



# РЕОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ

*Выпуск 2*

**РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ХИРУРГИИ РАМН**

*Россия 119874 Москва, Абрикосовский пер., 2*

**РЕОЛОГИЧЕСКОЕ ОБЩЕСТВО им. Г.В.ВИНОГРАДОВА**

*Институт нефтехимического синтеза им. А.В.Топчиева РАН*

*Россия 117912 Москва Ленинский пр-т, 29. тел. (095) 955 4235; (095) 955 4388*

*<http://rheo.ips.ac.ru>*

**ИНФОРМАЦИОННЫЙ ПРОЕКТ «ГЕМОСТАЗ И РЕОЛОГИЯ»**

*<http://www.aha.ru/~hemostas>*

*E-mail: [hemostas@aha.ru](mailto:hemostas@aha.ru)*

**РЕОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В МЕДИЦИНЕ**

Выпуск 2

**Под редакцией**

профессора И.И.Дементьевой

Russian Research Centre of Surgery

Vinogradov Rheologic Society

Information Project «Hemostasis and Rheology»

**MEDICAL RHEOLOGIC RESEARCHES**

Vol.2

**Editor: I.I.Dementieva, Prof., D.Sci.**

В сборник включены материалы исследований в области  
биомедицинской реологии, выполненных в период 1995 - 2000 гг.

При публикации были сохранены авторские иллюстрации.

Макет, информационная и техническая  
поддержка:

Проект «Гемостаз и реология»

*<http://www.aha.ru/~hemostas>*

*E-mail: [hemostas@aha.ru](mailto:hemostas@aha.ru)*

*Тел. (095) 248 0517*

© РНЦХ РАМН  
Москва 2000

**Тепляков А.И., Кручинский Н.Г., Прищепова Е.В., Чегерова Т.И., Теплякова Д.В.**  
**СЕКРЕЦИЯ МОЛЕКУЛ КЛЕТОЧНОЙ АДГЕЗИИ И ЦИТОКИНОВ В РЕГУЛЯЦИИ**  
**МЕЖКЛЕТОЧНЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ ПРИ СВЕРТЫВАНИИ КРОВИ И**  
**РЕОЛОГИЧЕСКОМ СТРЕССЕ У ПАЦИЕНТОВ С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ<sup>1</sup>**

*Белорусский НИИ экологической и профессиональной патологии, г. Могилев,  
Республика Беларусь*

**Введение**

Патогенез многих общепатологических процессов (атерогенез и тромбоз в частности) может рассматриваться с принципиально новых позиций - как результат нарушения “привычных” межклеточных взаимодействий [1], которые обеспечиваются четырьмя классами веществ: молекулами клеточной адгезии, внеклеточным матриксом, цитокинами и протоонкогенами [1,2]. Взаимодействие “клетка-клетка” и “клетка-субстрат” обеспечиваются различными семействами молекул клеточной адгезии (селектины, интегрины, суперсеме́йство иммуноглобулинов). Адгезия клеток к матриксу и межклеточная адгезия индуцирует синтез различных цитокинов и факторов роста [1-3].

Согласно гипотезе Р.Росса, в инициации атерогенеза важнейшая роль отводится тромбоцитарному фактору роста, высвобождающемуся при адгезии тромбоцитов к матриксу поврежденной сосудистой стенки, особенно коллагену [4,5]. Обнаружена структурная идентичность В-цепи этого цитокина и протоонкогена c-sis, который индуцирует сигнальный путь с вовлечением других протоонкогенов и сигнальных молекул [1, 2], что хорошо согласуется с работами, показавшими, что пролиферирующие субинтимальные гладкомышечные элементы, формирующие атерому, имеют моноклоновое происхождение [4].

Анализ механизмов нарушения регуляции межклеточных взаимодействий при атеросклерозе явился целью настоящего исследования.

---

<sup>1</sup> работа выполнена при финансовой поддержке Фонда Фундаментальных Исследований НАН Беларуси (грант № МП-71) и Белорусского Фонда Сороса (грант № В 95-9-1100-29)

## Материалы и методы

Объектом настоящего исследования явились 29 пациентов. Диагноз уточнялся с помощью общепринятых клинических, инструментальных (электрокардиография, эхокардиоскопия с доплеровским исследованием, ультразвуковая доплерография магистральных артерий) и лабораторных тестов (липидный и углеводный обмен, маркеры повреждения миокарда, острофазовые реактанты, маркеры гепатитов при необходимости для исключения сопутствующих воспалительных процессов). Клинически пациенты распределялись следующим образом: у 16 пациентов диагностирована ИБС (у 4 - прогрессирующая стенокардия, у остальных - стабильная стенокардия напряжения II-III функциональных классов), у 13 - дисциркуляторная энцефалопатия (осложненная в 6 случаях ишемическим инсультом). У всех пациентов с ИБС обнаружены гемодинамически незначимые атеросклеротические изменения магистральных артерий головы, что отражает системный характер поражения сосудов при атеросклерозе.

