

остается открытым. Аналогичным образом происходит и экзоцитоз – опорожнение везикул через плазмалемму.

Таким образом, плазмалемма эндотелиоцитов чрезвычайно динамична как в норме, так и особенно в условиях воздействия вредных факторов. Она может быть как легко проницаема для жидкостей и электролитов, так и вовсе непроницаема.

Плазмалемма эндотелиоцитов как легко уязвима, так и стойка к повреждающим факторам. Все зависит от количества повреждающего фактора, длительности воздействия.

Эндотелиальные клетки без крови в сосудах быстро, в течение 21 секунды погибают, поэтому фактор постоянного тока крови является важным для ее нормальной функции и структуры.

Микропоры в плазмалемме эндотелиальных клеток легко проницаемы. Это четко видно при использовании контрастных маркеров (ферритин, миоглобин, эванс-блю и др.) путем раздвижения молекулы белка и фосфолипидного бислоя. В работе приводятся примеры различных структурных изменений плазмалеммы эндотелиоцитов различных экспериментальных и патологических условиях.

Для полного понимания патологических состояний плазмалеммы эндотелиоцитов кровеносных капилляров следует учитывать процессы обмена не только в белково-липидном слое, но и в гликокаликсе, эктоплазме и цитоплазме клетки.

РЕДОКС-РЕГУЛЯЦИЯ ДИНАМИЧЕСКОГО ХАРАКТЕРА ФЕНОТИПА ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

Шебеко В.И.

Витебский государственный медицинский университет, Витебск

Разработка метода культивирования эндотелиальных клеток открыла путь для интенсивного исследования функции этих клеток в условиях *in vitro*. Несомненно, что использование этого метода способствовало значительному прогрессу в понимании свойств эндотелиоцитов. Вместе с тем, многочисленные научные исследования с применением метода культивирования эндотелиоцитов хорошо продемонстрировали существование выраженных различий между результатами таких опытов даже при достаточно полном сходстве экспериментальных условий и одинаковых способах воздействия на эндотелиоциты. Сформировавшееся представление о гетерогенности эндотелиоцитов кровеносных сосудов только отчасти позволило понять, почему так значительно различаются между собой результаты, казалось бы, "одинаковых" экспериментов в

условиях *in vitro*. Сопоставление результатов исследования эндотелиальных клеток *in vitro* и *in vivo* только добавило скепсиса в оценке научной значимости опытов с использованием культуры эндотелиоцитов. Оказалось, что один и тот же способ воздействия на эндотелиоциты часто приводит к совершенно разному ответу этих клеток в условиях *in vitro* и *in vivo*. Этот факт позволил поставить естественный вопрос - как можно объяснить такие различные свойства эндотелиоцитов *in vitro* и *in vivo*? В процессе поиска ответа на этот вопрос сформировалась концепция, в соответствии с которой считается, что действие самых различных факторов животного организма на эндотелиоциты приводит к постоянному динамическому видоизменению их свойств. Явление выраженной модификации фенотипа эндотелиоцитов в условиях *in vitro* ярко продемонстрировано при изучении влияния напряжения сдвига на функцию этих клеток. Оказалось, что изменение только лишь величины действующего на эндотелиальные клетки ламинарного напряжения сдвига или изменение ламинарного характера напряжения сдвига на осциллирующий способно существенно модифицировать ответ эндотелиоцитов на один и тот же стимул. Признание факта чрезвычайно выраженной динамичности фенотипа эндотелиоцитов вынуждает исследователя, с одной, стороны принять позицию агностика, по крайней мере, временно, а с другой стороны, стимулирует его к поиску стереотипных ответов эндотелиальных клеток на различные воздействия и к выяснению важнейших механизмов регуляции их фенотипа.

