

**В.Т.Ивашкин, О.М.Драпкина**

**КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ОКСИДА АЗОТА И  
БЕЛКОВ ТЕПЛОВОГО ШОКА**

1. Введение. Актуальность проблемы.
2. Оксид азота.
  - 2.1. История открытия NO.
  - 2.2. Образование NO в организме.
  - 2.3. Клеточные мишени NO.
  - 2.4. Энзимология синтазы оксида азота
  - 2.5. Роль No в регуляции основных систем организма:
    - сердечно-сосудистой
    - системе пищеварения
    - нервной системе
    - иммунной
  - 2.6. Оксид азота и апоптоз.
  - 2.7. Перспективы использования препаратов, влияющих на уровень NO.
3. Белки теплового шока (HSP 70)
  - 3.1. История открытия
  - 3.2. Структурно-функциональная характеристика HSP70. Шаперонинг.
  - 3.3. Генетический аппарат синтеза белков теплового шока.
  - 3.4. Нейрогуморальная регуляция белков теплового шока.
  - 3.5. Стресс, адаптация и белки теплового шока.
4. Взаимодействие оксида азота и белков теплового шока.
5. Клинические исследования.

Эта книга рассчитана на врача интерниста в самом широком понимании этого термина: ведь речь пойдет об оксиде азота и белках теплового шока, которые имеют отношение буквально ко всем процессам, происходящим в организме.

В эру больших возможностей диагностики и лечения различных заболеваний и впечатляющих достижений в изучении патофизиологии основных систем организма особенно актуальным становится поиск новых маркеров прогнозирования исхода и течения болезней. Это и определяет огромный интерес к эндогенным системам защиты, одной из которых является система белков теплового шока или стресс-белков, а также к поиску универсальных регуляторов физиологических функций организма, достойным представителем которых является оксид азота.

В последнее десятилетие было установлено, что простейшее химическое соединение - оксид азота (NO) - непрерывно продуцируется ферментативным путем в организме животных и человека, участвуя в основных процессах клеточного метаболизма. Лавинообразный рост публикаций, посвященный биологии NO, позволили редакции журнала Science в 1992г провозгласить NO молекулой года (Koshland D.E.,1992).

Таким образом, за сравнительно короткий промежуток времени с начала 80-х до 90-х годов была доказана важная роль NO в регуляции основных систем организма: сердечно-сосудистой (Ignarro L.J., Buga G.M., 1987; Langford E.J., et al., 1996), системе гемостаза (Albert J., et al.,1997; Drexler H., et al.,1992), иммунной (Hibbs J.B., et al.,1988; Hibbs J.B., Vavrin Z., et al.,1987), нервной (Garthwaite J., et al.,1988; Suzuki Y.,et al.,1994), системе органов дыхания (Frostell C.G.,1994; Pepke-Saba J., et al., 1991), что явилось

свидетельством универсального значения NO для биосистем и основой становления новой области биологии - биологии NO.

Хорошо известно, что любая клетка располагает уникальным механизмом узнавания и временного взаимодействия с конформационно-неполноценными белками (Попов Е.М.,1995; Ellis J.,1987). Результатом работы этого механизма является предотвращение нежелательных внутри и межмолекулярных взаимодействий пептидов в процессе их синтеза, транспорта, а также при сопряженных с резкими изменениями внутриклеточного гомеостаза процессах роста, дифференцировки, в ходе приспособления к неблагоприятному средовому окружению. Оказалось, что стресс-белки являются основным реализующим звеном этого механизма. Ряд из них начинают активно синтезироваться в клетке после действия на нее повреждающим агентом. Многие проблемы общей и частной патологии тесно связаны с участием стресс-белков в процессах нормальной и патологической физиологии (Conroy S.E., et al.,1996).

История изучения биологической роли NO и стресс-белков, участие этих агентов в регуляции основных физиологических систем организма, молекулярные механизмы действия и клеточные мишени NO, структурно-функциональная характеристика и генетический аппарат синтеза белков теплового шока, апоптоз и поддержание внутриклеточного гомеостаза, перспективы использования лекарственных средств, влияющих на содержание NO и стресс-белков – все это чрезвычайно интересные и трудные вопросы, на которые можно будет найти ответы в данной книге.

## **История изучения NO**

Оксид азота давно печально известен своей ядовитостью. Высокая токсичность оксида азота обусловлена наличием в его структуре неспаренного электрона (Bredt D.S., et al.,1994; Brigham K.L.,1991). Ранние работы по NO не позволяли говорить о каких-либо благотворных или регуляторных эффектах этой чрезвычайно лабильной молекулы с коротким временем жизни (6-10сек).

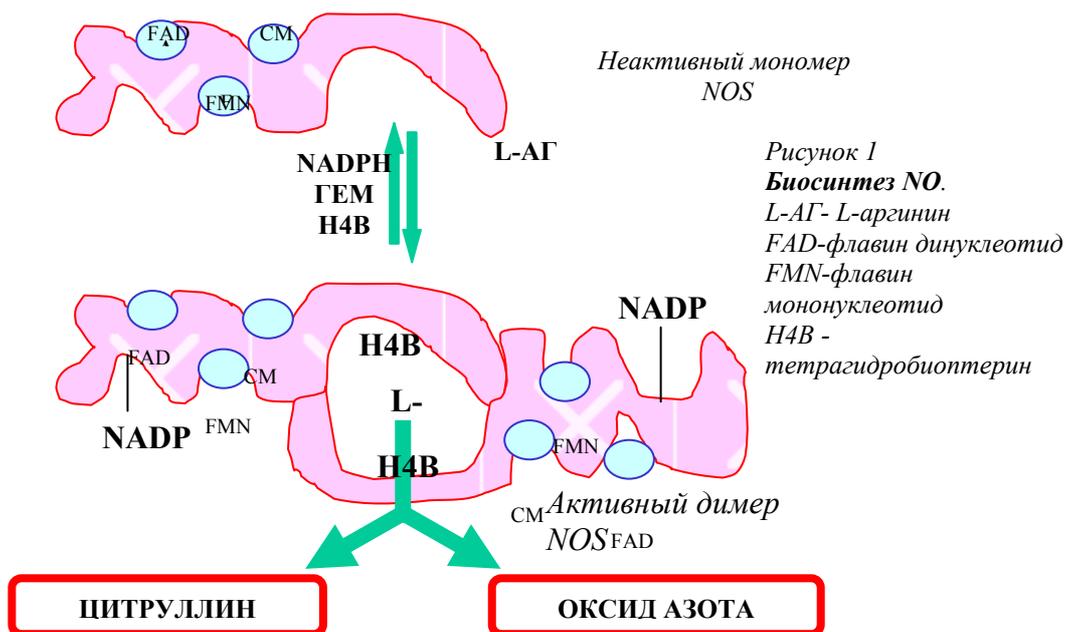
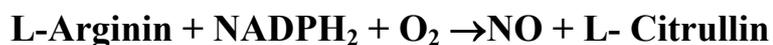
И хотя у человека имеет место выделение нитратов и нитритов, считалось, что они попадают в организм исключительно с пищей. Поэтому, когда в 1956г. англичане Магги и Барнз установили, что нитраты, содержащиеся в копченостях и консервах, превращаются в организме в канцерогенные нитрозоамины, люди бросились менять свой рацион питания.

Однако, в начале 80-х было установлено, что пища не единственный и даже не главный источник нитритов и нитратов. Был сделан вывод, что нитриты и нитраты образуются в результате окисления восстановленных форм азота, в ходе которого в качестве промежуточного продукта может возникать NO. Указание на то, откуда и каким образом берутся нитраты, сам того не подозревая, дал больной, страдающий диареей. В моче этого больного было обнаружено большое количество нитратов. Его лечащий доктор Tannebaum впервые связал интенсивное образование нитратов с воспалительным процессом. Начиная с открытия Tannebaum, количество публикаций, посвященных оксиду азота, стало расти буквально как снежный ком. Бурный поток исследований функций NO подтвердил представление об оксиде азота как об основном вазодилататоре (Ignarro L.J.,1987; Cason B.A.,et al,1994; Yang W.D.,et al.,1994)

Было показано, что оксид азота участвует в иммунной защите организма, вовлекаясь в цитотоксический процесс на самых последних этапах и выполняя роль карающего меча иммунной системы (Hibbs et al.,1988,1987). Выяснилось, что NO необходим для синаптической передачи нервного импульса (Garthwaite J. et al.,1998), регуляции нормальной перистальтики кишки (Grisham M.V.,1994), предотвращения гипоксической вазоконстрикции в легких (Rossaint R., et al.,1993) и даже для нормализации эрекции. Таким образом, оксид азота действительно является, образно говоря, мастером на все руки. Как же столь ценная молекула образуется в организме человека?

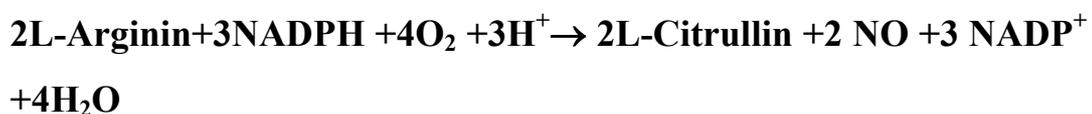
### Образование NO в организме.

В организме человека радикал NO образуется из аминокислоты аргинина в результате реакции, которая катализируется ферментом, получившим название NO- синтазы (NOS) (рис.1)



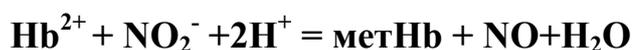
Ферменты, катализирующие продукцию большей части NO, уникальны по сложности организации, включают рекордное число разнообразных кофакторов: FMN, FAD, гем и кальций-кальмодулин и по крайней мере 3 субстрата- аргинин, кислород и NADPH (Недоспаев А.А.,1998).

Суммарное уравнение, катализируемой NOS реакции включает пятиэлектронное ( $N^{-3}-N^{+2}$ ) окисление атома азота аргинина, сопряженное с окислением NADPH:

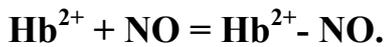


Известно, что молекулярный кислород используется для образования NO и L-цитруллина. Таким образом, NO-синтазный механизм образования NO – это синтез NO в присутствии кислорода. При патологических процессах, протекающих на фоне гипоксии или ишемии активность NO-синтазного механизма может снижаться и повышаться активность нитритредуктазных систем (Реутов В.П., Сорокина Е.Г.,1998)

Изучение действия нитритов на гемоглобин начал исследовать Gamge A. в 1868г. После поступления в кровь ионы  $NO_2^-$  проникают через плазматические мембраны. Одновременно с окислением Hb наблюдается образование Hb-NO-комплексов. В опытах in vitro было установлено, что при взаимодействии ионов  $NO_2^-$  с дезоксиHb осуществляется окислительно-восстановительная реакция, в ходе которой дезоксиHb окисляется в метHb, а ионы  $NO_2^-$  восстанавливаются в NO.



Взаимодействуя с восстановленным гемоглобином, NO образует стабильные Hb-NO-комплексы:



Комплексы метHb с NO нестабильны и поэтому легко распадаются. Образование  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и других активных форм кислорода может явиться причиной окисления NO в нитриты и нитраты. Таким образом, значительный вклад в нитритредуктазную активность вносит Hb в крови и миоглобин (Mb) в мышечной ткани. Учитывая, что содержание гемоглобина в 250 раз выше, чем цитохрома C, можно предположить, что вклад нитритредуктазных систем в цикл NO является основным. Однако, мощная нитритредуктазная способность Hb крови делает его уязвимым по отношению к метгемоглобинообразующему действию ионов  $\text{NO}_2^{-2}$ . Поэтому наличие NO-синтазных систем, лимитирующих образование нитритных и нитратных ионов, обеспечивает защиту Hb от окисления, и, следовательно, организма в целом от токсического действия нитросоединений. Кроме того, без механизма эндогенного образования нитритов/нитратов клетки и организм в целом оказались бы полностью зависимыми от поступления нитритов и нитратов. Схематически цикл оксида азота изображен на рис.2

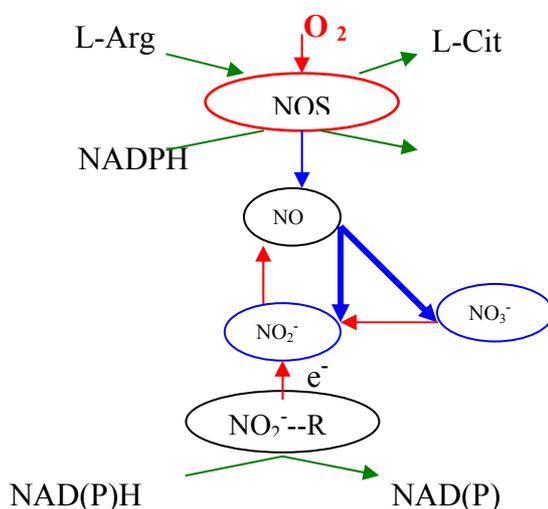


Рисунок 2. NO-синтазная (NOS) и нитритредуктазная ( $\text{NO}_2^- \text{--R}$ ) компоненты цикла оксида азота:  
 1- образование NO в присутствии кислорода  
 2- окисление NO в нитриты и нитраты  
 3- восстановление нитритов, нитратов ( $\text{NO}_2^-$ )

Образовавшийся NO оказывает как аутокринное, так и паракринное действие, т.е. будучи синтезирован в каких-либо клетках, он способен влиять на метаболические процессы, как в самих этих клетках, так и в расположенных по соседству. Это означает, что молекулы NO, несмотря на свою высокую химическую активность, способны транспортироваться на расстояния, превышающие по крайней мере в несколько раз клеточные размеры (Ванин А.Ф., 1998).

На пути к клеточным мишеням паракринное действие молекул NO может в значительной степени ослабляться под действием различных факторов.

Каковы же клеточные мишени NO? (табл.1)

Во-первых, это железосодержащие ферменты и белки, такие как гуанилатциклаза (Гц), собственно сама NOS, Hb, митохондриальные ферменты, ферменты цикла Кребса, ферменты синтеза белка и ДНК. Связывание NO с железосодержащим участком фермента приводит к их изменению активности. Взаимодействие NO с этими мишенями имеет важное значение в цитотоксическом действии макрофагов, в расслаблении мышц сосудов и ЖКТ, в переносе кислорода, образовании АТФ и формировании долговременной памяти.

Вторая важная молекулярная мишень для оксида азота - это белки, содержащие SH=группы. NO служит эффективным катализатором образования дисульфидных мостиков. Благодаря взаимодействию с SH=группами NO может регулировать такой важный для клетки процесс, как биосинтез белка.

Наконец, третья важная молекулярная мишень - активные формы кислорода. NO связывается с кислородом с образованием чрезвычайно токсичных соединений – пероксинитритов. (Beckman J.S., et al. 1990, 1994).

Последние по токсичности во много раз превосходят сам NO. Образование пероксинитритов выступает существенным элементом во многих патофизиологических процессах, включая септический шок, а также ишемические и язвенные повреждения органов.

### **Некоторые характеристики синтазы оксида азота.**

Синтаза оксида азота (NOS) катализирует образование NO и L-цитруллина из L-аргинина, O<sub>2</sub> с использованием донора электронов NADPH. Для активности NOS необходимо несколько кофакторов и простетических групп: тиолатсвязывающий гем, FAD, FMN, кальмодулин и Ca (только для конститутивной NOS (Palmer R.M.J., et al., 1988)).

В неактивном состоянии NOS представляет собой мономер, содержащий пять мест связывания для 5 разных кофакторов. При наличии в окружающей среде всех кофакторов и аргинина происходит димеризация NOS и фермент становится активным. При участии кислорода и воды происходит превращение аргинина в цитрулин с высвобождением NO.

Существует несколько изоформ NOS. Нейрональная (n NOS) или тип 1, эндотелиальная (eNOS) или тип 2 и индуцибельная (iNOS) форма (Горен А.К.Ф., 1998). Разные изоформы отличаются друг от

друга локализацией в организме и способом активации. Тип 1 нейрональная и тип 2 эндотелиальная - это конституитивные формы синтазы оксида азота (сNOS). Они обеспечивают синтез NO в физиологических условиях. Индуцибельные формы (iNOS) в физиологических условиях неактивны. Синтез их увеличивается в ответ на действие патогенных стимулов.

Активные формы всех 3 изоформ представлены гомодимерами с молекулярной массой субъединиц 130(iNOS), 135 (e NOS), 160 кДа (nNOS). В каждом мономере выделяют несколько дискретных доменов. Начиная с С конца, различают редуктазный домен, имеющий высокую степень гомологии с цитохром-Р-450-редуктазой; небольшой кальмодулинсвязывающий домен; оксигеназный домен, обладающий многими характеристиками цитохром Р 450 – редуктазы, но без структурной гомологии с последней; N-концевую последовательность, специфичную для каждой изоформы (рис.3).

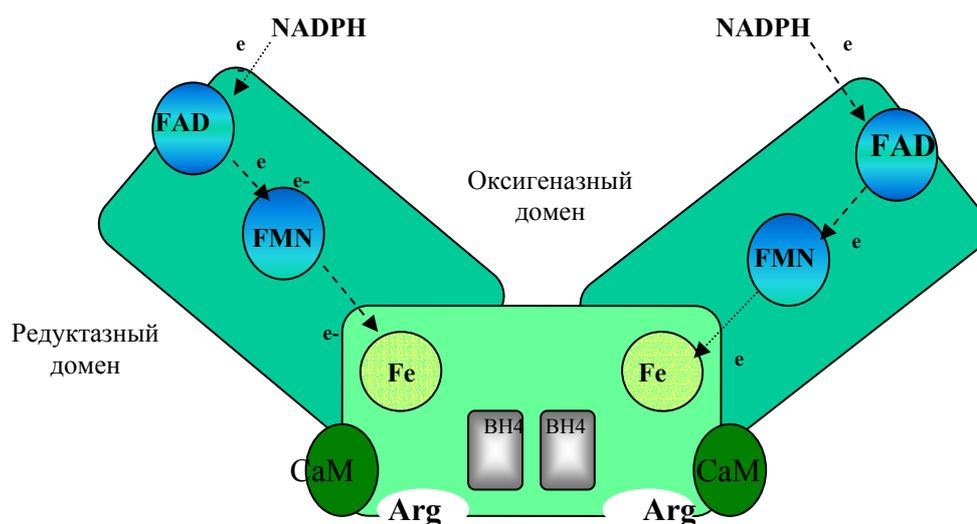


Рисунок 3. Гомодимер NOS.

CaM-кальмодулин

Arg –аргинин

Fe- железо

BH4- тетрагидробиоптерин

FMN-флавин мононуклеотид

FAD- флавинаденин динуклеотид

Основные функциональные различия изоформ заключаются в том, что Ca необходим для активации eNOS и nNOS, в то время как кальмодулин связан с iNOS столь прочно, что наличие Ca в среде не является необходимым.

Эндотелиальная NOS демонстрирует свою активность только в присутствии кальция и кальмодулина. Увеличение продукции NO происходит пропорционально поступлению в цитоплазму кальция либо извне, либо из эндоплазматического ретикулума (при действии ацетилхолина, брадикинина и других агентов, стимулирующих реакции фосфатидилинозитолфосфатного цикла).

Поступление ионов кальция в цитоплазму нейронов через каналы, возбуждаемыми аминокислотами, приводит к активации nNOS, увеличению продукции NO и активации гуанилатциклазы. Кроме способности катализировать образование оксида азота NOS обладает также и NADPH<sub>2</sub> - диафоразной активностью (Schmidt H.H.W.et al.,1992). Поэтому клетки тканей, гистохимически определяемые как содержащие NADPH<sub>2</sub> диафоруазу, способны производить NO. Диафоразная активность обнаруживается также в нервных окончаниях стенок кровеносных сосудов, гладких мышц сфинктеров. Диафоразная активность, как и другие, опосредованные NOS эффекты, блокируются N<sup>G</sup> - производными аргинина, выступающими конкурентными ингибиторами NOS. Специфические для разных тканей формы cNOS выделены и очищены. Выделены и проклонированны соответствующие гены, определены первичные структуры белков и нуклеотидные последовательности ДНК. Это позволило изучить распределение cNOS в тканях и клетках организма методами иммуногистохимии с помощью моноклональных антител, а также методами

гибридизации *in situ* нуклеиновых кислот и приступить к детальному изучению NOS. Разные формы NOS кодируются разными генами, расположенными дискретно в хромосомах и имеющими свои особенности организации. Для конститутивной формы NOS идентифицированы рецепторные структуры, участвующие в синтезе NO. Роль основного регулятора выполняет система кальций-кальмодулин. Вместе с тем, рецепторная и основная регулирующие системы для iNOS пока не получили достаточных характеристик.

Как известно, медиаторы вазорелаксации, такие как брадикинин, вызывают быстрое увеличение концентрации кальция в клетках эндотелия. Остается пока неясным, что заставляет eNOS пребывать в активном состоянии в течение продолжительного времени. Fleming et al., 1993 показали, что этим фактором, по видимому, служит повышение внутриклеточного pH, происходящее под влиянием брадикинина. В сочетании с первоначальным увеличением концентрации внутриклеточного кальция, долгосрочное подщелачивание внутренней среды клетки (происходящее после кратковременного подкисления) может обеспечить поддержание активного состояния конститутивной eNOS. При этом следует учитывать, что pH оптимум для eNOS составляет 7,6.

### **Механизмы регуляции активности NOS**

В работах W.C.Sessa, 1993 было показано, что хронические физиологические нагрузки у собаки индуцируют более значительное расширение коронарных артерий в ответ на кратковременное введение ацетилхолина. Биохимический анализ показал, что обнаруженный эффект может объясняться более

интенсивной генерацией NO вследствие экспрессии гена eNOS. Возможно, в полный цикл установленного пути регулирования вовлечена система гипофиз-надпочечники, как неспецифический механизм долговременной адаптации организма к различного рода стрессорным воздействиям. Во многих работах приводятся свидетельства участия других стероидных гормонов (половых) в регуляции синтеза NO (Riedel M., et al.,1994).

Нельзя не отметить тот факт, что ген эндотелиальной NOS человека содержит в своей структуре нуклеотидные последовательности, соответствующие тем, на которые оказывает свое воздействие эстроген и стрессорные агенты. Возможно, что эти участки NOS представляют собой регуляторные элементы, имеющие функциональное значение в экспрессии этого гена. В работах С. Weiner и соавт. Rubanyi G. и соавт. описан положительный эффект 17- $\beta$ -эстрадиола на уровень образования NO в головном мозге, почках, сердце и скелетных мышц морских свинок; также показано, что введение небольших доз 17 $\beta$ -эстрадиола вызывает у крыс увеличение базального уровня NO. Аналогичный эффект вызывает эстроген посредством усиления экспрессии мРНК конститутивных форм NOS в ЦНС и в клетках эндотелия. Инкубация клеток эндотелия с 17 $\beta$ -эстрадиолом в течении 16 - 24 часов вызывает дозозависимое увеличение содержания мРНК NOS и концентрацию NO в ответ на стимуляцию ацетилхолином.

В настоящее время накоплен большой материал о механизме регуляции активности iNOS в макрофагах (Маеда Х.,1998; Corraliza I.M.,et al.,1994) и гладкомышечных клетках (Dudec

R.R., et al., 1993), об участии вторичных мессенджеров, протеинкиназ и цитокинов в регуляции синтеза NOS.

Так в работе D.Kunz и соавт. было показано, что в культуре мезангиальных клеток интерлейкин-1 $\beta$  и вещества, повышающие концентрацию цГМФ индуцируют экспрессию гена iNOS. Это приводит к повышению активности фермента и образованию NO. К настоящему времени установлено, что кроме интерлейкина-1 $\beta$  синтез iNOS индуцируется интерфероном- $\gamma$ , фактором некроза опухолей (TNF $\alpha$ ), липополисахаридами грамотрицательных бактерий (McCall TB, et al., 1992). Пик продукции этой формы NOS достигается по одним источникам через 6 часов, по другим - через 12 часов после начала действия индуктора. К этому времени независимая от кальция продукция NO достигает уровня, при котором начинает сказываться влияние NO не только на гуанилатциклазу, но и на железосодержащие компоненты дыхательной цепи митохондрий, на аконитазу, рибонуклеотидредуктазу. В результате этого в клетках, подвергнутых действию таких количеств NO, нарушается энергетический обмен и синтез ДНК. В организме эта способность оксида азота используется для уничтожения опухолевых клеток макрофагами, которые не только сами производят NO, но и секретируют фактор некроза опухолей, который вызывает индукцию NOS в опухолевых и других клетках. Активация iNOS имеет место при болезнях иммунной системы, сердечно-сосудистых заболеваниях, злокачественных заболеваниях, острым и хроническом воспалении (Wizemann T. M., et al., 1994). При воспалении, особенно при септическом шоке, происходит увеличение уровня пептида, ассоциированного с

геном кальцитонина. Этот пептид представляет собой цАМФ-зависимый сосудорасширяющий агент. При эндотоксическом шоке активация iNOS и избыточная продукция NO чревата немедленными тяжелыми последствиями. Дело в том, что липополисахариды грамотрицательных бактерий вызывают столь значительное образование NO в гладких мышцах сосудов, что это приводит к падению системного кровяного давления и развитию характерных для шока нарушений кровообращения (Cremers B., et al., 1997).

