

БИОХИМИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА ОКСИДА АЗОТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ NO-СИНТАЗОЙ В НОРМЕ И ПРИ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОЙ ПАТОЛОГИИ

Н.А. Кравченко, Н.В. Ярмыш

*Институт терапии им. А.Т. Малой АМН Украины, Харьков
Харьковский государственный медицинский университет*

Ключевые слова: оксид азота, эндотелиальная NO-синтаза, полиморфизм гена eNOS, регуляция экспрессии, атеросклероз, статины.

Открытие эндотелийзависимого фактора релаксации, идентифицированного в 1980 г. R.F. Furchgott и J.V. Zawadzki как NO, изменило наше представление о роли эндотелиальных клеток в регуляции функции сердечно-сосудистой системы. В середине 80-х годов было установлено, что эндотелиальная дисфункция является основным фактором патогенеза сосудов, что, в свою очередь, ускорило развитие новой терапевтической стратегии.

Оксид азота (NO) обладает широким спектром биологического действия: участвует в функционировании центральной и вегетативной нервной системы, пищеварительного канала и мочеполовой системы, секреторных тканей и органов дыхания, в регуляции сердечно-сосудистой системы. В высоких концентрациях NO может проявлять цитостатическую и/или цитотоксическую активность, т. е. он играет определенную роль в системе клеточного иммунитета. Этим объясняется влияние NO на процессы иницирования и протекания апоптоза [6, 46].

Структура и функции доменов NOS

Синтез NO из L-аргинина осуществляется под действием, по крайней мере, трех основных изоформ фермента NO-синтазы (NOS): нейрональной (nNOS), эндотелиальной (eNOS) и индуцибельной (iNOS). В активной форме все три изоформы представляют собой гомодимеры с молекулярной массой 130 (iNOS), 135 (eNOS) и 160 (nNOS) kDa [1,2]. В мономере фермента NOS, начиная с C-конца, выделяют: 1) редуктазный домен, сходный по аминокислотному составу с цитохром P450-редуктазой; 2) малый кальмодулинсвязывающий домен; 3) оксигеназный домен с характеристиками, схожими с цитохромом P450, но без структурной гомологии; 4) N-концевую специфическую последовательность (рис. 1).

Для функционирования eNOS требуется пять различных простетических групп и кофакторов. Редуктазный домен содержит два флавиновых кофермента — ФАД и ФМН. ФАД является первичным акцептором электронов, происходящих от НАДФН, а ФМН переносит электроны от ФАД в центр гема на оксигеназный домен. Последний содержит центры связывания для гема, субстрата — L-аргинина и кофактора (6R)-5,6,7,8-тетрагидро-L-биоптерина (BH₄).

При внутреннем переходе электронов происходят конформационные изменения молекулы фермента, необходимые для передачи электронов от редуктазного на оксигеназный домен, например, от ФМН на гем, и стимуляции передачи электронов в пределах редуктазного домена, например, от ФАД к ФМН [3].

Исследования химии изоформ NOS, в которых кальмодулинсвязывающие домены менялись между изоформами iNOS и nNOS (или между iNOS и eNOS) показали, что расстояние между молекулами в этих доменах определяет различия в Ca²⁺/кальмодулинсвязывающих свойствах изоформ [45]. Гемовый «карман» является центром, в котором связываются субстрат — L-аргинин и кислород (O₂) и проходит собственно катализ. Рассматриваемый нами фермент сходен с цитохром P450 как цистеиновым тиолатом и с осевым гемовым лигандом. Цистеин, представленный в проксимальном лиганде, идентичен для всех трех изоформ NOS. Однако NOS выделена в виде высокоспинового соединения с пятью координационными связями, тогда как многие (но не все) цитохромы P450 становятся высокоспиновыми только после добавления субстрата. Это отличие поясняется присутствием в гомодимере NOS кофактора BH₄: биоптеринсвободная NOS имеет более высокие показатели низкоспинового гема. Различия в спек-

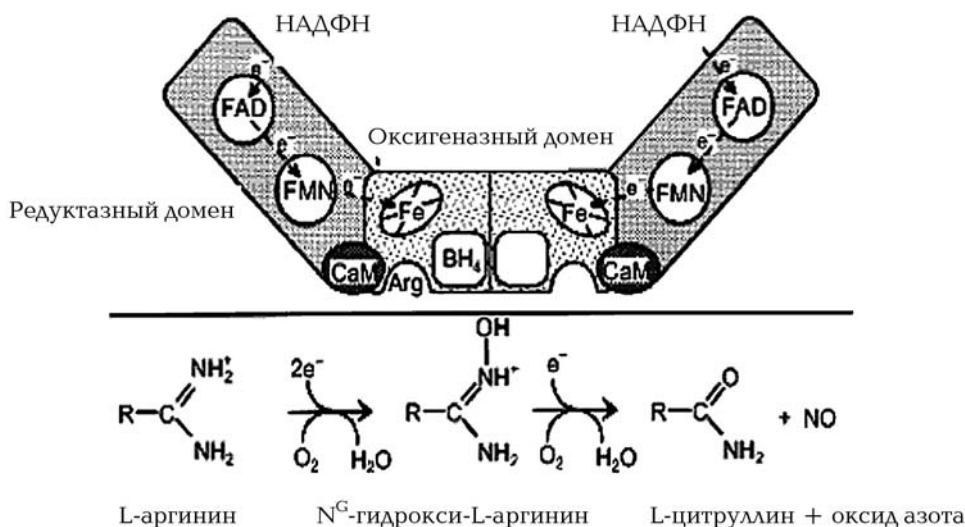


Рис. 1. **Схема доменов гомодимера NOS.** Показаны общие для всех изоформ три домена, кофактор и субстратсвязывающие центры, предполагаемый путь электронов (e⁻) через фермент. В данном случае фермент имеет только один BH₄ [45]

