

О.В. Коркушко, В.Ф. Сагач, В.Ю. Лішневська

Деякі механізми розвитку ендотеліальної дисфункції при старінні

Изучена способность эндотелия к выработке вазоактивных веществ у здоровых людей разного возраста, а также в условиях эксперимента – активность конститутивной и индуцибельной NO-синтазы. У здоровых людей 60–79 лет исследована сосудодвигательная функция эндотелия, содержания эндотелина-1, NO₂, простаглицлина, тромбосана, число адгезивных молекул и уровень ингибитора тканевого активатора плазминогена, Также изучали активность эндотелиальной и индуцибельной NO-синтазы в ткани миокарда и аорты здоровых крыс разного возраста. Показано, что при старении уменьшается выработка эндотелием факторов релаксации – оксида азота и простаглицлина. Важным механизмом нарушения NO-синтезирующей функции эндотелия является снижение активности эндотелиальной NOS. При этом синтез эндотелиальных вазоконстрикторов с возрастом увеличивается, что на фоне снижения выработки вазодилататорных субстанций приводит к нарушению защитных свойств эндотелия. О возрастном нарушении противовоспалительной и антитромботической активности эндотелия свидетельствует повышение титра адгезивных молекул и ингибитора тканевого активатора плазминогена.

ВСТУП

Згідно з класичним визначенням ендотелій – шар є сплосчених клітин, що виникають із мезенхіми та покривають зсередини судини [2]. Нині з'ясовано, що ендотелій має судинорухові, антикоагулянтні, тромболітичні, протизапальні, антиоксидантні та антипроліферативні властивості [2, 4, 8]. Порушення захисних властивостей ендотелію значно підвищує ризик розвитку судинної патології та відіграє надзвичайно велику роль у розвитку атеросклеротичних змін судинної стінки, ремоделюванні судин, ангіогенезі [10, 13, 16].

Виходячи з різноманітності та значущості ендотеліальних функцій, їх порушення впливає не тільки на стан судинної стінки, але й на життєдіяльність організму в цілому. В свою чергу, функціональний стан ендотелію значною мірою визначається змінами, що відбуваються в організмі при старінні.

За даними морфологічних досліджень [15] у здорових людей, яким більше ніж 60 років, спостерігається гетерохромність ядер ендотеліоцитів, збіднення рибосомами, що вказує на порушення білоксинтезуючої функції клітин. Відбуваються зміни у структурі мітохондрій у вигляді набухання, руйнування крист, що може свідчити про зміни енергетичного обміну клітин. Збільшується кількість первинних і вторинних лізосом. Ці морфологічні зміни є ознаками функціональної неспроможності ендотеліоцитів, що підтверджують дані експериментальних [5, 7, 13] і клінічних досліджень [1, 7, 9], які свідчать про залежне від віку порушення судинорухової, антитромботичної, антиоксидантної, протизапальної активності ендотелію. Все це сприяє розвитку судинної патології в осіб похилого віку [2, 8].

Більшість функцій здійснюється ендотелієм за допомогою синтезу ендотеліальних вазоактивних речовин – ендотеліального

релаксуючого фактора, простагландинів, тромбоксанів, ендотелінів та цілої низки інших субстанцій. Саме порушення адекватного вироблення ендотелієм вазоактивних речовин може бути одним із механізмів розвитку ендотеліальної дисфункції при старінні.

Мета нашого дослідження – вивчити синтезуючу активність ендотелію у здорових людей різного віку та обговорити можливі механізми порушення його NO-синтезуючої функції при старінні.

МЕТОДИКА

Було обстежено дві групи (по 30 осіб) здорових осіб різного віку: I група – 60–79 років, II група – 20–29 років. Здоровими були визнані особи, у яких за даними клінічних і лабораторних досліджень не було виявлено ознак гострих чи хронічних захворювань.