Вся полнота биологических свойств эндотелиоцитов в животном организме проявляется в условиях их постоянного взаимодействия с плазменными компонентами и клетками крови, с клетками сосудистой стенки и компонентами базальной мембраны, а также со всем тем, что образуется или попадает в кровотоки. Кроме того, эндотелиальные клетки кровеносных сосудов испытывают еще и постоянные воздействия биофизических факторов, существование которых обусловлено периодическими сокращениями сердца и движением крови в сосудах. Все это, в конечном итоге, определяет высокую динамичность фенотипа эндотелиоцитов [14]. Не вызывает сомнений тот факт, что имеется некоторая специфичность влияния различных экзогенных и эндогенных факторов на эндотелиоциты. Вместе с тем, представляется вероятным существование и каких-то общих, универсальных механизмов модификации фенотипа эндотелиальных клеток, через которые опосредуется действие самых различных "стимулов" на эндотелиоциты. Можно допустить, что изменение редокс-состояния эндотелиоцитов кровеносных сосудов является одним из таких универсальных механизмов, который определяет выраженную динамичность фенотипических свойств этих клеток в условиях постоянного действия на них "избыточного" количества физиологических "стимулов", а также действия патогенных факторов.

Наш интерес к механизмам редокс-регуляции клеточных функций возник в связи изучением характера нарушения эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса в условиях активации системы комплемента. Традиционные представления о механизмах воздействия системы комплемента на функцию клеток не позволяли нам объяснить некоторые полученные экспериментальные результаты, в частности, двойственный характер нарушения эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса при активации системы комплемента - одновременное усиление базальной продукции оксида азота и сопутствующее этому нарушение агонистиндуцированного эндотелийзависимого расслабления артерий. Использование современных сведений о редокс-регуляции функции клеток позволило сформулировать новую и, как нам кажется, достаточно интересную гипотезу о механизме регулирующего действия системы комплемента на различные клетки органов и тканей [1, 2]. Теперь кратко рассмотрим общие сведения о редокс-регуляции функции клеток. Следует сразу оговориться, что в настоящее время едва лишь начинают вырисовываться представления о механизмах регуляции свойств эукариотических клеток через изменение их редокс-состояния.

В конце 80-х, начале 90-х годов было показано, что внутриклеточное редокс-состояние определяет стабильность м-РНК ферритинового/трансферринового рецептора, а также активацию таких факторов транскрипции как AP-1 и NF-κB. Эти наблюдения привели в дальнейшем к формулировке концепции, в соответствии с которой редокс-регуляция (через преобладание в клетке процессов окисления или восстановления протеинов и, возможно, других молекул) рассматривается в качестве одного из фундаментальных механизмов регуляции функции эукариотических клеток [7, 8, 11]. Установлено, что в отличие от высоких концентраций активных форм кислорода, вызывающих окислительное повреждение протеинов, липидов и нуклеиновых кислот, промежуточные концентрации активных форм кислорода через механизмы внутриклеточной сигнализации вовлечены в регуляцию клеточной пролиферации, межклеточной адгезии, метаболизма, хемотаксиса, иммунного ответа, мышечного сокращения, апоптоза и др. [4, 6, 12]. Оказалось также, что активные формы кислорода образуются в клетках (дополнительно к постоянному базальному образованию) в ответ на взаимодействие различных лигандов, таких как гормоны, факторы роста и цитокины со своими клеточными рецепторами, причем, лиганд-опосредованная передача внутриклеточного сигнала может блокироваться антиоксидантами. Значит, активные формы кислорода вполне могут сами выполнять функцию вторичных посредников в процессе передачи внутриклеточного сигнала, а также могут оказывать существенное влияние на механизмы передачи внутриклеточных сигналов [4, 9, 10].

Ряд биологически активных протеинов, играющих ключевую роль в процессах внутриклеточной сигнализации и регуляции экспрессии генов,

характеризуются высокой чувствительностью к действию на них активных форм кислорода в концентрациях значительно ниже тех, которые способны вызывать окислительное повреждение таких протеинов. В список редокс-чувствительных молекулярных мишеней входят факторы транскрипции (например, AP-1, NF-κB, Elk-1, Sp-1, HIF-1, и др.), киназы (например, BMK1, JNK, ERK1/2, CDK, p38 MAP киназа и др.), фосфатазы, регуляторы внутриклеточного метаболизма кальция (например, риадиноновый рецептор и L-тип кальциевых каналов) протеины АТФ-зависимых калиевых каналов внутренней мембраны митохондрий, а также протеины, регулирующие внутриклеточное содержание железа - IRP1/IRP2, транспортер глюкозы - GLUT, гемоксигеназа, NMDA-рецептор, аконитаза, шапероны (например, Hsp 33) и целый ряд других биологически активных молекул [4, 8, 9].