тральных эффектах лигандов проявляются в области геометрии «кармана» гема. BH₄ связывается с оксигеназным доменом, возможно, в непосредственной близости к субстрату — L-аргинуину. По аналогии с функциями, которые биоптерин выполняет в других ферментах, при связывании ожидается переход диссоциированного электрона, но прямых доказательств этого нет. Известно, что BH₄ стимулирует димеризацию, переход «низкий спин — высокий спин» в геме и увеличивает сродство фермента к L-аргинуину [45]. В условиях недостатка кофактора тетрагидробиоптерина eNOS способна продуцировать супероксид-анион (O₂⁻) или перекись водорода (H₂O₂). При недостатке L-аргинина фермент также вырабатывает H₂O₂, т.е. проявляется его НАДФН-оксидазная активность. В некоторых работах показано, что NOS постоянно продуцирует H₂O₂ даже при оптимальных концентрациях кофактора и субстрата, т.е. NOS может продуцировать ряд активных кислородных метаболитов помимо NO [3, 5].

Особенностью eNOS является способность к димеризации субъединиц на N-концевом участке молекулы. У eNOS, в отличие от других изоформ, в этой области находится короткая N-терминальная последовательность, в которой расположены три центра ацилирования жирных кислот, необходимые для взаимодействия с мишенью и мембранного связывания [3, 6]. Молекула NOS активна в виде гомодимера, который образуется путем межмолекулярного контакта в области кальмодулинсвязывающего домена. Предполагается, что при образовании димера «голова» одного димера соединяется с «хвостом» другого [6] (см. рис. 1). Таким образом, NOS следует рассматривать как сложный ферментный комплекс, синтезирующий высокоактивные соединения в зависимости от функционального состояния клетки.

Функциональная роль NO в клетках

Две Ca²⁺-зависимые изоформы (eNOS и nNOS) могут не присутствовать только в эндотелиальных и нейрональных клетках, но и в других типах клеток, или содержаться в этих клетках одновременно [6]. Они, возможно, являются частью различных сигнальных путей, и их роль заключается в повышении уровня Ca²⁺ и цГМФ, который служит пусковым механизмом связывания NO с его основной мишенью — растворимой гуанилатциклазой (pГЦ) [3,7]. Далее цГМФ может модулировать работу цГМФ-зависимых Ca²⁺-каналов плазмалеммы, снижая их активность, или активировать G-киназы (цГМФ-зависимые протеинкиназы). Активация последних приводит, например, к фосфорилированию фосфоламбана — белка, регулирующего активность Ca²⁺-насоса саркоплазматического ретикулула (СР), и усилению депонирования в нем Ca²⁺. Кроме того, G-киназы стимулируют протеинфосфатазу, дефосфорилирующую K⁺-каналы, и активируют последние. Эти процессы направлены на снижение уровня свободного Ca²⁺ в цитоплазме клеток. Кроме того, NO может оказывать активирующее действие через цГМФ-зависимые механизмы на фермент цАДФ-рибозилтрансферазу. Образование цАДФ-рибозы — агониста риадиноновых рецепторов — усиливает выход Ca²⁺ из СР. Таким образом, NO посредством цГМФ, может как снижать, так и повышать концентрацию свободного Ca²⁺ в цитозоле. Функциональная активность и токсическое действие NO зависят от его концентрации в клетках. В наномолярных и более низких концентрациях NO регулирует функциональную активность клеток, его умеренная гиперпродукция приводит к апоптозу, а более высокие концентрации вызывают некроз тканей [3].

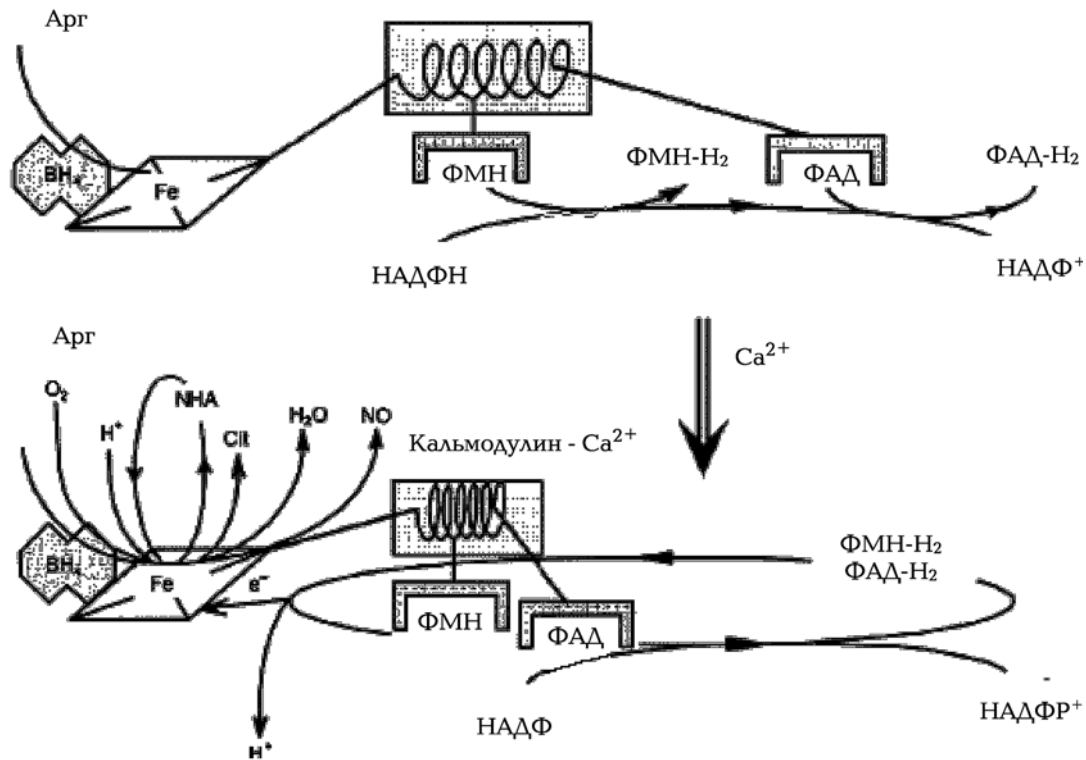
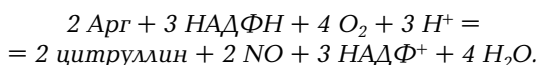