Для изучения регуляции межклеточных взаимодействий нами разработана методика исследования влияния процессов свертывания крови (модель тромбообразования) и вискозиметрического течения с высоким напряжением сдвига (модель постстенотической сепарации кровотока) на секрецию цитокинов и свободных форм молекул клеточной адгезии, которая позволила оценить характер изменений их концентрации в ответ на процессы свертывания крови и фибринолиза (инкубация сгустка в течение 6 часов при 37°C). Параллельно образцы крови подвергались воздействию стандартизированным вискозиметрическим течением на ротационном вискозиметре АКР-2 ("Комед", Москва) при скорости сдвига 100 1/с (экспозиция 60 с при 37°C) с оценкой изменения содержания цитокинов и растворимых форм молекул клеточной адгезии также после 6 часов инкубации по сравнению с исходными значениями.

Уровень циркулирующих (растворимых) форм молекул клеточной адгезии: Р- (тромбоцитарного) и Е- (эндотелиального) селектинов, а также членов суперсемейства иммуноглобулинов - ICAM-1 и VCAM-1 исходных образцов плазмы крови, сыворотки (после инкубации сгустка) и плазмы (после реологического воздействия) исследован с помощью иммуноферментного (анализатор "Biomek-1000, Beckman, США) метода (наборы фирмы R&D, Англия). Концентрация интерлейкинов (IL): 1a, 1b, 6, 8 и 10 определялась иммуноферментным методом ELISA (наборы фирмы "Immunotech", Франция). Концентрация эндотелина-1 (ET-1) оценивалась также методом ELISA (набор фирмы R&D, Англия). Полученные результаты обрабатывались статистически с помощью пакета программ "Statistica 5.0 for Windows".

## Результаты

Результаты исследования исходного содержания цитокинов и изменения их концентрации в ответ на процессы свертывания крови и воздействие вискозиметрического течения с высоким напряжением сдвига представлены в табл.1.

Исходное содержание цитокинов в плазме пациентов характеризуется повышенным уровнем основных провоспалительных интерлейкинов (IL): IL-1 (преимущественно IL-1b) и IL-6 даже без функциональной нагрузки при отсутствии острых и обострения хронических воспалительных процессов.

Процессы свертывания крови и активация в реологическом тесте значительно повышают уровень секреции всех определяемых цитокинов. Резкий достоверный рост концентрации IL-1a и IL-8 в обоих тестах не показал статистических различий

между ними. В то же время, реологическое воздействие вызвало значительно более выраженное высвобождение IL-1b, IL-6 и IL-10 при сдвиговой активации.

Таблица 1.

Динамика изменения концентрации цитокинов в ответ на процессы свертывания крови и реологическое воздействие у пациентов с атеросклерозом ( $\bar{X} \pm SD$ )

| Исследуемый цитокин | Исходная концентрация в плазме | Концентрация в плазме после реологического воздействия | Концентрация в сыворотке после свертывания крови | Нормальный диапазон значений для используемых наборов |
|---------------------|--------------------------------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------|
| IL-1a (нг/мл)       | 12.90 $\pm$ 6.72               | 62.09 $\pm$ 51.63*                                     | 51.68 $\pm$ 48.54*                               | 0-10                                                  |
| IL-1b (нг/мл)       | 55.28 $\pm$ 14.09              | 680.95 $\pm$ 589.97*                                   | 133.98 $\pm$ 132.68*,**                          | 0-10                                                  |
| IL-6 (нг/мл)        | 65.16 $\pm$ 55.66              | 1610.81 $\pm$ 50.78*                                   | 847.55 $\pm$ 676.21*,**                          | 0-10                                                  |
| IL-8 (нг/мл)        | 0                              | 60.25 $\pm$ 42.75*                                     | 51.98 $\pm$ 44.46*                               | 0-10                                                  |
| IL-10 (нг/мл)       | 0.81 $\pm$ 1.40                | 158.14 $\pm$ 112.62*                                   | 9.72 $\pm$ 4.78*,**                              | 0-10                                                  |
| ЭТ-1 (нг/мл)        | 15.88 $\pm$ 15.83              | 35.46 $\pm$ 11.49*                                     | 17.89 $\pm$ 15.16**                              | 0-30                                                  |

Примечание: \* - достоверные ( $p < 0.05$ ) различия по сравнению с исходными значениями; \*\* - достоверные различия между экспрессией в ответ на реологическое воздействие и на процессы коагуляции и фибринолиза ( $t$ -тест).