Установлено, что $\text{CH}_2\text{-SH}$ группы цистеиновых остатков этих протеинов играют роль "редокс-сенсоров" [8, 11]. Однако в условиях нормальной функции восстанавливающих систем клетки - тиоредоксина, глутатиона и пероксиредоксинов, роль "редокс-сенсоров" играют не все, а только некоторые тиоловые группы протеинов, отличающиеся особенно высокой чувствительностью к окислению. Последний факт представляется очень важным, так как позволяет допустить вполне специфическое действие незначительного окислительного стресса на клетку, при казалось бы диффузном влиянии окислителей на протеины, вследствие присутствия достаточно большого количества SH-групп в их структуре. Структурная идентичность ряда компонентов системы редокс-регуляции у прокариотов и эукариотов доказывает фундаментальность роли этой системы в регуляции клеточных функций. Скорее всего, изменение редокс-состояния протеинов представляет собой более древний способ регуляции их функции, по сравнению с таковым, обеспечиваемым через фосфорилирование/дефосфорилирование. Важность роли единичного цистеинового остатка в механизмах редокс-регуляции функции клеток можно продемонстрировать следующими примерами. Так, связывание протеинов Fos и Jun с ДНК регулируется через окисление/восстановление сульфгидрильной группы единичного цистеинового остатка, локализованного в специализированном домене этих протеинов. Восстановление цистеинового остатка в AP-1 тиоредоксином и ядерным редокс-фактором - Ref-1 стимулирует связывание AP-1 с ДНК. Замещение этого цистеинового остатка в Fos-протеине на сериновый остаток сопровождается трехкратным увеличением способности AP-1 связываться с ДНК, но при этом утрачивается редокс-контроль над активностью AP-1 [11]. Для эффективного связывания фактора транскрипции NF-κB с ДНК также необходимо, чтобы цистеиновый остаток, расположенный в начальном участке Rel-гомологичного домена, находился в восстановленной форме. Окисление этого остатка препятствует связыванию NF-κB с ДНК. Важная роль в восстановлении этого цистеинового остатка в

NF- κ B в ядре клетки, вероятно, принадлежит тиоредоксину [11]. Точно такой же механизм регулирует активность ряда других факторов транскрипции: c-Myb, p53, REBP2. Функция других протеинов, например, ряда киназ и фосфотирозиновых фосфатаз тоже подвержена редокс-регуляции через окисление сульфгидрильной группы единичного цистеинового остатка. В дополнение к сказанному, важно отметить высокую редокс-чувствительность компонентов убикитинзависимого протеолиза белков в клетках.

Однако, насколько важна редокс-регуляция в механизмах динамического изменения фенотипа эндотелия? В качестве ответа представим некоторые соображения, основанные на уже известных фактах. Во-первых, редокс-состояние эндотелиоцитов оказывает существенное влияние на эндотелийзависимую регуляцию сосудистого тонуса. Так, оксид азота, синтезирующийся NO-синтазой, может нитрозилировать тиоловые группы, расположенные вблизи каталитического центра этого фермента, приводя к подавлению его активности. Восстановленный тиоредоксин препятствует такой инактивации NO-синтазы. Кроме непосредственного влияния на активность NO-синтазы, тиоредоксин совместно с тиоредоксинредуктазой обеспечивают расщепление S-нитрозоглутатиона с образованием NO и восстановленного глутатиона. Имеются основания считать, что редокс-состояние эндотелия также определяет доступность и/или аффинитет тетрагидробиоптерина для конституциональной NO-синтазы эндотелиоцитов. Это представляется важным, так как недостаток тетрагидробиоптерина нарушает сопряжение процессов восстановления кислорода и окисления L-аргинина, вызывая преобладающее образование супероксида NO-синтазой, по сравнению с образованием NO. Так как редокс-состояние клеток оказывает влияние на функцию ряда тирозиновых киназ, фосфотирозиновых фосфатаз, митогенактивируемых протеинкиназ, образование церамида и на эффективность взаимодействия конституциональной NO-синтазы с кавеолином-1, то вполне можно предположить, что редокс-регуляция является составной частью комплексных механизмов, влияющих на базальную и стимулированную продукцию NO в эндотелиоцитах. Изменение редокс-состояния эндотелиоцитов может определять "преимущество" того или другого типа молекулярных мишеней для NO (например, через изменение доступности тиоловых групп, расположенных в критически важных участках тех или иных протеинов, а также через изменение эффективности протекания реакции перенитрозирования) [13]. Это позволяет в какой-то мере понять динамичность функциональной роли NO в клетке. Здесь уместно подчеркнуть, что функции оксида азота в эндотелиоцитах, как впрочем и в других клетках, вообще нельзя рассматривать изолированно от механизмов, определяющих их редокс-состояние. То есть, оксид азота представляет собой всего лишь один из компонентов системы редокс-