Рис. 2. Биосинтез NO. В верхней части рисунка приведена схема активного фермента в отсутствие ионов Ca^{2+} . НАДФН редуцирует флавины (ФМН, ФАД), но гем остается нередуцированным. Аргинин (Арг) и биоптерин BH_4 (слева) связываются в активном центре, но не окисляются. Внизу показано, что связывание Ca^{2+} вызывает пространственные структурные изменения и комбинирование системы электронов (e^-) флавинов и гема. Гем редуцируется, связывает O_2 , окисляет аргинин в N-гидрокси-L-аргинин (NHA) и затем в процессе второго цикла — в цитруллин (Cit) и NO [45]

Биохимические механизмы синтеза NO

Полное уравнение NOS-катализируемой реакции включает 5-электронное окисление ($N^{3-} \rightarrow N^{2+}$) атома азота L-аргинина (Арг), связанного с окислением НАДФН как источника электронов в присутствии O_2 имеет следующий вид:



В настоящее время различают следующие этапы этой реакции: каждая субъединица является гибридом цитохром Р450-подобного фермента и НАДФН-зависимой редуктазы; НАДФН (первый субстрат) связывает в редуктазном домене молекулу, содержащую флавины (ФАД, ФМН); кальций и кальмодулин вызывают структурные конформационные изменения, обеспечивающие передачу электронов от флавинов к гему; L-аргинин (второй субстрат) и кофактор BH_4 связываются в соседней с гемом области; O_2 (третий субстрат) взаимодействует с редуцированным железом гема, окисляет его и затем активирует; комплекс гем—кислород окисляет L-аргинин (и, возможно, BH_4 , который на последующей стадии редуцируется), образуя N-гидрокси-L-аргинин (NHA) (промежуточный продукт); второй атом молекулы O_2 высвобождается в виде молекулы воды (первый продукт), и гем снова редуцируется и связывает новую молекулу кислорода; второй комплекс гем—

кислород окисляет NHA, образуя NO (второй продукт) и цитруллин (третий продукт) (рис. 2).

Роль NO в регуляции сосудистого гомеостаза

NO является ключевым регулятором сосудистого гомеостаза. Физиологическую и патофизиологическую роль этой молекулы интенсивно изучают. Создание в последнее десятилетие генетически модифицированных моделей животных в исследовании сосудистой функции позволило не только получить интересные научные данные, но и найти им клиническое применение [22]. Новые технологии открывают неограниченные возможности для исследования физиологии сосудов, их патологии и обеспечивают базисную терапию при заболеваниях сердечно-сосудистой системы [26, 33].

В сосудистом эндотелии NO представляет собой короткоживущий (не более 1 с) вазоактивный субстрат, который играет ключевую роль в релаксации и снижении миграции и пролиферации сосудистых гладкомышечных клеток (ГМК), ингибировании адгезии тромбоцитов и лейкоцитов к эндотелию, ингибировании окисления липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [35]. NO может ингибировать многие ключевые звенья атерогенеза. Изменение продукции NO в сосудистом эндотелии отвечает за патогенез атеросклероза (АС). Функциональные варианты гена eNOS влияют на индивидуальную предрасположенность к АС.

Блокирование гена eNOS приводит к развитию гипертензии, в то время как у мышей с заблокированным pNOS или iNOS таких нарушений не отмечено. Сверхэкспрессия eNOS в мышечных клетках и каротидной артерии препятствует формированию неинтимы после балонного повреждения, что свидетельствует о роли NO в контроле пролиферации ГМК и ремоделировании сосудов [31, 32]. В 1996 г. S.P. Jonssen и другие ученые показали, что сверхэкспрессия eNOS в клетках адвентиции и эндотелиальных клетках сосудов легких предотвращает индуцированную гипоксией легочную гипертензию [24]. В других исследованиях продемонстрировано, что eNOS повышает продукцию NO и цГМФ эндотелии в ГМК, снижая эффект вазоконстрикции, вызванный фенилэфрином, и обеспечивает эндотелийзависимую релаксацию в ответ на ацетилхолин. В дальнейшем были проведены эксперименты с NO при различных патологических состояниях: гиперхолестеринемии, диабете. Установлено, что недостаток или ускоренный распад NO приводят к развитию сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с нарушением функции эндотелия, повышением тонуса сосудов и артериального давления (гипертензия, стенокардия, АС, диабетическая ангиопатия и др.) [37].

