

## МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ NO-ЗАВИСИМЫХ НАРУШЕНИЙ ФУНКЦИИ ЭНДОТЕЛИЯ

**О.А. Балбатун, к.м.н., доцент**

***УО «Гродненский государственный медицинский университет»***

В обзоре обсуждаются современные методы изучения NO-зависимых нарушений функции эндотелия. Более подробно рассматриваются электрохимическое определение NO и неинвазивное определение эндотелий-зависимой/эндотелий-независимой вазодилатации. Показано, что единого и оптимального метода определения дисфункции эндотелия нет и для получения достоверных данных должна подбираться группа взаимодополняющих методов, исходя из поставленной экспериментальной или клинической задачи.

**Ключевые слова:** дисфункция эндотелия, электрохимическое определение NO, эндотелий-зависимая/эндотелий-независимая вазодилатация.

In this review, we discuss modern techniques in the research on NO-mediated endothelial functions disturbances. It focuses on electrochemical NO detection and non-invasive assessment of endothelium-dependent/endothelium-independent vasodilation. We conclude that no single optimal method to assess endothelial dysfunction is available and only a group of concordant methods can provide reliable data for given experimental or clinical situation.

**Key words:** endothelial dysfunction, electrochemical NO detection, endothelium-dependent/endothelium-independent vasodilation.

Выдающимся достижением биомедицинских исследований конца XX века стало открытие сигнальной роли монооксида азота (NO) в организме человека и животных. В 1992 г. журнал Science назвал NO “молекулой года”, а в 1998 г. R.F. Furchgott, F. Murad и L.J. Ignarro была присуждена Нобелевская премия за исследование роли этого соединения в сердечно-сосудистой системе. Источниками NO в организме являются эндогенный синтез из аминокислоты L-аргинина при участии различных изоферментов NO-синтазы и его экзогенное поступление в виде нитратов/нитритов/S-нитрозотиолов и др. NO-доноров (рис.1) [13]. В физиологических условиях, при мультивариантности образования монооксида азота ведущее значение имеет его образование в эндотелии с постоянно экспрессируемой конститутивной NO-синтазой [17, 23]. Стремительное накопление знаний о ключевой роли эндотелия в регуляции сосудистого тонуса, локального кровотока, роста сосудов, процессов адгезии лейкоцитов, тромбообразования и NO-опосредованный характер многих его функций позволили в конце XX века сформулировать понятие дисфункции эндотелия (ДЭ или эндотелиальной дисфункции – ЭДФ), как кратковременного или устойчивого потенциально обратимого нарушения фенотипических свойств эндотелиоцитов, вызванного действием различных патогенных факторов [9]. В большинстве исследований термин ДЭ используется как синоним нарушений эндотелиального метаболизма L-аргинин-NO-системы [4, 19]. В связи с этим надежное и достоверное определение NO-зависимых нарушений функции эндотелия является важным направлением экспериментальных и клинических исследований.

Различные подходы к изучению монооксида азота в функционировании эндотелия можно разделить на количественное определение концентрации NO и его метаболитов, анализ распределения и активности различных изоформ NO-синтаз, функциональные пробы для оценки состояния эндотелия в модификациях in vivo или in vitro (ex vivo) и определение маркеров функции эндотелия (таблица).