Функціональний стан ендотелію визначали за допомогою розробленої нами методики (Патент UA 2001074888). Оцінювали приріст об'ємної швидкості кровотоку шкіри на передпліччі при розвитку ендотелій-залежної судинної реакції – реактивної гіперемії. Останню створювали стисненням судин плеча протягом 3 хв; тиск у манжеті був на 50 мм рт.ст. вищим за систолічний артеріальний тиск. Дослідження кровотоку виконували методом лазерної доплерівської флоуметрії на двоканальному лазерному флоуметрі T206 “Transonik” (США).

Вміст стабільного метаболіту оксиду азоту (NO_2^-) визначали за допомогою реактива Гріса [6], а ендотеліну – імуноферментним методом за допомогою набору реактивів Endotelin-1 Peninsula Laboratories INC (США). Концентрацію простагландину та тромбоксану визначали імуноферментним методом за допомогою наборів реактивів Tromboxane B_2 і 6-keto-Prostaglandin F RD Systems (США). Число судинних адгезивних молекул досліджували

імуноферментним методом за допомогою набору реактивів sP-selectin («Bender MedSys», Австрія). Вміст інгібітора тканинного активатора плазміногену визначали імуноферментним методом за допомогою набору реактивів PAI-1 (“Biorol”, Швеція).

З метою вивчення залежних від віку механізмів зниження синтезу NO, в дослідження було включено експериментальну частину. В гомогенатах серця, аорти, а також у плазмі крові та еритроцитах дорослих (віком 6–8 міс) і старих (24–26 міс) щурів визначали вміст стабільних метаболітів NO: нітрит- (NO_2^-) і нітрат-аніонів (NO_3^-) та активність кальційнезалежної індукцибельної (iNOS) і кальційзалежної конститутивної (cNOS) NO-синтаз. Вміст нітрит-аніона (NO_2^-) визначали в безбілкових надосадових аліквотах після визначення активності NO-синтази або в безбілкових розчинах гомогенатів тканин клітин у колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса [6]. Вміст NO_3^- визначали в гомогенатах тканин спектрофотометричним методом. Активність NO-синтаз вивчали за допомогою реєстрації швидкості утворення продуктів перетворення L-аргініну методом спектрофотометрії [3, 18, 19]. Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою комп'ютерних програм EXEL та Statistica 6.0.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати дослідження показали, що в осіб старших за 60 років порівняно з молодшою групою знижується приріст об'ємної швидкості кровотоку шкіри у відповідь на створення реактивної гіперемії, подовжується латентний період реакції та зменшується її тривалість (табл. 1).

Наведені результати свідчать про порушення судинорухові функції ендотелію в осіб старших за 60 років, що може бути пов'язане із залежним від віку погіршенням його синтезуючої функції. Підтвердження цьому

Таблиця 1. Зміни об'ємної швидкості кровотоку у практично здорових людей різного віку при проведенні проби з реактивною гіперемією

Показник	Групи обстежених	
	20–29 років	60–79 років
Об'ємна швидкість, мл/хв · 100 г тканини		
вихідна	2,4±0,12	1,6±0,13*
на піку гіперемії	6,5±0,23	5,21±0,13*
Час досягнення максимуму реакції, с	5,51±0,22	6,50±0,34*
Час відновлення показників, с	109,5±4,4	98,5±2,1

* P<0,05.

припущенню ми знаходимо, аналізуючи вміст ендотеліальних вазоактивних речовин у плазмі крові здорових людей різного віку. З віком у крові спостерігається вірогідне зниження вмісту ендотеліального релаксуючого фактора та простаглантину, а вміст ендотеліну-1 та тромбоксану – збільшується (табл. 2).

Указані зміни співвідношення ендотеліальних вазоактивних речовин зумовлюють порушення не тільки вазодилаторної, але й цілої низки інших властивостей ендотелію. В першу чергу, це стосується оксиду азоту, який виконує багато інших важливих функцій: модулює вивільнення вазоактивних медіаторів, інгібує адгезію лейкоцитів (пригнічує експресію VCAM, ICAM, E-селектину, знижує стабільність мРНК-моноцитарного хемотаксичного фактора) [4, 9, 14]. Він також бере участь у регуляції ремоделювання судинної стінки, пригнічує експресію прозапальних генів, адгезію та агрегацію тромбоцитів, інгібує міграцію та проліферацію клітин гладеньких м'язів [14, 17]. У серцевому м'язі оксид

азоту бере участь у регуляції скоротливої активності міокарда [2].