Регуляция экспрессии и транскрипции гена eNOS и стабильность мРНК

Прогрессу в понимании молекулярных механизмов, вовлеченных в конститутивную и регулирующую экспрессию мРНК гена eNOS, способствовало применение нового подхода к изучению эндотелиальной генной регуляции в норме и при патологии. Проводятся исследования по выяснению механизмов как транскрипции, так и стабильности мРНК гена eNOS — двух процессов, поддерживающих уровень eNOS в сосудистом эндотелии. Конститутивная экспрессия eNOS зависит от уровня транскрипции промоторной области, включая позитивную и негативную регуляцию, взаимодействия белок—белок и белок—ДНК, эпигенетические события, такие как регуляторная экспрессия гена eNOS на посттранскрипционном уровне. Конститутивная активность является основным фактором, поддерживающим уровень eNOS, однако различные физиологические и патофизиологические факторы, влияющие на уровень транскрипции гена, также имеют важное значение для продукции eNOS и NO. Например, повышение уровня транскрипции мРНК гена eNOS происходит в ответ на лизофосфатидилхолин, на напряжение сдвига (shear stress) и на трансформирующий фактор роста бета (ТФР-β) и др. При обычных условиях мРНК гена eNOS остается достаточно стабильной. Транскрипционный механизм в отдельных случаях является критически важным регуляторным путем в снижении экспрессии eNOS. При исследовании стабильности мРНК гена eNOS, в значительной степени определяющей уровень и активность eNOS, были получены неожиданные результаты. Эти исследования

определили новое направление в изучении регуляции гена при патологии. Стабильность мРНК гена eNOS может в значительной степени изменяться в зависимости от целого ряда факторов. В то же время дестабилизация мРНК гена eNOS играет важную роль в быстром снижении уровня ее экспрессии в моделях воспаления, пролиферации/повреждения, окисления ЛПНП и гипоксии [13, 46]. Период полужизни мРНК гена eNOS составляет от 24 до 48 ч. Высокая базальная стабильность транскриптов eNOS зависит от структуры 3'-нетранслируемой области гена [8, 43]. После стимуляции клетки различными индукторами период полужизни мРНК может резко сокращаться, что при неизменном уровне транскрипции влияет на концентрацию мРНК гена eNOS.

В настоящее время определены хромосомная локализация и нуклеотидные последовательности генов трех основных изоформ NOS. Так, ген эндотелиальной изоформы (тип III) локализован в 7-й хромосоме в позиции 7q35 — 7q36. Помимо известных трех форм, из гепатоцитов была выделена индуцибельная NOS, рекомбинантная ДНК которой имела нуклеотидную последовательность, на 80% гомологичную макрофагальной NOS и на 50% — синтазам из эндотелиоцитов и нейронов. Эта NOS обладает уникальными свойствами, характерными как для индуцибельной (индуцируется комбинацией факторов: интерлейкином-1, фактором некроза опухоли α (ФНО-α), интерфероном γ и липополисахаридами), так и для конститутивной NOS [39, 42].

Матричная РНК гена eNOS кодируется 4052 нуклеотидами, ген представлен единственной копией в гаплоидном геноме человека. Последовательности в 5'-фланкирующем участке представлены многочисленными потенциальными цис-регуляторными последовательностями ДНК: Sp1, GATA, AP-1, NF-1, элементом, отвечающим за напряжение сдвига, и элементом, отвечающим за регуляцию стеролом [25, 30]. Тем не менее, механизм базальной транскрипции eNOS недостаточно изучен в плане идентификации двух цис-положительных регуляторных элементов в проксимальной области гена eNOS.

Экзогенные и эндогенные индукторы eNOS

В исследованиях, проведенных на культуре эндотелиальных клеток, J.K. Liao с соавт. впервые обнаружили, что окисленные ЛПНП вызывают время- и дозозависимое снижение конститутивного уровня мРНК гена eNOS и активности фермента [35]. Этот эффект был обусловлен уменьшением периода полужизни мРНК гена eNOS с 36 до 10 ч, т. е. посттранскрипционной регуляцией. Низкая концентрация окисленных ЛПНП может быть связана с парадоксальным повышением экспрессии мРНК и белка [21]. Очень высокий уровень нативных ЛПНП снижал экспрессию мРНК гена eNOS [13]. В культуре эндотелиальных клеток лизофосфатидилхолин (ЛФХ) — основной компонент окисленных ЛПНП — мог повышать уровень мРНК гена eNOS. Возможно, этим объясняется двухфазный эффект различ-

ных доз окисленных ЛПНП. ЛФХ повышает уровень мРНК гена NOS на уровне регуляции транскрипции, связанной с Sp-1- и Ets-сайтами.

Роль нарушения тока крови при АС достаточно хорошо изучена, однако эффект влияния изменения кровотока на экспрессию eNOS продолжает оставаться в центре внимания исследователей. Изучение роли эндотелия на моделях животных при изменении кровотока, индуцированного нагрузками, и вазодилатации показало повышение экспрессии мРНК гена eNOS. Изменение уровня молекулы фермента было связано с индукцией экспрессии мРНК гена eNOS посредством транскрипции. В то же время, мыши линии eNOS^{-/-} не способны к ремоделированию сосудов в ответ на напряжение сдвига (shear stress), который зависит от ядерного фактора каппа В (NF-κB) [17]. За индуцированную транскрипционную активность напряжения сдвига в фетальных эндотелиальных клетках отвечает элемент AP-1 (-661), что свидетельствует о регуляции eNOS в процессе развития различными путями [18, 47].

Представители суперсемейства ТФР-β играют ключевую роль в регуляции роста и развития. В частности, ТФР-β₁ является важным медиатором в васкулярном иммуноповреждении, ремоделировании сосудов, васкулогенезе и ангиогенезе. Как показано на различных культурах эндотелиальных клеток, ТФР-β дозозависимым способом повышает уровень экспрессии мРНК гена eNOS и трансктивирует промотор гена eNOS посредством рибонуклеопротеиновых комплексов, содержащих SMAD- и NF-1-сайты [44].