Таблица – Методы оценки NO-зависимых процессов в функционировании эндотелия

<p>■ <b>Количественное определение концентрации NO и его метаболитов</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● электронный парамагнитный резонанс (ЭПР)</li> <li>● электрохимическое определение (электродный метод в <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> модификации)</li> <li>● хемилюминесцентная спектроскопия, флуоресцентная микроскопия, капиллярный электрофорез с лазер-индуцируемой флуоресценцией</li> <li>● радиоиммунный анализ конверсии L-аргинина в L-цитруллин</li> <li>● NO-опосредованное образование метгемоглобина, нитрозилгемоглобина и S-нитрозогемоглобина</li> <li>● концентрация нитритов и нитратов в плазме и моче</li> <li>● содержание NO в выдыхаемом воздухе</li> </ul>
<p>■ <b>Анализ распределения и активности различных изоформ NO-синтаз</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● электрофорез и вестерн-блоттинг</li> <li>● иммуногистохимический метод</li> <li>● иммуноферментный анализ (ИФА), иммунопреципитация и иммунофлуоресценция</li> <li>● изучение полиморфизма гена NO-синтазы</li> </ul>
<p>■ <b>Функциональные пробы для оценки состояния эндотелия (<i>in vivo</i> и <i>in vitro</i>)</b></p> <p>A) <i>In vivo</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● фармакологические инвазивные коронарная или предплечная пробы с введением ацетилхолина, доноров NO и др.</li> <li>● фармакологические и нефармакологические неинвазивные пробы: окклюзионная, холодовая и др. с контролем параметров гемодинамики при помощи ультразвуковой доплерометрии, реографии, лазерной доплеровской флоуметрии и др.</li> </ul> <p>B) <i>In vitro</i></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● измерение объемной скорости коронарного потока в изолированном по Лангендорфу сердце</li> <li>● изучение дилатации кольцевых сегментов крупных сосудов (грудная аорта и др.)</li> </ul>
<p>■ <b>Анализ маркеров функции эндотелия</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● оценка количества циркулирующих (десквамированных) эндотелиоцитов в крови по Hladovec J. (1978)</li> <li>● изучение ультраструктуры эндотелиоцитов на электронном микроскопе</li> <li>● тест на апоптоз эндотелиоцитов</li> <li>● определение гомоцистеина, эндотелина-1, натрийуретического пептида С, фактора Виллебранда, простаглицлина, асимметричного диметиларгинина и др.</li> <li>● изучение молекул клеточной адгезии эндотелия (молекулы межклеточной адгезии-1 и 2 (ICAM-1, ICAM-2), молекулы адгезии клеток сосудов-1 (VCAM-1), E-селектина, P-селектина и др.)</li> <li>● оценка содержания белков теплового шока HSP70 и HSP32</li> </ul>

Прямое количественное определение данного соединения в связи с чрезвычайной реактогенностью NO, быстрым периодом полураспада (2-10 секунд) и низкой концентрацией в биологических средах является трудной методической задачей. Высокой избирательностью в отношении NO характеризуется метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Для формирования стабильных парамагнитных комплексов используются ловушки NO

(комплексы двухвалентного железа с производными тиокарбоновой кислоты и др.) и по интенсивности сигнала ЭПР определяют количество монооксида азота [2, 13]. Дальнейшим развитием данного метода является техника ЭПР-томографии, позволяющая оценить пространственное распределение синтеза NO.

Целым набором уникальных свойств характеризуется электрохимический метод, предложенный профессором Т. Малинским в 1992 г. [21]. Используя различные варианты *in vivo* и *in vitro* электродов, непосредственно измеряется продукция NO в культуре клеток, функционирующем органе в течение определенного отрезка времени (рис. 2) [10]. Метод характеризуется высокой чувствительностью и быстрым ответом электрода на приток NO (около 100 микросекунд). С помощью данного метода определена динамика выделения NO в сокращающемся сердце, показан градиент NO в эндотелии различных участков артериального русла [1,10]. Данный метод продолжает развиваться с выраженной тенденцией к стандартизации и промышленному производству NO-сенсоров [22, 29, 31].

Активно взаимодействует NO с гемоглобином, что сопровождается формированием метгемоглобина (MetHb) и нитрата ( $\text{NO}_3^-$ ), нитрозилгемоглобина ( $\text{HbFe}^{2+}\text{NO}$ ) и S-нитрозогемоглобина (SNO-Hb) [3]. Ориентировочное соотношение между реакциями, ведущими к образованию NO-производных гемоглобина:  $\text{MetHb}$  и  $\text{NO}_3^- \gg \gg \text{HbFe}^{2+}\text{NO} > \text{SNO-Hb}$ . Эти соединения участвуют в формировании кислородсвязующих свойств крови, прооксидантно-антиоксидантного состояния, и в то же время параметры транспорта  $\text{O}_2$  оказывают выраженное влияние на L-аргинин-NO систему [3, 4]. Гемоглобин также способен выполнять функцию депо NO в микроциркуляторной сети [26]. Поэтому анализ взаимодействия NO с гемоглобином с учетом кислородсвязующих свойств крови и прооксидантно-антиоксидантного состояния является перспективным направлением изучения функционирования эндотелия [3, 4].

