

М.Е. Барінова, О.М. Сулаєва

Стан систем внутрішньоклітинної сигналізації за умов ендотеліальної дисфункції

С целью оценки состояния различных звеньев системы внутриклеточной сигнализации, ассоциированной с продукцией и эффектами NO, при стимуляции α_2 -адренорецепторов в условиях эндотелиальной дисфункции у 22 больных с синдромом диабетической стопы проведен ингибиторный анализ изменения клофелин-индуцированной агрегации тромбоцитов при использовании стимулятора и ингибитора eNOS – L-аргинина и L-NAME, модулятора Ca^{2+} – кальмодулина – трифтазина, стимулятора гуанилатциклазы – нитропруссид натрия, ингибитора фосфодиэстераз – теофиллина, ингибитора протеинкиназы A – бутамида. Выявлено, что синдром эндотелиальной дисфункции у больных с диабетической стопой ассоциирован с нарушением адренореактивности на фоне угнетения активности eNOS, гуанилатциклазы и протеинкиназы A при повышении содержания фосфодиэстераз.

ВСТУП

Однією з патогенетичних ланок хронічних захворювань шлунково-кишкового тракту, сечостатевої, дихальної систем і шкіри, що супроводжуються дисрегенераторним синдромом, є ендотеліальна дисфункція [1]. Інтерпретуючи причинно-наслідкові зв'язки, що лежать в основі цього синдрому, патофізіологи відзначають значущість балансу між ендотелійзалежною та ендотелійнезалежною системами регуляції мікроциркуляції [5]. При цьому ендотелійзалежні фактори (оксид азоту, простагліцин) відіграють роль модуляторів і адаптерів реакції судинної стінки до зрушення адренергічної регуляції у бік домінування вазоконстрикторних і проагрегантних ефектів, що ініціюються за участю адренорецепторів [2]. Це призвело до спроб фармакологічної модуляції в клінічній практиці вмісту NO через корекцію активності ендотеліальної NO-синтази (eNOS) [1, 5]. Парадоксально, але при цьому були отримані суперечливі результати відносно ефективності застосування стимулятора

eNOS – L-аргінину й інгібітора – L-NAME. Втім це не дивно, адже відповідь клітинмішеней визначається не тільки вмістом системних і локальних регуляторів, але й станом внутрішньоклітинних сигнальних систем. Корекція активності eNOS аж ніяк не гарантує досягнення бажаного ефекту, оскільки не враховує стан месенджерних і трансдукторних систем клітини, що ініціюються NO та його антагоністами в регуляції мікроциркуляції [3, 8].

Мета нашої роботи – оцінка стану різних ланок внутрішньоклітинної сигнальної системи, асоційованої з продукцією й ефектами NO за умов стимуляції α_2 -адренорецепторів.

МЕТОДИКА

Проаналізовано результати обстеження 22 хворих (10 чоловіків і 12 жінок) на цукровий діабет 2-го типу з нейропатичною та змішаною формами синдрому діабетичної стопи. Вік хворих варіював від 20 до 78 років, у середньому – $62,3 \pm 6,5$ роки. Тривалість захворювання складала $10,5 \pm 3,2$

роки. Як клінічну модель дослідження нами було обрано цукровий діабет, ускладнений розвитком ранового процесу на стопі, оскільки провідною патогенетичною ланкою при цьому є мікроангіопатія, зумовлена розвитком ендотеліальної дисфункції. Унікальним і доступним об'єктом дослідження стану внутрішньоклітинної сигналізації є тромбоцити, що мають широкий спектр рецепторів та високу активність eNOS. Виділені з венозної крові тромбоцити відмивали і суспендували в буферному розчині такого складу (мкмоль/л): NaCl – 138, KCl – 3, MgCl₂ – 1, глюкоза – 10, HEPES – 10, Na₂PO₄ – 0,37, (pH 7,4). У I серії до суспензії тромбоцитів додавали 0,1 мл фізіологічного розчину, в II серії – 50, 100 і 200 мкмоль/л клофеліну – агоніста α_2 -адренорецепторів, що ініціює активацію фосфоліпази C – Ca²⁺ – кальмодуліну. Для аналізу функціонування різних ланок внутрішньоклітинної системи NO – протеїнкіназа G та її модюляторів застосовували певну комбінацію агоніста, стимуляторів чи інгібіторів, що використовували в наступних стандартних концентраціях: інгібітор комплексу Ca²⁺ – кальмодулін – трифтазин (3 мкмоль/л); субстрат, що стимулює eNOS – L-аргінін (200 мкмоль/л); інгібітор eNOS – L-NAME (2 мкмоль/л); стимулятор гуанілатциклази – нітропрурид натрію (5 мкмоль/л); інгібітор фосфодіестераз – теofilін (5 мкмоль/л); інгібітор протеїнкінази A – бутамід (100 мкмоль/л). Проби інкубували при 20° C протягом 8–9 хв, перемішуючи зі швидкістю 1000 хв⁻¹, після чого визначали ступінь зміни агрегації тромбоцитів у кожній пробі. Агрегацію та дезагрегацію тромбоцитів реєстрували модифікованим методом Борна за допомогою виміру оптичної густини світлового потоку, що проходить через суспензію тромбоцитів. Контролем були результати обстеження 10 практично здорових донорів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

