

Оригинальные статьи

МАЛАХОВА З. Л., ВАСИНА Е. Ю.,
ВОРОБЬЕВ Е. А., НЕСТЕРОВИЧ И. И.,
ВЛАСОВ Т. Д..

Неинвазивный метод исследования эндотелиального гиперполяризирующего фактора в клинике

Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова

e-mail: tvlasov@ya.ru

Реферат

Эндотелиальный гиперполяризирующий фактор (EDHF) в настоящее время остается наиболее малоизученным эндотелиальным вазодилататором. Определение активности EDHF можно производить при помощи «выключения» других вазодилататоров «двойной блокадой» синтеза оксида азота и простаглицлина нитро-L-аргинином и ингибиторами циклооксигеназы (ЦОГ), либо, напротив, блокадой синтеза EDHF введением тетраэтиламмония хлорида (ТЭА). Традиционно с этой целью блокаторы вазоактивных веществ вводятся внутриаrтериально или внутривенно, оказывая при этом системный эффект. Мы провели исследования на 30 здоровых добровольцах, в котором применили ионофоретическое введение нитро-L-аргинина, ингибитора ЦОГ (диклофенак) и ТЭА в сочетании с ионофорезом ацетилхолина. Полученные данные позволяют сделать заключение, что обе методики (блокада EDHF и блокада NO-синтаз + ЦОГ) позволяют оценить вклад EDHF в эндотелийзависимую вазодилатацию, причем результаты, полученные при применении этих методов, взаимно дополняют друг друга.

Ионофорез блокаторов вазоактивных веществ с последующим исследованием динамики кровотока в коже может быть использован для оценки вклада EDHF в эндотелийзависимую вазодилатацию.

Ключевые слова: EDHF, дисфункция эндотелия, эндотелиальный гиперполяризирующий фактор, эндотелийзависимая вазодилатация.

**Malakhova Z. L., Vasina E. Yu., Vorobiev E. A.,
Nesterovich I. I., Vlasov T. D.**

Non-invasive method of assessment of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human

First Pavlov State Medical University of St. Petersburg

e-mail: tvlasov@ya.ru

Abstract

Endothelial hyperpolarizing factor (EDHF) currently remains the most poorly studied endothelial vasodilator. Evaluation of activity of EDHF can be done through other vazodilators «dual block» of the synthesis of nitric oxide and prostacyclin nitro-L-arginine and inhibitors of COX or, in contrast with, the block of the synthesis EDHF introduction tetraethylammonii chloride (TEA). Traditionally vasoactive substances blockers are injected intraarterially or intravenously producing systemic effect. We conducted a study in 30 healthy volunteers using ionophoretic administration of nitro-L-arginine inhibitor of COX (diclophenac) and TEA combined with ionophoresis of acetylcholine. The data obtained allow to conclude that both methods (block EDHF and block of NO-synthase activity plus COX) allow to evaluate the contribution of EDHF in endothelium-dependent vasodilation. Results obtained by applying these methods complement each other.

Conclusion. Ionophoresis of blockers of vasoactive substances with the following measurement of dynamics of blood flow in the skin can be used to assess the contribution of EDHF in endothelium-dependent vasodilation.

Keywords: EDHF, endothelium-derived hyperpolarizing factor, endothelial dysfunction, endothelium-dependent vasodilatation.

Введение

Нарушения функции эндотелия, или дисфункция эндотелия (ДЭ), — один из наиболее важных и универсальных механизмов повреждения в патогенезе самых разных заболеваний: сахарный диабет, атеросклероз, гипертоническая болезнь, хроническая болезнь почек и многие другие. При этом функциональные изменения эндотелия, как правило, предшествуют морфологическим изменениям сосудистой стенки. Выделяют несколько форм дисфункции эндотелия, из которых наиболее значимой представляется вазомоторная форма ДЭ [6].

Одной из важных задач современной медицины является поиск самых ранних маркеров нарушения структуры и функции эндотелия и механизмов его повреждения для профилактики и предупреждения осложнений различных заболеваний.