При АС ФНО-α снижает эндотелийзависимую вазорелаксацию. Этот процесс опосредуется снижением базального уровня мРНК гена eNOS [42]. ФНО-α значительно снижает период полужизни мРНК (с 48 ч до 3 ч). Молекулярные механизмы, обуславливающие этот эффект, длительное время не удавалось выяснить [46]. Инкубация клеток с ФНО-α повышала формирование рибонуклеопротеиновых комплексов в 3'-нетранслируемом участке гена eNOS [8, 43]. Формирование этих комплексов отрицательно коррелировало с уровнем мРНК гена eNOS. Несмотря на то, что была определена молекулярная масса белка (60 кДа), этот связывающий фактор, индуцируемый ФНО-α, не удалось идентифицировать. Взаимодействие рибонуклеопротеинового комплекса с различными вариантами гиперварианбельной области мРНК гена eNOS обуславливает сложный механизм, обеспечивающий стабильность базальных транскриптов гена eNOS и ответ на различные клеточные стимулы [28, 44].

Липополисахариды (ЛПС) как сами по себе, так и в комплексе с цитокинами индуцируют существенное снижение уровня мРНК гена eNOS [14, 23]. Обработка культуры эндотелиальных клеток ЛПС и актиномицином D снижает уровень мРНК гена eNOS в большей степени, чем только одним актиномицином D. Некоторыми исследователями показано, что клеточный ответ (синтез eNOS) на действие ЛПС осуществляется в два этапа. На са-

мом деле, эффект ФНО-α и ЛПС на экспрессию гена eNOS и общую регуляцию при сепсисе в условиях *in vivo* является еще более сложным [40].

Роль эндотелиального фактора роста сосудов (ЭФРС) в развитии кровеносных сосудов, биологии эндотелия и сосудистых заболеваний остается малоизученной. Для исследователей представляет интерес связь между ЭФРС и соотношением eNOS/NO. Этот фактор улучшает ангиогенез у мышей линии eNOS^{-/-}, что доказывает роль eNOS как снижающего медиатора ЭФРС-индуцированного ангиогенеза. A. Bouloumié с соавт. показали, что в культуре эндотелиальных клеток ЭФРС время- и дозозависимым способом увеличивает экспрессию мРНК гена eNOS [11]. Механизм, посредством которого ЭФРС усиливает экспрессию мРНК гена eNOS, до сих пор неясен [9].

Как выяснилось, применение циклоспорина А при иммуносупрессорной терапии сопровождается гипертензией. Этот гипертензивный эффект связывали с паракринной вазоконстрикцией. В то же время было установлено, что циклоспорин А вызывает также существенное повышение продукции NO *in vivo* и *in vitro*. Преинкубация культуры эндотелиальных клеток с циклоспорином А ведет к повышению экспрессии NO путем стимулирования транскрипции гена eNOS. Предполагают, что этот эффект циклоспорина обусловлен реактивными формами кислорода такими, как гидрперекиси. Реактивный кислород индуцирует активность AP-1 элемента промоторной области гена [41]. Перекись водорода активировала eNOS через механизмы, зависящие от Jak2, кальмодулин-киназы II и элемента промоторной области гена Sp-1 [12, 20, 36].

Гипоксия

Гипоксия связана с двумя эффектами: снижением и повышением уровня экспрессии мРНК гена eNOS, которые зависят как от транскрипционных, так и посттранскрипционных событий [24]. U.A. Arnet с соавт. установили, что гипоксия индуцирует повышение мРНК гена eNOS в культуре эндотелиальных клеток, обусловленное увеличением транскрипционной активности гена [10]. F. Coulet с соавт. констатировали двухфазный ответ изменения уровня мРНК гена eNOS в клетках эндотелия. Начальное повышение мРНК было результатом индукции транскрипции, обусловленным гипоксизависимым энхансерным элементом, содержащим два сайта связывания [16]. Противоречивые результаты объясняются неадекватностью условий экспериментов, в частности разной степенью гипоксии, различными типами клеток, несоответствием моделей. Приведенные доказательства свидетельствуют о том, что NO может модулировать экспрессию мРНК различных изоформ NOS, включая eNOS. Возможно, что различные модели *in vivo* и *in vitro* могут отражать отличия в регуляторных механизмах по типу обратной связи [39]. В эксперименте и клинике для лечения сердечно-сосудистых заболеваний часто используется адапта-

ция к гипоксии. Было установлено, что тяжелая или хроническая гипоксия угнетает синтез NO в эндотелии. При умеренной гипоксии активность eNOS увеличивается в результате повышения концентрации внутриклеточного Ca^{2+} , уровень которого коррелирует с содержанием эндотелиального NO. Для ферментативного окисления L-аргинина с участием NOS требуется кислород. При ишемии/гипоксии NOS-синтазный механизм ингибируется. В то же время дефицит кислорода активизирует более мощную нитритредуктазную компоненту, которая замыкает цепь метаболических превращений NO в цикле без участия eNOS [6].

Терапевтический эффект статинов опосредуется повышением уровня мРНК eNOS

Научный и практический интерес представляют механизмы, посредством которых статины (ингибиторы гидроксиз-3-метилглутарил-коэнзим А (ГМГ-КоА) редуктазы) изменяют липиднезависимую сердечно-сосудистую защиту. Основное внимание сфокусировано на вазоактивных и ангиогенных свойствах статинов и возможной роли eNOS в опосредовании этих эффектов. Симвастатин и ловастатин, например, снижают зону ишемического церебрального инфаркта путем увеличения церебрального тока крови при нормохолестеринемии [27]. Этот цереброваскулярный нейропротекторный эффект регулируется повышением уровня мРНК гена eNOS. При ишемии у мышей линии eNOS^{-/-} статины не проявляют защитного действия.