Таким образом, NOS с энзимологической точки зрения обладает рядом уникальных свойств: NOS - самый регулируемый в биологии фермент. Это единственный из известных ферментов, который имеет 5 кофакторов. В результате система генерации оксида азота представляет собой наиболее чувствительную систему, реагирующую на многие изменения, происходящие в организме.

## **NO в регуляции функций основных физиологических систем организма.**

### **Оксид азота и система кровообращения.**

Экономические потери от сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) в США составляют почти 60 млрд. долларов. В развитых странах на лечение ССЗ расходуется значительная часть бюджета здравоохранения. В некоторых из них на лечение этой группы заболеваний приходится до 12-13% от общих затрат на медицинское обслуживание. Многие из выходящих на

инвалидность больных теряют работоспособность в связи с болезнями сердца и сосудов. Таким образом, профилактика и лечение ССЗ представляет собой не только медицинскую, но и социально-экономическую проблему.

После успеха, обусловленного широким внедрением принципов интенсивного контроля за больными острым инфарктом миокарда (ИМ), госпитальная летальность в этой группе, повсеместно снизившись к началу 70-х годов, на протяжении последующих лет оставалась стабильной. Вместе с тем, изменилась структура непосредственных причин летального исхода от ИМ в условиях стационара: нарушения ритма сердца, преобладавшие до введения интенсивного контроля за деятельностью сердца, уступили первое место недостаточности кровообращения и разрывам сердца.

Общая летальность при ИМ составляет 30-35% (в США 140 человек в день). Большая часть больничной летальности приходится на первые двое суток, поэтому основные лечебные мероприятия чрезвычайно важны именно в этот период. Указанное обстоятельство делает проблему разработки новых критериев прогноза ИМ по-прежнему актуальной, во многом определяющей успешное предупреждение и лечение различных его осложнений.

Известно, что основными патофизиологическими механизмами развития ИМ служат тромбоз атеросклеротически измененной коронарной артерии, ее спазм или чаще комбинация этих факторов. И тромбоз, и спазм, которые вначале рассматривались, как независимые патофизиологические процессы, обладают синергическим действием. При этом важное значение имеют предшествующие или сопутствующие повреждения эндотелия и

агрегация тромбоцитов. Последствия ишемии определяются не столько гемодинамическими изменениями как таковыми, сколько развивающимся при этом тканевым повреждением. По этой причине растет исследовательский интерес в направлении изучения каскада метаболических реакций, развертывающегося на этапе от ишемии к повреждению миокарда.

В свое время, изучая механизмы расширения кровеносных сосудов, американский фармаколог Furchgott обнаружил, что ацетилхолин взаимодействует с рецепторами клеток эндотелия кровеносных сосудов, что приводит к образованию малых молекул, мигрирующих в мышечный слой и вызывающих его расслабление (Furchgott R.W., and Zavadski J.V., 1980). Эти молекулы получили название - расслабляющий фактор из эндотелия (ЭФР) (Ignarro L.J., et al., 1987, 1990).

В течение длительного времени ученые не могли идентифицировать природу этого фактора. Однако, несмотря на это было сделано одно очень важное открытие – фактор расслабления стимулирует образование циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ), который служит вторичным посредником для нейромедиаторов и гормонов, способных стимулировать гуанилатциклазу и обладающих вазодилатирующим действием. Идентифицировать природу расслабляющего фактора из эндотелия помогло изобретение Альфреда Нобеля. Более ста лет тому назад Нобель изобрел нитроглицерин – активный химический компонент динамита. Со времени этого изобретения прошло несколько десятков лет, и только в конце 70-х годов ученый Murad установил молекулярный механизм действия нитроглицерина. Оказалось, что

нитроглицерин и органические нитраты сами по себе не активны, и вызывают расширение коронарных артерий благодаря тому, что в ходе их превращений образуется оксид азота. Более того, оказалось, что NO оказывает расслабляющее действие на мышечный слой сосудистой стенки путем стимуляции образования цГМФ, точно также как это делает загадочный фактор расслабления из эндотелия. И наконец, в 1987 году была доказана идентичность фактора расслабления из эндотелия и оксида азота (Palmer R.M.G., et al., 1987).

Однако, некоторые исследования ставят под сомнение эту идентификацию (Ванин А.Ф., 1998). Возможно, ЭФР представляет собой нитрозосоединение, активным вазодилатирующим компонентом которого выступает NO.

Когда нейромедиатор ацетилхолин и другие вазодилататоры связываются с клетками эндотелия сосудов в этих клетках повышается активность NO синтазы и увеличивается содержание NO. Молекула NO мигрирует в прилежащие мышечные клетки, активирует синтез цГМФ и вызывает их расслабление (рис. 4)

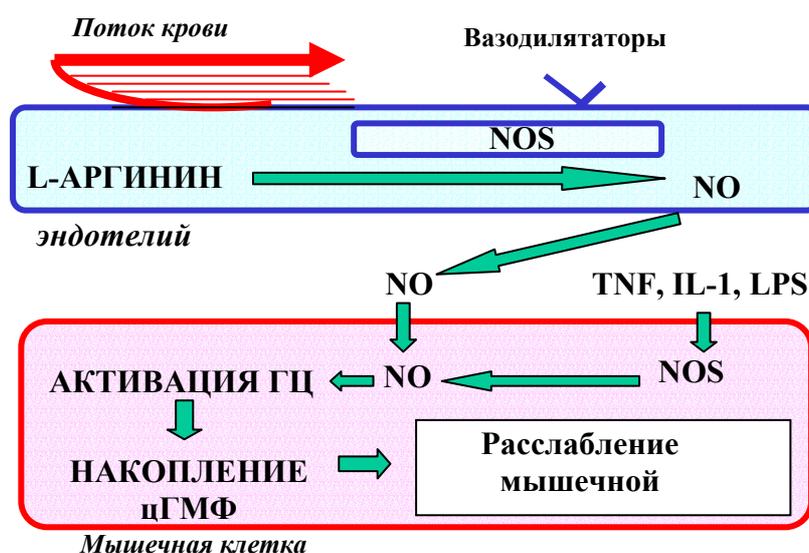


Рисунок 4. Механизм сосудорасслабляющего действия NO

Эндогенный NO в настоящее время рассматривается как эндогенный вазодиллятор. Антигипертензивные и антиагрегационные свойства оксида азота непосредственно связаны с его способностью повышать активность гуанилатциклазы (Северина И.С.,1998). Энзим гуанилатциклаза существует в двух формах: растворимой и мембраносвязанной. Установлено, что эти формы различаются как по структуре, так и по механизмам регуляции. Сосудорасширяющее действие NO связано с активацией растворимой формы гуанилатциклазы по гемзависимому механизму и с увеличением содержания цГМФ .

Накапливающийся цГМФ активирует цГМФ-зависимую протеинкиназу, а также Са-АТФазу, что в свою очередь приводит к выходу Са из мышечных клеток, их релаксации и в конечном итоге – к вазодилляции.

Ингибирующий эффект оксида азота на агрегацию тромбоцитов также связывали со способностью NO активировать растворимую гуанилатциклазу. Механизм антиагрегационного действия NO стал проясняться после исследования роли гуанилатциклазы в регуляции процесса агрегации тромбоцитов. Гуанилатциклаза регулирует агрегацию по механизму обратной связи: инициация агрегации способствует активации фермента, а накапливающийся цГМФ опосредует сигнал к дезагрегации. Функционирование тромбоцитарной гуанилатциклазы и агрегационная способность тромбоцитов взаимосвязаны.

Уровень продукции NO зависит от скорости кровотока, которая, в свою очередь, зависит от тонуса сосудов. Таким образом, посредством NO осуществляется вазальная ауторегуляция кровотока. Ослабление действия любого из звеньев этого

механизма приводит к развитию гипертензии. Кроме того, важнейшим в практическом отношении свойством NO выступает его способность ингибировать адгезию нейтрофилов на стенках сосудов.

Главный фактор, участвующий в инактивации NO, ограничивающий его распространение и снижающий его концентрацию - это супероксидный радикал  $O_2^-$  (Волин М.С., 1998).

В кровеносной системе увеличение продукции  $O_2^-$  фагоцитирующими клетками или эндотелиальными клетками (в период перехода от ишемии к реперфузии) провоцирует спазм. Предотвращение инактивации оксида азота супероксидом объясняет способность супероксиддисмутазы улучшать микроциркуляцию при воспалительных процессах и нормализовать кровоток после тромбозов, вазоспазма и других нарушений кровообращения.

Кардиомиоциты содержат как конститутивную, так и индуцибельную NOS (iNOS). Генерация оксида азота конститутивной NOS играет важную роль в поддержании гомеостаза. Индуцибельная кальций-независимая NOS экспрессируется в тканях-мишенях после стимуляции эндотоксином и некоторыми цитокинами. Этот путь синтеза NO имеет место в патологических условиях и приводит к чрезмерной вазодилатации и повреждению тканей. Оба пути биосинтеза NO играют важную роль в сердце млекопитающих. Исследования на крысах продемонстрировали, что кардиомиоциты экспрессируют iNOS под действием цитокинов-индукторов. Эти данные позволили предположить Belder A. J. и соавт., 1993 что экспрессия iNOS в сердце человека должна происходить в случае иммунных

нарушений, в связи с чем были обследованы пациенты с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП).

Биопсийный материал из миокарда правого желудочка исследовался у больных ДКМП с явными клиническими проявлениями сердечной недостаточности. Измерение активности индуцибельной и конститутивной NOS показало, что кардиомиоциты больных содержат значительно более высокий уровень iNOS по сравнению с относительно низкой активностью cNOS. Миоциты экспрессируют iNOS только после стимуляции цитокинами. Эти результаты доказывают, что iNOS появляется в миокарде только при наличии дефектов в работе иммунной системы.

В работе Wildhirt S. M., 1995 изучалось участие NOS в патогенезе экспериментального ИМ у кроликов. Содержание фермента измерялось с помощью моноклональных антител. Оказалось, что уровень iNOS значительно возрастал в инфарцированном миокарде спустя 48 часов после перевязки коронарной артерии у кроликов. В течение последующих 14 дней активность iNOS оставалась высокой, и лишь позже начинала постепенно снижаться. Иммуногистохимические методы позволили доказать, что макрофаги служат основным источником экспрессии iNOS.

Измерение свободного NO методом электронного парамагнитного резонанса, проведенные при перевязке левой коронарной артерии у крыс, показали, что уровень NO в течение первых 2 часов после экспериментального инфаркта в сердце и печени оставался неизменным. (Belkina L.M., 1995). Через 3 часа было зарегистрировано кратковременное, но значительное снижение уровня NO и затем быстрое 2 кратное увеличение к пятому часу

после экспериментального инфаркта. Высокий уровень NO сохранялся в течение 24 часов. Эти результаты дают возможность предполагать, что увеличение продукции NO может играть роль в падении периферического сопротивления при остром ИМ, в частности при кардиогенном шоке.

Во многих работах исследуется экспрессия iNOS в кардиомиоцитах, способы и условия ее активации. Интересные результаты получили Jean Luc Balligand и соавт., 1994 исследуя содержание обоих типов NOS в кардиоцитах взрослых крыс в ответ на действие интерлейкина, липополисахаридов, фактора некроза опухолей и кортикостероидов. Для оценки содержания iNOS и динамики содержания этого фермента применялся анализ Western immunoblot. Исследовалась также последовательность гена iNOS. Кроме этого изучался уровень свободного NO в кардиомиоцитах крыс с помощью NO селективного микросенсора. Авторы показали, что интерлейкин и интерферон, действуя вместе, увеличивали содержание iNOS в культуре клеток с максимальной экспрессией через 12 часов. Высокий уровень активности iNOS держался в течение более 24 часов в присутствии интерлейкина и интерферона. Эти временные отношения соответствуют таковым, найденным в гепатоцитах мышей в ответ на введение липополисахаридов и цитокинов. Период полужизни NOS составил 4 часа. Исследование нуклеотидной последовательности гена NOS показало ее идентичность с последовательностью гена iNOS из макрофагов мыши и человека. Обработка простагландинами снижала уровень активности iNOS.

С помощью NO селективного микросенсора было доказано, что кардиомиоциты крыс служат источником NO.

В работе Н. Luuss и соавт. изучалась экспрессия iNOS в кардиомиоцитах у больных тетрадой Фалло на основе материалов биопсии желудочков сердца. В нестимулированных клетках экспрессия iNOS не определялась. Совместное действие липополисахаридов и цитокинов IL-1 и IFN-гамма сопровождалось выраженной экспрессией mRNA iNOS, начиная со 2-го - 4-го часа и сохраняясь в течение 96 часов. Ген iNOS был проклонирован, в результате чего было выяснено, что нуклеотидная последовательность iNOS кардиомиоцитов на 99,8 % гомологична человеческой печёночной iNOS.

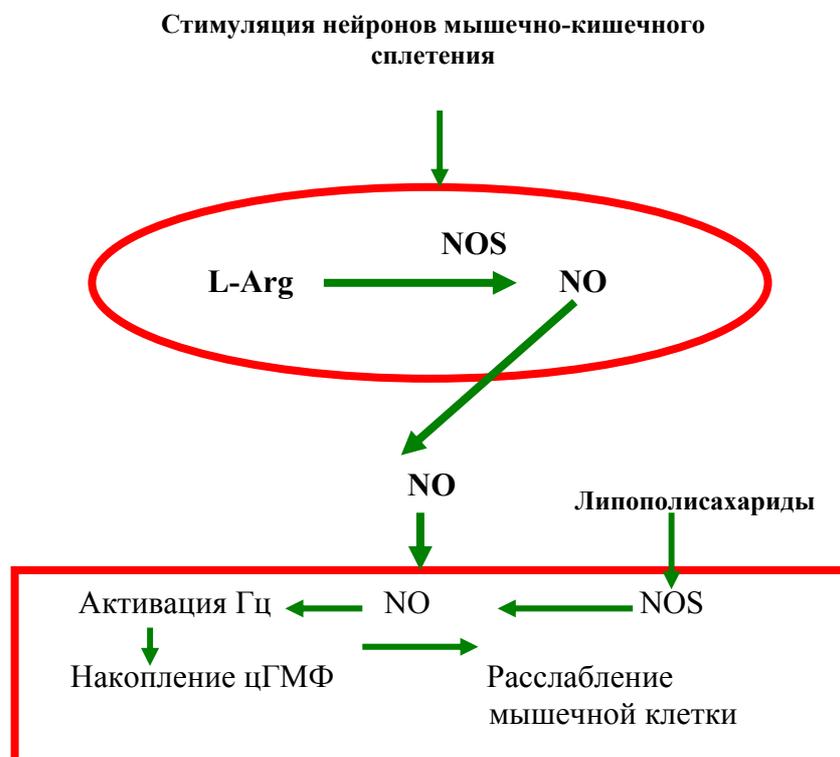
Повышение экспрессии iNOS обнаруживается и при атеросклеротическом поражении сосудов, что было показано в работе L. D. K. Buttery и соавт., 1995. Во время оперативных вмешательств были собраны участки сосудов, в составе которых были две интактные вены, две интактные артерии, две артерии с жировыми бляшками, одна артерия с фиброзно-жировыми отложениями, три участка брюшного отдела аорты в местах аневризмы. Для определения экспрессии NOS пользовались методами Norden and Western blot. В интактных сосудах активность iNOS не выявлялась, однако в атеросклеротически поражённых участках отмечался высокий уровень активности iNOS, причём наиболее значимый уровень активности NOS наблюдался в области атеросклеротической бляшки. Возможно, NO, продуцируемый в атеросклеротической бляшке, тормозит такие проатерогенные явления, как адгезия макрофагов, и препятствует развитию нарушений, связанных с недостаточной

продукцией эндотелиального NO, которая сопровождает начало атеросклероза. Имеется ряд работ о том, что в атеросклеротической бляшке продуцируются свободные радикалы, что сопровождается образованием такого соединения как ONOO-, способного непосредственно повреждать ткани. Известно также, что гиперхолестеринемия способствует уменьшению содержания в тканях глутатиона и ослаблению, тем самым, механизма детоксикации, направленного против ONOO-. Однако, окисленные липопротеины низкой плотности способны ингибировать NOS-2 в макрофагах. Таким образом, оказывает ли продукция NO NOS-2 при атеросклерозе защитное или повреждающее действие предстоит выяснить.

#### **- NO в регуляции функций пищеварительного тракта**

Если первоначально, в 80-е годы, исследования, связанные с NO, были преимущественно посвящены сердечно-сосудистой системе, то в 90-х годах мощный рост таких исследований каснулся едва ли не всех функциональных систем, включая пищеварительный тракт. В 1994 году была создана линия экспериментальных животных – мышей, у которых был заблокирован ген, кодирующий NOS. Гистологические исследования позволили выявить выраженные контрактурные изменения и гипертрофию пилорического отдела, а функциональные изменения создавали картину, наблюдаемую в клинике пилоростеноза. Возникло предположение о роли NO-дефицита в развитии пилоростеноза. Действительно, вскоре было обнаружено, что у пациентов с пилоростенозом в нейронах мышечного сплетения отсутствует NOS. В нескольких лабораториях было доказано, что нормальная релаксация мышц желудка может быть блокирована

ингибиторами NOS. И напротив, непосредственное введение оксида азота в кишку имитирует действие нервной стимуляции. Таким образом, предполагается следующая картина участия оксида азота в регуляции моторики ЖКТ (рис. 4)



*Рисунок 4. Участие NO в регуляции моторики ЖКТ*

Стимуляция нейрональной активности сопровождается повышением активности NOS и выделением оксида азота, который проникает в мышечный слой и активирует гуанилатциклазу. Это приводит к увеличению содержания гуанозинмонофосфата и расслаблению мышц. Кроме того, физиологическим регулятором перистальтики ЖКТ служит также бактериальная флора кишечника. Выше мы отмечали, что

компоненты мембран клеток – липополисахариды обладают способностью активировать NOS.

К. Takeuchi и соавт., 1995 оценивали роль NO в регуляции желудочной секреции гидрокарбонатов. Авторы показали, что ингибитор NOS L-NAME дозозависимо увеличивает секрецию гидрокарбоната, из чего следует, что в желудке крыс осуществляется базальная продукция NO, поддерживающая в покое тоническое напряжение желудочной стенки и угнетающее влияние на секрецию гидрокарбоната. На изолированных главных клетках свиньи увеличение секреции пепсиногена в ответ на лейкотриены угнеталось на 50-60% при введении L-NMMA. Следовательно, стимулирующий эффект лейкотриенов частично опосредован высвобождением NO. Данные проведенных исследований позволяют предположить возможность NO-механизма обратной связи, способного ограничивать гиперсекрецию кислоты в случае гистаминовой стимуляции. Briejer M.R. и соавт., 1995 на толстой кишке морской свинки показали, что релаксация, вызываемая серотонином, опосредована синтезом NO. На XV Международном симпозиуме по регуляции моторики ЖКТ (Nov., 1995) сообщалось, что NO является главным медиатором, определяющим расслабление сфинктера Одди, анального сфинктера, тонкой и толстой кишки, пищевода и желудка.

Регуляция моторики пищевода остается актуальной и до конца нерешенной проблемой гастроэнтерологии. И здесь NO играет немаловажную роль. Wills S. и соавт., 1994 получили интересные результаты при изучении роли NO в регуляции моторики пищевода. Введение донора NO молсидомина уменьшало

базальное давление в нижнем пищеводном сфинктере. Внутривенное введение больших доз нитроглицерина –100-200 мкг/(кг в час) больным с диффузным спазмом пищевода восстанавливало его нормальное перистальтическое сокращение, что доказывало связь данной патологии с нарушением синтеза эндогенного NO.

Трудно переоценить роль NO в регуляции желудочного кровотока. Исследования в этой области позволили сделать вывод о том, что в сосудистом русле желудка, как и любого другого органа, имеется некоторый базальный уровень непрерывной секреции NO, который оказывает вазодилатирующее действие. Опыты с холецистокинином и прямой электрической стимуляцией вагуса показали, что NO опосредует вагусную дилатацию сосудов желудка. При применении ассоциированного с геном кальцитонина пептида и капсаицина оказалось, что их вазодилатирующий эффект также опосредован действием NO. При внутрижелудочном введении соляной кислоты синтез NO увеличивает кровоснабжение слизистой оболочки. Этот механизм защищает слизистую оболочку при усилении обратной диффузии ионов водорода в случае нарушения слизистого барьера. Важно отметить, что именно через NO, как вторичного посредника, обеспечиваются вазодилататорные эффекты блуждающего нерва и многих других вазоактивных веществ.

В последние годы получено множество убедительных данных, доказывающих участие оксида азота в гастропротекции, ведь именно NO опосредует гастропротекторные эффекты гастрина, морфина. Одним из важных механизмов действия этих препаратов является улучшение кровоснабжения желудка через релизинг NO.

Доноры NO ускоряют заживление ацетатных язв. Угнетение синтеза NO усиливает этаноловое повреждение желудка и ослабляет гастропротекторное действие простагландина E2 и капсаицина. И это вполне объяснимо: ведь улучшение кровоснабжения –одно из ключевых звеньев гастропротекции, а NO – основное звено в механизме вазодилатации, вызванной этанолом.

Но не столь интересна была бы молекула NO, будь она исключительно положительным персонажем. NO может быть плейотропным агрессивным фактором за счет своей способности при определенных условиях угнетать циклооксигеназу, усиливать цитотоксичность перекиси водорода при поражении слизистой оболочки желудка, выступать одним из патогенетических факторов развития колита, инициировать апоптоз гепатоцитов при острых и хронических активных вирусных гепатитах, гепатоцеллюлярной карциноме, алкогольных поражениях и при отторжении трансплантированной печени. Все эти нежелательные эффекты опосредованы активацией индуцибельной NOS и чрезмерной выработкой NO, при которой проявляется цитотоксический эффект оксида азота. Именно поэтому усилия фармакологов направлены на поиск избирательных ингибиторов NOS-2. В целом исследование роли NO в регуляции функций ЖКТ представляет собой перспективное и увлекательное направление, способное обеспечить прогресс в практической гастроэнтерологии.

## - NO в нервной и иммунной регуляции

В начале 90-х годов было выяснено, что оксид азота играет важную роль в синаптической передаче нервного импульса. При этом функции оксида азота оказались тесно связанными с одним из самых главных возбуждающих медиаторов — аминокислотой глутаматом. На рисунке 6 видно, что происходит при передаче нервного импульса от одного нейрона к другому. Из пресинаптического нейрона в момент возбуждения выделяется нейромедиатор — глутамат. Далее глутамат достигает мембрану постсинаптического нейрона и связывается там со своим специфическим рецептором. Это связывание вызывает вход Ca в клетку. Кальций активирует NOS, которая синтезирует оксид азота.

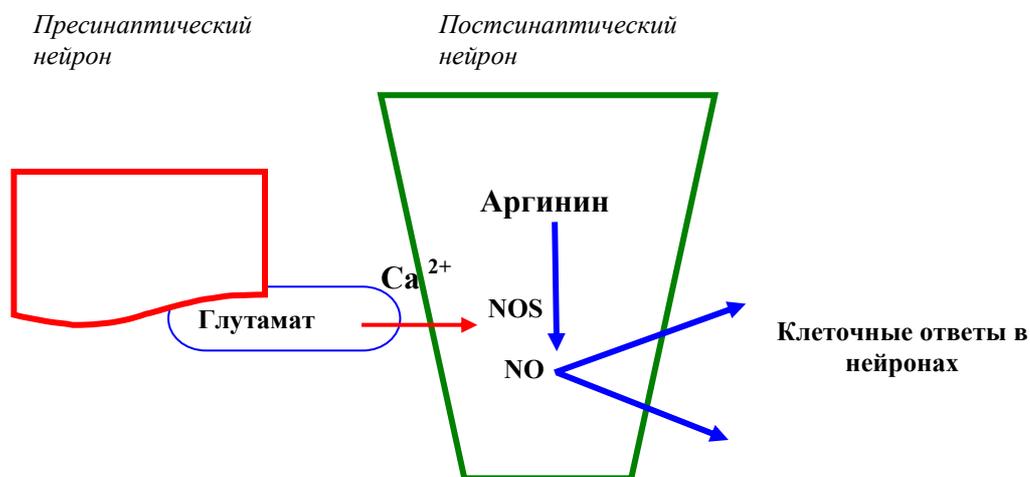


Рисунок 6. Участие NO в синаптической передаче нервного импульса

Весь процесс от момента выделения глутамата до начала синтеза оксида азота протекает с ошеломляющей быстротой в течение нескольких миллисекунд. После этого оксид азота также очень быстро выделяется из нейронов и стимулирует образование

вторичного мессенджера – цГМФ. Вторичные мессенджеры, в свою очередь участвуют в процессах дифференцировки, выделении нейротрансмиттеров и формировании долговременной памяти.