Вазомоторная форма ДЭ обусловлена нарушением соотношения между эндотелиальными вазоконстрикторами и вазодилататорами и имеет значение в механизмах как системного повышения артериального давления (АД), так и локального ангиоспазма. К настоящему времени вазомоторная форма дисфункции эндотелия остается недостаточно изученной проблемой и механизмы ее развития требуют дальнейшего изучения [4, 6, 7].

Эндотелий участвует в регуляции тонуса кровеносных сосудов посредством выработки биологически активных веществ, которые по своему действию делятся на вазодилататоры и вазоконстрикторы. Эндотелийзависимую вазодилатацию обеспечивают, главным образом, оксид азота (NO), эндотелиальный гиперполяризующий фактор и простаглицлин (PGI₂). Другие вазодилататоры, вырабатываемые эндотелием, в норме оказывают меньшее влияние на тонус сосудов [6, 7].

Наименее изученным вазодилататором эндотелиального происхождения остается эндотелиальный гиперполяризующий фактор. Методы его изучения в клинике описаны лишь в единичных работах, при этом предлагаемые методы исследования EDHF проводятся на фоне внутривенного или внутриартериального введения препаратов, т. е. являются инвазивными [10, 14].

Цель исследования

Разработка неинвазивной методики оценки вклада EDHF в механизмы эндотелийзависимой вазодилатации для последующего ее использования с диагностической целью в клинической практике.

Материал и методы исследования

В исследование были включены здоровые добровольцы (n=30) в возрасте 21±1,3 года (17 мужчин, 13 женщин).

Для оценки реактивности микроциркуляторного русла и исследования эндотелийзависимой вазодилатации использовали ионофорез вазоактивных веществ на приборе «Поток-1». Перед проведением процедуры пациенты в течение 30 минут пребывали в помещении с температурой воздуха 24–25 °С.

Тканевая перфузия измерялась с помощью прибора высокочастотной доплерографии «Минимакс-Допплер-К» датчиком с частотой излучения 25 МГц, позволяющим определять кровоток в ткани до глубины 0,5 см. Исследования тканевой перфузии проводили на передней поверхности кожи предплечья в одной и той же точке. Запись доплерограммы выполнялась до проведения ионофореза и в дальнейшем — каждую минуту после проведения процедуры, начиная с 1-й минуты после ионофореза. Определяли объемную скорость тканевого кровотока (мл³/с).

Эндотелийзависимую вазодилатацию вызывали ионофорезом 0,3%-го раствора ацетилхолина. Данная методика использовалась в наших предыдущих исследованиях и зарекомендовала себя как безопасная и хорошо воспроизводимая [2, 3, 5].

Определение вклада EDHF в эндотелийзависимую вазодилатацию. В настоящее время в зарубежной литературе встречаются данные об использовании в качестве ингибитора EDHF тетраэтиламмония хлорида [10, 13–16, 19]. В этих исследованиях указанное вещество применялось как *in vivo*, так и *in vitro*. Во всех клинических работах с применением ТЭА это вещество вводилось либо внутриаириально, либо внутривенно, с последующей регистрацией микроциркуляторного кровотока различными способами [10, 13, 16].

В нашем исследовании мы применяли неинвазивный способ введения ТЭА с помощью ионофореза. Для оценки роли EDHF выполнялась проба с последовательным введением ТЭА и ацетилхолина.

После ионофореза ТЭА в концентрации 0,05 мг/мл на переднюю поверхность предплечья в течение 1 мин в той же области выполнялся ионофорез 0,3 %-го раствора ацетилхолина, и проводилась ежеминутная запись доплерограммы по отработанной методике. Концентрация ТЭА и время экспозиции были определены нами ранее, на отдельной группе добровольцев. При использовании выбранных характеристик не отмечалось системного действия препарата.

Для приготовления растворов использовали деионизированную дистиллированную воду с целью исключения электрофоретического влияния примесей других ионов.