Статины предотвращают снижение экспрессии гена eNOS, вызванное окисленными ЛПНП, гипоксией и ФНО- α [34]. Ингибирование ГМГ-КоА-редуктазы сопровождается повышением экспрессии гена eNOS в эндотелиальных клетках путем увеличения периода полужизни мРНК [19]. Последующие эксперименты показали, что индуцированное статинами повышение полужизни мРНК гена eNOS соответственно от 28 до 46 ч и от 14 до 27 ч, не изменяет транскрипционную активность. Факт пролонгирования полужизни транскрипта гена eNOS согласуется с полученными результатами, свидетельствующими о трехкратном повышении уровня мРНК гена eNOS после 24-часовой экспозиции клеток со статинами. Эффект влияния ингибирования ГМГ-КоА-редуктазы на уровень мРНК гена eNOS также связан с изменениями в изопреноидном синтезе и Rho/ГТФазной белковой активностью [29]. Посттрансляционные события также влияют на эффект статинов в отношении изменения уровня мРНК гена eNOS. Ингибирование ГМГ-КоА-редуктазы приводит к активации протеинкиназы Akt (протеинкиназы B) и влияет на посттрансляционное фосфорилирование белка eNOS [18, 38]

Полиморфизм eNOS при сердечно-сосудистой патологии

Еще одним существенным фактором, влияющим на уровень экспрессии гена eNOS, является поли-

морфизм гена [15]. Частота мутаций в различных популяциях существенно отличается, чем может в значительной степени поясняться не только распространенность той или иной патологии в различных этнических группах и популяциях, но и сам характер протекания заболевания.

При исследовании Glu298Asp мутации гена eNOS (7-й экзон) была установлена связь генотипа Asp с сердечно-сосудистой патологией. Гомозиготы Asp/Asp характеризуются более низкой активностью eNOS по сравнению с Glu/Glu генотипом. Другим возможным механизмом влияния этого полиморфизма на уровень/активность eNOS может быть его неравновесие по сцеплению с еще неустановленными функциональными вариантами гена eNOS. Итальянскими исследователями при скринировании популяции с целью определения распространенности T786C полиморфизма в 5'-нетранслируемой области гена и его связи с патологией было установлено, что гомозиготы C786 чаще встречаются среди пациентов с АС коронарных артерий по сравнению с группой контроля соответственно 24,6 и 14,5%. Риск развития патологии был в 2,5 раза выше у C786 гомозигот СС по сравнению с гомозиготами ТТ. Таким образом, была установлена ассоциация этого типа полиморфизма с АС коронарных артерий, которая не зависела от других факторов риска. Результаты были подтверждены при исследовании других европейских популяций. Между этими двумя типами мутаций было установлено значительное неравновесие по сцеплению. При исследовании британской популяции не была выявлена связь этих полиморфизмов с уровнем NO плазмы и риском инфаркта миокарда [15].

Была также установлена связь между T786C полиморфизмом и системой оценки критериев риска Duke — прогностическим индексом, который учитывает не только количество стенозированных сосудов, но и процент сужения, анатомическую локализацию стенозов. На основании результатов исследования этой связи было сделано предположение о влиянии мутации на процесс ремоделирования сосудов при АС путем изменения продукции NO, что, в свою очередь, может влиять на миграцию и пролиферацию ГМК. Эта гипотеза была подтверждена при исследовании мутантной линии мышей, у которых отмечено парадоксальное утолщение стенок сосудов, сопровождающееся гиперплазивным ответом артериальной стенки при наложении лигатуры на каротидную артерию, что указывает на связь мутации с патологическим ремоделированием, изменением сосудистой стенки, морфологически сходным с атеросклеротическим [15].

Выводы

В поддержании уровня NO в организме участвуют несколько систем (ферментативная, связанная с окислением L-аргинина в присутствии кислорода, и нитритредуктазная, активизирующаяся в условиях дефицита кислорода). Регуляция гена

eNOS представляє собою складний процес, а кінцева концентрація функціональної eNOS залежить від діяння багатьох факторів, включаючи активність промоторного отвѣта, впливання посттран-