Таким образом, роль NO в регуляции нервной системы состоит в том, что он служит медиатором действия возбуждающих аминокислот и более конкретно, является посредником между глутаматом и образованием вторичных мессенджеров, ответственных за различные клеточные ответы нейронов (Moncada S, Palmer R.M.J., Higgs E.A., 1991).

В настоящее время особый интерес вызывает способность NO индуцировать ряд важнейших белков и ферментов, что выявляется как на уровне транскрипции, так и на уровне трансляции (белков антиоксидантной защиты, белка Р 53, ответственного за блокирование злокачественного роста) (Aguota O. I., 1994), активировать или подавлять активность многих белков и ферментов (гуанилатциклазы, рибонуклеотидредуктазы, компонентов дыхательной цепи и гликолиза).

И, наконец, исследования Hibbs и соавт., 1988, 1987 обнаружили генерацию NO активированными макрофагами. Было доказано, что цитостатический и цитотоксический эффекты макрофагов осуществляются посредством NO. При активации бактериальными эндотоксинами или Т-лимфоцитами макрофаги активируют синтез NOS, которая превращает аргинин в оксид азота. Последний выделяется из макрофагов (МФ), и быстро проникает в бактерии, грибки или опухолевые клетки. Там оксид азота ингибирует 3 жизненно-важных группы ферментов: митохондриальной дыхательной цепи цикла Кребса и синтеза

ДНК. В этих условиях энергопродукция и деление клеток становится невозможным и клетка погибает (рис. 7).

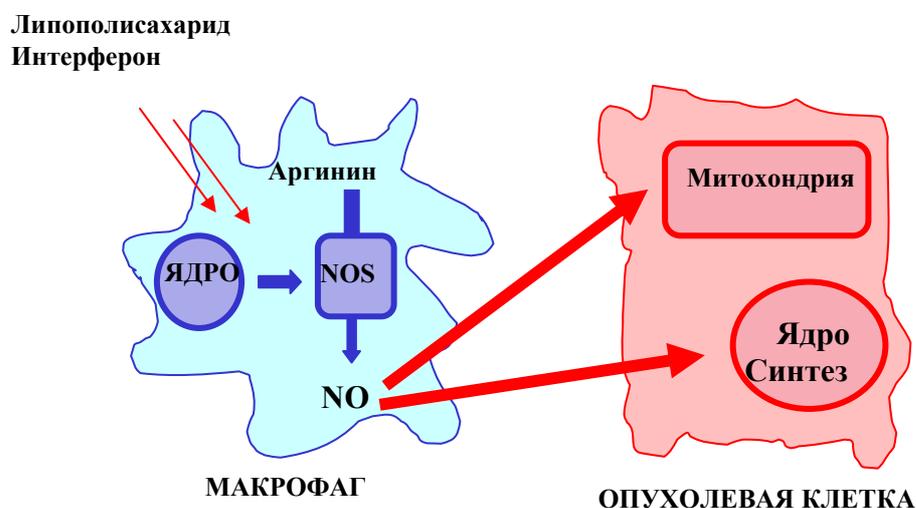


Рисунок 7. Механизм цитотоксического действия макрофагов

Для понимания природы цитостатических и цитотоксических сигналов необходимо рассмотреть реакции с кислородом и супероксидным радикалом. Продукты этих реакций пероксинитриты и обуславливают токсические эффекты NO. Подавление аконитазы цикла Кребса, рибонуклеотидредуктазы, взаимодействие с тиолами и истощение запасов энергии обсуждаются в настоящее время как возможные сценарии гибели клеток. Таким образом, мы вплотную подошли к проблеме апоптоза.

## **Оксид азота и апоптоз**

Термин апоптоз был предложен Керром и его сотрудниками в 1972г. для обозначения активного процесса разрушения клетки, характеризуемого ее сжатием, агрегацией хроматина с обширной фрагментацией генома и пикнозом ядра. Об апоптозе сейчас говорят как о научной революции не только в толковании смерти клеток, но и в расшифровке патогенеза многих болезней, в первую очередь злокачественных (Thompson C.V.,1995). Термин “апоптоз”- неологизм, образованный от двух греческих слов: apo – отделение, ptosis – падение, то есть нечто, подобное осеннему листопаду (Kerr J.F.R., et al.,1972). Под апоптозом понимают высокорегулируемую форму запрограммированной смерти клетки с характерными морфологическими и биохимическими признаками. Благодаря апоптозу из многоклеточного организма удаляются поврежденные, завершившие свой жизненный путь или нежелательные клетки без повреждения клеточного микроокружения.

Как известно, гибель клетки опосредована двумя механизмами: некрозом и апоптозом, которые характеризуются различными морфологическими и молекулярными проявлениями и разными эффектами на окружающие ткани. Некроз сопровождается набуханием цитоплазмы и органелл при незначительных изменениях ядра и оканчивается разрушением клетки. Выраженные изменения митохондрий сопровождаются быстрым истощением запасов энергии и нарушением механизмов внутриклеточного гомеостаза. В результате разрушения мембраны высвобождаются лизосомальные ферменты, которые вызывают лизис цитоплазматических структур и кариолизис.

Некроз всегда сопровождается перинекротическим воспалением и последующим склерозом.

При апоптозе вначале возникают изменения ядра с конденсацией хроматина, образующего своеобразные кольца у внутренней поверхности ядерных мембран. Органеллы цитоплазмы образуют агрегаты, в которых они остаются интактными. В дальнейшем клетки округляются, расширяются интрацеллюлярные пространства, нарушаются межклеточные контакты. Затем происходит фрагментация ядер и цитоплазмы. И, наконец, клетки распадаются на мелкие тельца, содержащие интактные органеллы, глыбки хроматина, окруженные мембранами. Такие апоптозные тельца быстро фагоцитируются макрофагами и соседними клетками того же вида. В отличие от некроза апоптоз обычно происходит в отдельных клетках. Поэтому не выделяются медиаторы воспаления, и в окружающих тканях не наблюдается развитие вторичной воспалительной реакции.

Для распространения стимулов апоптоза необходимо, чтобы иницирующие сигналы были восприняты и переданы эффекторным системам, ответственным за гибель клетки. Наиболее древним регулятором гибели клеток млекопитающих является протоонкоген *bcl-2*, который впервые был выделен из В-клеток фолликулярной лимфомы (Аруин Л.И., 1998). Внутри клетки, подвергшейся апоптозу происходит активация эндонуклеаз, трансклутаминаз, протеаз. Значения активации этих ферментов в развитии апоптоза доказывает его предотвращение при ингибировании последних.

Важнейшим проапоптозным фактором признан белок *p53*. Этот белок подавляет рост опухолей и поддерживает целостность генома, играя роль “стража генома”. Повреждение ДНК ведет к накоплению *p53*, вследствие чего клеточный цикл останавливается на стадии G1. При обширном повреждении ДНК *p53* вызывает апоптоз.

Вызванный NO апоптоз был впервые продемонстрирован в экспериментах на перитонеальных макрофагах (Брюне Б., 1998).

Затем исследования NO-зависимых механизмов апоптоза проводились на клетках инсулиномы, тимоцитах, хондроцитах, мезангиальных клетках. Эти исследования выявили следующие признаки воздействия NO. Индукция iNOS в макрофагах действием липополисахаридов или интерферона вызывает типичные морфологические и биохимические признаки апоптоза, развитие которых можно было блокировать введением ингибитора NOS-NMMA. С применением спонтанно разрушающихся доноров NO было показано, что степень повреждения пропорциональна концентрации NO. Далее было показано, что активация протеинкиназы подавляет развитие признаков апоптоза, вызванных NO. В клетках инсулиномы было выявлено накопление *p53* при гибели клеток, вызванной NO. NMMA подавляет накопление *p53*, обусловленное действием цитокинов или липополисахаридов, что указывает на активную роль NO. И, наконец, было доказано стимулирующее действие NO на активацию каспаз. Суперэкспрессия антиапоптотического белка *bcl-2* защищала клетки от цитотоксического действия NO. Интересные данные были получены при изучении взаимодействия радикалов супероксид-

аниона ( $O_2^-$ ) и оксида азота ( $NO\cdot$ ). Оба радикала вызывали зависимые от концентрации процессы апоптоза. Примечательно, что совместная инкубация оксида азота и супероксид-аниона вызывала перекрестный защитный эффект. Причем сбалансированная пропорция этих радикалов вызывала максимальный защитный эффект. Можно предположить, что сбалансированное отношение активных форм кислорода и азота имеет большое значение в регуляции апоптоза.

Таким образом, активация сигнальных путей апоптоза оксидом азота делает его способным убивать клетки. Однако, не все клетки после активации NOS вступают на путь апоптоза. Гибель клетки предотвращается суперэкспрессией bcl-2, индукцией гемоксигеназы, супероксидного радикала и белков теплового шока. Понимание взаимодействия этих сигнальных механизмов поможет выяснить, как NO влияет на жизнь и смерть клеточных систем.

### **Перспективы применения лекарственных веществ, влияющих на уровень NO**

Вместе с доказательством важной биологической роли оксида азота возник огромный интерес к этой молекуле со стороны теоретической и практической медицины.

Перспектива применения препаратов, влияющих на содержание NO, представляется многообещающей. Однако разнообразие функций NO заставляет задуматься о реальной возможности целенаправленных терапевтических воздействий на физиологические механизмы: слишком велика вероятность

побочных эффектов. Кроме вазодилиатирующего эффекта с NO связаны регуляция секреции инсулина и развитие диабета вследствие гибели клеток поджелудочной железы при вирусных инфекциях, регуляция почечной фильтрации, регуляция репаративных процессов в костях, регуляция слизиобразования в кишечном эпителии и это далеко не полный перечень.

Вместе с тем, в клинической практике давно применяются воздействия на физиологические механизмы, ведущая роль в которых отводится NO. Речь идет о нитровазодилататорах и в первую очередь о нитроглицерине (Langford E.J., et al., 1996).

Молекулярные механизмы оказываемых нитратами эффектов долгое время не были изучены. Микросомальные ферментные системы гладкомышечных клеток метаболизируют нитроглицерин с образованием NO, который и опосредует терапевтическое действие вазодилататоров. В острых ситуациях может оказаться полезным насыщение NO инфузируемых растворов. В эксперименте таким образом удалось предотвратить развитие постишемических повреждений миокарда. Усилия фармакологов направлены в настоящее время на поиски доноров NO, продуцирующих оксид азота либо под действием ферментов, либо спонтанно.

Другой терапевтический подход может быть связан с использованием блокаторов NOS. Так например, при добавлении селективного блокатора NOS - S-метилтизотиола (SMT) сокращались размеры инфарктной зоны, улучшался региональный кровоток. С помощью ингибиторов NOS в эксперименте удалось также сократить размеры инфарктной зоны и при ишемии головного мозга. Интересно, что такой

результат получен при воздействии ингибитора в течение нескольких суток после периода ишемии.

Кроме ингибиторов NOS активно исследуется терапевтический потенциал блокаторов индукции NOS. Из числа уже используемых препаратов таким действием обладают глюкокортикостероиды. Кроме того, способностью блокировать NOS обладают интерлейкины 4, 8, 10, трансформирующие факторы роста b-типа, эпидермальный фактор роста (Hayashi T., et al., 1994).

Усиление действия NO может быть основано на предотвращении его инактивации, что и делают различные препараты супероксиддисмутазы (SOD) и ее миметиков. Есть работы, доказывающие, что полезным может оказаться аргинин. Инфузия раствора аргинина приводит к снижению системного кровяного давления, к увеличению ЧСС, форсированному диурезу (Kanno K., et al., 1992).

Другой интересный подход для увеличения продукции NO состоит в использовании фактора некроза опухолей, предварительное введение которого предотвращает развитие постишемических повреждений в миокарде (Stamler J.S., et al., 1992).

Известно также, что продукты неферментативного гликозилирования белков крови, накапливающиеся при гипергликемии, связывают NO и препятствуют нормальному функционированию механизмов ауторегуляции кровотока. Предполагается, что блокирование этих механизмов окисленными липопротеинами вносит вклад в развитие

гемоциркуляторных нарушений при атеросклерозе (Flavahan N.A., 1992)

Воздействия на механизмы образования и инактивации NO могут представлять интерес не только для кардиологии, а также для неврологии, диабетологии (в связи с участием NO в регуляции синтеза инсулина и в гибели клеток поджелудочной железы), гастроэнтерологии (участие NO в регуляции слизиобразования в кишечнике, регуляции моторики ЖКТ, уменьшении проявлений пилоростеноза, трансплантологии, сексопатологии (участие NO в эрекции). Огромен потенциал воздействий, направленных на процессы образования NO для пульмонологии в лечении всего комплекса пульмонологических расстройств, которые относят к респираторному дистресс синдрому взрослых. Ингаляция NO снижает уровень легочной гипертензии, предотвращает гипоксическую вазоконстрикцию в легких.

В целом, при использовании и разработке препаратов, влияющих на содержание NO, необходимо помнить, что NO вовлечен как в нормальную регуляцию, так и во многие патофизиологические процессы. Поэтому идеальным препаратом окажется тот, который будет обладать способностью ограничивать гиперпродукцию или компенсировать недостаток NO в организме, и при этом не затрагивать существенные регуляторные и защитные функции NO.

Обобщая вышесказанное, можно выделить несколько особенностей NO и систем его генерации.

оксид азота коротко живущее соединение, что позволяет ему выполнять функции регуляторного сигнала.

NOS – один из самых регулируемых в биологии ферментов

молекула NO может существовать в трёх различных формах: NO<sup>•</sup>, NO<sup>+</sup>, NO<sup>-</sup>. Каждая форма NO имеет свои клеточные мишени.

Кроме того, в последнее время доказано, что оксид азота может запасаться в двух разных клеточных депо в форме динитрозильных комплексов железа и нитрозотиолов. NO может высвобождаться из них с различной кинетикой и в ответ на различные стимулы.

В совокупности эти особенности создают уникальные возможности как для регуляции всего синтеза NO, так и делают эту молекулу универсальным регулятором физиологических функций организма.

## **Белки теплового шока. История открытия.**

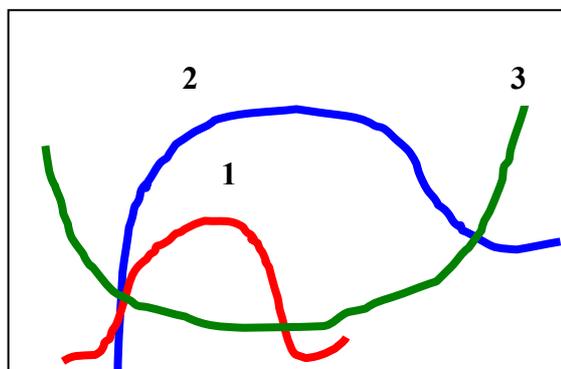
Своим названием белки теплового шока (Heat shock proteins - HSP) обязаны истории их открытия (Schlesinger M.J,1990; Schlesinger M.J.,Ashburner M., Tissieres et al.,1982). В 1962 году F.Ritossa обнаружил пuffed на хромосоме слюнной железы *Drosophila*, перенесшей тепловой шок. Впоследствии A.Tissieres связал образование пuffed с увеличением экспрессии генов, кодирующих HSP(Tissieres A.,et al.,1974). Известно, что в клетках, подвергнутых тепловому шоку, происходит угнетение общего белкового синтеза (Welch W.J.,Suhan J.P.,1986). Поэтому связь, обнаруженная A. Tissieres, свидетельствует об уникальности HSP.

В эволюционном отношении HSP относятся к высококонсервативным белкам. Это свидетельствует о том, что они выполняют фундаментальные клеточные функции.

Нативная молекула HSP70 представляет собой димер, обладает способностью формировать высоко олигомерные комплексы со многими структурами в клетке и имеет по меньшей мере 8 изоформ, точное число и концентрация которых зависит от типа клетки и контролируется видом стрессорного воздействия. (Schlesinger M.J,1990).

Динамика изменения общего синтеза белка и белка HSP70и в клетке, подвергнутой стрессу, была изучена Welch W.J. и Suhan J.P.,1986 (рис.8).

Рис.8 *Общий белковый синтез и синтез HSP70и в клетке после перенесенного стресса*



- 1- динамика содержания HSP70 в ядре
  - 2- динамика содержания HSP70 в цитоплазме
  - 3- динамика общего белкового синтеза
- По оси абсцисс - время после стресса в часах  
По оси ординат - содержание белков

Они показали, что максимальный синтез HSP70<sub>и</sub> в клетках наблюдается через 7-8 часов после окончания теплового шока и поддерживается на высоком уровне еще 4-5—часов. Через 24 часа после шока синтез HSP70<sub>и</sub> значительно уменьшается. Для общего синтеза клеточных белков характерна значительная депрессия во время шока и в первые часы после него. Синтез основных клеточных белков начинает восстанавливаться через 7-8 часов после окончания шока. Далее он нарастает, а через 24 часа достигает уровня, превышающего дошоковый. Соотношение уровня HSP и общего уровня белка в клетке, подвергнутой шоку, настолько велико, что количество белков теплового шока в ней достигает 15-20% от всех растворенных белков цитоплазмы (Theodorakis N.G., et al.,1987; Lindquist S.,et al.,1988).

После действия на клетки повреждающим агентом происходит не только активация синтеза белков теплового шока, но и их перемещение внутри клетки. После стресса HSP накапливаются в наиболее “уязвимых” участках клетки, а именно: в первые 4-5 часов – в ядре, затем в перинуклеарной, присарколеммальной зонах и вдоль актиновых филаментов (Welch W.J., Suhan J.P., 1986).

Смысл накопления HSP в ядре после повреждения клетки заключается в защите генетического материала, в частности, в ограничении деградации прерибосом, восстановлении структуры и функции ядрышек, экранировании нуклеазодоступных участков ДНК (Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю., 1993). Таким образом, HSP играют значительную роль в повышении устойчивости клеточного аппарата биосинтеза белка к повреждающим воздействиям.

В присарколеммальной зоне накопление HSP совпадает по времени со скоплением в этой зоне большого количества функционально активных, способных к трансляции молекул мРНК и рибосом. Известно, что при оптимальных для физиологии клетки условиях, количество рибосом в присарколеммальной области незначительно и они диффузно распределены по всей цитоплазме (Welch W.J., Suhan J.P., 1986), в то время как в присарколеммальных областях встречаются в незначительном количестве. Таким образом, речь идет о стресс-индуцированной миграции рибосом. Предполагается, что сочетание скопления HSP70 и рибосом в присарколеммальной области клетки, находящейся в состоянии шока, необходимо для быстрого восстановления мембранных белков, к которым, в частности,

относятся белки ионных каналов, рецепторные белки, ферменты (Малышев И.Ю.,1982). Следовательно, значение этого явления, вероятно состоит в том, чтобы наиболее эффективно компенсировать повреждение мембранных белков. Кроме того, имеются данные о связи HSP с вновь синтезированными тяжелыми цепями иммуноглобулинов в тех областях, где может происходить как нормальное связывание с легкой цепью, так и нежелательное связывание тяжелых цепей друг с другом, что препятствует образованию агрегатов из тяжелых цепей. Затем в ходе АТФ-азной реакции легкая цепь вытесняет белок теплового шока и формируется нормальная структура иммуноглобулина. Возможно, по такому же механизму обеспечивается образование и других белковых структур (Меерсон Ф.З.,1993).

Накопление HSP вдоль актиновых филаментов рассматривают как фактор, способствующий облегчению восстановления их сократительной способности (Benjamin I.J., McMillan R.,1998).

Накопление HSP после кратковременных воздействий на клетку тепловым шоком лежит в основе феномена временного повышения порога температурной чувствительности клеток, так называемой термотолерантности (Carper S.W., et al.,1987).

Активация синтеза HSP происходит не только после теплового шока, но и при культивировании клеток в присутствии солей тяжелых металлов, этанола (Morimoto R.I,1994; Werner I., et al., 1997), заменителей аминокислот, в условиях субстратного голодания (Werner-Washburne M., et al.,1993) при осмолярном и окислительном видах стресса (Whelan S.A., Hightower L.E.,1985), гипоксии (Benjamin I.J., Kroger B.,Williams R.S.,1990). Накопление белков теплового шока в тканях происходит после

кратковременных эпизодов их ишемии и реперфузии (Mehta H.V., et al., 1988). С накоплением HSP связывают формирование явления временной перекрестной толерантности к разным повреждающим агентам (Currie R.W., et al., 1988). В настоящее время белкам теплового шока придается большое значение в формировании феномена адаптационной стабилизации структур (Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю., 1993) и феномена аутоиндуцированной толерантности к ишемии (прекондоционинг, «ischemic precondition»)(Кулешова Э.В., Казеннов П.А., 1997).

Универсальный ответ клетки на воздействие различных стресс-факторов активацией синтеза HSP стал причиной появления другого их названия – “стресс-белки”. Вместе с тем ряд исследователей на этом основании рассматривают отдельные HSP как маркеры повреждения. (Sharp F.R., Sagar S.M., 1994).

К настоящему времени выделено несколько семейств HSP, различающихся по молекулярному весу: малые HSP (от 8 до 28 кДа), HSP40, HSP60, HSP70, HSP90, HSP100, HSP110. (Willem H., et al., 1995). По характеру активации синтеза HSP, подобно синтезу оксида азота, подразделяются на конститутивные и индуцибельные. Конститутивные HSP синтезируются в клетке постоянно и для их активации не требуется воздействия на клетку повреждающего агента, т.е. синтез их при стрессе не увеличивается. Вполне объясним большой интерес исследователей к индуцибельным HSP. Синтез индуцибельных белков начинается вскоре после воздействия на клетку повреждающего агента. По определению Schlesinger M.J., 1990: ”Индукцибельные HSP- это белки, синтез которых стимулируется

стрессом окружающей среды, а их гены содержат одну или более маркерных нуклеотидных последовательностей”. Данные, полученные *in vivo*, свидетельствуют о том, что разделение HSP на конститутивные и индуцибельные в человеческом организме достаточно условно, т.к. зависит от специализации и функциональной активности клеток. К примеру, в нейтрофилах крови здорового человека HSP70<sub>и</sub> не определяется, но выявляется в нейтрофилах крови больных сепсисом (Wong H.R.,1998). Такой же феномен мы описывали выше, характеризуя индуцибельную синтазу оксида азота у больных сепсисом, диффузными заболеваниями соединительной ткани, ДКМП, активация которой происходила в условиях стрессорных воздействий. Накопление HSP70<sub>и</sub> в нейтрофилах больных сепсисом может быть объяснено участием нейтрофилов в фагоцитозе, по аналогии с активированными макрофагами. Так, показано, что при активации макрофагов в них накапливается HSP70<sub>и</sub> (Teshima S.,et al.,1996). Этот феномен объясняется участием HSP70<sub>и</sub> в предотвращении аутоповреждения вследствие накопления в макрофагах активных форм кислорода, необходимых для “дыхательного взрыва”. В отличие от нейтрофилов HSP70<sub>и</sub> обнаруживается в лимфоцитах крови здорового человека (Deguchi Y.,et al.,1990). Это может объясняться участием HSP в процессах активации лимфоцитов и синтезе иммуноглобулинов. Рядом исследователей отмечено, что при аутоиммунных заболеваниях, таких как СКВ, ревматоидный артрит, повышение содержания в лимфоцитах крови HSP70<sub>и</sub> связано с активностью патологического процесса (Minota S.,et al., 1998; Wendling U.,et al.,1997). Таким образом, обнаруженная связь между содержанием HSP в клетках и устойчивостью тканей к ишемии и реперфузии, участие HSP в формировании

термотолерантности и явления перекрестной толерантности к разным повреждающим агентам служат проявлением их ярко выраженных цитопротекторных свойств. Вместе с тем, HSP необходимы для нормальной жизнедеятельности клетки, т.к. участвуют в поддержании клеточного гомеостаза, процессах роста и дифференцировки клеток (Dura J.,1981; Roccheri M.C., et al., 1981).

Резюмируя рассмотрение свойств, локализации, классификации HSP можно выделить следующие основные положения:

- В клетке после стресса быстрыми темпами происходит накопление белков теплового шока, причем активация синтеза HSP70 предшествует восстановлению общего синтеза клеточных белков.
- В ранний постстрессорный период HSP70 локализуются в основном в ядре, в поздний - в цитоплазме в 3 областях: присарколеммальной, перинуклеарной и вдоль актиновых филаментов.
- В клетке, подвергшейся стрессорному воздействию, HSP70 мгновенно принимаются за работу, нормализуя формирование рибосом в поврежденном ядре, предупреждая агрегационные процессы при фолдинге белков в условиях значительного накопления первичных полипептидов, восстанавливая нормальную структуру миофибриллярного аппарата в цитоплазме.
- В постстрессорный период HSP70 участвуют в дисагрегации комплекса с восстановлением нормальной структуры белка или с окончательной деградацией поврежденных

полипептидов, являясь составной частью клеточной системы репарации, защищая процессы биосинтеза белка и структурную целостность клеточных пептидов.