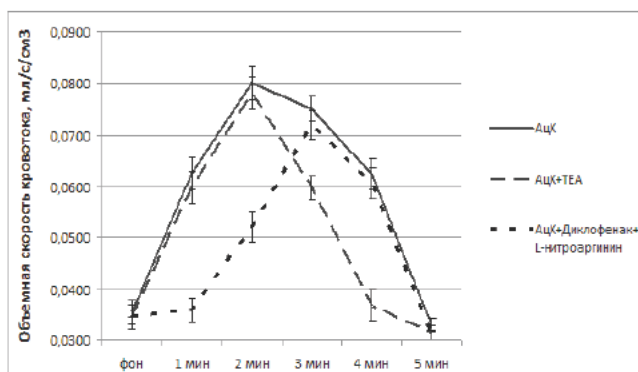
Для дополнительной верификации вклада эндотелиального гиперполяризующего фактора в индуцированную ацетилхолином эндотелийзависимую вазодилатацию проводилось исследование кожного кровотока в условиях одновременной блокады синтеза оксида азота и простаглицлина на фоне эндотелийзависимой вазодилатации.

Оставшаяся при этом вазодилатирующая способность эндотелия связана преимущественно с ацетилхолининдуцированным образованием эндотелиального гиперполяризующего фактора. Принцип метода «двойной» блокады оксида азота и простаглицлина часто используется в исследованиях эндотелиального гиперполяризующего фактора как в эксперименте [11], так и в исследованиях, проводимых на человеке [13, 21].

Динамика изменений средней объемной скорости кровотока при проведении проб с вазоактивными веществами

Показатель		Объемная скорость кровотока, мл/с/см ³					
		исходно	1 мин	2 мин	3 мин	4 мин	5 мин
АцХ	среднее значение	0,0344	0,0597*	0,0796*	0,0750*	0,0623*	0,0329
	SD	0,0087	0,0115	0,0115	0,0087	0,0112	0,0048
	m	0,0024	0,0032	0,0032	0,0024	0,0031	0,0013
АцХ+ТЕА	среднее значение	0,0344	0,0597*	0,0796*	0,0597*#	0,0367#	0,0313
	SD	0,0087	0,0115	0,0115	0,0115	0,0048	0,0038
	m	0,0000	0,0032	0,0032	0,0024	0,0031	0,0013
АцХ+Диклофенак+L-нитроаргинин	среднее значение	0,0344	0,0359#@	0,0520*#@	0,0719*#@	0,0623*#@	0,0329
	SD	0,0087	0,0087	0,0101	0,0101	0,0112	0,0048
	m	0,0024	0,0024	0,0028	0,0028	0,0031	0,0013

* — достоверные ($p < 0,05$) различия по отношению к фоновому (исходному) значению объемной скорости кровотока; # — достоверные различия значения объемной скорости кровотока опыта по сравнению с группой АцХ; @ — достоверные различия значения объемной скорости кровотока по сравнению с группой АцХ+ТЕА.



Динамика изменений средней объемной скорости кровотока при проведении проб с вазоактивными веществами, $M \pm m$

Блокаду оксида азота вызывали с помощью ионофореза нитро-L-аргинина (LNNA). Нитро-L-аргинин является универсальным ингибитором синтаз оксида азота, в том числе и конститутивной эндотелиальной NO-синтазы. Блокаду синтеза простациклина вызывали ионофорезом неселективного ингибитора циклооксигеназы, в качестве которого использовался официальный ампулированный 10%-й раствор диклофенака натрия [2, 3]. После одновременного ионофореза на переднюю поверхность предплечья 10%-го диклофенака натрия и 0,1%-го нитро-L-аргинина в течение 2 минут, в той же области выполнялся ионофорез 0,3 %-го раствора ацетилхолина по описанной выше методике.

Записи доплерограмм выполнялась до проведения ионофореза (фоновый кровоток), затем каждую минуту после проведения процедуры, до возврата показателей тканевой перфузии к исходному уровню, в общей сложности, семикратно. К исходным показателям объемная скорость кровотока во всех исследованиях возвращалась на 5-й минуте, 6-я минута была контрольной, для подтверждения нормализации кровотока и отсутствия изменений, поэтому в результатах исследования показатели 6-й минуты не обсуждаются. Определялась объемная скорость тканевого кровотока (мл³/с).