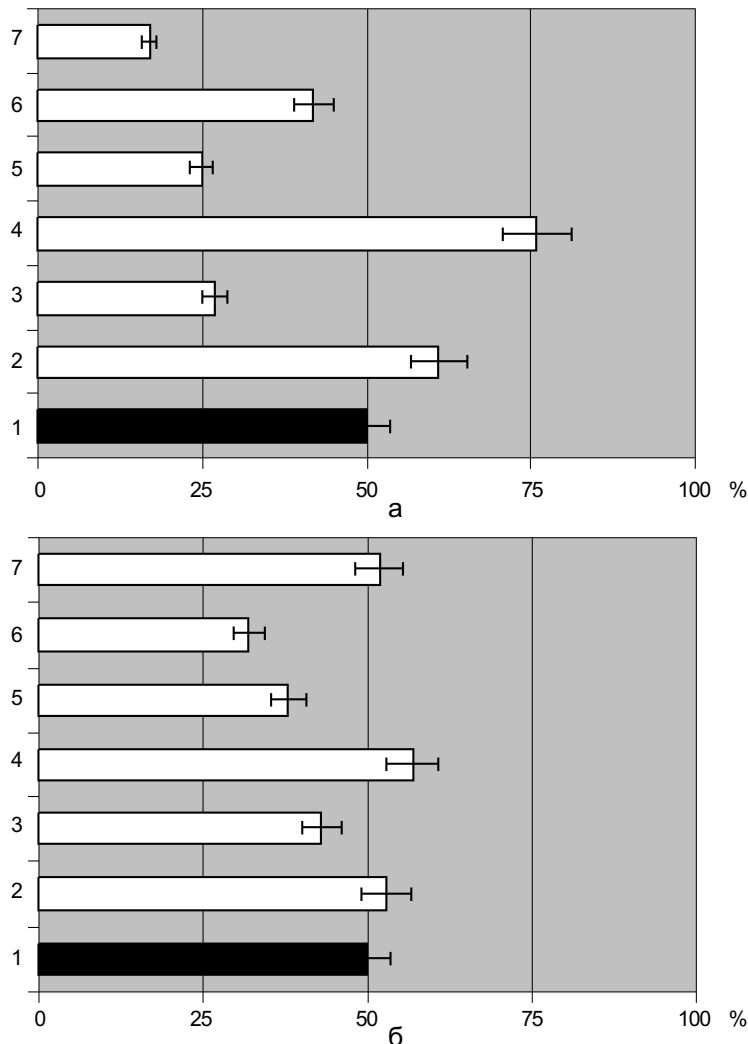
Попередні дослідження показали, що в здорових людей концентрація клофеліну, яка викликає агрегацію 50 % тромбоцитів (EC₅₀) становить 60,4 мкмоль/л ± 1,1 мкмоль/л. Трифтазин посилював індуковану клофеліном агрегацію тромбоцитів на 21,42 % (P<0,05). Стимуляція та пригнічення eNOS за умов додавання в інкубаційну суміш L-аргініну та L-NAME призводили до приблизно однакового за значенням, але різноспрямованого ефекту (рисунок): агрегація зменшувалася на 44,57 % чи збільшувалася на 39,33 % відповідно (P<0,001). Активація гуанілатциклази призводила до зниження агрегації тромбоцитів на 48,6 % (P<0,001). Пригнічення активності фосфодіестераз теofilіном незначно впливало на агрегацію: вона зменшувалася на 7,1 % (P>0,1), тоді як інгібітор бутамід підвищував її на 15,2 % (P<0,05). Отже, метод інгібіторного аналізу дає змогу отримати інформативні дані щодо стану ключових ланок внутрішньоклітинної сигнальної системи eNOS – NO – протеїнкіназа G.