регуляции функции эндотелиоцитов. Поэтому, тиолсодержащие антиоксиданты, такие как N-ацетилцистеин и пирролидиндитиокарбамат, вмешиваясь в механизмы, определяющие редокс-состояние эндотелия, способны далее изменять не только функцию NO-синтазы, но тип молекулярных мишеней для оксида азота. Следует назвать еще два механизма влияния редокс-состояния эндотелиоцитов на регуляцию сосудистого тонуса. Действие первого механизма обеспечивается через редоксзависимое изменение функции ряда протеинов, вовлеченных в транспорт ионов (кальциевые и калиевые каналы, Na^{2+} - K^+ -АТФаза и др.). Действие второго механизма связано с редоксзависимой модификацией содержания кальция в инозитолтрифосфат-чувствительных кальциевых депо эндотелиоцитов.

В последние годы получены доказательства, указывающие на важность роли системы редокс-регуляции функции эндотелиоцитов в механизмах их активации при действии ангиотензина-2, окисленных липопротеинов низкой плотности, осциллирующего напряжения сдвига, фактора некроза опухоли- α , интерлейкина- 1β и, возможно, при локальной или генерализованной активации системы комплемента. Вместе с тем, выяснилось, что эндотелиоциты способны синтезировать компоненты альтернативного пути активации системы комплемента и компоненты мембраноатакующего комплекса. Такой же способностью обладают резидентные макрофаги сосудистой стенки и фибробласты адвентиции. Более того, синтез компонентов системы комплемента в эндотелиоцитах может усиливаться при некоторых воздействиях на эти клетки, например, при действии интерлейкина- 1β . Из этого следует, что в сосудистой стенке функционирует локальная система комплемента. Изменение редокс-состояния эндотелиоцитов может увеличивать активность локальной (сосудистой) системы комплемента через повышение продукции C3 и C5 в клетках сосудистой стенки и изменение экспрессии и/или функции мембранных регуляторов системы комплемента, а также через активацию системы комплемента по лектиновому пути [2, 3, 5]. Редоксзависимая активации системы комплемента может иметь важное значение в механизмах атерогенеза в тех зонах артерий, где эндотелиоциты подвержены действию осциллирующего напряжения сдвига [2]. Локальная активация системы комплемента может еще больше изменять редокс-состояние эндотелия и гладкомышечных клеток кровеносных сосудов через активацию в этих клетках НАД(Ф)Н оксидазы.

Некоторые физиологические регуляторы редокс-состояния ЭК:

- величина и характер напряжения сдвига
- биологически активные продукты протеолитических систем плазмы крови и клеток крови
- гормоны, возраст, интенсивность метаболизма, стрессоры и др.

Некоторые патогенные воздействия, способные изменять редокс-состояние ЭК:

- ФНО, ИЛ-1, интерферон-гамма
- C5a, C5b67, C5b-9, iC5b67, SC5b-9, iC5b-9
- окси-ЛПНП
- гипергликемия
- ангиотензин-2 и др.