### **Шаперонинг.**

#### **Структурно-функциональная характеристика белков теплового шока.**

Как цитопротекторные свойства стресс-белков, так и их роль в процессах нормальной жизнедеятельности клетки во многом определяется тем, что эти белки являются шаперонами. Термин шаперон (chaperon – фр., пожилая дама, сопровождающая молодую девушку на балы, компаньонка) впервые применен Laskey RA в 1978 году к белку, предотвращавшему нежелательные ионные взаимодействия между гистонами и молекулой ДНК.

Шапероны – это белки, которые облегчают сворачивание, сборку и разборку других белков. К шаперонам относятся HSP70, HSP90, HSP60,  $\alpha\beta$ -кристаллин (HSP22), HSP27. Способность к шаперонингу заложена в структуре белков-шаперонов, которое позволяет им осуществлять цикличное АТФ/АДФ-зависимое связывание с другими белками (Fung K.L., et al., 1996).

Четвертичная структура шаперонов – представителей семейства HSP70 представлена димером. HSP70 состоит из двух функционально значимых доменов (Pukaу B., Horvich A. 1998): АТФ/АДФ-связывающего домена, соответствующего

NH<sub>2</sub> –терминали, которая по существу представлена АТФ-азой, и пептид связывающего домена, соответствующего COOH-терминали, которая вариабельна по аминокислотному остатку и определяет субстратную специфичность, а также некоторые различия в функциях HSP в клетках разных видов живых организмов (Lindquist S.,1988). В субстрат-связывающем домене находится функционально значимая последовательность аминокислот (NRLLLLTG). Четыре остатка лейцина, входящих в эту последовательность, образуют четыре петли, две из которых формируют субстрат-связывающий участок. Последний взаимодействует с гидрофобными аминокислотными последовательностями белков-субстратов (Rudiger S., et al.,1987).

Когда белок-субстрат находится в нативной конформации, гидрофобные последовательности спрятаны в сердцевине глобулы белка и недоступны для HSP. В активной конформации гидрофобные последовательности белка экспонируются на поверхности молекулы и становятся доступными для субстрат-связывающего участка HSP70. В результате взаимодействия субстрат-связывающего участка HSP70 с гидрофобными последовательностями белка-субстрата между ними формируются гидрофобные связи.

Для HSP показана способность образовывать комплексы с белками ядрышка, с ДНК-репликативным иницирующим комплексом, клатрином, белком р53, фактором транскрипции, белками микротубул.

Консервативный АТФ-азный домен состоит из двух больших глобулярных субдоменов. Оба субдомена и связывающие их

альфа-спирали отвечают за формирование нуклеотид-связывающего участка, для функционирования которого необходимо присутствие ионов  $Mg^{++}$  и  $K^+$  (Flaherty K.M., et al., 1990). Нуклеотид взаимодействует с двумя фосфат-связывающими петлями и гидрофобным аденозин-связывающим участком HSP70. Одновременно устанавливается связь комплекса с ионом магния.

Для гидролиза АТФ молекулой HSP70 необходим ион магния и два иона калия. Это объясняет факт обязательного участия калия в шаперонном действии HSP70.

В зависимости от насыщенности нуклеотида фосфатными остатками, различают два состояния HSP70: HSP70-АТФ и HSP70-АДФ. В комплексе HSP70-АТФ субстрат-связывающий участок открыт, т.к. комплекс HSP70-АТФ обладает низким сродством к субстрату и высокой скоростью обмена субстрата. В комплексе HSP70-АДФ субстрат-связывающий участок закрыт, т.к. он обладает высоким сродством к субстрату и низкой скоростью его обмена.

На первом этапе шаперонного механизма происходит быстрое формирование слабого комплекса между HSP-АТФ и субстратом, далее следует медленная структурная перестройка, изменяющая константу диссоциации для АТФ. На втором этапе происходит гидролиз АТФ, сопряженный с изменением конформации пептид-связывающего домена и высвобождением или заменой связанного с HSP70 субстрата.

В компетенции HSP-шаперонов находится временное связывание и облегчение скручивания незрелых пептидов в процессе трансляции (Morimoto R.I., Tissieres A., et al., 1994), облегчение транспорта белков вдоль мембран органелл, разборка олигомерных белковых комплексов, контроль биологической активности регуляторных белков, в том числе транскрипционных факторов, предотвращение агрегации частично денатурированных белков вследствие межмолекулярных взаимодействий, раскрытие клатриновых везикул, облегчение деградации токсических метаболитов белков путем облегчения транспорта денатурированных белков к протеосомам и лизосомам (Freeman B.C., Morimoto R.I., 1996). *In vitro* показана роль шаперонного механизма в восстановлении функциональной активности цитрат-синтазы, бета-галактозидазы и других ферментов. HSP90 и HSP70, будучи компонентами апорецепторных комплексов стероидных гормонов, посредством шаперонного механизма обеспечивают поддержание стероидных рецепторов в конформационном состоянии, необходимом для взаимодействия с гормонами. Такое многообразие функций, выполняемых HSP, требует жесткого контроля за их синтезом.

### **Генетический аппарат синтеза HSP**

Система HSP представляется одной из основных систем поддержания внутриклеточного гомеостаза. Доказательством этого утверждения служат следующие факты. Во-первых, белки теплового шока активно участвуют в метаболизме белковых молекул: формировании четвертичной структуры, транспорте и

деградации пептидов, что делает их жизненно необходимыми для нормальной жизнедеятельности клетки (Willem H.,1995).

Во-вторых, стресс-белки также обладают способностью к саморегуляции (Sorger P.K.,1990; Clos J., et al.,1990) и отчетливыми цитопротекторными свойствами.

И, наконец, белки теплового шока характеризуются общностью механизма контроля их синтеза. Ген HSP70 имеет два основных участка: промоторную область и кодирующую последовательность. В промоторе генов всех HSP содержится специфическая регуляторная последовательность, обозначаемая как heart shock consensus element (HSE). Впервые он был описан Pelham в 1982 году. HSE локализован на кодирующем тяже ДНК и необходим для стресс-опосредованной транскрипции HSP гена. А специфическими для HSP факторами транскрипции служат HSFs (heart shock transcription factors). HSFs взаимодействует с HSE в процессе активации синтеза белков теплового шока. (Willem H.,1995).

Известно, что активация синтеза HSP может происходить как на уровне трансляции, т.е. за счет ускорения синтеза полипептидов на матричных РНК, так и на уровне транскрипции, т.е. за счет синтеза новых РНК. Исследования самого последнего времени позволяют предположить, что в клетках млекопитающих синтез HSP происходит главным образом за счет накопления новых молекул РНК. Поэтому особый интерес представляет рассмотрение механизмов транскрипции гена белков теплового шока. HSP ген экспрессируется как первичный транскрипт. Он состоит из 2241 нуклеотида и содержит кодирующую часть из 2025 нуклеотидов. По обе стороны от кодирующей части

находятся интроны – нуклеотидные последовательности, которые не несут информации для синтеза полипептида. Интересен тот факт, что мРНК HSP содержит не более двух коротких интронов, тогда как количество интронов мРНК других клеточных белков достигает 17. Высокая скорость стресс-индуцированного синтеза индуцибельных белков теплового шока связана с малыми затратами времени и энергии, необходимых на вырезание всего лишь 2 интронов. В гене конститутивного HSP70, синтез которого, как мы оговаривались, не меняется в ходе стрессорных воздействий, содержится 8 интронов (Dworniczak B., and Mirault M.-E., 1987).

Активация транскрипции генов HSP происходит в результате взаимодействия фактора теплового шока с согласительным элементом теплового шока в промоторе генов HSP.

Фактор теплового шока представляет собой регуляторный белок и постоянно обнаруживается в клетке. Разные HSF-белки отличаются по аминокислотному составу. У человека обнаружено 2 вида HSF (HSF1 и HSF2). Активируют синтез HSP только транскрипционно активные HSF-белки. Такие белки приобретают указанную активность в результате посттрансляционной модификации. Факторы, запускающие этот процесс различны для HSF1 и HSF2. Активация HSF1 происходит после действия на клетки теплового шока, солей тяжелых металлов, этанола, заменителей аминокислот. Активация HSF2, предположительно, происходит в процессе дифференцировки клетки, например при сперматогенезе.

В неповрежденной клетке HSF1 присутствует в виде мономера и равномерно распределен по цитоплазме и ядру. Спустя 2-5-

минут после теплового шока происходит тримеризация HSF1 и его перемещение в ядро. ДНК-связывающей способностью обладает только HSF1-тример. Связывание HSF1-тримера с согласительным элементом (HSE) теплового шока в промоторе генов HSP недостаточно для активации синтеза стресс-белка. Предполагается, что HSF1 приобретает транскрипционную активность после фосфорилирования в его составе серина/треонина (Teodorakis N.G.,1987). После прекращения действия раздражителя HSF возвращается в состояние мономера и распределяется по всей клетке, теряя транскрипционную активность.

Разное число молекул HSE содержится в промоторе всех генов HSP и представлены они последовательностями из 5 пар нуклеотидов, количество которых варьирует от 3 до 6. Для стабильной связи HSF с HSE *in vitro* необходимо хотя бы 2 молекулы HSE.

Помимо HSF-HSE опосредованной активации, синтез белков теплового шока может инициироваться и другими факторами транскрипции, как то стресс-чувствительного элемента STRE (General Stress Response Element), представленного последовательностью нуклеотидов CCCCT (Marchler G., et al.,1993). Транскрипционный фактор, взаимодействующий с этим элементом, точно не идентифицирован. Возможно, он относится к AP1-подобным, bZIP-содержащим факторам транскрипции. Помимо генов белков теплового шока STRE присутствует в промоторах генов каталазы цитозоля, глицерол-3-фосфат дегидрогеназы. bZIP-содержащие факторы транскрипции, а еще точнее Yap1p, активируют синтез

мембранного белка, вовлеченного в процессы детоксикации при воздействии тяжелых металлов, гена, кодирующего тиоредоксин, гена гаммаглутамилцистеинсинтетазы (Kuge S., 1994; Wu A.-L., et al., 1994). Специфическими участками узнавания Yap1p служат ARE-последовательности в промоторах генов, которые кроме вышеупомянутых были найдены в промоторе генов уже известной нам супероксиддисмутазы, глутатион-6-фосфатдегидрогеназы. Предполагается, что AP1 участвует в контроле апоптоза за счет высокой чувствительности к изменениям редокс-потенциала и отрицательной регуляции активности гена “смерти” c-myc. (Rahl H.K., Baeuerle P.A., 1994).

Проблеме неспецифического ответа клетки на повреждение уделяется большое внимание, так как предполагается, что между стресс-контролем и контролем роста и дифференцировки клеток существуют тесные взаимосвязи. Белки теплового шока участвуют в формировании явления перекрестной резистентности и феномена адаптационной стабилизации структур, в восстановлении нативной конформации белковых молекул, в восстановлении активности ферментов и, наконец, взаимодействуют с антиоксидантной системой и системой генерации хорошо известного нам оксида азота. Таким образом, можно с уверенностью сказать, что система белков теплового шока представляет одно из обязательных звеньев неспецифического ответа клетки на повреждение, и в организме человека эта система находится под нейро-гуморальным контролем. Было доказано, что HSP опосредуют действие глюко-, минеролокортикоидов и половых

гормонов. HSP, как шапероны, участвуют в синтезе гликопротеинов, к которым относится тиреоглобулин, причем механизмы стрессорной активации синтеза белков теплового шока характеризуются высокой тканевой специфичностью.

### **Механизмы нейро-гуморального контроля синтеза HSP**

Исследования по изучению экспрессии HSP70 в условиях *in vivo* показали, что минимальная температура, при которой начинается индукция HSP, менее  $40^{\circ}$ , что оказалось ниже, чем в опытах *in vitro*. Ведь при такой температуре денатурация клеточных белков не происходит и соответственно этот фактор не может участвовать в активации синтеза HSP. Однако стало известно, что в условиях *in vivo*, в отличие от таковых *in vitro* в клетках исходно присутствуют молекулы мРНК индуцибельных HSP. Было установлено, что при действии на организм животных такой температуры, что само по себе уже является стрессом, происходит выброс в кровь стресс-гормонов, включая адреналин, норадреналин, АКТГ, пролактин. Это дало основание предположить участие нейрогуморальных факторов в активации синтеза HSP70.

Хорошо известно, что при стрессорном воздействии возникает активация высших вегетативных центров, в результате чего в клетках, во-первых, происходит выход  $Ca^{2+}$  в цитоплазму, увеличение концентрации диацилглицерола и повышение активности протеинкиназы C, изменение внутриклеточного pH, что в конечном итоге приводит к активации генов.

Во-вторых, стимуляция  $\beta$ -адренорецепторов с последующим увеличением в клетке цАМФ и  $Ca^{2+}$  приводит к активации цАМФ и  $Ca$ -зависимых протеинкиназ, одной из внутриклеточных

мишеней которых служит фактор транскрипции гена теплового шока.

В-третьих, в цитоплазме стероидные гормоны связываются со специфическими рецепторами, которые обладают высоким сродством к ДНК и связываются с генетической матрицей. В результате обнаруживается продукция специфических белков, которые влияют на рост и дифференцировку клетки. К этим белкам относятся и белки теплового шока.

Таким образом, в условиях организма инициация синтеза HSP при стрессе связана с активацией по меньшей мере трех рецепторных систем: Са-мобилизующих,  $\beta$ -адренорецепторов и рецепторов стероидных гормонов (Меерсон Ф.З. и соавт.1993)

Накопление HSP70 *in vivo* тканеспецифично. В экспериментах Blake M.J.,1993 накопление мРНК HSP70 в мозге, легких и коже крыс зависило от продолжительности и уровня гипертермии, в отличие от динамики этого процесса в печени. Максимальный синтез белка наблюдался через 1 час после теплового шока. Кроме средней гипертермии к накоплению HSP в тканях организма приводит иммобилизационный стресс. Было показано, что при иммобилизационном стрессе в аорте и надпочечниках крыс накапливается HSP70. Udelsman R. et al.,1993 отметили, что в стенке аорты содержание HSP70 увеличивается преимущественно в миоцитах. В экспериментах к повышению уровня HSP приводило назначение животным агониста дофаминовых рецепторов (CQP) и агониста  $\alpha$ 1-адренорецепторов – фенилэфрина. В ряде работ показано, что в аорте стресс-индуцированное накопление HSP70 зависит от взаимодействия стероидных и адренергических влияний (Udelsman R., et

al.,1994), а синтез HSP в надпочечниках крыс - от АКТГ. Накопление HSP70 регистрируется в тканях, испытывающих функциональные перегрузки. Интересны также данные о том, что при содержании крыс в условиях средовой гипотермии ( $-6^{\circ}$ ), накопление HSP70 происходит в бурой жировой ткани, и это явление опосредовано альфа 1-адреностимуляцией. Fakaуama et al. показали, что паратгормон увеличивает содержание мРНК HSP70 в клетках почечного эпителия, причем эффект гормона оказался настолько сильным, что не уменьшался даже после регистрации делеции в HSE-эlemente промотора. Имеются многочисленные данные о активации кальцитонином синтеза HSP70.

Система HSP не только находится под нейро-гуморальным контролем, но и участвует в рецепции ряда гормонов, таких как глюкокортикоиды, минералокортикоиды, прогестерон и эстроген. Оказалось, что HSP входят составными элементами в компонентами их апорцепторные комплексы. Эти белки требуются для поддержания рецепторов в конформационном состоянии, необходимом для акцепции гормонов. После присоединения гормона к рецептору происходит диссоциация комплекса рецептор-HSP и комплекс гормон-рецептор начинает взаимодействовать со своими мишенями.

Известно, что кортикостероиды выступают посредниками в реакции стрессорных воздействий. В настоящее время кортикостероидам придается решающее значение в координации взаимодействия эндокринной и иммунной систем при стрессе. Поэтому участие отдельных HSP в рецепции кортикостероидов и стероидогенезе может предопределять связь между внутриклеточной эндогенной системой защиты, к которой

относится система HSP и центральным звеном общего адаптационного синдрома при стрессе.

### **HSP и сердечно-сосудистая система**

В структуре смертности от сердечно-сосудистых заболеваний инфаркт миокарда сохраняет за собой печальное первенство. Поэтому в этом разделе мы решили сфокусировать свое внимание на роли HSP в патогенезе ИМ. Не секрет, что первые необратимые изменения при ИМ отмечаются уже спустя 30-40 минут с момента окклюзии коронарной артерии. И кому же как не стресс-белкам, включиться в первую линию защиты миокарда.

Экспериментально данное предположение было подтверждено в работе W.H.Dillmann в 1995 году. Оказалось, что у мышей с генетически детерминированной гиперэкспрессией HSP70 после 20-ти минутной окклюзии коронарной артерии размер зоны некротизированного миокарда и уровень креатинфосфокиназы во время реперфузии были значительно меньше, чем у мышей с обычной экспрессией HSP70. Исследователи отметили, что трансгенным животным свойственны не только меньшие размеры некроза миокарда при его ишемии, но и более быстрые темпы восстановления функциональной активности сердца при реперфузии.

Хорошо изучены изменения метаболизма при ишемии в кардиомиоцитах. Это и возрастание доли анаэробного гликолиза, и нарастание дефицита макроэргов, и развитие ацидоза, и подавление синтеза белка. Клеточное повреждение

манифестируется резким нарастанием продукции свободных форм кислорода, активизацией процессов перекисного окисления липидов, нарушением структуры внутриклеточных и мембраносвязанных белков. И тут на помощь приходят шапероны.

При электронной микроскопии в ишемизированном кардиомиоците обнаруживается конденсация промежуточных филаментов в перинуклеарные агрегаты, реорганизация цитоплазматической сети, скопление актиновых филаментов вокруг ядра, разрыв микротрубочек, вакуолизация и исчезновение митохондрий, признаки агрегации хроматина ядра.

Привлекает внимание тот факт, что в эксперименте разрушения промежуточных филаментов в термотолерантных клетках не происходило (Welch W.J., et al., 1988). А ведь само явление термотолерантности тесно связано с накоплением внутри клетки HSP. Белки теплового шока способны взаимодействовать с тубулином, который входит в состав микротрубочек (Silva N.L.C.L., et al., 1995). Более того, было доказано, что HSP могут предохранять генетический аппарат клетки, взаимодействуя с хроматином и ядерными белками – гистонами и топоизомеразами, а также связываться внутри клетки с жирными кислотами: пальмитиновой и стеариновой, ограничивая детергентное действие последних (Guidon P.T., 1986).

Но, к сожалению, способности HSP защищать миокард не безграничны, ведь работа шаперонного механизма энергозависима, как впрочем и все внутриклеточные процессы, включая сам синтез HSP. Спустя 40 минут с момента окклюзии коронарной артерии дефицит макроэргов составляет более 90%. Остаточной энергии хватает только на работу ионных насосов. С

прекращением их функционирования по времени совпадает клеточная гибель. Морфологически в это время отмечается образование дефектов в мембранах кардиомиоцитов. Однако, не все клетки в зоне ишемии погибают одновременно. Полная волна "некротической гибели" от субэндокарда к субэпикарду продолжается 6 часов. Но даже спустя это время в зоне ишемии могут оставаться живые кардиомиоциты. В этих случаях говорят о гибернации (hibernus –лат.зимний, холодный) или об "оглушении миокарда".

Точного определения гибернирующего миокарда в настоящее время нет, т.к. нет экспериментальной модели хронической гибернации. Однако, конструируя модель острой гибернации в эксперименте, ученые пришли к выводу, что само состояние "зимней спячки миокарда" связано с его метаболической адаптацией (переход к анаэробному метаболизму). Это дает основание расценивать гибернацию миокарда как возникающую в ряде случаев адаптацию кардиомиоцитов к уровню их кровоснабжения, которая проявляется снижением функциональной активности клеток и изменением их метаболизма. При "метаболической адаптации" повреждения кардиомиоцитов не происходит в связи с чем трудно предполагать активацию системы HSP при острой гибернации. При длительной гибернации гистологически в миокарде определяется миолиз, накопление гликогена и интерстициальный фиброз.

Состояние "оглушенного миокарда" в отличие от гибернации не расценивается как адаптивная реакция и характеризуется стойким нарушением сократительной функции кардиомиоцитов при отсутствии признаков их необратимого повреждения и нарушений

коронарного кровотока. При этом состоянии наблюдается двухэтапное повреждение кардиомиоцитов при ишемии/реперфузии, первый из которых наблюдается при ишемии, а второй при реперфузии. При повторяющихся эпизодах ишемии/реперфузии в эксперименте исследователями была обнаружена активация синтеза HSP70. В работе Murry CE в 1986 году было показано, что кратковременные эпизоды окклюзий коронарных артерий с интервалами реперфузии существенно повышали толерантность миокарда к последующим, более длительным ее эпизодам, что приводило к снижению частоты развития ИМ, меньшему объему инфарктирования, снижению риска жизнеугрожающих аритмий. Белки теплового шока в этой ситуации выступают не только как шапероны, но и как потенциальные антиоксиданты.

Хорошо изучена и описана роль стресс-реакции в патогенезе ИМ. В крови больных ИМ определяется повышенное содержание адреналина, норадреналина, кортикостероидов, кортизола. Сам по себе стресс означает реактивное изменение внутри биологической системы, вызванное воздействиями, интенсивность которых нарушает равновесие системы (Мюлленайзен Б., 1993). Эффективность этой реакции зависит от силы и продолжительности действия раздражителя, а также от скоординированности работы стресс-реализующих и стресс-лимитирующих систем организма (Меерсон Ф.З.). Реализация этих компонентов происходит на клеточном уровне и требует совершенства рецепции, путей внутриклеточной передачи информации, а также адекватных энергетических ресурсов. Состояние кардиомиоцитов в зоне ишемии не соответствует ни

одному из этих требований. Поэтому физиологический эффект гормонального стимула становится патогенетическим механизмом клеточного повреждения. Глюкокортикоиды регулируют иммунный и воспалительный ответ посредством специфических механизмов на уровне экспрессии, транскрипции, трансляции, клеточной пролиферации и дифференцировки, секреции белков. Ни один из этих процессов не обходится без участия белков теплового шока.

### **HSP и апоптоз**

Мы не будем вновь подробно останавливаться на определении и характеристике апоптоза, а лишь попытаемся осветить роль HSP в этом процессе.

Белки теплового шока оказывают антиапоптотическое действие, подобно белку bcl-2. Существует несколько гипотез относительно антиапоптотического действия белков теплового шока. Первая заключается в защите с помощью HSP генетического аппарата клетки. Показано, что HSP связываются с хроматином и ядерными белками (Li G.C.,1987). В поврежденной клетке они распределяются преимущественно в участках деконденсированной, нуклеазодоступной ДНК .

Вторая гипотеза базируется на факте связывания белками теплового шока цитохрома C, аномально локализованного в цитоплазме (McMillan D.R.,et al.,1998).

Третья гипотеза основывается на данных о взаимодействии отдельных HSP со стресс-активируемыми протеинкиназами, которые участвуют в инициации программированной клеточной гибели клеток.

Таким образом, воздействуя на систему HSP, можно опосредованно регулировать процесс апоптотической гибели клетки.

### **Стресс, адаптация и белки теплового шока**

Мы убедились, что система белков теплового шока играет основную роль в феномене адаптационной стабилизации клеточных структур, в реализации стресс-реакции. Интенсивность стресс-реакции определяется соотношением активации стресс-системы и стресс-лимитирующей системы, которая ограничивает чрезмерную активацию стресс-системы и повреждающее действие стресс-гормонов (Меерсон Ф.З. 1993). Можно ли отнести систему синтеза HSP к стресс-лимитирующей?