Всем испытуемым проводили по две пробы: проба с ацетилхолином — для определения степени эндотелийзависимой вазодилатации ($n=30$), а также проба с ацетилхолином + ТЕА ($n=15$), либо проба с ацетилхолином + LNNA + диклофенак ($n=15$).

Статистическая обработка результатов производилась с помощью программного пакета «StatSoft Statistica v6.0 Multilingual» и «IBM SPSS Statistics Version 20». Значимость различий оценивали непараметрическим критерием Манна–Уитни для независимых выборок, тестом Фридмана, критерием Уилкоксона. Величину p менее чем 0,05 рассматривали как подтверждение статистически значимых различий. Результаты измерений представлены как $M \pm m$.

Результаты исследования

При проведении пробы с ацетилхолином у всех пациентов отмечалось достоверное ($p < 0,05$) увеличение объемного кровотока уже с 1-й минуты после процедуры, которое достигало максимального значения (146 % от исходного) на 2-й минуте. Начиная с 3-й минуты регистрировалось уменьшение тканевой перфузии с возвратом к исходному уровню на 5-й минуте (таблица; рисунок).

При проведении пробы с нитро-L-аргинином, диклофенаком натрия и ацетилхолином прирост показателей тканевой перфузии запаздывал и начинался лишь со 2-й минуты регистрации. Тканевой кровоток достигал максимальных значений на 3-й минуте, составляя 132% от фонового, и к исходному уровню возвращался на 5-й минуте. Таким образом, блокада синтеза оксида азота и простациклина достоверно снижала эндотелийзависимую вазодилатацию. Тем не менее вазодилатация, индуцированная ацетилхолином, сохранялась, что, предположительно, можно связать с неизменным в условиях блокады оксида азота и простациклина синтезом эндотелиального гиперполяризующего фактора.

При проведении пробы с ТЕА и ацетилхолином объемная скорость кровотока начинала увеличиваться с 1-й минуты регистрации, достигала максимума

на 2-й минуте (142 % от фонового) и дальше начинала снижаться достоверно быстрее, чем при пробе с ацетилхолином. Уже на 4-й минуте разница с исходным уровнем была незначимой.

Таким образом, при использовании двух разных методик блокады эндотелиальных вазодилаторов мы получили возможность определить роль эндотелиального гиперполяризующего фактора в условиях эндотелийзависимой вазодилатации.

Обсуждение результатов

Микроциркуляторное русло — звено системы кровообращения, которое подвергается функциональной перестройке с минимальными морфологическими изменениями на начальных этапах развития различных заболеваний. Исследование вазодилаторных реакций микроциркуляторного русла, в частности, кожи, посредством проб с вазоактивными веществами используют для ранней диагностики вазомоторной формы эндотелиальной дисфункции [18, 22]. Поскольку кожная вазодилатация опосредуется тремя вазоактивными эндотелиальными факторами — оксидом азота, простациклином и эндотелиальным гиперполяризующим фактором, изучение реактивности микроциркуляторного русла кожи перспективно в плане раскрытия механизмов формирования вазомоторной формы эндотелиальной дисфункции при различных заболеваниях.

В то же время в клинической практике исследования по вкладу отдельных звеньев в механизмы нарушения вазодилатации немногочисленны, особенно в отношении эндотелиального гиперполяризующего фактора.

До настоящего времени химическая природа EDHF окончательно не определена. Предполагается, что в этом качестве выступают ионы калия, оксид азота, который не полностью блокируется нитро-аргинином, анандамид (эндогенный каннабиоид), перекись водорода, эпоксиэйкозатриеновые кислоты (EET 14-15), являющиеся метаболитами арахидоновой кислоты по монооксигеназному цитохром-P450-зависимому пути, натрийуретический пептид C (CNP) и другие вещества [4, 6, 12, 14].

Эндотелиальный гиперполяризующий фактор воздействует на кальцийзависимые калиевые каналы гладкомышечных клеток сосудов, стимулируя выход из них ионов калия, что вызывает их гиперполяризацию и расслабление, сопровождающееся вазодилатацией [1, 6].