Система синтезу та вивільнення NO ендотелієм швидко реагує на подразники і першою реакцією на неадекватне підвищення судинного тонуусу стає збільшення його синтезу. У крові осіб віком від 60 до 79 років зменшується вміст метаболіту NO нітрит-аніону (табл. 2). Це може говорити про погіршення резервних можливостей ендотеліоцитів як внаслідок їх пошкодження, так і можливого виснаження після тривалого впливу сполук, які стимулюють синтез NO – катехоламінів, ацетилхоліну, брадикініну, вазопресину та інших біологічно активних речовин.

Суттєвою причиною зниження синтезу оксиду азоту може бути зниження активності ендотеліальної NO-синтази.

Це підтверджують результати експериментальних досліджень – визначення активності конститутивної та індукційної NO-синтази у тканинах серця і судин у щурів різного віку (табл. 3).

Таблиця 2. Вікові розбіжності рівня окремих вазоактивних субстанцій, що синтезуються ендотелієм

Показник	Групи обстежених	
	20–29 років	60–79 років
Ендотелін-1, пмоль/л	5,6±0,4	10,2±1,1*
NO ₂ ⁻ , нмоль/л	16,5±1,3	8,4±0,8*
6-кетопростагландин F _{1α} , ммоль/л	218,2±7,1	118,2±7,2**
Тромбоксан B ₂ , ммоль/л	146,6±6,3	168,6±5,5*
Відношення 6-кетопростагландину F _{1α} до тромбоксану B ₂ , ум.од.	1,49±0,04	0,70±0,02**

* P<0,005; ** P<0,01.

Таблиця 3. Вміст стабільного метаболіту NO, активність індукбельної (iNOS) і конститутивної (cNOS) NO-синтаз у гомогенатах серця, аорти, а також у плазмі крові дорослих і старих щурів

Показник	Дорослі щури (6–8 міс)	Старі щури (21–24 міс)
cNOS		
у міокарді	56,2±6,2	12,9±2,5**
в аорті	329,9±34,2	58,7±3,5**
у плазмі	2,15±0,26	2,26±0,38
в еритроцитах	0,95±0,16	1,1±0,18
iNOS		
у міокарді	27,2±3,9	19,2±2,7
в аорті	80,2±3,8	511,5±9,5*
NO ₂		
у міокарді	502,22±35,78	200,19±33,46*
у аорті	278,22±35,83	151,34±18,28*

* P<0,005; ** P<0,01.

Як видно з результатів, представлених у табл. 3, у тканинах серця, аорти та в плазмі старих тварин вміст метаболіту оксиду азоту – нітрит-аніона суттєво нижчий порівняно зі значеннями у дорослих щурів. Це може бути результатом пригнічення активності конститутивної кальцій-залежної NO-синтази, активність якої найбільш істотно була зниженою в аорті.

Водночас активність індукбельної NO-синтази, яка активується при дії патогенних факторів, була в аорті старих тварин значно вищою. Останнє дозволяє говорити про можливість значного підвищення рівня синтезу NO внаслідок активації індукбельної NOS. Як відомо, великі концентрації NO можуть призводити до активації вільнорадикального окиснення та запальних реакцій, пригнічення дихальних ферментів мітохондрій і розмноження клітин. Реагуючи з супероксидним радикалом NO утворює пероксинітрит, який внаслідок високої токсичності може викликати пошкодження ДНК і мутації в клітинах [11]. При високих концентраціях пероксинітрит є дуже токсичним, індукуює апоптоз, порушує функціонування системи простациклінсинтетази, викликає фрагментацію білків, індукуює окиснення ліпопротеїдів низької щільності.