Популярной является оценка образования NO по концентрации продуктов его деградации в виде нитратов ( $\text{NO}_3^-$ ) и нитритов ( $\text{NO}_2^-$ ) содержащихся в плазме крови и моче. С этой целью используется спектрофотометрический метод с реактивом Грисса и его многочисленные модификации, высокоэффективная жидкостная хроматография и др. Дополнительно может определяться содержание вторичного мессенджера NO – цГМФ [27]. Метод определения  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  является достаточно информативным при условии осуществления контроля за содержанием нитратов, нитритов и других азот-содержащих веществ в пище.

Экспрессия и активность той или иной изоформы NO-синтазы может обуславливать способность NO выступать в качестве физиологического регулятора или же токсического агента в сердечно-сосудистой системе. Поэтому важным направлением изучения состояния эндотелия является анализ экспрессии конститутивной, индуцибельной и митохондриальной форм NO-синтаз в эндотелии и клетках крови. Для этой цели используются вестерн-блоттинг, иммуноферментный анализ и др. (таблица) [12]. В настоящее время активно изучается полиморфизм аллелей генов NO-синтазы и выявлены генотипы, являющиеся фактором риска развития дисфункции эндотелия [15].

В клинической практике активно развивается использование функциональных проб для диагностики состояния эндотелия. Подробная классификация методов и методика проведения функционального контроля степени дисфункции эндотелия приведена в работе Максимовича Н.А., Зинчука В.В. (2006) [6]. В таблице представлено обобщенное представление о методах изучения эндотелий-зависимой/эндотелий-независимой вазодилатации и оценки состояния эндотелия *in vivo* и *in vitro*. Классической неинвазивной функциональной пробой является методика, описанная Celermajer D.S. и соавт. (1992) [11].

## Эндогенное образование

## Экзогенное поступление

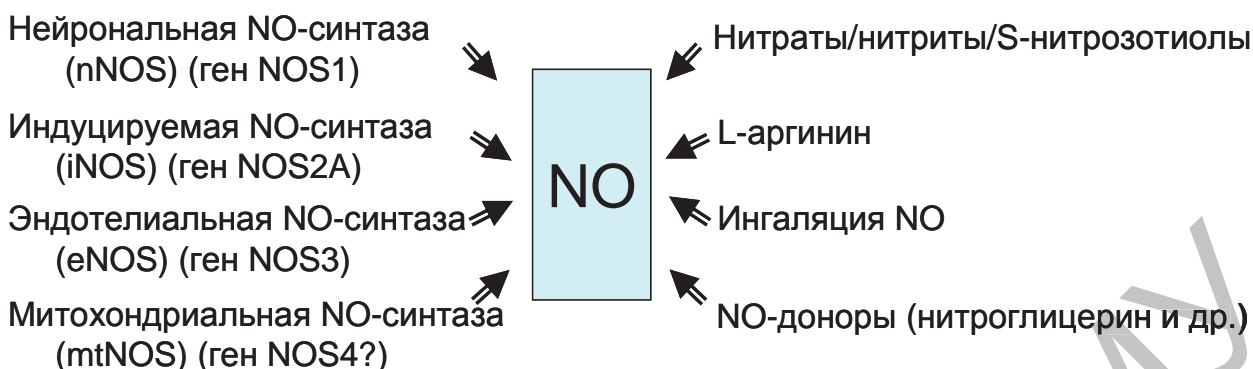


Рисунок 1 – Источники образования NO в организме (Fink B. et al., 2006; с изменениями)