Сосудорасширяющее действие эндотелиального гиперполяризующего фактора стимулируется ацетилхолином, брадикинином и многими другими веществами, которые способствуют образованию в эндотелии всех трех основных вазодилаторов. EDHF имеет важное значение как вазодилатор в артериальных сосудах резистивного типа, особенно в артериолах диаметром менее 300 мкм, в то время как в более крупных артериях основным вазодилатором считается оксид азота [4, 6].

Поскольку структура EDHF до настоящего времени является предметом дискуссии, его роль в физиологии и патологии сосудов изучена недостаточно. Большинство предположений о структуре EDHF получено из экспериментальных работ и чаще всего построено на результатах опытов с блокадой тех или иных эндогенных факторов фармакологическими веществами, которые «выключают» различные ферменты или звенья регуляции сосудистого тонуса. Однако эти данные чрезвычайно разнообразны и не позволяют определить химическую структуру, претендующую на роль эндотелиального гиперполяризующего фактора, которую можно было бы измерить в крови человека или животного.

В связи с этим некоторые исследователи предлагают использовать термин «эндотелийзависимая гиперполяризация» (EDH), что отражает понятие явления, а не наличие вещества [14]. Это понятие в большей степени соответствует получаемым экспериментальным и особенно клиническим данным, поскольку в исследованиях на человеке используются только функциональные методы оценки эндотелийзависимой гиперполяризации (эндотелиального гиперполяризующего фактора). Необходимо отметить, что предлагаемый нами метод позволил впервые выявить определенную очередность включения эндотелиальных факторов в ацетилхолининдуцированную вазодилатацию.

По результатам нашего исследования можно сделать вывод, что разные эндотелиальные факторы участвуют в эндотелийзависимой вазодилатации не одновременно. Так, блокада эндотелиального гиперполяризующего фактора ионофорезом TEA не изменила начальную фазу реакции сосудов кожи на ацетилхолин и уменьшила только вторую половину этой реакции. Напротив, блокада двух эндотелиальных факторов — оксида азота и простациклина — уменьшает именно начальную часть кривой реакции на ацетилхолин с сохранением последней фазы.

Наиболее вероятным объяснением этого является следующее: эндотелиальный гиперполяризующий фактор играет роль не во всей ацетилхолининдуцированной вазодилатации, а только во второй половине этой реакции, и не является «дублером» оксида азота и простациклина, а имеет самостоятельное значение для продления реакции вазодилатации. Эти данные требуют дальнейшего изучения и отдельной оценки вклада каждого из изучаемых эндотелиальных факторов в эндотелийзависимую вазодилатацию.

Таким образом, предложенный нами метод исследования вклада эндотелиального гиперполяризующего фактора в эндотелийзависимую вазодилатацию у человека является неинвазивным, хорошо воспроизводимым, технически несложным.

Это позволяет использовать данный метод в клинической практике для исследования механизмов нарушения вазомоторной дисфункции эндотелия и разработки способов ее коррекции.