К основным признакам, характеризующим стресс-лимитирующие системы, относятся:

1. Способность ограничивать стрессорные повреждения
2. Способность активироваться под действием стресса, т.е. стресс-индуцибельность
3. Способность ограничивать выброс или продукцию стресс-гормонов
4. Способность экзогенных метаболитов стресс-лимитирующих систем увеличивать, а ингибиторов этих систем снижать как устойчивость организма к стрессу, так и его адаптивные возможности

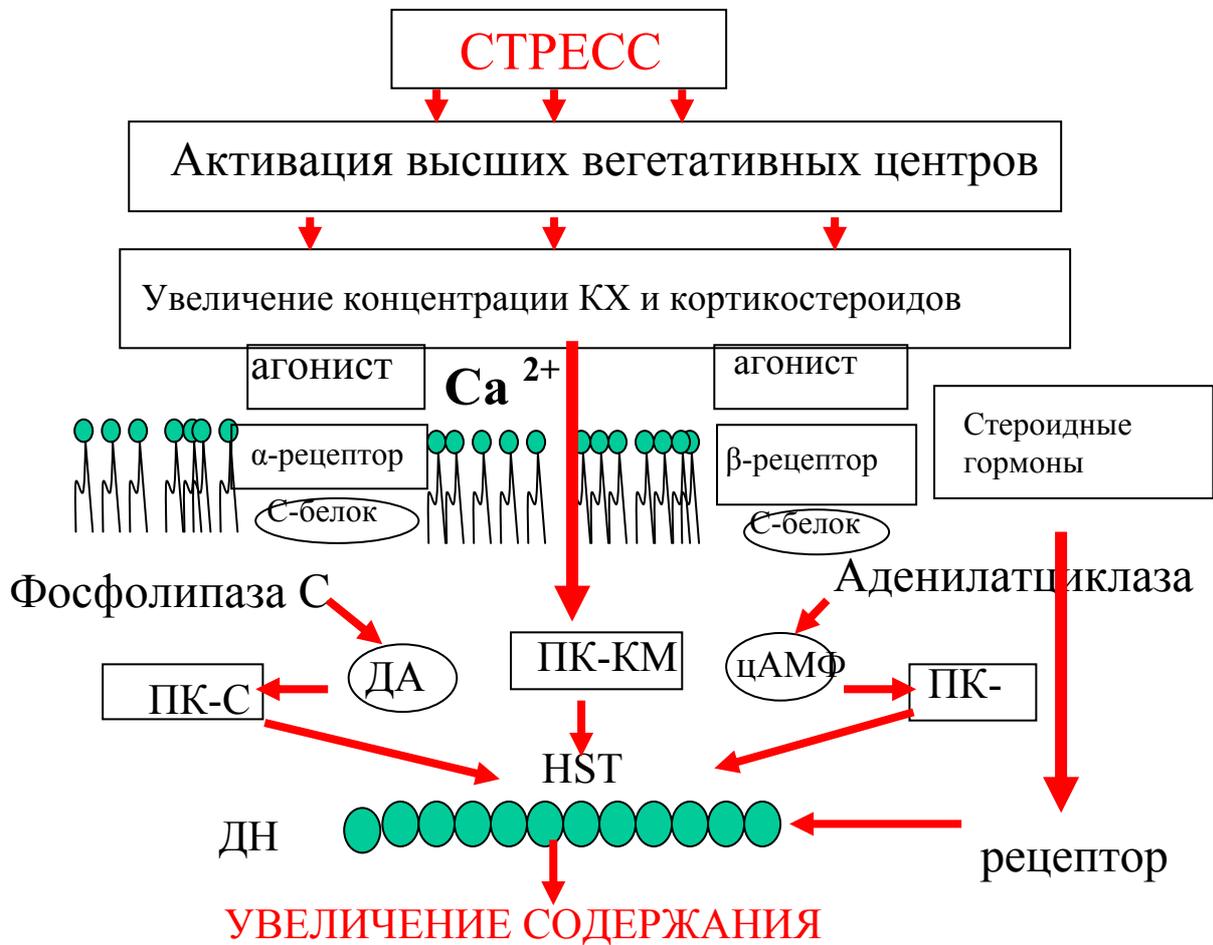
5. Способность к увеличению собственной активности или реактивности в процессе адаптации к повторным действиям факторов среды.(Меерсон Ф.З.,1984)

Белки теплового шока участвуют в ограничении по меньшей мере эффектов двух повреждающих агентов стресс-реакции: вызванных избытком кальция и чрезмерного липотропного эффекта, связанного с накоплением и детергентным действием жирных кислот. Таким образом, HSP70 участвуют в ограничении повреждающих эффектов стресс-реакции. Это соответствует первому условию, предъявляемому к стресс-лимитирующим системам.

Далее, стресс служит мощным активатором синтеза HSP70, т.е. система HSP демонстрирует себя как стресс-индуцибельная.

И, наконец, выше было описано, что HSP70 обладают цитопротекторными свойствами и повышают устойчивость клеток к повреждающим воздействиям.

Все вышперечисленное позволяет определить систему белков теплового шока как внутриклеточную стресс-лимитирующую систему. Механизм стресс-индуцированной активации синтеза белков теплового шока показан на рис.



Стресс-реакцию нельзя рассматривать как изолированное явление, а следует расценивать как необходимое звено адаптации организма к среде. После однократного стресса, как уже было сказано, активизируется по меньшей мере три внутриклеточных пути активации HSP-системы: через кальций –мобилизующие системы, через  $\beta$ -адренорецепторы и через активацию внутриклеточных стероидных рецепторов. Казалось бы, что при многократном действии стрессорного фактора будет происходить периодическая активация вышеупомянутых рецептор-зависимых путей накопления HSP. Однако, следует принять во внимание, что в процессе адаптации каждое последующее стрессорное воздействие сопровождается все меньшим подъемом уровня стрессорных гормонов крови. Каким же образом, несмотря на снижение степени подъема концентрации гормонов происходит

выраженная активация синтеза HSP и их накопление в испытывающем нагрузку органе?

Можно предположить, что первые стрессорные воздействия выступают в качестве триггера для формирования внутриклеточного механизма самоусиления в цепи рецепторно-зависимой активации синтеза HSP70. Высокая же концентрация белков теплового шока в последующем связана с поддержанием активного состояния сенситизации ряда ферментов, таких как фосфолипаза C и аденилатциклаза, то есть в процессе адаптации эти ферменты приобретают способность повышать свою активность не только в ответ на внешний гормональный стимул, но и при действии внутриклеточных факторов. В качестве такого фактора как правило выступает  $Ca^{2+}$ . Таким образом, в клетке формируются метаболические циклы с самоусиливающимися свойствами. За счет внутриклеточного механизма усиления, сформировавшегося в процессе адаптации, клетки приобретают способность отвечать на одиночный слабый гормональный сигнал многократной активацией генов и накоплением белков (Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю..1993).

Адаптацию можно подразделить на срочную и долговременную. Активация HSP играет ключевую роль в переходе от срочного этапа адаптации к долговременному. К настоящему времени показано, что HSP70 вовлечены в 3 наиболее важных неспецифических механизма генетического обеспечения адаптации и ее защитных эффектов: HSP70 могут действовать как ядерные сигналы в активации экспрессии поздних структурных генов; белки теплового шока участвуют в регуляции свертывания и внутриклеточного транспорта вновь синтезированных белков и ,

наконец, стресс-белки могут ограничивать повреждения за счет дезагрегации аномальных белковых агрегатов и увеличения мощности антиоксидантных систем.

Биологический смысл адаптивного увеличения мощности рецептор-опосредованной передачи информации состоит в обеспечении более экономного использования управляющих сигналов и возможности поддерживать адаптивные структурные изменения с помощью небольших коротких сигналов-напоминаний.

### **Перспективы использования системы HSP в медицине.**

Вполне понятно, что повышение эффективности защитной системы белков теплового шока может оказаться полезной для практической медицины. Так как система HSP является стресс-индуцибельной, то применение умеренных стрессов-воздействий помогло бы активизации данной системы. В качестве стресса в этом случае может выступать гипертермия. Речь идет об эффективных методах народной медицины – банях и саунах. В экспериментах на животных установлено, что гипертермия целого организма сопровождается накоплением HSP в миокарде, активацией антиоксидантных систем и повышением устойчивости сердца к реперфузионному повреждению.

Нередко приходится слышать о долгожителях в высокогорных местностях. С определенной долей допущения долгожительство можно трактовать с помощью системы HSP. Дело в том, что при адаптации к периодическому действию высотной гипоксии регистрируется высокое содержание HSP в сердце. В работе хорошо

всем известной барокамеры используется эффект адаптации к гипоксии.

Следующий подход состоит в применении фармакологических активаторов HSP системы. К настоящему времени доказано, что ингибиторы АПФ и органические нитраты могут быть использованы для увеличения содержания HSP. В эксперименте на культуре фибробластов показано, что соли тяжелых металлов и некоторые аналоги аминокислот интенсивно активаторуют синтез HSP.

И, наконец, последний, более гипотетический прием – введение в организм природных HSP или их синтетических аналогов. Имеются экспериментальные данные о том, что введение HSP в клетку повышает ее резистентность к тепловым повреждениям, а введение белков теплового шока в организм крыс уменьшает вероятность аутоиммунных заболеваний.

Таким образом, изучение стресс-лимитирующей системы HSP, ее регуляторных механизмов является чрезвычайно актуальной и перспективной задачей современной медицины.

### **Взаимодействие оксида азота и белков теплового шока**

Вот и пришло время встретиться двум главным героям данной книги. Было бы удивительно, если бы универсальный регулятор физиологических функций организма – оксид азота не оказывал бы никакого влияния на эндогенные системы защиты, одна из которых представлена системой белков теплового шока.

Мы изложили факты в соответствии с которыми HSP играют ключевую роль в стресс-реакции и в процессе адаптации организма к стрессорным воздействиям. Каков же вклад NO в регуляцию стресс-реакции? Экспериментальные данные по уровню продукции

NO при стрессе неоднозначны. В одних работах указывается на увеличение продукции NO, в других - на ее снижение.(Busse R., et al.,1993). Привлекает внимание тот факт, что при действии кратковременных стрессорных агентов отмечалось увеличение продукции оксида азота, тогда как длительные повреждающие воздействия приводили к снижению продукции NO. Здесь стоит вспомнить, что кратковременное действие стресса и адекватная стресс-реакция служит условием для усиления функционирования органов и мобилизации организма, в то время как интенсивная длительная стресс-реакция оказывает повреждающее действие на органы и ткани и из звена адаптации превращается в звено патогенеза различных заболеваний. Таким образом, можно предположить, что увеличение продукции NO соответствует стадии мобилизации при адекватной стресс-реакции, а снижение – стадии истощения. Оказывается, что при любом стрессорном воздействии увеличивается содержание ферментов, активирующих или инициирующих NOS. Активация этого фермента может быть связана с повышением внутриклеточной концентрации кальция, активацией свободнорадикального окисления и повышением концентрации свободных жирных кислот. Увеличение содержания NO может происходить за счет образования оксида азота из нитритов в ходе нитритредуктазных реакций в условиях недостатка кислорода, например, при гипоксии. NO играет роль в регуляции функции гипофиза и соответственно в предупреждении чрезмерной активации центрального звена стресс-системы. Доказана роль оксида азота и в регуляции периферического звена стресс-реакции. Так, NO ограничивает выброс симпатических медиаторов как на уровне надпочечников, так и на уровне нервных окончаний,

благодаря чему происходит эффективное NO–зависимое подавление стрессорного выброса катехоламинов.

Нам уже известно, что стресс-реакция приводит к активации HSP. К настоящему времени полностью доказано, что оксид азота активирует синтез этих протекторных стресс-белков. Это означает, что NO-зависимая активация HSP70 может составлять важный механизм антистрессорной защиты клеток. Но не только оксид азота способен влиять на синтез HSP. Возможна и обратная реакция. Белки теплового шока могут подавлять экспрессию индуцибельной NOS за счет снижения активации фактора транскрипции iNOS (NFkB). Смысл этого явления, по-видимому, состоит в ограничении гиперпродукции оксида азота и его цитотоксического действия.

Таким образом, можно предполагать, что NO участвует в регуляции стресс-реакции, ограничивая ее чрезмерную активацию и повреждающие эффекты как на центральном, так и на периферическом уровне.

Предположение о роли NO в долговременной адаптации было выдвинуто несколько лет назад, когда обнаружилось, что адаптация к иммобилизационному стрессу сопровождается выраженным усилением NO. Как уже указывалось выше ключевая роль в неспецифических эффектах адаптации принадлежит HSP70. Имеется ли связь между участием оксида азота в неспецифических механизмах долговременной адаптации и индукцией синтеза HSP. Исследования, проведенные Малышевым И.Ю. и Манухиной Е.Б., 1998 дали определенный ответ на этот вопрос. Исследователи попытались выяснить, как влияет блокада синтеза NO на накопление HSP70 в ходе адаптации. Выяснилось, что после курса мягких гипоксических воздействий происходило выраженное накопление

HSP70 и повышение устойчивости организма к гипоксии. L-NNA (блокатор NOS) полностью предотвратил как адаптационное накопление HSP70, так и развитие адаптационной защиты. Полученные результаты свидетельствовали, что при адаптации к гипоксии реализуется NO –зависимый механизм активации синтеза HSP70, обеспечивающий адаптационную защиту.

Проведенные в последнее время исследования показали, что NO участвует в формировании трех основных этапов долговременной адаптации:

- на этапе срочной адаптации оксид азота ограничивает чрезмерную стресс-реакцию и обеспечивает направленное перераспределение энергетических ресурсов в органы, осуществляющие адаптивную реакцию
- на переходном этапе NO активирует ранние регуляторные гены (HSP70 и протоонкогены) и участвует в передаче сигнала от ранних генов к поздним.
- на этапе долговременной адаптации NO участвует в поддержании повышенной устойчивости организма в отсутствии стресс-реакции.

Получается, что система генерации NO выступает как стресс-индуцибельная, способная ограничивать стресс-реакцию и повышать устойчивость к факторам среды, а также способная увеличивать устойчивость организма к стрессу или снижать ее при применении ингибиторов NOS. Все это позволило исследователям определить систему генерации NO как новую стресс-лимитирующую систему (Малышев И.Ю., Манукина Е.Б., 1998).

## **Клинические исследования**

Вполне понятен огромный интерес со стороны практической медицины к оксиду азота и белкам теплового шока. На нашей кафедре ассистентом Драпкиной О.М. и аспиранткой Задорожной О.О. были выполнены две работы, в которых изучались особенности синтеза оксида азота и стресс-белков у больных инфарктом миокарда.

### **Изучение особенностей синтеза NO у больных ИМ**

Задача первой работы состояла в изучении продукции оксида азота у больных с трансмуральным инфарктом миокарда.

Для изучения особенностей синтеза NO у больных ИМ было обследовано 30 больных Q-инфарктом миокарда. Определялся уровень конечных продуктов метаболизма в виде нитритов и нитратов в моче, плазме и культуральной среде мононуклеаров периферической крови больных на 1 и 21 дни заболевания спектрофотометрическим методом по реакции Гриса, а также содержание iNOS в мононуклеарах периферической крови больных на 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 дни ИМ с помощью Western blot analysis.

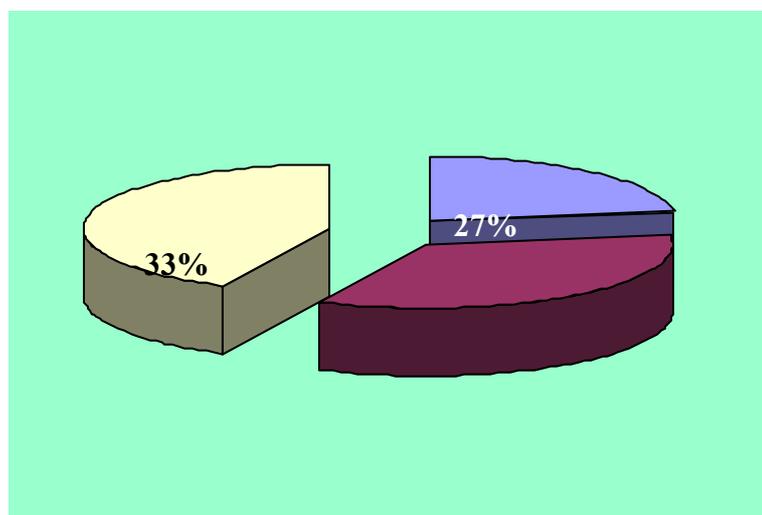
Диагноз инфаркта миокарда устанавливался на основании характерного болевого синдрома, типичных изменений электрокардиограммы и биохимических тестов (повышение активности сывороточных ферментов КФК, МВ-КФК, ЛДГ, АСТ). В исследование были включены больные, поступившие в первые 6-12 часов от начала заболевания с развивающимся инфарктом миокарда до внутривенной инфузии нитратов или

сублингвального приема нитроглицерина. Критериями включения в исследование являлись:

1. Наличие характерного болевого синдрома, подтвержденного данными ЭКГ и кардиоспецифических ферментов.
2. Возможность исследования уровня метаболитов NO в моче и плазме до применения нитратов.
3. Отсутствие тяжелой сопутствующей патологии: сахарного диабета, воспалительных заболеваний, локальных воспалительных процессов, обострения ревматических заболеваний, аллергических реакций, признаков почечной недостаточности, недостаточности кровообращения ПБ-Ш ст, болезни Альцгеймера.
4. Исключалось наличие в течение предшествующих 2-3 недель гипертермии и инсоляции.

При поступлении в отделение интенсивной терапии боли в области сердца были полностью купированы у 8 больных (26,6%), ангинозный приступ отмечался у 12 больных (40%), остаточный характер болей у 10 человек (33,3%) (диагр. 2).

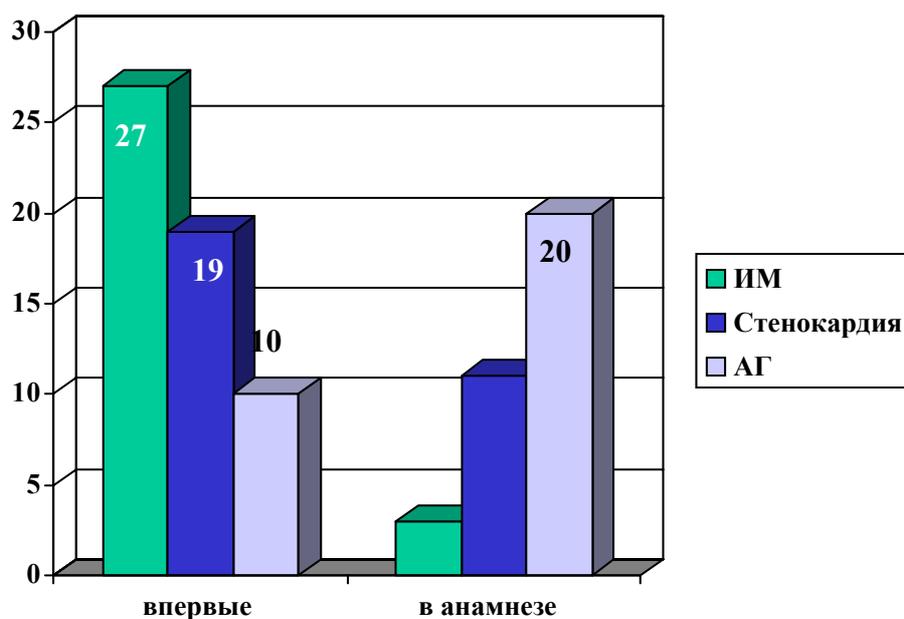
*Диаграмма 2 Распределение больных по степени купирования болевого синдрома на момент поступления*



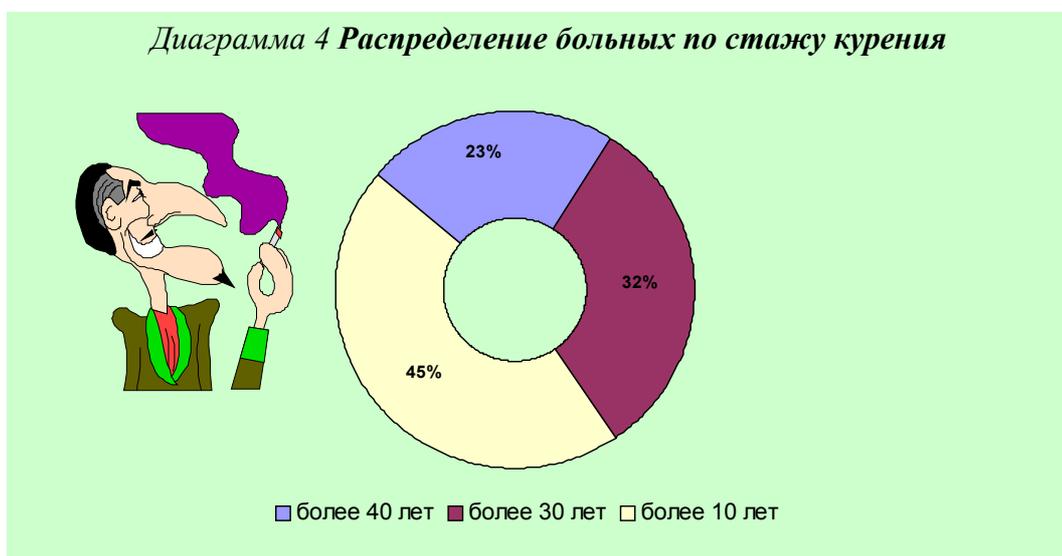
- - остаточный характер болей
- - ангинозный приступ
- - боли полностью купированы

27 больным (90%) был поставлен диагноз первичного инфаркта миокарда, 3 больным (10%) - повторного ИМ. 11 больных (36,6%) имели предшествующий стенокардитический анамнез, у 19 больных (63,33%) боли в области сердца отмечались впервые в жизни. У 20 больных (66,6%) анамнестически имелись указания на повышение АД, 10 (33,3%) больных отрицали наличие гипертензивных реакций в анамнезе (диагр. 3).

*Диаграмма 3 Распределение больных по анамнезу*



22 больных (62,8%) курили, из них стаж курильщика более 40 лет имели 5 человек (23%), более 30 лет 7 человек (32%), более 10 лет 10 человек (45%) (диагр.4).



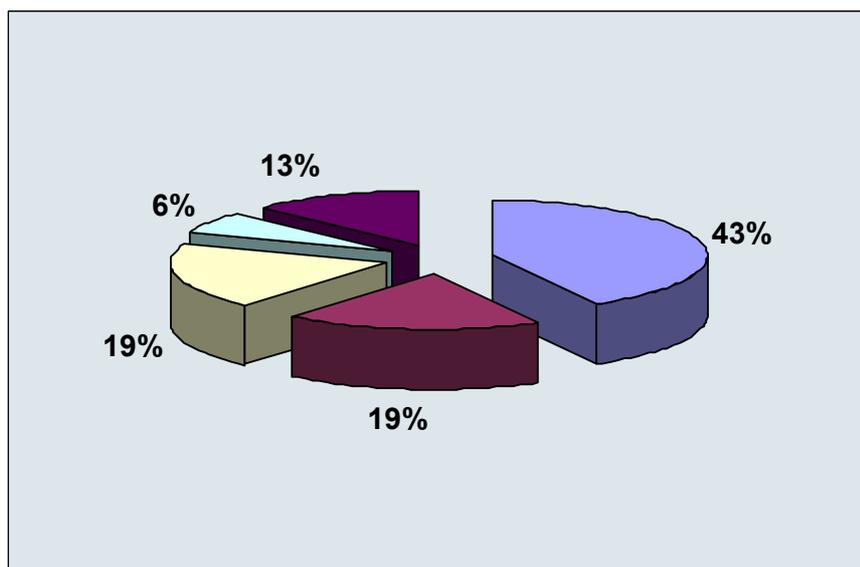
Наследственный анамнез в отношении сердечно-сосудистой патологии был отягощен у 24 больных (80%).

Системная тромболитическая терапия (саруплаза, стрептаза) проводилась 23 больным (76,7%), при этом реперфузионный синдром отмечался у 21 (80%) больного, клиническими критериями которого считались:

- расстройства сердечного ритма (частая желудочковая политопная, групповая экстрасистолия, желудочковая тахикардия, фибрилляция желудочков сердца, нарушения атриовентрикулярной проводимости), возникавшие в период введения саруплазы;
- снижение сегмента ST к изоэлектрической линии не менее чем на 25% от исходного уровня в первые 3 часа от начала лечения;
- достижение максимальной активности КФК и МВ фракции КФК в первые 12 часов от начала лечения.

Желудочковая экстрасистолия регистрировалась у 13 больных (43%), желудочковая тахикардия у 6 больных (19%), фибрилляция желудочков у 2 больных (6%), ускоренный идиовентрикулярный ритм у 6 больных (19%), нарушения проводимости у 4 больных (13%) во время проведения тромболитической терапии (диагр.5).

*Диаграмма 5 Реперфузионные аритмии*



- Желудочковая экстрасистолия 43%
- Фибрилляция желудочков 6%
- Нарушения проводимости 13%
- Желудочковая тахикардия 19%
- Ускоренный идиовентрикулярный ритм 19%

Тромболитические препараты не применялись у 7 больных (23,3%). Всем больным проводилась терапия препаратами нитроглицерина внутривенно капельно под контролем ЧСС и АД, гепаринотерапия под контролем ВСК первые 3-4 суток с последующим переходом на фиксированную дозу, применялась ацетилсалициловая кислота 125 мг в сутки. 18 больных получали

бета-блокаторы. 15 - ингибиторы ангиотензин превращающего фермента.

