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-reguiring enzyme // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 1990. - Vol. 87, № 2. - 682-685.
- Ceolamajer D.S., Sorensen K.E., Gooch V.M. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis // Lancet. 1992; 340: 1111-1115.
- Chesebro J.H., Zoldhelyi P., Fuster V. Plaque disruption and thrombosis in unstable angina pectoris // Am. J. Cardiol., 1991. Vol.68, N.12 (Suppl.). - 9-15.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of the endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine // Nature. 1980; 288: 373-6.
- Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension // N. Engl. J. Med. 1995; 333:214-221.
- Giligan D.M., Quyyumi A.A., Cannon-3rd R.O. et al. Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women // Circulation. 1994; 89:2545-2551.
- Green L.C., David A.V., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids // Ann. Biochem.- 1982. -Vol. 126, № 1.-P. 131-138.
- Joshua M., Hare et.al // J. Am. Coll. Cardiol. 2002; 40: 1114-9.
- Kader KN., Akella R., Ziats N.P. et al. eNOS-overexpressing endothelial cells inhibit platelet aggregation and smooth muscle cell proliferation in vitro // Tissue. Eng. 2000 Jun.; 6(3):241-51.
- Kibbe M., Billiar T., Tzeng E. Inducible nitric oxide synthase and vascular injury // Cardiovasc. Res. 1999 Aug 15; 43(3): 650-7.
- Ludmer P.L., Selwin A.P., Shook T.L. et al. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries // N. Engl. J. Med. 1986; 315:1046-1051.
- Luscher T.F. The endothelium and cardiovascular disease - a complex relation // N. Engl. J. Med., 1994. Vol.330, N.15. - 1081-1083.
- Moncada S., Higgs A., Furchott RE. XIV International union of pharmacology nomenclature in nitric oxide research // Pharmacol. Rev. 1997; 49:137-142.
- Nabel E.G., Selwyn A.P., Ganz P. Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis // J. Am. Coll. Cardiol. 1990; 16: 349-356.
- Nishikawa Y., Ogawa S. Importance of nitric oxide in the coronary artery at rest and during pacing in humans // J. Am. Coll. Cardiol. 1997; 29: 85-92.
- Palmer RMJ, Ashton DS., Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine // Nature. 1988; 333: 664-666.
- Quyyumi A.A. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease // Am. J. Med., 1998. Vol.105 (Suppl. 1A). - 32-39.
- Raitakari O.T. Imaging of subclinical atherosclerosis in children and young adults // Ann Med, 1999. Vol.31 (Suppl 1). - 33-40.
- Rubaniy G.M., Polokoff M.A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology // Pharmacol. Rev. - 1994. - Vol. 46. - 325-415.
- Vallance P., Collier J., Moncada S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man // Lancet 1989; 997-1000.
- Vanhoutte P.M. // Eur.Heart. J. - 1997. - Vol. 18(suppl E). - 19-29.
- Vanhoutte P.M. // Circulation. -1993. - Vol. 87(suppl V). - 9-17.
- Wood D., De Backer G., Faergeman O. et al. Prevention of coronary heart disease in clinical practice: recommendations of the Second Joint Task Force of European and other Societies on Coronary Prevention // Atherosclerosis., 1998. Vol.140, N.2. - 199-270.
- Worthley S.G., Helft G., Zaman A.G. et al. Atherosclerosis and the vulnerable plaque— pathogenesis: Part I // Aust. N. Z. J. Med., 2000. Vol.30, N.5. -600-607.
- Yeung A.C., Vekshtein V.I., Krantz D.S. et al. The effect of atherosclerosis on the vasomotor response of coronary arteries to mental stress // N. Engl. J. Med. 1991; 325:1551-1556.
- Zanchetti A., Bond M.G., Hennig M. et al. Risk factors associated with alterations carotid intima-media thickness in hypertension: baseline data from the European Lacidipine Study on Atherosclerosis // J. Hypertens., 1998. Vol.16. -949-961.

Поступила 30/01-2004