1. Васина Е. Ю., Менишутина М. А. Реактивность сосудов кожи у пациентов с болезнью Рейно // Региональное кровообращение и микроциркуляция. 2003. № 2. С. 43–47.
2. Васина Е. Ю., Менишутина М. А., Власов Т. Д., Петрищев Н. Н. Микроциркуляторные нарушения при болезни Рейно // Амбулаторная хирургия. 2003. № 3 (11). С. 73.
3. Васина Е. Ю., Власов Т. Д., Петрищев Н. Н., Менишутина М. А., Гирина М. Б. Механизмы эндотелиальной дисфункции при болезни Рейно // Ангиол. и сосудистая хирургия. 2006. Прил. С. 12–13.
4. Власов Т. Д. Механизмы гуморальной регуляции сосудистого тонуса. Часть 1 // Региональное кровообращение и микроциркуляция. 2002. № 3. С. 68–77.
5. Власов Т. Д., Васина Е. Ю., Звездин М. С. Диагностика эндотелиальной дисфункции при болезни Рейно // Клинико-лаборатор. консилиум. 2007. № 15. С. 52–56.
6. Петрищев Н. Н., Васина Л. В., Власов Т. Д., Гавришева Н. А., Менишутина М. А. Типовые формы дисфункции эндотелия // Клинико-лаборатор. консилиум. 2007. № 18. С. 31–35.
7. Петрищев Н. Н., Власов Т. Д., Дубина М. В. Дисфункция эндотелия — ключевой фактор нарушений микроциркуляции // Вестник Росс. военно-мед. акад. 1999. № 2. С. 41–42.
8. Boegli Y., Gremion G., Golay S. et al. Endurance training enhances vasodilation induced by nitric oxide in human skin // J. Invest. Dermatol. 2003. Vol. 121. № 5. P. 1197–2003.
9. Brandes R. P., Schmitz-Winnenthal F. H., Feletou M. et al. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97. P. 9747–9752.
10. Chennupati R., Lamers W. H., Koehler S. E., De Mey J. G. Endothelium-dependent hyperpolarization-related relaxations diminish with age in murine saphenous arteries of both sexes // Br. J. Pharmacol. 2013. Vol. 169 (7). P. 1486–1499.
11. Chan E. C., Woodman O. L. Enhanced role for the opening of potassium channels in relaxant responses to acetylcholine after myocardial ischaemia and reperfusion in dog coronary arteries // Brit. J. Pharmacol. 1999. Vol. 126 (6). P. 925–932.
12. Garland C. J., Plane F., Kemp B. K., Cocks T. M. Endothelium-dependent hyperpolarization: a role in the control of vascular tone // Trends Pharmacol. Sci. 1995. Vol. 16. P. 23–30.
13. Inokuchi K., Hirooka Y., Shimokawa H. et al. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in human forearm circulation // Hypertension. 2003. Vol. 42. P. 919–924.
14. Luksha L., Agewall S., Kublickiene K. Endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular physiology and cardiovascular disease // Atherosclerosis. 2009. № 202 (2). P. 330–344.
15. McCulloch A. I., Bottrill F. E., Randall M. D., Hiley C. R. Characterization and modulation of EDHF-mediated relaxations in the rat isolated superior mesenteric arterial bed // British Journal of Pharmacology. 1997. № 120. P. 1431–1438.
16. McNeish A. J., Wilson W. S. Dominant role of an endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)-like vasodilator in the ciliary vascular bed of the bovine isolated perfused eye // Brit. J. Pharmacol. 2001. Vol. 134. P. 912–920.
17. Molokhia S. A., Zhang Y., Higuchi W., Li S. K. Ionophoretic transport across a multiple membrane system // J. Pharm. Sci. 2008. Vol. 97 (1). P. 490–505.
18. Noon J. P., Walker B. R., Hand M. F., Webb H. D. Studies with ionophoretic administration of drugs to human dermal vessels in vivo: cholinergic vasodilatation is mediated by dilator prostanooids rather than nitric oxide // Br. J. Clin. Pharmacol. 1998. Vol. 45 (6). P. 545–551.
19. Mortensen S. P., Gonzalez-Alonso J., Damsgaard R. et al. Inhibition of nitric oxide and prostaglandins, but not endothelial-derived hyperpolarizing factors, reduces blood flow and aerobic energy turnover in the exercising human leg // J. Physiol. 2007. Vol. 581. Pt 2. P. 853–861.
20. Niederhober N., Szabo B. Involvement of CB1 cannabinoid receptors in the EDHF-dependent vasorelaxation in rabbits // Brit. J. Pharmacol. 1999. Vol. 126. P. 1383–1386.
21. Ohlmann P., Martinez M. C., Schneider F., Stoclet J. C. Characterization of endothelium-derived relaxing factors released by bradykinin in human resistance arteries // Brit. J. Pharmacol. 1997. Vol. 121. P. 657–664.
22. Yan G., Li S. K., Higuchi W. I. Evaluation of constant current alternating current iontophoresis for transdermal drug delivery // J. Control Release. 2005. Vol. 110 (1). P. 141–150.