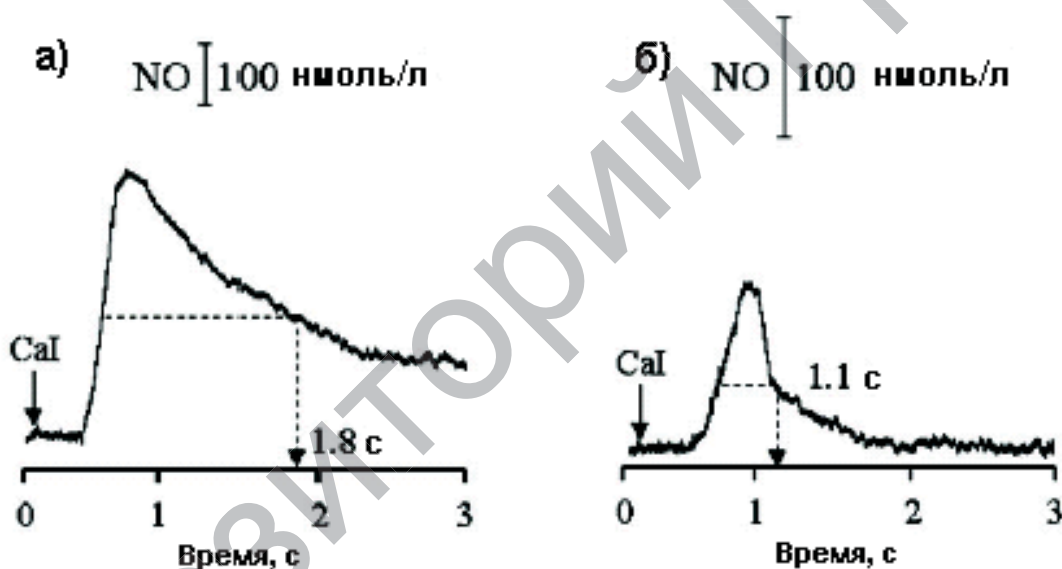


Рисунок 2 – Максимальная продукция NO *in vitro* под влиянием стимуляции кальциевым ионофором A23187 (1 мкмоль/л) в эндотелиальных клетках подвздошной аорты нормотензивных крыс линии WKY (а) и спонтанно гипертензивных крыс линии SHR (б). CaI – момент инъекции кальциевого ионофора.

Диаметр артерии измеряется с помощью ультразвука высокого разрешения в трех состояниях: исходное, через 40-50 секунд после 5-минутной окклюзии с помощью сфигмоманометра (поток-опосредованная или эндотелий-зависимая вазодилатация в результате реактивной гиперемии) и через 4-5 минут после сублингвального назначения нитроглицерина (нитроглицерин-опосредованная или эндотелийнезависимая вазодилатация) (рис. 3). Наблюдается значительное варьирование поток-опосредованной вазодилатации в зависимости от приема пищи, фазы менструального цикла, времени суток [17, 18]. С увеличением возраста степень поток-опосредованной вазодилатации прогрессивно снижается [20]. Поэтому метод Celermajer D.S. имеет строгие ограничения и может использоваться только у детей и взрослых молодого и среднего возраста, в определенные

часы суток, с учетом фазы менструального цикла (у женщин), без предварительного приема пищи [18, 20, 24, 25]. Метод изучения поток-зависимой вазодилатации продолжает совершенствоваться и имеются его модификации [5, 14, 28]. В функциональных пробах *in vitro* может измеряться объемная скорость коронарного потока в изолированном по Лангендорфу сердце [8], оцениваться степень дилатации кольцевых сегментов крупных сосудов [7].