**Характеристика контрольной группы.** Контрольную группу составили 12 некурящих добровольцев в возрасте от 33 до 53 лет (средний возраст  $43,7 \pm 9,3$ ). Из них 11 мужчин и 1 женщина. Лица контрольной группы не имели указаний в анамнезе на стенокардитические боли, повышение АД, другой патологии со стороны сердечно-сосудистой системы. Исключалось также наличие сахарного диабета, системных или локальных воспалительных заболеваний, аллергических реакций, тромбоза вен нижних конечностей, недавней гипертермии или инсоляции (за 2-3 недели до забора анализов).

**План обследования больных.** Обследование больных проводилось по единому плану, в который входили:

- клиническое исследование;
- лабораторное исследование;
- инструментальное исследование;
- определение уровня метаболитов NO в моче, плазме и в среде культивирования мононуклеаров периферической крови больных в 1 и 21 дни ИМ;
- определение содержания iNOS в мононуклеарах периферической крови в 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 дни ИМ.

Клиническое обследование включало в себя расспрос, осмотр, перкуссию, аускультацию и пальпацию. При расспросе оценивались основные жалобы, степень купирования болевого

синдрома на момент поступления, данные анамнеза: наличие предшествующей стенокардии, наличие предшествующей артериальной гипертензии, продолжительность болевого синдрома, время от начала появления болей до взятия анализов крови и мочи на предмет определения уровня нитритов/нитратов, перенесенные ИМ, стаж курения, отягощенный наследственный анамнез.

При проведении осмотра особое внимание уделялось выявлению симптомов острой левожелудочковой недостаточности. Каждому больному определялся класс сердечной недостаточности по Killip Т.(1967)

Табл. 1 Клиническая классификация острого ИМ (по Т.Killip, J.T.Kimball).

Класс	Характеристика
I	Признаки левожелудочковой недостаточности отсутствуют
II	Легкая или умеренная левожелудочковая недостаточность
III	Тяжелая левожелудочковая недостаточность; отек легких
IV	Кардиогенный шок: тяжелая гипотензия, тахикардия, психическая заторможенность, похолодание конечностей, олигурия, гипоксия

Внутрибольничная летальность больных класса I составляет 3-5%, класса II- 6-10%, класса III-20-30% и больных класса IV- более 80%. Таким образом, оценка класса сердечной недостаточности по Killip является важным прогностическим критерием ИМ. Также оценивались гемодинамические показатели: артериальное давление систолическое, артериальное давление диастолическое,

частота сердечных сокращений, синдром нарушения ритма и проводимости. Большое внимание уделялось выявлению симптомов развития аневризмы желудочка - нередкого осложнения обширных трансмуральных инфарктов, которые могли являться причиной рецидивирующих желудочковых аритмий и снижения сердечного выброса. Представляли опасность также формирующиеся в области аневризм пристеночные тромбы - источники тромбоэмболий в системе большого круга кровообращения.

***Статистическая обработка полученных данных.*** Результаты всех исследований обработаны методом факторного анализа на основе выделения 102 параметров на каждого больного и последующим вычислением 4 факторов на каждого больного, методом промежуточного факторного анализа, а также методом вариационной статистики с вычислением критериев Стьюдента.

После получения результатов обследования больных ИМ, определения уровня нитритов/нитратов в моче, плазме, культуральной жидкости, продуцируемой мононуклеарами периферической крови, перед нами встал вопрос: существуют ли значимые корреляции между уровнем конечных продуктов метаболизма NO и значением выделенных параметров. В связи с тем, что число параметров было большим (102 параметра на больного), каждый нес в себе клинически значимую информацию и измеряемые переменные хорошо коррелировали между собой, мы предположили, что они либо взаимно определяют друг друга, либо связь между ними обусловлена какой-то третьей величиной. Для решения данной задачи нами была использована модель факторного анализа.

***Полученные результаты.*** В контрольной группе было обследовано 12 здоровых некурящих добровольцев (11 мужчин и 1 женщина).

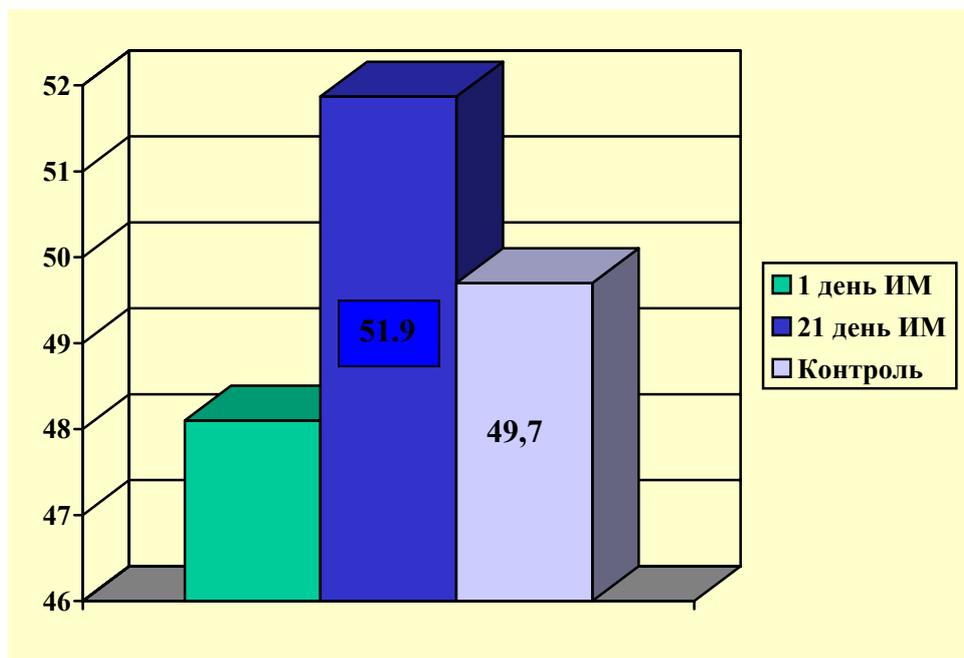
Средний уровень нитритов/нитратов в плазме крови составил 9,76 мкМ, в моче 49,70 мкМ. Уровень конечных продуктов метаболизма NO в культуральной жидкости, продуцируемой лимфоцитами составил 28,50 мкМ.

iNOS в лимфоцитах периферической крови здоровых добровольцев не была выявлена.

***Уровень метаболитов NO в моче больных ИМ.***

Средний уровень нитритов/нитратов в моче больных ИМ в первые сутки составил 48,08 мкМ. На 21 день ИМ в моче больных уровень нитритов/нитратов в среднем составлял 51,87 мкМ. Таким образом, средний уровень нитритов/нитратов на 21 день существенно не отличался от концентрации нитритов нитратов у контрольной группы и в первый день ИМ.

Диаграмма 6    *Уровень нитритов/нитратов в моче (мкМ)*  
мкМ



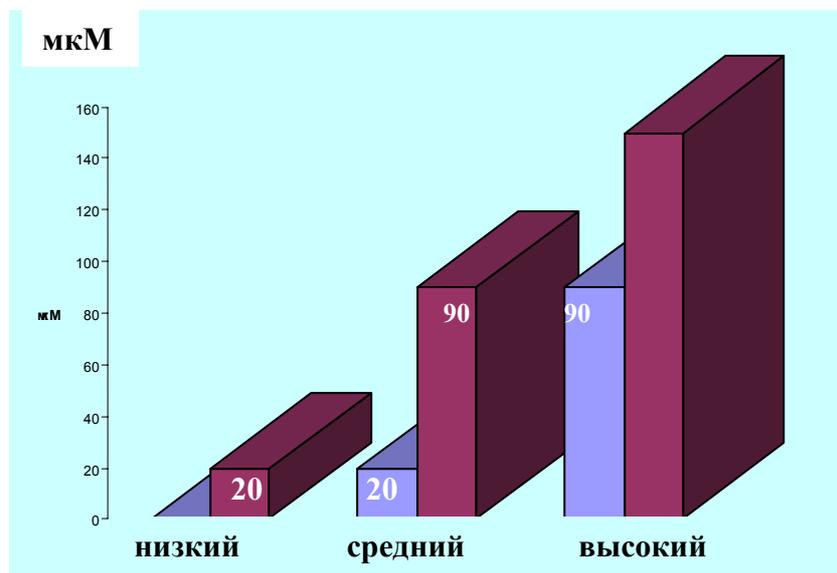
На 1 день определялись очень выраженные индивидуальные различия. Поэтому больных в первые сутки ИМ в зависимости от уровня нитритов/нитратов мы разделили на 3 группы:

с низким уровнем (0-20мкМ) 8 больных,

со средним уровнем (20-90мкМ) 17 больных,

высоким уровнем (от 90 и выше) 5 больных.

*Диаграмма 7 Распределение больных по уровню нитритов/нитратов в моче больных ИМ в первые сутки.*



Средний уровень соответствовал значениям нитритов/нитратов у здоровых людей (по нашим данным и данным литературы). В группу с низким и высоким уровнем нитритов/нитратов относились больные, имеющие соответственно более высокие или низкие уровни нитритов/нитратов по сравнению со средней группой. Во всех группах забор анализов для определения нитритов/нитратов осуществлялся в период от 2 до 6 часов от начала ангинозного приступа.

Наличие выраженных индивидуальных различий и формирование разных групп больных по уровню продукции NO в первый день ИМ позволяет сделать важный вывод о том, что существует по меньшей мере 3 типа ответов систем генерации

NO на ИМ: 1. усиление , 2. отсутствие изменений и 3. угнетение синтеза NO.

Для 1 группы с низким уровнем нитритов в первый день ИМ характерным является: значение фракции выброса  $33,8 \pm 4,41$ , Killip класс  $2,9 \pm 0,28$ , максимальный уровень КФК  $1446,3 \pm 289,16$ , сутки нормализации КФК  $5,0 \pm 0,28$ , артериальное давление систолическое  $115,0 \pm 14,22$ , артериальное давление диастолическое  $66,3 \pm 8,53$ .

Во второй группе больных значение фракции выброса было равно  $49,94 \pm 0,81$ , класс Killip  $1,41 \pm 0,14$ , АД систолическое  $125,59 \pm 2,03$ , АД диастолическое  $76,47 \pm 2,03$ , максимальный уровень КФК  $780,06 \pm 57,92$ , фракция МВ КФК  $91,67 \pm 9,84$ .

У больных третьей группы отмечались значения фракции выброса равные  $38,75 \pm 0,38$ , максимальный уровень КФК  $907,00 \pm 208,13$ , МВ КФК  $82,00 \pm 12,12$ , класс Killip  $1,25 \pm 0,19$ , АД систолическое  $118,75 \pm 8,65$ , АД диастолическое  $72,50 \pm 5,75$ . Интересно отметить, что в данной группе больных регистрировался самый высокий уровень холестерина плазмы крови.

Резюмируя вышеописанное, можно говорить о статистически достоверных различиях между группой больных с уровнем нитритов/нитратов в моче больных ИМ от 0 до 20 мкМ в первые сутки заболевания и группой больных с уровнем нитритов/нитратов от 20 до 90 мкМ по следующим показателям:

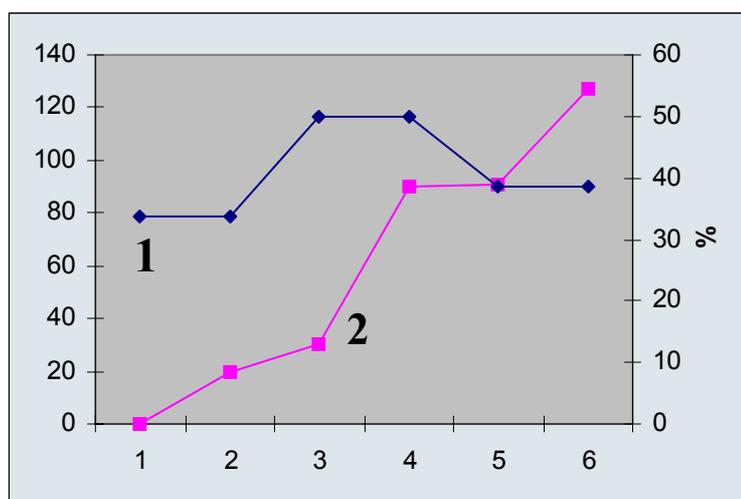
максимальному уровню КФК, максимальному уровню АСТ, уровню холестерина плазмы, классу Killip, значениям фракции выброса, подъему сегмента ST в мм ( $p < 0,05$ ).

Статистически значимые различия между уровнем продуктов метаболизма NO выше 90 мкМ и уровнем нитритов/нитратов ниже 20 мкМ определяются по следующим показателям: уровню МВ КФК и общей КФК, уровню АСТ ( $p < 0,05$ ).

Между группой с высоким уровнем метаболитов NO и их средним уровнем различия между значениями фракции выброса, уровню холестерина ( $p < 0,05$ ).

Значения фракции выброса менее 39% наблюдаются как при очень низком уровне нитритов/нитратов в моче больных ИМ в первые сутки, так и при высоком уровне конечных продуктов метаболизма NO. В группе больных со средним уровнем нитритов/нитратов в моче (от 20 до 90 мкМ) среднее значение фракции выброса составило  $49,94 \pm 4,41$ .

*Диаграмма 8 Зависимость фракции выброса от уровня нитритов/нитратов в моче больных ИМ в первые сутки*



**1** Фракция выброса (%)

**2** Уровень нитритов/нитратов в моче больных ИМ (мкМ)

Важно отметить, что все больные на 21 день ИМ относятся только к группе со средним уровнем нитритов/нитратов (20-90мкМ) с уровнем продукции NO, характерной для здоровых людей. Это означает, что в группе больных ИМ с высоким уровнем нитритов/нитратов на 1 день происходит снижение уровня метаболитов NO к 21 дню, а в группе больных с низким уровнем напротив - повышение.

Таким образом, после острой фазы ИМ по мере течения заболевания в организме вероятно активируются механизмы, направленные на восстановление нормальной продукции NO, наблюдаемой у здоровых людей.

Следующим шагом была попытка сопоставления значений факторов, рассчитанных при помощи факторного анализа и уровнем нитритов/нитратов в моче и плазме больных ИМ на 1 и 21 дни ИМ. Для каждого больного были выведены формулы для подсчета 4 факторов:

- 1. фактора риска острой левожелудочковой недостаточности,***
- 2. фактора тяжести клинического течения ИМ,***
- 3. фактора прогноза летального исхода,***
- 4. фактора риска аритмических осложнений ИМ.***

Наибольшее значение первого фактора составило 3,509 у больного с уровнем нитритов/нитратов 0,5мкМ (наименьшее

значение по группе). Клинически у данного больного регистрировался кардиогенный шок, острая левожелудочковая недостаточность, Killip 4.

Наименьшее значение данного фактора составило 0,623 у больного с уровнем нитритов/нитратов в 1 день 32,6мкМ. Фракция выброса у данного больного оказалась равной 57%, течение ИМ осложнилось нарушениями ритма, признаков недостаточности кровообращения не было.

Была выявлена обратная корреляционная зависимость между уровнем нитритов/нитратов в моче больных ИМ в 1 день и значением фактора риска острой левожелудочковой недостаточности.

Наибольшее значение второго фактора – фактора тяжести клинического течения ИМ - составило 5,054. Уровень нитритов/нитратов в моче на 1 день ИМ у этого больного составил 0,5 мкМ (наименьший уровень). Течение ИМ осложнилось у данного больного кардиогенным шоком, острой левожелудочковой недостаточностью (Killip 4), острой постинфарктной аневризмой сердца, постинфарктной стенокардией, нарушениями ритма и проводимости, хронической недостаточностью кровообращения.

Наибольшее значение фактора прогноза составило 15,405. Значение нитритов/нитратов у данного больного составляло 67,0мкМ. Фракция выброса оказалась равной 57%. Рецидива инфаркта миокарда, признаков недостаточности кровообращения не отмечалось.

Наименьшее значение фактора прогноза составило 8,469. Уровень нитритов/нитратов у данного больного составил 5,8мкМ. Фракция выброса 14%. Течение инфаркта миокарда осложнилось нарушениями ритма сердца и проводимости, острой левожелудочковой недостаточностью, формированием хронической аневризмы сердца, хронической недостаточностью кровообращения, рецидивом ИМ с летальным исходом.

Наименьшее значение 1У фактора - фактора риска аритмических осложнений - составило  $-4,613$  у больного с уровнем нитритов/нитратов 32,6мкМ. Фракция выброса у данного больного оказалась равной 57%. Течение ИМ осложнилось нарушениями ритма в виде желудочковой тахикардии и желудочковой экстрасистолии.

Наибольшее значение этого фактора составило  $-0,058$  у больного с уровнем нитритов/нитратов 0,5мкМ. Фракция выброса составила 34%. Течение ИМ осложнилось нарушениями ритма сердца в виде желудочковой экстрасистолии, проводимости в виде АВ-блокады, блокады левой ножки пучка Гиса.

Корреляционной зависимости между значением 1У фактора и уровнем нитритов/нитратов в моче больных ИМ в первые сутки не было выявлено.

Уровень нитритов/нитратов в моче больных на 21 день ИМ существенно не отличался от значения в контрольной группе. Корреляционной зависимости ни с одним фактором обнаружено не было.

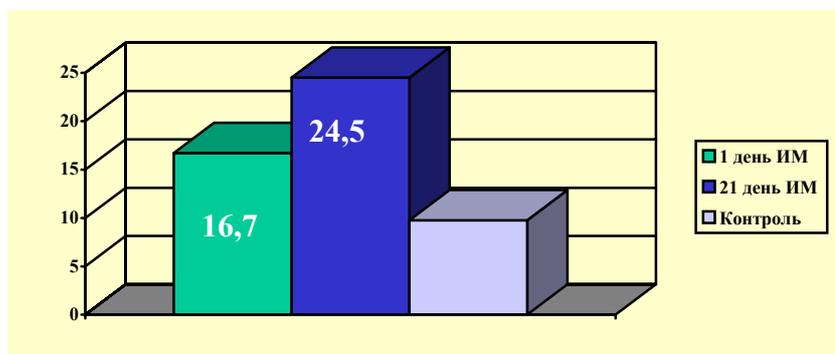
Таким образом, наиболее прогностически неблагоприятным являлся уровень нитритов/нитратов в моче в 1 день ИМ ниже 20,0мкМ. Содержание нитратов выше 90,0мкМ предшествовало падению АД и тяжелому клиническому течению ИМ.

Была выявлена обратная корреляционная зависимость между содержанием нитритов/нитратов в 1 день и факторами риска развития острой левожелудочковой недостаточности и тяжести течения ИМ. Неблагоприятный прогноз отмечался в группе больных с уровнем нитритов/нитратов в моче ниже 20 мкМ. Зависимости не было выявлено между фактором риска аритмий и содержанием продуктов метаболизма NO в моче больных в 1 день. У больных с клинически неосложненным течением ИМ, хорошим прогнозом с восстановлением трудоспособности уровень нитритов/нитратов колебался в пределах 20,0 мкМ до 90,0 мкМ.

#### ***Определения нитритов/нитратов в плазме больных ИМ.***

Средний уровень нитритов/нитратов в плазме в 1 день ИМ составил 16,69 мкМ. На 21 день уровень нитритов/нитратов увеличивался до 24,48 мкМ. В контрольной группе уровень конечных продуктов метаболизма NO составил 9,76 мкМ (диагр. 9)

*Диаграмма 9* Уровень нитритов/нитратов в плазме  
больных ИМ



По уровню нитритов/нитратов в плазме в первый день ИМ все больные были разделены на 3 группы:

С низким уровнем - от 0 до 5 мкМ

Со средним уровнем - от 5 до 30 мкМ

С высоким уровнем - выше 30 мкМ.

При сопоставлении уровня нитритов/нитратов в плазме и значением рассчитанных факторов были выявлены следующие зависимости:

Наибольшее значение 1 фактора (фактора риска острой левожелудочковой недостаточности) составило 3,509 у больного с уровнем нитритов/нитратов в плазме 0,30мкМ. Течение ИМ осложнилось у данного больного развитием кардиогенного шока, острой левожелудочковой недостаточностью (Killip4).  
Наименьшее значение 1 фактора составило 0,623 у больного с уровнем нитритов/нитратов в плазме 24,6мкМ. Признаков острой левожелудочковой недостаточности при поступлении не было, фракция выброса составила 57%.

Наибольшее значение 2 фактора (фактора тяжести течения ИМ) составило 5,054 у того же больного с уровнем нитритов/нитратов 0,30мкМ. Как сказано выше, течение ИМ осложнилось острой, затем хронической недостаточностью кровообращения, нарушениями ритма сердца и проводимости, отмечалось снижение фракции выброса до 34%.

Наименьшее значение 3 фактора (фактора прогноза) составило 8,469 у больного с уровнем нитритов/нитратов в плазме 4,70мкМ. Фракция выброса у данного больного составила 14%, течение ИМ осложнилось недостаточностью кровообращения, нарушениями ритма и проводимости, рецидивом ИМ с летальным исходом. Наибольшее значение фактора 15,405 оказалось у больного с уровнем метаболитов NO в плазме 38,2мкМ. Фракция выброса составила 57%, течение ИМ было неосложненным.

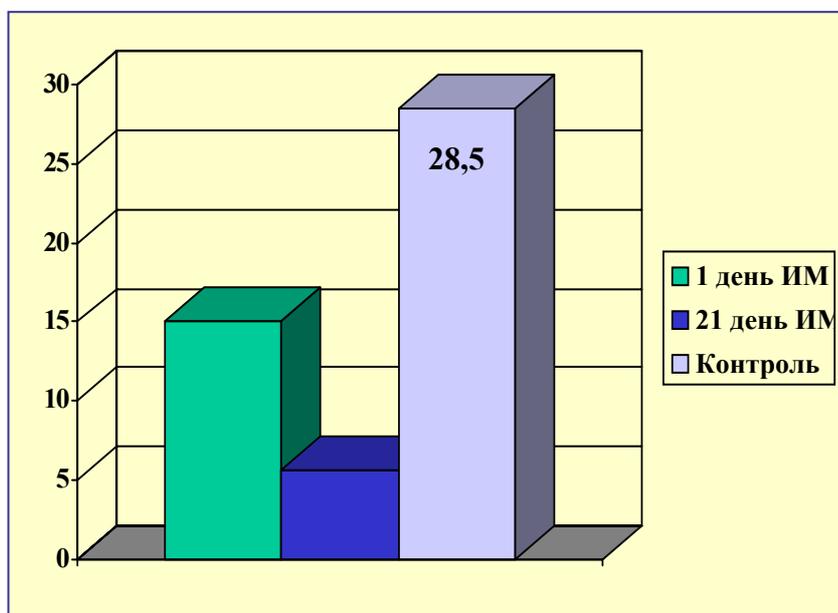
Корреляционной зависимости между величиной 4 фактора и уровнем метаболитов NO в плазме не было выявлено.

Таким образом, уровень нитритов/нитратов в плазме больных ИМ в 1 сутки уменьшается по сравнению с контрольной группой. На 21 сутки ИМ происходит увеличение содержания нитритов/нитратов в плазме до 24,48мкМ, превышая уровень метаболитов NO в контрольной группе (среднее значение 9,76 мкМ), что возможно связано с терапией нитратами. Определяется обратная корреляционная зависимость между уровнем нитритов/нитратов в плазме больных на 1 день ИМ и факторами риска острой левожелудочковой недостаточности, фактора тяжести клинического течения ИМ; прямая корреляционная зависимость со значением фактора прогноза ИМ.

### ***Определение уровня нитритов/нитратов в культуральной среде лимфоцитов, содержания iNOS***

Как было указано выше, на 21 день ИМ в плазме крови больных отмечалось увеличение уровня нитритов/нитратов. Мы решили рассмотреть возможные причины этого увеличения. Во-первых, не исключалось влияние терапии нитровазодилататорами. Однако, напрашивался и второй вопрос: могут ли клетки периферической крови больных ИМ вносить вклад в усиление продукции NO на 21 день ИМ. В связи с последним предположением, исследовался базальный уровень нитритов/нитратов в культуральной среде лимфоцитов. Для этого использовалась методика, предложенная только в 1995г и ранее применявшаяся только в экспериментах (130). Было обследовано 10 больных ИМ, 5 больных контрольной группы. В контрольной группе средний уровень нитритов/нитратов в супернатанте составил 28,50мкМ. В первый день ИМ отмечалось снижение уровня метаболитов NO до  $15,10 \pm 6,1$ мкМ. На 21 день ИМ средний уровень составил  $5,60 \pm 2,2$ мкМ.