Результаты исследования изменения концентрации растворимых форм молекул клеточной адгезии представлены в табл. 2.

Таблица 2.

Динамика изменения концентрации растворимых форм молекул клеточной адгезии в ответ на процессы свертывания крови и реологического воздействия при атеросклерозе ( $\bar{X} \pm SD$ ).

| Молекулы клеточной адгезии | Исходные значения    | посткоагуляционные значения | значения после реологического воздействия | Нормальные значения для используемых наборов |
|----------------------------|----------------------|-----------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------|
| P-селектин (нг/мл)         | 168.16 $\pm$ 127.62  | 589.67 $\pm$ 301.50*        | 118.54 $\pm$ 72.97*,**                    | 20-44                                        |
| E-селектин (нг/мл)         | 90.70 $\pm$ 67.93    | 80.87 $\pm$ 47.93           | 91.85 $\pm$ 63.39                         | 29-63                                        |
| ICAM-1 (нг/мл)             | 515.65 $\pm$ 124.49  | 550.38 $\pm$ 237.83*        | 700.22 $\pm$ 105.63*,**                   | 115-306                                      |
| VCAM-1 (нг/мл)             | 1039.74 $\pm$ 528.87 | 1087.12 $\pm$ 300.13        | 1263.29 $\pm$ 239.91                      | 395-714                                      |

Примечание: \* - достоверные различия по сравнению с исходными значениями; \*\* - достоверные различия между изменениями концентраций в пробах ( $t$ -тест).

Исходный уровень всех растворимых форм молекул клеточной адгезии оказался неожиданно высоким. Уровень Е-селектина после свертывания крови достоверно снижается, тогда как после "сдвиговой активации" повышается в 13 и снижается в 16 образцах. Концентрация свободного Р-селектина в процессе коагуляции возрастает однонаправленно и резко, и, в то же время, достоверно снижается после реологического воздействия.

Проведенный корреляционный анализ еще раз продемонстрировал шлейотропность цитокинов и регуляторный характер изменения в разработанной нами модели. Так, исходный уровень IL-1b оказался тесно связанным с ET-1 в процессах свертывания крови и реологическом тесте:  $r=0.61$  и  $0.69$  соответственно,  $n=29$ ,  $p<0.02$ . Уровень IL-1b также тесно и положительно коррелировал с остальными провоспалительными цитокинами и оказался тесно связанным с уровнем секреции IL-8 в обоих тестах. В процессах свертывания крови IL-1b и IL-6 статистически значимо и тесно коррелируют с уровнем IL-8 ( $r=0.83$  и  $0.63$ , соответственно  $p<0.001$  и  $p<0.02$ ).

Однако, наибольший интерес представляет анализ зависимостей между секрецией цитокинов и молекул клеточной адгезии. Так, исходный уровень свободного ICAM-1 достоверно отрицательно коррелировал с уровнями секреции IL-1b, IL-8 и IL-10 в реологическом тесте ( $r=-0.76$ ,  $-0.74$  и  $-0.71$ ,  $n=29$ ,  $p<0.02$  соответственно), а исходный уровень VCAM-1 оказался отрицательно связанным с секрецией IL-8. Обнаружена достоверная отрицательная связь между исходным уровнем IL-10 и ICAM-1 в процессе свертывания крови ( $r=-0.65$ ,  $n=29$ ,  $p<0.05$ ), сильная обратная связь между содержанием исходного Е-селектина и ET-1 в реологической и коагуляционной пробах ( $r=-0.9$ ,  $-0.89$   $p<0.002$ ). Уровень VCAM-1 статистически значимо отрицательно коррелировал со степенью и скоростью адгезии тромбоцитов (первая фаза ристоцетин-агрегации,  $r=-0.85$  и  $r=-0.59$ ,  $n=29$ ,  $p<0.05$ ), оказался тесно связанным со временем адреналин-агрегации ( $r=0.71$ ,  $n=12$ ,  $p<0.05$ ), Е-селектин оказался отрицательно связанным с активированным частичным тромбопластиновым временем ( $p<0.05$ ), а уровень Р-селектина коррелировал с агрегационной активностью тромбоцитов ( $p<0.05$ ).