### Изменение диаметра и кровотока в плечевой артерии:

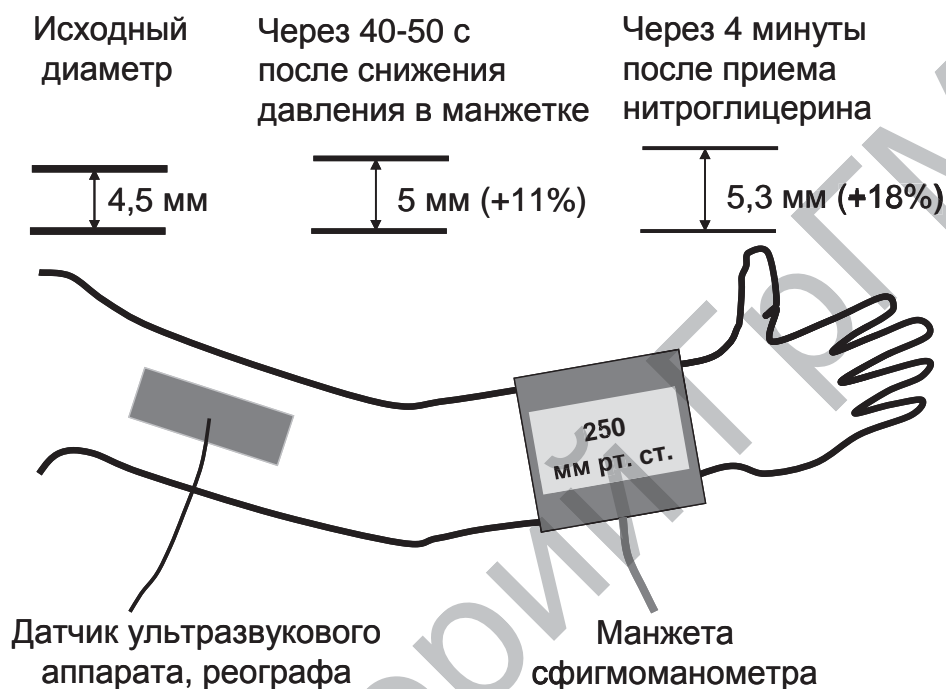


Рисунок 3 – Неинвазивное определение эндотелий-зависимой (поток-опосредованной) и эндотелий-независимой (нитроглицерин-опосредованной) вазодилатации по методике *Celermajer D.S. (1992)* в различных модификациях.

В силу разнообразия функций и продуцируемых эндотелием веществ предложено значительное количество методов по анализу маркеров повреждения эндотелия (таблица). Определяется количество циркулирующих (десквамированных) эндотелиоцитов в крови по методу Hladovec J. (1978) [16]. Несмотря на простоту, данный подход продолжает оставаться информационным [30]. Изучается ультраструктура эндотелиоцитов, вероятность их апоптоза, различные эндотелиальные факторы (эндотелин-1 и др.), молекулы клеточной адгезии и белки теплового шока [6].

Таким образом, существуют разнообразные по инвазивности и сложности методы изучения NO-зависимых нарушений функции эндотелия. Однако уже сама многочисленность подходов свидетельствует о том, что одного универсального и оптимального метода выявления дисфункции эндотелия нет. Каждый из подходов имеет ограничения по его использованию и в конкретной ситуации для выявления NO-зависимых нарушений функции эндотелия должна подбираться группа взаимодополняющих методов, исходя из поставленной экспериментальной или клинической задачи.



## Литература

1. Балбатун О.А. Содержание оксида азота в различных регионах системы кровообращения // В.В. Зинчук, Н.А. Максимович, В.И. Козловский и др. Дисфункция эндотелия: фундаментальные и клинические аспекты / под ред. Зинчука В.В. – Гродно, 2006. – С. 73-83.
2. Ванин А.Ф. Оксид азота: регуляция клеточного метаболизма без участия системы клеточных рецепторов // Биофизика. – 2001. – Т. 81, № 7. – С. 51-55.
3. Зинчук В.В. Участие оксида азота в формировании кислородсвязывающих свойств гемоглобина // Успехи физиологических наук. - 2003. - Т.34, №2. - С. 33-45.
4. Зинчук В.В., Максимович Н.А., Козловский В.И., Балбатун О.А., Пронько Т.П. Дисфункция эндотелия: фундаментальные и клинические аспекты / под ред. Зинчука В.В. - Гродно, 2006. - 183 с.
5. Максимович Н.А. Исследование постшемической вазодилатации сосудов предплечья в диагностике дисфункции эндотелия у детей // Труды республиканской научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования». – Витебск, 2000. – С. 136-138.
6. Максимович Н.А., Зинчук В.В. Дисфункция эндотелия и ее диагностика // В.В. Зинчук, Н.А. Максимович, В.И. Козловский и др. Дисфункция эндотелия: фундаментальные и клинические аспекты / под ред. Зинчука В.В. – Гродно, 2006. – С. 57-72.
7. Максимович Н.Е. Стресс-индуцированная дисфункция эндотелия: патофизиологические аспекты // Труды республиканской научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования». – Витебск, 2000. – С. 76-77
8. Солодков А.П., Щербинин И.Ю. Реакция эндотелиальной системы синтеза NO коронарных сосудов у крыс с различной чувствительностью к стрессу // Труды республиканской научно-практической конференции «Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования». – Витебск, 2000. – С. 35-43.
9. Шебеко В.И. Эндотелий и система комплемента. – Витебск, 1999. – 149 с.
10. Balbatun A., Louka F.R., Malinski T. Dynamics of nitric oxide release in the cardiovascular system // Acta Biochim. Pol. – 2003. – Vol. 50, № 2. – P.185-187.
11. Celermajer D.S., Sorensen K.E., Gooch V.M. et al. Non-invasive detection of endothelial dysfunction in children and adults at risk of atherosclerosis // Lancet. – 1992. – Vol. 340. – P. 1111-1115.
12. Deanfield J, Donald A, Ferri C. et al. Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds // J. Hypertens. – 2005. – Vol. 23, № 1. – P. 7-17.
13. Fink B., Dikalov S., Fink N. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo as an index of endothelial function // Pharmacological reports. – 2006. - Vol. 58. – P. 8-15.
14. Ghiadoni L., Versari D., Giannarelli C. et al. Non-invasive diagnostic tools for investigating endothelial dysfunction // Curr Pharm Des. – 2008. – Vol. 14. – P. 3715-3722.
15. Gonzalez-Gay M.A., Llorca J., Palomino-Morales R. et al. Influence of nitric oxide synthase gene polymorphisms on the risk of cardiovascular events in rheumatoid arthritis // Clin Exp Rheumatol. – 2009. – Vol. 27, № 1. – P. 116-119.
16. Hladovec J. Circulating endothelial cells as sign of vessel wall lesions // Physiol. Bohemoslov. – 1978. – Vol. 27., № 2. – P. 140-144.
17. Inoue T., Matsuoka H., Higashi Y. et al. Flow-mediated vasodilation as a diagnostic modality for vascular failure // Hypertens Res. – 2008. – Vol. 12. – P. 2105-2113.
18. Kasprzak J.D., Klosinska M., Drozd J. Clinical aspects of assessment of endothelial function // Pharmacological Reports. – 2006. – Vol. 58. – P. 33-40.
19. Kelm V., Rath J. Endothelial dysfunction in human coronary circulation: relevance of the L-arginine-NO pathway // Basic. Res. Cardiol. – 2001. – Vol. 96. – P. 107-127.