***Диаграмма 10 Уровень нитритов/нитратов в культуральной среде лимфоцитов***



Таким образом, в культуральной среде лимфоцитов отмечается снижение уровня нитритов/нитратов к 21 дню ИМ, которое можно объяснить механизмом обратной связи: высокий уровень нитритов/нитратов в плазме на 21 день ингибирует продукцию эндогенного NO клетками периферической крови. Доказана принципиальная возможность применения данной методики для оценки особенностей синтеза NO. Кроме того, исследовалось содержание iNOS с помощью моноклональных антител реакцией Western blott analysis на 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 дни ИМ. iNOS ни в одной из проб не была обнаружена. Не определялась она и у здоровых добровольцев.

Таким образом, результаты, полученные при исследовании уровня нитритов/нитратов в плазме, культуральной среде лимфоцитов у больных ИМ в 1 день свидетельствовали о значительном дефиците продукции NO в первые часы ИМ с тяжелым клиническим течением. Данные по определению уровня iNOS в мононуклеарах периферической крови больных ИМ свидетельствуют, что увеличение уровня нитритов/нитратов к 21 дню ИМ не связано с активацией iNOS в лимфоцитах периферической крови.

Таким образом, проведенное исследование доказало, что существует 3 типа ответа систем генерации NO на ИМ: увеличение продукции NO, отсутствие изменений и снижение продукции оксида азота.

В зависимости от индивидуальных существенных различий по уровню нитритов/нитратов в моче и плазме всех больных ИМ можно было подразделить на 3 группы: с низким уровнем

продуктов метаболизма NO в моче (ниже 20,0 мкМ) и плазме (ниже 5,0 мкМ); со средним уровнем нитритов/нитратов в моче (от 20,0 до 90,0 мкМ) и плазме (от 5,0 до 30,0 мкМ) и, наконец с высоким уровнем (выше 90,0 мкМ и выше 30,0 мкМ) в моче и плазме соответственно. Интересным оказался тот факт, что все больные на 21 день ИМ относились к группе со средним уровнем нитритов/нитратов, что позволило нам предположить возможную активизацию механизмов, направленных на восстановление нормальной продукции NO.

В плазме крови больных ИМ на 21 день отмечалось увеличение уровня нитритов/нитратов, что можно было объяснить как влиянием терапии нитратами, так и диктовало необходимость исключить участие клеток периферической крови больных ИМ в продукции NO. В связи с этим предположением исследовался базальный уровень нитритов/нитратов в культуральной среде лимфоцитов. Уровень конечных продуктов метаболизма NO в культуральной среде лимфоцитов на 1 день ИМ (15,1 мкМ) был ниже контрольной группы (28,5 мкМ). На 21 день уровень нитритов/нитратов уменьшался до 5,6 мкМ. Данные изменения можно объяснить механизмом обратной связи: высокий уровень экзогенного NO ингибирует продукцию эндогенного NO. В нашей работе доказана принципиальная возможность применения методики для определения уровня нитритов/нитратов в культуре мононуклеаров периферической крови больных ИМ, которая наиболее точно отражает продукцию эндогенного NO. Кроме того, исследовался уровень iNOS в мононуклеарах крови больных на 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21 дни ИМ с помощью Western blot analysis. iNOS ни в одной из проб обнаружено не было. Не было ее и у

здоровых добровольцев. Эти результаты повторно свидетельствовали о том, что увеличение уровня продуктов метаболизма NO в плазме на 21 день ИМ не связано с активацией iNOS в мононуклеарах периферической крови.

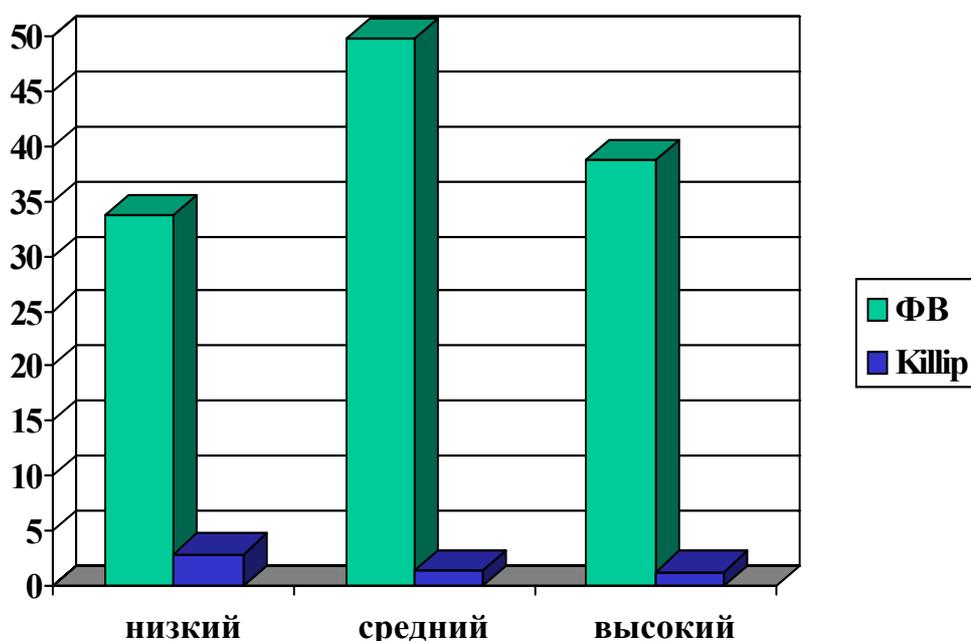
Выявлена зависимость между уровнем конечных продуктов метаболизма NO в виде нитритов/нитратов в моче и плазме больных ИМ в первые сутки и клиническим течением ИМ. Установлено, что при уровне нитритов/нитратов в пределах 20,0мкМ до 90,0мкМ (в моче) и 5,0мкМ до 30,0мкМ (в плазме) течение ИМ было благоприятным, не сопровождалось признаками недостаточности кровообращения, наличием постинфарктной стенокардии, развитием аневризмы, рецидивом ИМ.

При уровне нитритов/нитратов ниже 20,0мкМ (моча) и 5,0 мкМ (плазма) отмечалось тяжелое клиническое течение ИМ с развитием острой левожелудочковой недостаточности, значением фракции выброса равно 33,8%, нарушениями ритма сердца и проводимости, формированием хронической аневризмы сердца, рецидивом ИМ.

При уровне нитритов/нитратов выше 90,0мкМ отмечались низкие показатели АД (90 и 50 мм.рт.ст.), значение фракции выброса было равно 38,8%. После нормализации гемодинамических показателей течение ИМ было неосложненным.

Таким образом, прогностически неблагоприятным являлся уровень нитритов/нитратов в моче ниже 20,0 мкМ, в плазме ниже 5,0 мкМ.

*Диаграмма 11 Значение ФВ и Killip-класс у больных с низким, средним и высоким уровнем метаболитов NO в 1 день ИМ*



На представленной диаграмме видно, что наибольшее значение фракции выброса (49,9%) наблюдается в группе больных со средним уровнем нитритов/нитратов в моче и плазме на 1 день ИМ. Наименьшее значение ФВ (33,7%) отмечается в группе больных с низким уровнем нитритов/нитратов в моче и плазме больных ИМ в 1 день заболевания. Эти различия имели статистически значимый характер ( $p < 0,05$ ). В группе больных с уровнем конечных продуктов метаболизма NO выше 90 мкМ и 38,4 мкМ в моче и плазме соответственно значение фракции выброса (38,8%) было меньше, чем во второй группе и выше, чем в первой группе. Данные различия не носили статистически значимый характер ( $p > 0,05$ ).

Класс Killip был статистически достоверно выше в группе больных с низким уровнем продуктов метаболизма NO.

Максимальный уровень КФК (1446,3) и МВ КФК (171,3) отмечался в 1 группе больных и был достоверно выше, чем в двух других.

Эти результаты были обработаны методом вариационной статистики с вычислением коэффициента Стьюдента.

Однако, в связи с выделением 102 клинически значимых параметров на каждого больного, перед нами встал вопрос, существуют ли значимые корреляции между уровнем конечных продуктов метаболизма NO и значением выделенных параметров. Мы предположили, что измеряемые переменные либо взаимно определяют друг друга, либо связь между ними обусловлена какой-то третьей величиной. Для решения данной задачи нами была использована модель факторного анализа. Были получены формулы вычисления значений факторов из исходных данных. Для каждого фактора был проанализирован состав параметров, имеющих наибольшие на него нагрузки. Исходя из этого каждому фактору было определено название, отражающее природу этих параметров:

- *фактор риска развития острой левожелудочковой недостаточности*
- *фактор тяжести клинического течения ИМ*
- *фактор прогноза летального исхода ИМ*
- *фактор риска аритмических осложнений ИМ*

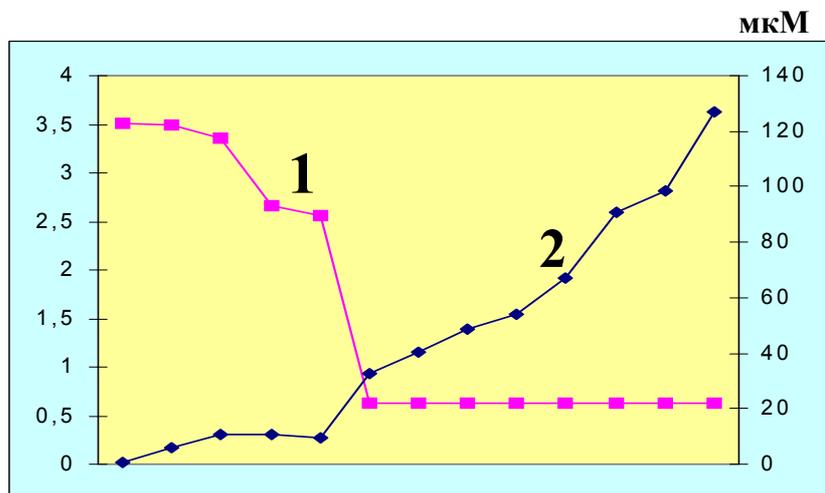
Была проанализирована связь полученных значений выделенных факторов и исследуемых параметров.

Наибольшее значение первого фактора (фактора риска развития острой левожелудочковой недостаточности) составило 3,509 с уровнем нитритов/нитратов 0,5 мкМ и 0,3 мкМ в моче и плазме в 1 день ИМ соответственно. Клинически у данного больного регистрировался класс Killip 4 (кардиогенный шок).

Наименьшее значение первого фактора составило 0,623 у больного с уровнем нитритов/нитратов 32,6 мкМ в моче и 24,6 мкМ в плазме. При поступлении признаков острой левожелудочковой недостаточности не было.

Графическое изображение зависимости фактора риска развития острой левожелудочковой недостаточности от уровня нитритов/нитратов в 1 день ИМ показано на графике 1.

*График 1 Зависимость между фактором риска развития острой левожелудочковой недостаточности и уровнем продуктов метаболизма NO*



**1** - значение 1 фактора

**2** - уровень нитритов/нитратов (мкМ)

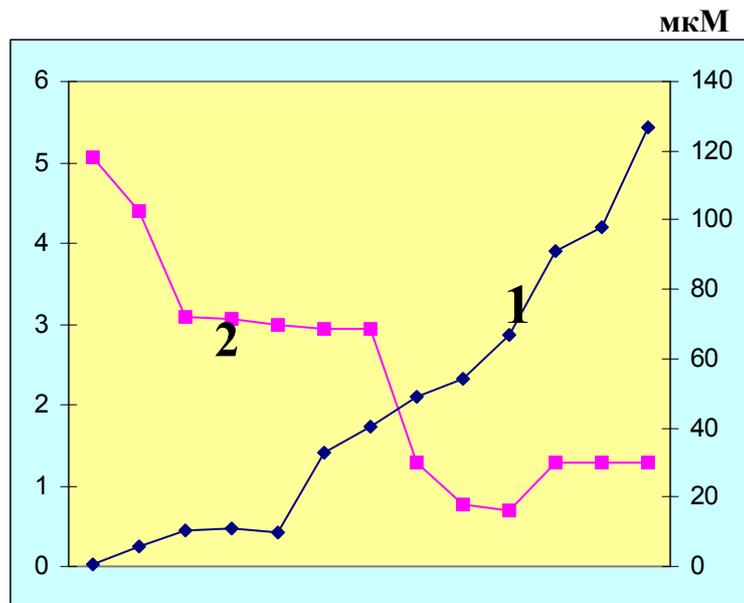
Таким образом, при увеличении уровня нитритов/нитратов до 90 мкМ и до 30,0 мкМ отмечается уменьшение значения 1 фактора, т.е. выявляется обратная корреляционная зависимость.

Наибольшее значение второго фактора (фактора тяжести клинического течения ИМ) составило 5,054 у этого же больного (уровень метаболитов NO 0,5 мкМ в моче и 0,3 мкМ в плазме). Течение ИМ осложнилось острой левожелудочковой недостаточностью, кардиогенным шоком, постинфарктной аневризмой сердца, постинфарктной стенокардией, хр. недостаточностью кровообращения.

Наименьшее значение фактора тяжести клинического течения ИМ составило 0,771 у больного с уровнем продуктов метаболизма NO 67,0 мкМ в моче и плазме 38,2 мкМ в плазме. Течение ИМ было неосложненным. ФВ составила 57%.

На графике 2 представлено графическое изображение зависимости 2 фактора от уровня нитритов/нитратов в 1 день ИМ.

*График 2 Зависимость между фактором тяжести клинического течения ИМ и уровнем нитритов/нитратов в 1 день ИМ.*



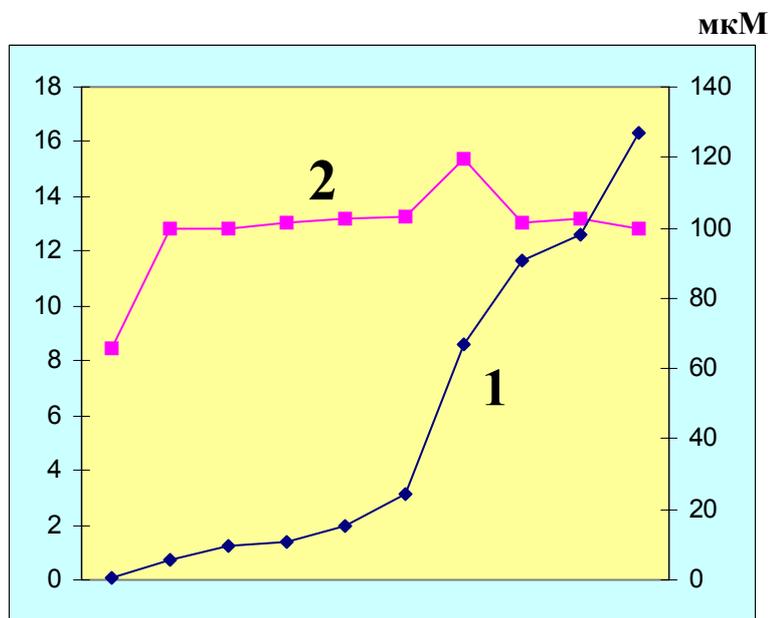
**1**- уровень нитритов/нитратов (мкМ)      **2** - значение 2 фактора

При увеличении уровня метаболитов NO до 90 мкМ в моче и 30,0 мкМ в плазме происходит уменьшение значений 2 фактора, а затем незначительное увеличение (при уровне выше 90 мкМ и 30,0 мкМ.).

Наибольшее значение фактора прогноза ИМ 15,405 отмечалось у больного с уровнем нитритов/нитратов в моче 67,0 мкМ и в плазме 38,2 мкМ. Фракция выброса у данного больного оказалась равной 57%. Признаков недостаточности кровообращения, рецидива ИМ не отмечалось.

Наименьшее значение фактора прогноза ИМ составило 8,469 у больного с уровнем нитритов/нитратов в моче 5,8 мкМ в плазме 4,7 мкМ. Течение ИМ осложнилось нарушениями ритма сердца и проводимости, острой левожелудочковой недостаточностью, формированием хронической аневризмы сердца, хронической недостаточностью кровообращения, рецидивом ИМ с летальным исходом.

*График 3 Зависимость между фактором прогноза ИМ и уровнем нитритов/нитратов в 1 день ИМ*



**1** - уровень нитритов/нитратов (мкМ) **2** - значение фактора прогноза

Как показано на графике с увеличением уровня конечных метаболитов NO повышается значение 3 фактора, однако, начиная с уровня нитритов/нитратов более 90 мкМ значение фактора прогноза ИМ незначительно уменьшается.

Корреляции не было выявлено при сопоставлении фактора риска развития аритмических осложнений ИМ и уровнем конечных продуктов метаболизма NO в моче и плазме в первые сутки ИМ. На 21 день ИМ корреляционной зависимости между уровнем нитритов/нитратов и четырьмя факторами не было выявлено.

Таким образом, результаты, полученные при исследовании уровня нитритов/нитратов в моче, плазме, культуральной среде лимфоцитов свидетельствовали о значительном дефиците продукции NO в первые часы ИМ с тяжелым клиническим течением и неблагоприятным прогнозом. В группе с высоким уровнем нитритов/нитратов в моче и плазме больных отмечаются наибольшие показатели уровня холестерина плазмы, что согласуется с литературными данными о гиперпродукции NO при атеросклерозе. Значения фракции выброса в данной группе менее 39% наблюдаются как при низком, так и при высоком уровнях продуктов метаболизма NO.

Попробуем объяснить, почему же при высоком уровне нитритов/нитратов наблюдаются низкие показатели фракции выброса, нарушения гемодинамики. Для функционирования сосудов в патологических состояниях важное значение имеют передачи сигнала NO и оксидантов. Известно, что супероксид инактивирует эндотелийзависимую релаксацию. Существенное значение для выделения NO и его релаксирующего действия имеет супероксиддисмутаза эндотелия (50, 51).

Поскольку опосредуемая сGMF релаксация инициируется наномолярными концентрациями NO, аналогичный наномолярный уровень супероксида будет ослаблять NO-зависимые ответы. Эндотелий сосудов - основной источник супероксида, участвующий в ингибировании тканевого дыхания посредством образования ONOO<sup>-</sup>. При сопоставлении значений факторов, рассчитанных на основе факторного анализа и уровнем нитритов/нитратов в моче и плазме больных ИМ была выявлена обратная корреляционная зависимость между фактором риска острой левожелудочковой недостаточности и уровнем нитритов/нитратов в моче и плазме больных ИМ

Результаты данного клинико-лабораторного исследования указывают на снижение способности организма продуцировать NO при ИМ, что, возможно, связано с активностью супероксида с образованием токсичных пероксинитритов, которые в несколько раз превосходят по токсичности сам NO и участвуют в развитии ишемических повреждений органов и тканей.

Можно предполагать, что NO вовлечен как в нормальную регуляцию, так и во многие патофизиологические процессы, поэтому для функционирования регуляторных и защитных функций NO необходимо ограничивать гиперпродукцию или компенсировать дефицит NO в организме.

Таким образом, полученные результаты можно рассматривать как дополнительное научное обоснование априорно избранного направления лечения ИБС - терапии нитратами. Интересным может оказаться применение препаратов супероксиддисмутазы и ее миметиков. В экспериментах с помощью этих препаратов удавалось снижать размеры инфарктной зоны при ИМ. Данное

направление может оказаться новой многообещающей тактикой лечения больных ИМ.

Были сделаны следующие выводы:

1. У больных ИМ в первый день заболевания отмечается 3 типа ответа систем генерации NO: угнетение синтеза NO, отсутствие изменений, усиление продукции NO, что позволяло разделить больных на 3 группы: с низким уровнем нитритов/нитратов в моче (ниже 20,0 мкМ) и плазме (ниже 5,0 мкМ), средним уровнем (от 20,0 до 90,0 мкМ) в моче и (от 5,0 до 30,0 мкМ) в плазме, высоким уровнем выше 90,0 мкМ в моче и выше 30,0 мкМ в плазме.
2. Уровень конечных продуктов метаболизма NO - нитритов и нитратов в моче и плазме больных ИМ на 1 день заболевания можно использовать в качестве дополнительного прогностического критерия течения и прогноза ИМ: при уровне конечных продуктов метаболизма NO ниже 20,0 мкМ в моче и 5,0 мкМ в плазме у больных ИМ в первые сутки заболевания отмечается неблагоприятный прогноз ИМ, тяжелое клиническое течение ИМ; при уровне конечных продуктов метаболизма NO в моче от 20,0 мкМ до 90,0 мкМ и от 5,0 мкМ до 30,0 мкМ у больных ИМ на первые сутки заболевания отмечается неосложненное течение ИМ.
3. Выявлена обратная корреляционная зависимость между уровнем нитритов/нитратов в плазме крови и моче в первые часы ИМ и факторами риска острой левожелудочковой недостаточности и тяжести клинического течения ИМ.

4. При уровне нитритов/нитратов в плазме крови до 5,0 мкМ и моче до 20,0 мкМ в первые часы ИМ высок риск летального исхода ИМ.
5. Между уровнем нитритов/нитратов в плазме и моче больных ИМ на 21 день и факторами риска острой левожелудочковой недостаточности, фактором тяжести клинического течения ИМ, фактором прогноза ИМ, фактором риска развития аритмических осложнений корреляционной зависимости не выявлено. Уровень конечных продуктов метаболизма NO на 21 день ИМ в моче существенно не отличается от контрольной группы, в плазме - несколько выше контрольной группы.
6. У больных ИМ снижалась способность мононуклеаров периферической крови к продукции NO на 1 день заболевания.
7. У больных трансмуральным ИМ в культуре мононуклеаров периферической крови не происходило активации iNOS.

Проведенное исследование позволило практическим врачам в течение первых часов ИМ получить новый дополнительный критерий прогноза ИМ для более успешного предупреждения и лечения осложнений этого заболевания. Обнаруженное снижение уровня NO и его метаболитов в моче и плазме больных ИМ означало истощение компенсаторных коронародилатирующих возможностей организма и указывало на плохой прогноз.

### **Стресс-белки и инфаркт миокарда**

Целью второй работы стало изучение синтеза HSP70 у больных трансмуральным ИМ. Было обследовано 25 больных трансмуральным ИМ. Содержание HSP70<sub>и</sub> определялось методом

Western blot analysis в лимфоцитах периферической крови больных на 1, 2, 7, 14, 21 сутки ИМ. В результате исследований получали иммунофореграммы, на которых визуализировались пятна, отражающие содержание HSP70<sub>и</sub> в прогретых и непрогретых лимфоцитах. Количество HSP70<sub>и</sub> оценивалось по плотности и размерам пятен на сканограммах при помощи компьютерной программы PhotoShop. Кроме динамики содержания HSP70<sub>и</sub> после теплового шока и без него, анализировалась динамика разности между содержанием белков теплового шока в прогретых и непрогретых лимфоцитах. Этот показатель отражал способность системы синтеза HSP70 к индукции.

Проведенное исследование показало, что в лимфоцитах периферической крови здоровых добровольцев HSP70<sub>и</sub> обнаруживается как при культивировании при 37°C, так и после теплового шока. У всех исследуемых содержание этого белка в прогретых лимфоцитах было намного больше, чем в непрогретых, что доказывало, что воздействие *in vitro* на лимфоциты здоровых людей тепловым шоком (42°C в течение 1 часа) вызывает значительное накопление HSP70<sub>и</sub>. На основании анализа иммунофореграмм больных ИМ можно было разделить на 3 группы: Первую группу отличало то, что

- в лимфоцитах, выделенных от больных в 1 день ИМ и подвергнутых ТШ HSP70<sub>и</sub> не обнаруживался.
- в лимфоцитах, выделенных из крови больных на 7 день ИМ в ответ на ТШ регистрировалась выраженная активация синтеза HSP70<sub>и</sub>.

- В непрогретых лимфоцитах на 2 и 7 дни ИМ содержание HSP70<sub>и</sub> было незначительным.

Вторую группу от двух других отличали:

- значительная активация синтеза HSP70<sub>и</sub> в ответ на ТШ в лимфоцитах, выделенных из крови больных в 1 день ИМ.
- степень активации синтеза HSP70<sub>и</sub> после ТШ в лимфоцитах, выделенных на 2 день ИМ достоверно не отличалась от 1 дня заболевания.
- В 1 неделю ИМ прослеживались отчетливые изменения в содержании HSP70<sub>и</sub> в непрогретых лимфоцитах.

Третью группу отличало то, что:

- HSP70<sub>и</sub> обнаруживался в непрогретых лимфоцитах в 1 день ИМ.
- Со 2 по 14 день отчетливо менялась способность лимфоцитов активировать синтез HSP70<sub>и</sub> в ответ на тепловой шок.

Сопоставление типов иммунофореграмм и клинической картины, а также исхода и осложнений ИМ позволили сформулировать следующие выводы:

1. Больные острым инфарктом миокарда реагируют на заболевание включением в лимфоцитах периферической крови системы синтеза внутриклеточных защитных белков. На основании анализа иммунофореграмм HSP70<sub>и</sub> в первый день заболевания можно разделить больных ОИМ на 3 группы:

Первая группа характеризуется ареактивностью системы синтеза HSP70<sub>и</sub> как при физиологически оптимальной температуре, так и после теплового шока.