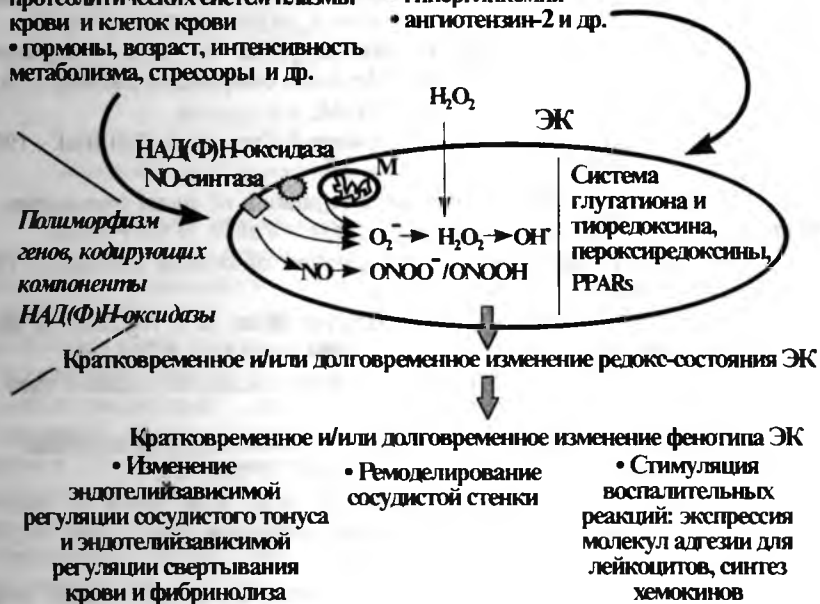


Рис 1. Редокс-регуляция функции эндотелиальных клеток (ЭК) кровеносных сосудов (сокращения: ФНО - фактор некроза опухоли- α ; ИЛ-1 - интерлейкин-1 β ; окси-ЛПНП - окисленные формы липопротеинов низкой плотности; C5a - анафилатоксин; C5b-9 - мембраноатакующий комплекс; PPARs - peroxisome proliferator-activated receptors; M - митохондрии)

Итак, не будет преувеличением сказать, что редокс-состояние эндотелиоцитов играет ключевую роль в регуляции динамического характера их фенотипа (рис. 1). Если это так, то можно представить, как сильно варьируют свойства эндотелиоцитов даже в нормальных условиях, а тем более в условиях патологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шебеко В. И., Родионов Ю. Я. Дисфункция эндотелия при гиперхолестеринемии и атеросклерозе // Мед. новости. - 1997. - №11. - С.14-17.
2. Шебеко В.И. Эндотелий и система комплемента. // Витебск: ВГМУ, 1999. - 149с.

3. Шебеко В.И. Дисфункция эндотелия при активации системы комплемента. // Иммунопатология, аллергология, инфектология. - 2000. - №1. - С.14-25.

4. Abe J-i., Berk B. C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. // Trends Cardiovasc. Med. - 1998. - V.8. - P.59-64.

5. Collard C. D., Vakeva A., Morrissey M. A., et.al. Complement activation after oxidative stress. Role of the lectin complement pathway. // Am. J. Pathol. - 2000. - Vol.156, N 5. - P.1549-1556.

6. Finkel T. Oxygen radical and signaling // Curr. Opin. Cell Biol. - 1998. - Vol.10. - P.248-253.

7. Herrlich P., Bohmer F. D. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells // Biochem. Pharmacol. - 2000. - Vol.59, N 1. - P.35-41.

8. Kamata H., Hirata H. Redox regulation of cellular function. // Cell Signal. -1999. - V.11,N.1. - P.1-14.

9. Kunsch C., Medford R. M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature // Circ. Res. - 1999. - Vol.85. - P.753-766.

10. McCord J. M. The evolution of the free radicals and oxidative stress. // Am. J. Med. - 2000. - V.108. - P.652-659.

11. Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. Redox regulation of cellular activation. // Annu. Rev. Immunol. - 1997. - V.15. - P.351-369.

12. Remacle J., Raes M., Toussaint O., et.al. Low levels of reactive oxygen species as modulators of cell function.. // Mutation Res. - 1995. - V.316. - P.103-122.

13. Stamler J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. // Cell. - 1994. - V.78. - P.931-936.

14. Vanhoutte P. M., Perrault L. P., Vilaine J. P. Endothelial dysfunction and vascular disease. // The endothelium in clinical practice. / Ed. by Rubanyi G. M., Dzau V. J. - New York: Marcel Dekker, Inc., 1997. - P.265-289.