20. Lind L. Impact of ageing on the measurement of endothelium-dependent vasodilation // *Pharmacological Reports*. – 2006. – Vol. 58. – P. 41-46.
21. Malinski T., Taha Z. Nitric oxide release from a single cell measurement in situ by a porphyrinic-based microsensor // *Nature*. – 1992. – Vol. 358. – p. 676-678.
22. Malinski T. Nitric oxide and nitroxidative stress in Alzheimer's disease // *J Alzheimers Dis*. – 2007. – Vol. 11, № 2. – P. 207-218.
23. Morooka T., Node K. Methods to evaluate the vascular endothelial function // *Nippon Rinsho*. – 2006. – Vol. 11. – P. 2069-2073.
24. Patel P.D., Arora R.R. Endothelial dysfunction: a potential tool in gender related cardiovascular disease // *Ther Adv Cardiovasc Dis*. – 2008. – Vol. 2. – P. 89-100.
25. Patel S., Celermajer D.S. Assessment of vascular disease using arterial flow mediated dilation // *Pharmacological Reports*. – 2006. – Vol. 58. – P. 3-7.
26. Stepuro I., Chaikovskaya N., Piletskaya T., Solodunov A. Glutathione oxidation under the action of sodium nitrite on hemoglobin // *Pol. J. Pharmacol.* - 1994. – Vol. 46. – P. 601-607.
27. Vapaatalo H., Mervaala E. Clinically important factors influencing endothelial function // *Med. Sci. Monit*. – 2001. – Vol. 144. – P. 449-458.
28. Viridis A., Ghiadoni L., Versari D. et al. Endothelial function assessment in complicated hypertension // *Curr Pharm Des*. – 2008. – Vol. 14. – P. 1761-1770.
29. Ye X., Rubakhin S.S., Sweedler J.V. Detection of nitric oxide in single cells // *Analyst*. – 2008. – Vol. 133, № 4. P. 423-433.
30. Závada J., Kideryová L., Pytlík R., Tesar V. Circulating endothelial cells and circulating endothelial progenitors in kidney disease--victims, witnesses, or accomplices? // *Folia Biol (Praha)*. – 2008. – Vol. 54, № 3. – P. 73-80.
31. Zhang X. Real time and in vivo monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors--from dream to reality // *Front Biosci*. – 2004. – Vol. 9. – P. 3434-3446.