У хворих із синдромом діабетичної стопи було зареєстровано зниження реакції тромбоцитів на активацію α_2 -адренорецепторів, оскільки EC₅₀ клофеліну становила 107,71 мкмоль/л ± 2,15 мкмоль/л (тобто збільшилася на 78,3 % порівняно з контролем; P<0,001). Додавання до суспензії тромбоцитів трифтазину викликало слабку реакцію: клофелініндукована агрегація тромбоцитів збільшилась усього на 14,22 % (P<0,05). Цей факт дає змогу припустити зниження реакції eNOS на зміну вмісту Ca²⁺ – кальмодуліну. Перевірка цієї гіпотези показала, що L-аргінін і L-NAME викликали значно менший ефект: агрегація тромбоцитів відрізнялася від показників у здорових людей на 31,51 і 21,05 % відповідно (P<0,01). Це можливе лише за умов низької вихідної активності eNOS. Важливим є також факт зниження активності гуанілатциклази, оскільки у відповідь на нітро-

прусид клофелініційована відповідь тромбоцитів була меншою на 25,89 % щодо контролю ($P<0,01$). Про виражений інгібуючий вплив фосфодіестераз на внутрішньоклітинні сигнальні процеси можна говорити за результатами інкубації тромбоцитів з теофіліном. Його дезагрегаційний ефект був на 27,07 % ($P<0,01$) більш вираженим, ніж у здорових людей. На цьому фоні відзначено зниження активності протеїнкінази А й її стимулювального

впливу на протеїнкіназу G. Підвищення агрегації тромбоцитів у відповідь на введення в інкубаційну суміш бутаміду було на 9,82 % ($P<0,05$) нижчим, ніж у здорових людей.

Особливості функціонування системи NO – протеїнкіназа G за умов цукрового діабету 2-го типу, незважаючи на багаторічні дослідження і величезний накопичений фактичний матеріал, залишаються однією з найбільш суперечливих проблем



Амплітуда зміни агрегації тромбоцитів за умов інкубації з модуляторами різних ланок внутрішньоклітинної сигнальної системи у здорових людей (а) і пацієнтів з синдромом діабетичної стопи (б). За віссю абсцис – рівень агрегації тромбоцитів (у відсотках), за віссю ординат – різні комбінації агоніста з модуляторами систем внутрішньоклітинної сигналізації: 1 – клофелін, 2 – клофелін і трифтазин, 3 – клофелін і L-аргінін, 4 – клофелін і L-NAME, 5 – клофелін і нітропрусид натрію, 6 – клофелін і теофілін, 7 – клофелін і бутамід

сучасної медицини. Ключове питання стосовно активності конститутивної форми eNOS за умов цукрового діабету викликає дискусію, оскільки в різних незалежних лабораторіях виявлено як підвищення, так і зниження активності ферменту, що певною мірою може бути зумовлено поліморфізмом експресії гена ферменту [1, 4, 5]. Іншою причиною протиріч може бути зіставлення результатів, отриманих *in vitro* (на фрагментах стінки судин або моношарі ендотеліальних клітин), в експерименті (у щурів, генетично детермінованих до розвитку цукрового діабету і за умов моделювання цукрового діабету 1-го типу) та в клінічних спостереженнях. Крім того, одні дослідники аналізували активність eNOS, а інші – вміст кінцевих продуктів метаболізму NO. При цьому в рамках одного дослідження не було проведено вивчення основних ланок внутрішньоклітинної сигнальної системи eNOS – NO – протеїнкіназа G, без чого неможливо скласти цілісне уявлення про механізми порушення реалізації даного сигнального шляху та оптимізувати тактику консервативного лікування порушень мікроциркуляції, що лежать в основі розвитку синдрому діабетичної стопи.