сляційних факторів, забезпечуючих визначений період полужизни мРНК, регуляцію експресії в отвѣт на різні фізіологічні стимули.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Арзамасцев А.П. Экзогенные доноры оксида азота и ингибиторы NO-синтаз // Вестн. РАМН.— 2003.— № 12.— С. 88—95.
2. Викторов И.В. Роль оксида азота и других свободных радикалов в ишемической патологии мозга // Вестн. АМН Украины.— 2000.— № 3.— С. 5—10.
3. Данилович Ю.В. Взаимосвязь образования NO и H₂O₂ и их роль в регуляции ионного гомеостаза клеток // Укр. біохім. журн.— 2001.— Т. 73, № 3.— С. 5—21.
4. Затейщикова А.Д., Затейщиков Д.А. Эндотелиальная регуляция сосудистого тонуса: методы исследования и клиническое значение // Кардиол.— 1998.— Т. 38.— № 9.— С. 68—80.
5. Зенков Н.К., Меньшиков Е.Б., Реутов В.П. NO-синтазы в норме и при патологии различного генеза // Вестн. АМН Украины.— 2000.— № 3.— С. 30—35.
6. Реутов В.П. Медико-биологические аспекты циклов оксида азота и супероксидного анион-радикала // Вестн. АМН Украины.— 2000.— № 3.— С. 35—41.
7. Северина И.С., Буссыгина О.Г., Пятакова Н.В. Активация растворимой гуанилатциклазы новыми донорами NO как основа направленного поиска новых эффективных вазодилататоров и антиагрегантов // Вестн. АМН Украины.— 2000.— № 3.— С. 25—30.
8. Alonso J., Sanchez de Miguel L., Monton M. et al. Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha // Mol. Cell Biol.— 1997.— Vol. 17.— P. 5719—5726.
9. Arnet U.A., McMillan A., Dinerman J.L. et al. Regulation of endothelial nitric-oxide synthase during hypoxia // J. Biol. Chem.— 1996.— Vol. 271.— P. 15069—15073.
10. Aoki N., Siegfried M., Lefer A.M. Anti-EDRF effect of tumor necrosis factor in isolated, perfused cat carotid arteries // Am. J. Physiol.— 1989.— Vol. 256.— P. H1509—H1512.
11. Bouloumie A., Schini-Kerth V.B., Busse R. Vascular endothelial growth factor up-regulates nitric oxide synthase expression in endothelial cells // Cardiovasc. Res.— 1999.— Vol. 41.— P. 773—780.
12. Cai H., Davis M.E., Drummond G.R., Harrison D.G. Induction of endothelial NO synthase by hydrogen peroxide via a Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase II/janus kinase 2-dependent pathway // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.— 2001.— Vol. 21.— P. 1571—1576.
13. Cieslik K., Abrams C.S., Wu K.K. Up-regulation of endothelial nitric-oxide synthase promoter by the phosphatidylinositol 3-kinase gamma/Janus kinase 2/MEK-1-dependent pathway // J. Biol. Chem.— 2001.— Vol. 276.— P. 1211—121.
14. Chavakis E., Dernbach E., Hermann C. et al. Oxidized LDL inhibits vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration by an inhibitory effect on the Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway // Circulation.— 2001.— Vol. 103.— P. 2102—2107.
15. Colombo M.G., Paradossi U., Andreassi M.G. et al. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of coronary artery disease // Clin. Chem.— 2003.— Vol. 49.— P. 389—395.
16. Coulet F., Nadaud S., Agrapart M., Soubrier F. Identification of hypoxia response element in the human endothelial nitric oxide synthase gene promoter // J. Biol. Chem.— 2003.— Vol. 17.— P. 235—248.
17. Davis M.E., Grumbach I.M., Fukui T. et al. Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase promoter activity through nuclear factor Kappa-B binding // J. Biol. Chem.— 2003.— Vol. 78.— P. 170—174.
18. Dimmeler S., Fleming I., Fisslthaler B. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation // Nature.— 1999.— Vol. 399.— P. 601—605.
19. Endres M., Laufs U., Huang Z. et al. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase // Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.— 1998.— Vol. 95.— P. 8880—8885.
20. Fulton D., Gratton J.P., Sessa W.C. Post-translational control of endothelial nitric oxide synthase: why isn't calcium/calmodulin enough? // J. Pharmacol. Exp. Ther.— 2001.— Vol. 299.— P. 818—824.
21. Hirata K., Miki N., Kuroda Y. et al. Low concentration of oxidized low-density lipoprotein and lysophosphatidylcholine upregulate constitutive nitric oxide synthase mRNA expression in bovine aortic endothelial cells // Circ. Res.— 1995.— Vol. 6.— P. 958—962.
22. Huang P.L. Mouse models of nitric oxide synthase deficiency // J. Am. Soc. Nephrol.— 2000.— Vol. 11.— P. S120—S123.
23. Iwase K., Miyataka K., Shimizu A. et al. Induction of endothelial nitric-oxide synthase in rat brain astrocytes by systemic lipopolysaccharide treatment // J. Biol. Chem.— 2000.— Vol. 275.— P. 11929—11933.
24. Justice J.M., Tanner M.A., Myers P.R. Endothelial cell regulation of nitric oxide production during hypoxia in coronary microvessels and epicardial arteries // J. Cell Physiol.— 2000.— Vol. 182.— P. 359—365.
25. Karantzioulis-Fegaras F., Antoniou H., Lai S. et al. Characterization of the human endothelial nitric oxide synthase promoter // J. Biol. Chem.— 1999.— Vol. 274.— P. 3076—3093.
26. Katusic Z.S., Caplice N.M., Nath K.A. Nitric oxide synthase gene transfer as a tool to study biology of endothelial cells // Arteriosclerosis, Thrombosis and Biology.— 2003.— Vol. 23.— P. 729—736.
27. Kureishi Y., Luo Z., Shiojima I. et al. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals // Nat. Med.— 2000.— Vol. 6.— P. 1004—1010.
28. Lai P.F., Mohamed F., Monge J.C., Stewart D.J. Downregulation of eNOS mRNA expression by TNFalpha: identification and functional characterization of RNA-protein interactions in the 3'UTR // Cardiovasc. Res.— 2003.— Vol. 59.— P. 160—168.
29. Laufs U., Liao J.K. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase // J. Biol. Chem.— 1998.— Vol. 273.— P. 24266—24271.
30. Laumonier Y., Nadaud S., Agrapart M., Soubrier F. Characterization of an upstream enhancer region in the promoter of the human endothelial nitric-oxide synthase gene // J. Biol. Chem.— 2000.— Vol. 275.— P. 40732—40741.
31. Lee P.C., Salyapongse A.N., Bragdon G.A. et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice // Am. J. Physiol.— 1999.— Vol. 277.— P. H1600—H1608.