Слід відзначити, що судинорухові властивості ендотелію залежать не тільки від

вмісту оксиду азоту, але й від інших факторів, зокрема концентрації простацикліну. Простациклін – продукт метаболізму арахідонової кислоти, має вазодилатуючу, антиагрегантну та цитопротекторну активність. Він здатний зменшувати розмір пошкодження при експериментальному інфаркті міокарда та прояви реперфузійних аритмій [2, 13]. Простациклін не відіграє значної ролі в підтримці рівня артеріального тиску і набагато менше за оксид азоту впливає на тонус судин, однак у коронарних судинах він може посилювати ефект оксиду азоту і стимулювати його вивільнення із ендотеліоцитів. Йому притаманна також антиагрегантна дія [10]. Отримані нами результати про вікове зниження вмісту простацикліну (див. табл. 2) наводять на думку про порушення захисної функції ендотелію при старінні.

Таким чином, у старіючому організмі ендотелій втрачає здатність до синтезу вазодилатуючих субстанцій у необхідній кількості. У той час, як згадувалося раніше, вміст сполук з вазоконстрикторними властивостями (ендотелін, тромбоксан) не тільки не знижується, а навпаки збільшується.

Враховуючи, що ендотелін-1 і тромбоксан A₂ викликають вазоконстрикцію, активацію вільнорадикального окиснення,

адгезію та агрегацію на поверхні ендотелію тромбоцитів, лейкоцитів, стимуляцію проліферації гладеньких м'язів судинної стінки [9, 12], зрушення балансу між вазоактивними сполуками ендотеліального походження в бік ендотеліну-1 та тромбоксану робить ендотелій більш чутливим до впливу пошкоджувальних факторів, що сприяє активності в судинній стінці запальних процесів.

Підтвердженням останнього є підвищений рівень у крові осіб похилого віку адгезивних молекул Р-селектину та sVCAM (табл. 4). Підвищений титр указаних молекул дозволяє говорити про схильність лейкоцитів і тромбоцитів до адгезії на ендотелій, високу ймовірність утворення лейкоцитарно-тромбоцитарних агрегатів, що може супроводжуватися також і внутрішньосудинним тромбоутворенням. Збільшення вмісту D-селектину в крові осіб похилого віку якраз і може бути підтвердженням активності процесу тромбоутворення [8].

Ще одним показником підвищеного ризику тромбоутворення при старінні є підвищення в крові вміст інгібітора тканинного активатора плазміногену (25,8 нг/мл \pm 1,3 нг/мл у групі молодих людей і 42,6 нг/мл \pm 1,2 нг/мл у людей віком від 60 до 79 років), який не тільки вказує на наявність ендотеліальної дисфункції, але є незалежним маркером ризику розвитку судинної патології [12].

Таким чином, отримані результати свідчать про те, що при старінні порушується синтез ендотелієм вазоактивних субстанцій, що супроводжується суттєвими змінами їх співвідношення та сприяє розвитку судинної патології в осіб похилого віку.

Таблиця 4. Вміст адгезивних молекул крові осіб різного віку

Показник	Групи обстежених	
	20–29 років	60–79 років
SVCAM, нг/мл	904,4 \pm 6,1	943,7 \pm 7,1*
Р-селектин, нг/мл	129,3 \pm 7,6	180,2 \pm 6,2*

* P<0,005.

ВИСНОВКИ

1. При старінні зменшується синтез ендотелієм факторів вазодилаторної дії оксиду азоту та простагліну.

2. Важливим механізмом порушення NO-синтезуючої функції ендотелію є зниження активності конститутивної NO-синтази.

3. Синтез ендотелієм сполук з вазоконстрикторними властивостями з віком збільшується, що, на фоні зниження вивільнення дилаторних субстанцій призводить до схильності розвитку вазоспастичних реакцій та підвищення ризику тромбоутворення.