Проведений у роботі комплексний аналіз стану сигнальної системи NO – протеїнкіназа G дав змогу виявити зниження активності всіх її ланок. В інтерпретації причинно-наслідкових зв'язків цього феномена важливо пам'ятати про мультифакторіальну природу регуляції систем внутрішньоклітинної сигналізації, що залежать як від індивідуальних показників роботи клітин-мішеней, так і від дії позаклітинних сигналів. Так, виявлений у роботі підйом порога чутливості до агоніста α_2 -адренорецепторів – клофеліну, може бути наслідком: 1) підвищення системного рівня катехоламінів; 2) зміни кількості рецепторів і їх чутливості; 3) зрушення показників роботи сигнального шляху, що ініціюється

за умов активації α_2 -адренорецепторів і включає до складу фосфоліпазу C, діацилгліцерол і протеїнкіназу C, інозитол-3-фосфат і Ca^{2+} – кальмодуліновий комплекс; 4) підвищення внутрішньоклітинної концентрації Ca^{2+} , що обмежує амплітуду реакції клітин-мішеней на “прокальцієві” сигнали [7].

Стимуляція кальційзалежних шляхів за умов дії вазоактивних агоністів призводить до включення надійної системи адаптації клітин ендотелію – активації eNOS. Зрозуміло, що активність останньої може зазнавати значних змін при розвитку цукрового діабету внаслідок зниження резервної потужності ферменту. Це підтверджують дослідження [5], у яких знайшли підвищення експресії eNOS через 2 тиж після моделювання цукрового діабету у щурів і зниження її протягом наступних 6 тиж. У обстежених нами пацієнтів спостерігалася низька активність eNOS, що й не дивно, з огляду на тривалість захворювання та розвиток гнійно-некротичного процесу на нижніх кінцівках. Причинами цього явища може бути: зниження ролі Ca^{2+} – кальмодулінової системи стимуляції ферменту і/або зміна інсулінзалежних механізмів регуляції активності eNOS через обмеження активності протеїнкінази Akt/протеїнкінази B і внутрішньоклітинної сигнальної системи за участю фосфоінозитид-3-кінази [2]. Важливим фактором є також розвиток у пацієнтів гнійного запалення, оскільки регуляція експресії eNOS можлива за участі транскрипційного фактора NF κ B і цитокінів [4]. Зокрема, підвищення рівня фактора некрозу пухлин α супроводжується інгібуванням eNOS [6].

Виникає логічне запитання: чи може терапевтична тактика базуватися виключно на корекції активності eNOS? Отриманий у роботі фактичний матеріал змушує сумніватися в цьому. Навіть за умов нормалізації продукції NO (у разі використання субстрату для eNOS – L-аргініну) ефективність його впливу на мішені буде

обмежена внаслідок існуючого блоку месенджерної системи (гуанілатциклази – цГМФ) і фермента-трансдуктора (протеїнкінази G). Наші результати узгоджуються з даними дослідження [8], що продемонстрували пригнічення гуанілатциклази (у 2 рази порівняно з контролем). У дослідженнях [5] на мишах з природженим цукровим діабетом (+db/db, лінія C57BL/Ks) підтвердили факт зниження вазодилатації у відповідь на пряму стимуляцію гуанілатциклази нітропрусидом натрію, хоча при цьому зберігалася нормальна експресія eNOS і M_3 -мускаринових рецепторів. Результатом пригнічення активності гуанілатциклази є зниження вмісту цГМФ, що активує протеїнкіназу G. Цьому також сприяє підвищення активності фосфодіестераз, що водночас створює умови до обмеження вмісту цАМФ. Ефекти цього месенджера неоднозначні. Одним із внутрішньоклітинних шляхів його дії є активація протеїнкінази A. Цей трансдуктор конкурентно зменшує активність фосфоліпази C, запобігаючи підвищенню вмісту внутрішньоклітинного Ca^{2+} , і стимулює активність протеїнкінази G, потенціюючи тим самим ефекти NO-сигнального шляху. Крім того, існують протеїнкіназа A-незалежні ефекти цАМФ. Вони опосередковані стимуляцією Ерас – системи трансдукторів, здатних активувати протеїнкіназу B. Остання бере участь у регуляції системи eNOS – NO – протеїнкіназа G, а також може модулювати експресію NF- κ B, обмежуючи продукцію прозапальних цитокінів [5]. До того ж, через прямий ефект на роботу Ca^{2+} -АТФази, цАМФ безпосередньо знижує вміст внутрішньоклітинного Ca^{2+} . З огляду на ефекти, що модулюють його вміст і прозапальну активність, система цАМФ – протеїнкіназа A може розглядатися як одна з саногенетичних ланок внутрішньоклітинної адаптації за умов ендотеліальної дисфункції, а, отже, може бути молекулярною мішенню корекції виявлених дисрегу-