Вторая группа характеризуется ареактивностью системы синтеза HSP70<sub>и</sub> при физиологически оптимальной температуре, но выраженной индукцией синтеза HSP после теплового шока

Третья группа характеризуется сохранением синтеза белка в оптимальном температурном режиме и индукцией синтеза HSP70<sub>и</sub> после теплового шока.

2. У больных с первым типом иммунограмм не отмечалось развития острой левожелудочковой недостаточности, регистрировались умеренные изменения активности КФК, определялась фракция выброса в пределах 55%.

У больных со 2 типом иммунофореграмм HSP70<sub>и</sub> изменения ЭКГ свидетельствовали об обширности поражения миокарда, регистрировалась высокая активность КФК и фракция выброса снижалась до 43%.

У больных с 3 типом иммунофореграмм HSP70<sub>и</sub> в половине случаев течение ИМ было неосложненным, в другой половине отмечались явления левожелудочковой недостаточности.

3. Показатели системы синтеза HSP70<sub>и</sub> наиболее высоко коррелировали с обширностью поражения миокарда в первый и второй дни заболевания. При обширном повреждении отмечалось нарастание уровня HSP70<sub>и</sub> в лимфоцитах при физиологически оптимальной температуре и уменьшение способности системы синтеза белков теплового шока к индукции тепловым шоком.

4. Динамика HSP70<sub>и</sub> при 37°C у больных ИМ напоминала динамику острофазового ответа с нарастанием показателей в 1-2 сутки заболевания и их снижением к концу первой недели. Принципиальное отличие состояло в том, что показатели острофазового ответа отражают степень повреждения миокарда, тогда как показатели системы HSP70<sub>и</sub> степень мобилизации внутриклеточных защитных белков.

5. Основным выводом работы состоял в том, что разность между уровнем HSP70<sub>и</sub> в лимфоцитах после теплового шока и уровнем HSP70<sub>и</sub> при физиологически оптимальной температуре может служить фактором прогноза течения ИМ. Чем больше эта разница, тем благоприятнее прогноз исхода ИМ.

Чрезвычайно важным в практическом отношении явилась демонстрация того, что больные ИМ реагируют на заболевание включением в лимфоцитах периферической крови системы HSP70<sub>и</sub> и эта реакция имеет прогностическое значение.

Реактивность системы синтеза HSP70<sub>и</sub> в ответ на стресс-реакцию отражает цитопротекторный потенциал клеток в период их максимальной функциональной активности. Это предполагает, что появлению дополнительных факторов, приводящих к повреждению сердца, у больных с исходно одинаковой зоной ишемии, но различной реактивностью системы синтеза HSP70, объем пораженного миокарда будет различным, т.к. с реактивностью этой системы связана способность функционально-активных клеток синтезировать цитопротекторный белок HSP70 в ответ на дополнительное повреждение.

Метод определения уровня нитритов/нитратов в моче, плазме крови и культуральной жидкости лимфоцитов больных ИМ в первые часы заболевания, а также метод комплексной оценки содержания HSP70и в подвергнутых умеренному шоку и культивированных при физиологической температуре лимфоцитах больных ИМ могут быть предложены для изучения поведения системы генерации оксида азота и HSP70и-системы в условиях клиники.

### Список литературы

1. Попов Е.М., Шибанова Е.Д. Молекулярные шапероны. // Проблема белка. Под редакцией В.Т.Иванова. В 5-ти т. М., "Наука", 1995, т.2, с.418-430.
2. Маеда Х., Акаике Т. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке. Биохимия.- 1998.- Т. 63, вып.7. С.
3. Аруин Л.И. Апоптоз и патология печени //Рос.журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии.-1998.-Т8.- N 2.
4. Брюне Б., Сандау К., фон Кнетен А. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические сигнальные пути. Биохимия.- 1998.- Т.63, вып. 7. С. 966-975.
5. Ванин А.Ф. Динитрозильные комплексы железа и S-нитрозотиолы – две возможные формы стабилизации и транспорта оксида азота в биосистемах. Биохимия.- 1998.- Т.63, вып. 7. С. 924-938.
6. Ванин А.Ф., NO в биологии: история, состояние и перспективы исследований. Биохимия.- 1998.- Т.63, вып. 7. С. 867-869.
7. Волин М.С., Дэвидсон К.А., Камински П.М., Фейнгерш Р.П., Мохазаб-Х К.М. Механизмы передачи сигнала оксидант-оксид азота в сосудистой ткани. Биохимия.- 1998.- Т. 63, вып.7. С. 958-965.
8. Горен А.К.Ф., Майер Б. Универсальная и комплексная энзимология синтазы оксида азота. Биохимия.- 1998.- Т.63 вып.7. С. 870-880.
9. Кулешова Э.В., Казеннов П.А. Аутоиндуцированная толерантность миокарда к ишемии. //Росс. Физиол. Ж.-1997.-Т.83.-№11-12.-С.105-114.
10. Малышев И.Ю. Феномен адаптационной стабилизации структур и роль в нем белков теплового шока.-дисс.д.м.н.,-М.-1982.
11. Меерсон Ф.З. Пшенникова М.Г. Стресс-лимитирующие системы организма и новые принципы профилактической кардиологии. Медицина и здравоохранение. Серия. Проблемы кардиологии. НПО "Союзмединформ",-вып.3,-72с.
12. Меерсон Ф.З., Малышев И.Ю. Феномен адаптационной стабилизации структур и защита сердца. М.: Наука, 1993.-158с.
13. Мюлленайзен Б. Синдром стресса. // Изд-во Казанского университетаю-1993.-135с.

14. Недоспаев А.А. Биогенный NO в конкурентных отношениях. Биохимия.- 1998.-Т.63. вып.7. С. 881-904.
15. Реутов В.П., Сорокина Е.Г. NO-синтазная и нитритредуктазная компоненты цикла оксида азота. Биохимия.- 1998.-Т.63, вып. 7. С. 1029-1040.
16. Северина И.С. Растворимая гуанилатциклаза в молекулярном механизме физиологических эффектов оксида азота. Биохимия.- 1998.- Т. 63, вып. 7. С. 939-947.
17. Koshland D.E. Editorial: The molecular of the year. Science.- 1992.- 258 (5090).- P. 1861.
18. Furchgott R.W., and Zavadski J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin. Nature.- 1980.- 288. P. 373-376.
19. Beckman J.S., Beckmann T.W., Chen J., Marshall P., Freeman B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelium injury from nitric oxide and superoxide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1990.- 87. P. 1620-1624.
20. Riedel M., Mugge A. Direct effects of estrogens on the vascular tone: characterisation and clinical importance. Zeitschrift Fur Kardiologia. -1994. Oct.- 83. 10 , P. 768-774.
21. Grisham M.B. Oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease..Lancet.- 1994.- 344: 8926 . P. 859-861.
22. Albert J., Wallen H., Li N., Frostell C., Hjemdahl P. Effects of nitric oxide inhalation on platelet function during systemic inhibition of endogenous NO production by L-NMMA. Second International Congress, Stockholm August 29-30.- 1997.- P. 53.
23. Aruoma O. I. Free radicals and antioxidant strategies in sports. J. of Nutritional Biochem.- 1994.- 5.- 8. P. 370-381
24. Balligand J-L., Ungureanu-Longrois D., Simmons W.W., Pimental D., Malinski T.A., Kapturezac M., Taha Z., Lowenstein C.J., Davidoff A.J., Kelly R.A., Smith T.W., Michel T. Cytokine-inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) Expression in Cardiac Myocytes. J.of Biological Chemistry.- 1994.- Vol.- 269. № 44. P. 27580-27588.
25. Beckman J.S., Chen J., Ischiropoulos H., Grow J.P. Oxidative chemistry of peroxynitrite. Methods Enzymol.- 1994.- 233. P. 229-240.
26. Belder A.J., Radomski M.W., Why H.J.F., Richardson P.J., Bucknall C.A., Salas E., Martin J.F., Moncada S. Nitric oxide synthase activities in human myocardium. Lancet.- 1993. Jan.- Vol. 341. P. 84-85.
27. Belkina L.M., Manukhina E.B., Mikoyan V.D., Kubrina L.N. and Vanin A.F. The time course of nitric oxide generation in rat tissues in acute myocardial infarction. Endothelium. (Suppl.).- 1995.- Vol.- 3.
28. Benjamin I.J., McMillan R. Stress (Heat shock) Proteins. Molecular Shaperones in Cardiovascular Biology and Diseases.// Circ.Res.-1998.-83.-P.117-132).

29. Blake M.J., Gershon D., Fargoli J., Holdbrook N.J. Discordant expression of heat shock proteins mRNA in tissues of heat-stressed rats. // *J.Biol.Chem.*-1990.-265.-P.15275-15279.
30. Bredt D.S., Snyder D.S. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev. Biochem.* - 1994.- 63. P. 175-195.
31. Brigham K.L. Oxygen radicals – an important mediator of sepsis and septic shock. *Klin Wochensh.*- 1991.- 69. P. 1004 –1008.
32. Busse R.,MulschA.,Fleming I., and Hecker M. // *Circ.*-1993.-87.-Suppl.V.-18-25.
33. Buttery L.D.K., Springall D.R., Evans T.J., Parums D.V., Standfield N., Polac J.M. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) is present in atherosclerotic vessels and relates to the severity of the lesion. *Endothelium.(Suppl.)* - 1995.- Vol.-3. 37.
34. Carper S.W., Duffy J.J.,Gerner E.W. Heat shock proteins in termotolerance and other cellular processes.// *Cancer Res.*-1987.-Vol.47.-P.5249-5255.
35. Cason B.A., Shubayev I., Hickey R.F. Blockade of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels eliminates isoflurane-induced coronary vasodilation. *Anesthesiology.*- 1994.- 81.- 5. P. 1245-1255.
36. Clos J., Westwood J.T., Becker P.B., Wilson S., Lambert K., and Wu C. Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat shock factor subject to negative regulation. // *Cell.*-1990.-Vol.63.-P.1085-1097.
37. Conroy S.E., Tucker L, Latchman D.S., Isenberg D.A. Incidence of anti Hsp90 and 70 antibodies in children with SLE, juvenil dermatomyositis and juvenil chronic arthritis// *Cli.Exp.Rheumatol.*-1996.-Vol.14,N.1.p.99-104.
38. Corraliza I.M., Campo M.L., Soler G, Modolell M. Determination of arginase activity in macrophages: A micromethod. *J. of Immunol. Methods.* – 1994.- 174: 1-2.
39. Cremers B., Flesh M., Kilter H., Baumer A.T. Horst M, Bohm M. Generation nitric oxide and free radicals contribute to myocardial dysfunction in septic shock. . Second International Congress, Stockholm August 29-30.- 1997.- P. 32.
40. Currie R.W., Karmazyn M., Klock M., Mailer K. Heat shock response is assotiated with enhanced postischemic ventricular recovery.// *Circ.Res.*-1988.-63.- P.543-549.
41. Deguchi Y., Kishimoto S. Spontaneous activation of haet shock protein gene transcription in peripheral blood mononuclear cells of individuals with active systemic lupus erythematosus. // *Clin.Rheumatol.*-1990.-9;2.-P.182-185.
42. Dillmann W.H., Mestrlil R. Heat shock proteins in myocardial stress. // *Z. Kardiol.*-1995.-84;Suppl.4.-P.87-90.
43. Drexler H., Hablawetz E., Lu W., Riede U., Christes A. Effects of nitric oxide formation on regional blood flow in experimental myocardial infarction. *Circulation.*- 1992. Jul.- 86(1). P. 255-62.
44. Dudec R.R., Conforfo A., Bing R.J. Lypophosphatidylcholine-induced vascular relaxation of cGMF are mediated by endothelium-derived factor. *Proceeding of the Society for Exper. Biol. And Medicine.*- 1993.- 203.- 4. P 474-479.

45. Dura J. Stage dependent synthesis of heat shock induced proteins in early embryos of *Drosophila melanogaster*. // *Mol.Gen. Genet.*-1981.-Vol.184.-P.381-385.;
46. Dworniczak B., and Mirault M.-E. Structure and expression of a human gene coding for a 71kd heat shock “cognate” protein. // *Nucl.Acids Res.*-1987.-Vol.15.-P.5181-5197.)
47. Ellis J. Proteins as molecular chaperones.// *Nature.*-1987.-328.-378-379)
48. Flaherty K.M., Deluca-Flaherty C., McKay D.B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of 70K heat-shock cognate protein. // *Nature.*-1990.-Vol.346.-P.623-628.
49. Flavahan N.A. Atherosclerosis or lipoprotein-induced endothelial dysfunction. Potential mechanisms underlying reduction in EDNR/nitric oxide activity. *Circulation.*- 1992.-85 (5). P. 1927-38.
50. Freeman B.C., Morimoto R.I. The human cytosolic molecular chaperones hsp90, hsp70 (hsc70) and hsp71 have distinct roles in recognition of nonnative protein and protein refolding. // *EMBO J.*-1996.-Vol.15, N.12.-P.2969-2979.
51. Frostell C.G. Acute lung injury and inhaled NO- The reduction of pulmonary capillary pressure has implication for lung fluid balance. *Acta Anaesthesiol. Scandinavica.*- 1994.-38.- 7. P. 623-624.
52. Fung K.L., Hilgenberg L., Wang N.M.,Chiroco W.J. Conformations of the nucleotide and polypeptide binding domains of a cytosolic hsp70 molecular shaperones are couple. // *J.Biol.Chem.*-1996.-Vol.271,N.35.-P.21559-21565(40).
53. Garthwaite J., Charles S.L., and Chess-Williams R. Endothelium –derived relaxing factor release on activation of NMDA reseptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature.*- 1988.- 336. P. 385-388.  
Guidon P.T., Hightower L.E. The 73 kd heat shock cognate protein purified protein from rat brain contains nonesterified palmitic and stearic acids. // *J.Cell Physiol.*- 1986.-Vol.128,-P.239-245).
54. Hayashi T., Ishikawa T., Yamada K., Kuzuya M., Naito M., Hidaka H., Iguchi A. Biphasic effect of estrogen on neuronal constitutive nitric oxide synthase via Ca<sup>2+</sup>-calmodulin dependent mechanism. *Biochem. and Biophys. Research Commun.*- 1994.- 203: 2. P. 1013-1019 .
55. Hibbs J.B., Taintor R.R., and Vavrin Z., and Rachlin E.M. Nitric Oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 1988.- 157. P. 87-94.
56. Hibbs J.B., Vavrin Z., Taintor R.R. L-arginin is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selectiv metabolic inhibition in target cells. *J. Immunology.*- 1987.-138. P. 550-565.
57. Ignarro L.J. Biosynthesis and methabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Pharmacol. Toxicol.* -1990.- 67. P. 1-7.
58. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., and Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.natl. Academ. Sci. USA.* – 1987.- 84. P. 9265-69.
59. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., and Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.natl. Academ. Sci. USA.* – 1987.- 84. P. 9265-69.

60. Ignarro L.J., Buga G.M., Wood K.S., Byrns R.E., and Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.natl. Academ. Sci. USA.* – 1987.- 84. P. 9265-69.
61. Kanno K., Hirata Y., Emori T., et al. L-arginin infusion induced hypotention and diuresis/natriuresis with concomitant increased urinary excretion of nitrite/nitrate and cyclic GMF in humans. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*-1992.-19 (9). P. 619-25.
62. Kerr J.F.R., Wyllie A.H., Currie A.R. Apoptosis; biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics // *Brit J. Cancer.*-1972.-Vol.26.- P.239-257).
63. Kuge S., Jones N. YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of *Saccaromyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. // *EMBO J.*,-1994.-Vol.57:1.-P.37-46.
64. Langford E.J., Wainwright R.J., Martin J.F. Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arterioscler.Tromb. Vasc. Biol.* – 1996. Jan.- 16 (1). P. 51-5.
65. Langford E.J., Wainwright R.J., Martin J.F. Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arterioscler.Tromb. Vasc. Biol.* – 1996. Jan.- 16 (1). P. 51-5.
66. Laskey R.A., Hoda B.M., Mills A.D., Finch J.T. Nucleosomes are reassembled by an acidic protein that binds histones and transfer them to DNA. // *Nature.*-1978.- Vol.275-P.416-420.
67. Li G.C., Heat shock proteins: role in thermotolerance, drug resistance, and relationship to DNA Topoisomerases. // *Nat.Cancer Inst.Monogr.*-1987.-N.4.- P.99-103.
68. Lindquist S., Craig E.A. The heat shock proteins.//*Annu Rev.Genet.*-1988.-22.- P.631-677).
69. McCall TB, Palmer RMJ, Moncada S. Interleukin-8 inhibits the induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils. *Biochem.Biophys.Res.Commun* 1992;186(2):
70. McMillan D.R., Xiao X., Shao L., Benjamin I.B. Targeted disruption of heat shock transcription factor 1 abolishes thermotolerance and protection against heat-induced apoptosis. // *J.Biol.Chem.*-1998.-273.-P.7523-7528.
71. Mehta H.B., Popovich B.K., Dillmann W.H. Ischemia induces changes in the level of mRNA coding for stress protein 71 and creatine kinase M.//*Circ.Res.*-1988.
72. Minota S., Cameron B., Welch W.J., Winfield J.B. Autoantibodies to constitutive 73-kD member of the hsp70 family of heat shock proteins in systemic lupus erythematosus. // *J.Exp.Med.*-1998.-Vol.168.,N.4.-P.1475-1480.
73. Moncada S, Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* - 1991.- 43. P. 109-142 .
74. Morimoto R.I. Cells in stress: transcriptional activation of heat shock genes.// *Science.*- 259.-P.1409-1410.
75. Morimoto R.I., Tissieres A., Georgopoulos C. Heat shock Proteins: Structure, Function and Regulation. Cold Spring Harbor, NY: 1994.

76. Murry C.A., Jennings R.B., Reiner K.A. Preconditioning with ischemia a delay of cell injury in ischemic myocardium. //Circ.-1986.Vol.74.-P.1124-1136.
77. Palmer R.M.G., Ferrige A.G., Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature.- 1987-327. P. 524-526.
78. Palmer R.M.J., Ashton D.S., and Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. Nature.- 1988.- 333. P. 664-666.
79. Pepke-Saba J., Higenbottan T.W., Dinh-Xuan A.T., Stone D., Wallwork J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. Lancet.- 1991.- 338 (8776). P. 1173-4.
80. Pukau B., Horvich A. Hsp70 and HSP60 chaperone machine. // Cell.-1998.- Vol.92.-P.351-366.): Rudiger S., Germeroth L., Shneider-Mergener J., Bukau B. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. // EMBO J.-1987.-Vol.16.-P.1501-1507.
81. Rahl H.K., Baeuerle P.A. Oxygen and the control of gene expression. // Bioessay.- 1994.- Vol.16-P.497-501.
82. Roccheri M.C., DiBernardo M.G., Giudice G. Synthesis of heat shock proteins in developing sea urchins. // Dev.Biol.-1981.-Vol.5.-P.173-177.).
83. Rossaint R., Falke K.J., Loper F., Slama K., Pizon U., Zupol W. M. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. N. Engl. J. Med.- 1993.- 328.- 399-405.
84. Schlesinger M.J. Heat shock proteins.// J. Biol.Chem. 1990.-Vol.265.P.12111-12114.
85. Schlesinger M.J., Ashburner M., Tissieres et al/ Heat shock: from bacteria to man.- New York: Cold Spring Laboratory, 1982.-P.440).
86. Schmidt H.H.H.W., Gagne G.D., Nacane M., Pollick J.S., Miller M.F., Murad F. Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localisation with NADPH- diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural function for nitrinergic signal transduction. J. Histochem. Cytochem.-1992.- 40 (10). P. 1439-1456.
87. Sharp F.R., Sagar S.M. Alterations in gene expression as an index of neuronal injury: heat shock and the immediate early gene response.// Neurotoxicology.- 1994.-Vol.15,№1.-P.51-59.  
Silva N.L.C.L., Haworth R.S., Singh D., Fliegel L. The Carboxyl-terminal region of the Na<sup>+</sup>/ K<sup>+</sup> Exchanger interacts with mammalian heat shock protein. // Biochem.-1995.-34.-P.10412-10420).
88. Sorger P.K. Heat shock factor and the heat shock response. // Cell.-1990. 65.- P.363-366.
89. Stamler J.S., Simon D.I., Osborne J.A., et al. S-nitrosylation of protein with nitric oxide: Synthesis and characterisation of biologically active compounds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1992.- 89 (1). P. 444-448.
90. Suzuki Y., Kajita Y., Oyama H., Tanazawa T., Takayasu M., Shibuya M., Sugita K. Dysfunction of nitric oxide in the spastic basilar arteries after subarachnoid hemorrhage. Journal of the Autonomic Nervous System. – 1994.- 49: Suppl. P. S83-S87.

91. Teshima S., Rocutan K., Takahashi M., Nikawa T., Kishi K. Induction of heat shock proteins and their possible role in macrophages during activation by macrophage colony-stimulating factor.//*Biochem.J.*,-1996.-315(Pt2).-P.497-504.
92. Theodorakis N.G., Morimoto R.I. Posttranscriptional regulation of hsp70 expression in human cells; effect of heat shock, inhibition of protein synthesis, and adenovirus infection on translation and mRNA stability.//*Mol.Cell.Biol.*-1987.-7.-P,4357-4368;
93. Thompson C.B. Apoptosis in the pathogenesis of disease// *Sci.*-1995.-Vol.267.-P.1456-1462
94. Tissieres A., Mitchell H.K., Tracy U.M, Protein syntesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster* // *J.Mol.Biol.*-1974.-Vol.84.-P.389-398.
95. Udelsman R., Blake M.J., Stagg C.A., Li D.G., Putney D.J., Holbrook N.J. Vascular heat shock protein expression in response to stress. Endocrin and autonomic regulation of this age dependent response. // *J.clin.Invest.*-1993.-91.-P.465-473
96. Uldelsman R., Li D.G., Stagg C.A., Gordon C.B., Kvetnansky R. Adrenergic regulation of adrenal and aortic heat shock protein. // *Surgery.*-1994.-116:2.-P.177-182.
97. Welch W.J., Mizzen L.A. Characterisation of the termotolerant cell. Effects on the intracellular distribution of heat shock protein 70. Intermediate filaments, and small nuclear ribonucleoprotein complexes. // *J.Cell.Biol.*-1988.-Vol.106.-P.1117-1130.
98. Welch W.J., Suhan J.P. Cellular and biochemical events in mammalian cells during and after recovery from phisiological stress.// *J.Cell.Biol.*-1986.-Vol.103.-P.2035-2052.
99. Wendling U.,Bloemendal A.,Van Der Zee R.,et all. Antirheumatic *E.coli* extract OM-89 induces T cell responses to HSP60 and 70. // *Int.J.Immunofarm.*-1997.-Vol.19,N.9-10.-P.565-568.
100. Werner I., Nagel R. Stress proteins HSP60 and HSP79 in 3 species amphipods exposed to cadmium, diasinon, dieldrin and fluoranthene.// *Environ.Toxicol.Chem.*-1997.-Vol.16.-P.2393-2403.
101. Werner-Washburne M.,Braun E., Jonston G.C., Singer R.A. Stationary phase in the yeast *Sacharomyces cerevisiae*.// *Microbiol.Rev.*-1993.-vol.57.-P.383-401.
102. Whelan S.A., Hightower L.E. Differential induction of glucose regulated and heat shock proteins; effect of pH and sulfhydryl-reducing agents on chicken embryo cells.//*J.Cell.Physiol.*-1985.-Vol.125,N.2.-P.251-258.
103. Wildhirt S.M., Dudec R.R., Suzuki H., Bing R.J. Involvement of inducible nitric oxide synthase in the inflammatory process of myocardial infarction. *Int. J. Cardiology.*- 1995 Jul.- 50 (3). P. 253-61
104. Willem H., Mager A., Andriaan J.J, De Kruijff. Stress-Induced Transcriptional Activation.//*Micribial.Rev.*-1995.-Vol.59.-N.3.-P.506-531.
105. Wizemann T. M., Laskin D. L.. Effects of acute endotoxemia on production of cytokines and nitric oxide by pulmonary alveolar and interstitial macrophages. Series: *Annals of the New York Academy of Sciences.* - 1994.- 730. P. 336-337.

106. Wong H.R. Potential protective role of the heat shock response in sepsis.//New Horiz.-1998.-Vol.6.N.2.-P.194-200.
107. Wu A.-L., Moye-Rowley W.S.. GSH1, which encodes  $\gamma$ -glutamyl-cystein synthase, is a target gene for  $\gamma$ AP-1 transcriptional regulation // Mol.Cell.Biol.-1994.-14.-P5832-5839.
108. Yang W.D., Ando J., Korenaga R., Toyooka T., Kamiya A. Exogenous nitric oxide inhibits proliferation of cultured vascular endothelial cells. Biocemestry immunications. – 1994 Sep.- 203(2). P. 1160-1167.