O. V. Korkushko¹, V. F. Sagach²,
V. Yu. Lishnevskaya¹

SOME MECHANISMS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN AGING

Taking into consideration age-related changes in endothelium, the ability of endothelium to produce vasoactive substances has been studied in healthy subjects of various age. Under experimental conditions, the activity of constitutive and inducible NO-synthase has been studied as well. The clinical part of the study involved investigation of 38 healthy subjects aged 60-79. The study has been designed to investigate vasomotor function of the endothelium, the levels of endothelin-1, NO₂, prostacyclin, thromboxan, the level of adhesive molecules and inhibitor of tissue plasminogen activator. The levels of endothelial and inducible NO-synthases in tissues of the myocardium and the aorta has been investigated in healthy rats of various age. The data obtained show a decrease in the production of relaxation factors: NO and prostacyclin with aging. An important mechanism of deterioration of NO-synthesizing function of the endothelium is a decrease in endothelial NOS activity. The synthesis of endothelial vasoconstricting agents increased with ageing. This in combination with decreased production of vasodilating substances results in deterioration of defence properties of the endothelium. The increase in titer of adhesive molecules and inhibitors of tissue plasminogen activator testifies to age-dependent deterioration of anti-inflammatory and antithrombotic activities of the endothelium.

¹ Institute of Gerontology, AMS of Ukraine, Kiev

² A.A. Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Коркушко О. В., Лишнева В. Ю., Саркисов К. Г., Дужак Г. В. Функциональное состояние эндотелия сосудов у практически здоровых людей пожилого возраста. – В кн.: Биологические механизмы старения: IV Междунар. симпоз.: Тез. 24–27 мая 2000. – Харьков. – С. 83.
2. Малая Л.Т., Корж А.Н., Балковая Л.Б. Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы. – X: Торсинг. – 2000. – 432 с.
3. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. et al. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – **277**, 5. – P. 797–804.
4. Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. – J. Pathol. – 2000. – **90**. – P. 244–254.
5. Gewaltig M., Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential // Circulat. Pes. – 2002. – **55**. – P. 250–261.
6. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [+5N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131–138.
7. Grundy S. Age as a risk factor: you are as old as your arteries // Amer. J. Cardiol. – 1999. – **83**, № 5. – P. 1455–1457.
8. Halcox J. Endothelial dysfunction and prognosis // Circulation. – 2002. – **106**. – P. 659–669.
9. Halcox J.P.J., Schenck W.H., Zalos G. et al. Prognostic value of coronary vascular endothelial function. – 2002. – **106**. – P. 653–658.
10. Hambrecht R., Wolf A., Gielen S. et al. Effect of exercise on coronary endothelial function in patients with coronary artery disease // N. Engl. J. Med. – 2000. – **342**. – P. 454–460.
11. Ignarro L.J., Cirino G., Casini A., Napoli C. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview // J. Cardiovasc. Pharmacol. – 1999. – **34**. – P. 879–886.
12. Jem S., Wall U., Bergbrant A. et al. Endothelium-dependent vasodilation and tissue-type plasminogen activator release in borderline hypertension // Arterioscler. Thromb. Vase Biol. – 1997. – **17**. – P. 3376–3383.
13. Kannel W. Coronary heart disease risk factors in the elderly // Amer. J. Geriatric. Cardiol. – 2002. – **9**, №2. – P. 101–108.
14. Kojda G., Cheng Y.C., Burchfield J., Harrison D.G. Dysfunctional regulation of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in response to exercise in mice lacking one eNOS gene // Circulation. – 2001. – **103**. – P. 2839–2844.
15. Korkushko O., Stupina A., Sarkisov K., Lishnevskaya V. Morpho-functional state of vessels endothelium in healthy elderly // Biogerontology. – 2002. – **3**, suppl.1. – P. 66–67.
16. Li H., Forstermann U. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease // J. Pathol. – 2000. – **190**(3). – P. 244–254.
17. Lucas K.A., Pitari G.M., Kazerounian S. et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP // Pharmacol. Rev. – 2000. – **52**. – P. 375–414.
18. Selzer M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases // FEBS Lett. – 1991. – **291** – P. 145–149.
19. Vodovotz Y., Know N.S., Popischil M. et al. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide // J. Immunol. – 1994. – **152**, №8. – P. 4110–4118.

*Ін-т геронтології АМН України, Київ;
Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до
редакції 10.02.2004*