32. Lee S.W., Trapnell B.C., Rade J.J. et al. In vivo adenoviral vector-mediated gene transfer into balloon-injured rat carotid arteries // *Circ. Res.*— 1993.— N 73.— P. 797—807.
33. von der Leyen H.E., Dzau V.J. Therapeutic potential of nitric oxide synthase gene manipulation // *Circulation.*— 2001.— Vol. 103.— P. 2760—2765.
34. Li D.Y., Chen H.J., Mehta J.L. Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation // *Cardiovasc. Res.*— 2001.— Vol. 52.— P. 130—135.
35. Liao J.K., Shin W.S., Lee W.Y., Clark S.L. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase // *J. Biol. Chem.*— 1995.— Vol. 270.— P. 319—324.
36. Lopez-Ongil S., Hernandez-Perera O., Navarro-Antolin J. et al. Role of reactive oxygen species in the signalling cascade of cyclosporine A-mediated up-regulation of eNOS in vascular endothelial cells // *Br. J. Pharmacol.*— 1998.— Vol. 124.— P. 447—454.
37. Lund D.D., Faraci F.M., Miller F.J. Jr., Heistad D.D. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase improves relaxation of carotid arteries from diabetic rabbits // *Circulation.*— 2000.— Vol. 101.— P. 1027—1033.
38. Luo Z., Fujio Y., Kureishi Y. et al. Acute modulation of endothelial Akt/PKB activity alters nitric oxide-dependent vasomotor activity in vivo // *J. Clin. Invest.*— 2000.— Vol. 106.— P. 493—499.
39. Marsden P.A., Heng H.H., Scherer S.W. et al. Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene // *J. Biol. Chem.*— 1993.— Vol. 268.— P. 17478—17488.
40. Morikawa A., Koide N., Kato Y. et al. Augmentation of nitric oxide production by gamma interferon in a mouse vascular endothelial cell line and its modulation by tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide // *Infect. Immun.*— 2000.— Vol. 68.— P. 6209—6214.
41. Navarro-Antolin J., Rey-Campos J., Lamas S. Transcriptional induction of endothelial nitric oxide gene by cyclosporine A. A role for activator protein-1 // *J. Biol. Chem.*— 2000.— Vol. 275.— P. 3075—3080.
42. Neumann P., Gertzberg N., Johnson A. TNF{alpha}-induces a decrease in eNOS-promoter activity // *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*— 2003.— Vol. 7.— P. 437—443.
43. Robb G.B., Tai S.C., Mawji I.A. et al. Functional characterization of eNOS 3'-mRNA regions: efficient translation and active stabilization of oligo(A) transcripts // *Nitric Oxide.*— 2002.— P. 454.
44. Saura M., Zaragoza C., Cao W. et al. Smad2 mediates transforming growth factor-beta induction of endothelial nitric oxide synthase expression // *Circ. Res.*— 2002.— Vol. 91.— P. 806—813.
45. Sennequier N., and Stuehr D. J. The versatile and complex enzymology of nitric oxide synthase // *Biochemistry.*— 1996.— Vol. 5.— P. 5883—5892.
46. Tai S.C., Robb G.B., Marsden P.A. Endothelial nitric oxide synthase.— 2004.— Vol. 24.— P. 405—423.
47. Wedgwood S., Mitchell C.J., Fineman J.R., Black S.M. Developmental differences in the shear stress-induced expression of endothelial NO synthase: changing role of AP-1 // *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.*— 2003.— Vol. 284.— P. L650—L662.

БІОХІМІЧНІ ТА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ СИНТЕЗУ ОКСИДУ АЗОТУ ЕНДОТЕЛІАЛЬНОЮ NO-СИНТАЗОЮ В НОРМІ ТА ПРИ СЕРЦЕВО-СУДИННІЙ ПАТОЛОГІЇ

Н.А. Кравченко, Н.В. Ярмиш

Оксид азоту — внутрішньоклітинний месенджер — звичайний метаболічний продукт, бере активну участь у регуляції фізіологічно важливих функцій серцево-судинної, імунної та нервової системи. В серцево-судинній системі він регулює скорочення серця, клітинну проліферацію, тонус судин і тиск крові. За умов надмірної продукції NO спричинює розвиток септичного, кардіогенного, термального та інших видів шоку. Перенесення гена eNOS в ендотеліальні клітини залишається одним із методів вивчення складових характерних ефектів високих локальних концентрацій NO на вазомоторну функцію. Рівень транскриптів eNOS підвищується у відповідь на лізофосфотидилхолін, зміщення напруги, ТФР-β та інші чинники. За звичайних умов мРНК гена eNOS визначається стабільністю, однак за певних умов посттранскрипційні механізми є важливим регуляторним шляхом зниження експресії гена eNOS. У моделях запалення, проліферації/пошкодження, окислення ліпопротеїдів низької щільності, гіпоксії дестабілізація мРНК гена eNOS сприяє швидкому зниженню її рівня.

BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR GENETIC MECHANISMS OF NITRIC OXIDE SYNTHESIS THE REGULATION BY ENDOTHELIAL NITRIC OXIDE SYNTHASE AT NORMAL AND IN THE INJURED BLOOD VESSEL

N.A. Kravchenko, N.V. Yarmish

Nitric oxide (NO), an intercellular messenger and a normal metabolic product, takes an active part in the regulation of physiologically significant functions of cardiovascular, immune, and nervous systems. In the cardiovascular system, it regulates cardiac contractility, cell proliferation, vascular tone, and blood pressure. At same time when produced in excess amounts, NO makes a contribution to the development of septic, cardiogenic, thermal, and other shocks. eNOS gene delivery to endothelial cells will continue to provide a powerful approach in studies designed to characterize the effects of high local concentrations of nitric oxide on vasomotor function. eNOS transcription rates increase in response to lysophosphatidylcholine, shear stress, and TGF-β, among others. Under basal conditions, eNOS mRNA is extremely stable. Surprisingly, posttranscriptional mechanisms have emerged as important regulatory pathways in the observed decreases in eNOS expression in some settings. In models of inflammation, proliferation/injury, oxidized low-density lipoprotein treatment, and hypoxia, eNOS mRNA destabilization plays a significant role in the rapid downregulation of eNOS mRNA levels.