ляторних порушень. Підтвердженням цього може бути досвід ефективного застосування інгібіторів фосфодіестераз (що оптимізують мікроциркуляцію в тканинах) і стимуляторів активності протеїнкінази A у клітинах (препарат метформін) за умов цукрового діабету [4, 5]. Однак вибір терапевтичної тактики в будь-якому разі повинен базуватися на даних діагностики статусу внутрішньоклітинних сигнальних систем. Це дає змогу не лише оцінити рівень адаптації чи дезадаптації ендотелію до дії патогенетичних факторів, але й розробити індивідуальну тактику корекції дисрегуляторного синдрому в кожному конкретному випадку.

Таким чином, у роботі доведено, що розвиток синдрому ендотеліальної дисфункції та дисрегенерації супроводжується зміною режиму роботи систем внутрішньоклітинних посередників і трансдукторів. Використаний підхід є не лише інструментом у з'ясуванні молекулярних механізмів патологічного процесу, але й дозволяє визначити стратегію індивідуальної терапевтичної корекції статусу і відповіді клітин-мішеней.

М.Е. Barinova, O.N. Sulayeva

STATE OF INTRACELLULAR SIGNALING SYSTEMS UNDER ENDOTHELIAL DYSFUNCTION

To estimate the state of different parts of intracellular signaling system associated with NO production after α_2 -adrenoreceptors stimulation under endothelial dysfunction in 22 patients with diabetic foot, the inhibitory analysis of clophelin-induced platelets aggregation modulation by administration of eNOS stimulator (L-arginin) and inhibitor (L-NAME), modulator of Calmoduline (triptazine), guanilate cyclase stimulator (sodium nitroprusside), inhibitors of phosphodiesterases (theophillinum) and protein kinase A (butamide). It was shown that endothelial dysfunction in patients with diabetic foot is associated with alteration of adrenoreactivity and inhibition of eNOS, guanilate cyclase, protein kinase A and stimulation of phosphodiesterases activity.

Donetsk Medical University, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Зенков Н.К., Меньщикова Е.Б., Реутов В.П. NO-синтазы в норме и при патологии // Вестн. Рос. АМН. – 2000. – № 4. – С. 30–34.
2. Манухина Е.Б., Малышев И.Ю., Архипенко Ю.В. Оксид азота в сердечно-сосудистой системе: роль в адаптационной защите // Там же. – С. 16–20.
3. Forstermann U. Endothelial NO synthase as a source of NO and superoxide // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2006. – **62**, Suppl 1. – P. 5–12.
4. Grumbach I.M., Chen W. A negative feedback mechanism involving nitric oxide and nuclear factor kappa-B modulates endothelial NOS transcription // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2005. – **39**, № 4. – P. 595–603.
5. Li H. Regulation of endothelial NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs // Nitric Oxide. – 2002. – **7**, № 3. – P. 149–164.
6. Picchi A., Gao X., Belmadani S. Tumor necrosis factor-alpha induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome // Circulat. Res. – 2006. – **99**, № 1. – P. 69–77.
7. Yoshida Y., Ohyanagi M., Iwasaki T. Chronological changes of alpha-adrenoceptor-mediated vascular constriction in Otsuka-Long-Evans-Tokushima fatty rats // Hypertens Res. – 2003. – **26**, № 7. – P. 559–567.
8. Zanetti M., Barazzoni R. Dysregulation of the endothelial nitric oxide synthase-soluble guanylate cyclase pathway is normalized by insulin in the aorta of diabetic rat / Atherosclerosis. – 2005. – **181**, № 1. – P. 69–73.

Донецьк. мед. ун-т ім. М. Горького МОЗ України

Матеріал надійшов до редакції 16.04.2007