#### Обсуждение

Повышение концентрации IL-1 и IL-6 также без функционального нарушения является, на наш взгляд, доказательством воспалительной природы атеросклеротического поражения сосудистой стенки [3, 7].

При отсутствии известных различий в биологических функциях IL-1a и IL-1b [2,7], тем не менее можно предположить, что реологическое воздействие явилось источником повышения секреции преимущественно IL-1b. Следовательно, постоянное изменение состояния кровотока, характерное для атеросклеротического процесса, является также дополнительным активирующим фактором, повышающим функциональную готовность иммуокomпетентных клеток крови к секреции медиаторов в смоделированных экстремальных гемореологических условиях, соответствующих окклюзионно-тромботическим осложнениям атеросклероза.

Высокий исходный уровень растворимых форм молекул клеточной адгезии при атеросклерозе свидетельствует о значительных изменениях клеточной координационной коммуникации и предполагает перспективность их использования для диагностики и оценки эффективности проводимого лечения.

Считается, что Е-селектин экспрессируется только эндотелиоцитами при активации эндотелия [1]. Однако, источник повышения уровня свободного Е-селектина в 13 и снижения в 16 из 29 образцах остается неясным и не описан в доступной литературе. Можно предположить несколько возможных механизмов его

возникновения: во-первых, изменение равновесия между шеддингом ("слушивание") и реинтернализацией (обратный захват) при изменении avidности рецепторов, связанной с высоким уровнем цитокинов; во-вторых, другой, отличный от эндотелия, источник Е-селектина в периферической крови; и в третьих, наличие в образце циркулирующих эндотелиоцитов, оторвавшихся от матрикса.

Следует обратить внимание и на аналогичную картину при исследовании изменения содержания ET-1. Рост его концентрации в реологической пробе коррелировал с индексом деформируемости эритроцитов ( $r=0.55$ ,  $n=25$ ,  $p=0.02$ ). С учетом периода жизни около 50 мин. и временем инкубации 6 часов, можно прийти к предположению о том, что, возможно, эритроциты и являются источником предшественника ET-1, который в последующем под влиянием протеолиза из предшественника превращается в ET-1.

Исходный уровень Р-селектина характеризует активность не только тромбоцитов, но и эндотелия, так как в отличие от тромбоцитов под влиянием тромбина, гистамина и окисленных липопротеинов низкой плотности обратимо транслоцируется на поверхность [13]. Обнаруженное явление имеет важное практическое значение: ни один из известных антиагрегантов не предотвращает активацию тромбоцитов под влиянием высоких напряжений сдвига [14].

Представляет интерес и высокий исходный уровень ICAM-1 и VCAM-1. В отличие от ICAM-2, постоянно экспрессируемого на покое эндотелии, ICAM-1 на нем практически не представлен, а VCAM-1 просто отсутствует [1,13]. Напротив, активация эндотелия приводит к быстрой экспрессии этих молекул клеточной адгезии суперсемейства иммуноглобулинов [15]. Среди исследованных классов молекул клеточной адгезии следует остановиться на значимости уровня VCAM-1 как маркера раннего атеросклероза (клеточная его экспрессия на эндотелии является пусковым моментом для адгезии и трансмиграции моноцитов с последующим превращением в макрофаги и пенные клетки).

Биологическое и патофизиологическое значение свободных форм изучено недостаточно, однако результаты проведенного исследования позволяют выделить два важных аспекта этой проблемы: во-первых, клеточные адгезивные молекулы, экспрессируемые на клеточной поверхности, вызывают свойственные им активационные эффекты по пути, который описан как юстакринный (явление адгезии и активации клеток-мишеней мембрано-связанными молекулами других клеток) и, во-вторых, концентрация растворимых форм молекул клеточной адгезии оказалась тесно связанной с концентрациями цитокинов и их секрецией в обоих тестах, что может указывать на плеiotропный механизм действия растворимых молекул клеточной адгезии.

Последние, согласно результатам настоящего исследования, изменяют характер этой реакции, что предполагает следующую гипотезу: они остаются функционально активными и, вероятно, способны связываться с рецепторами эффекторных клеток и клеток мишеней. Так, ICAM-1 в свободной форме, возможно, сохраняет способность связываться с интегрином LFA-1 (CD11a/CD18), VCAM-1 - с VLA-4 гранулоцитов и моноцитов, что требует проведения дальнейших исследований. Следовательно, появление свободных молекул клеточной адгезии может быть результатом не только шеддинга, но и секреции, что может являться еще одним механизмом контроля межклеточных взаимодействий.

## Выводы

1. Атеросклеротическое поражение сосудистой стенки характеризуется высоким уровнем растворимых молекул клеточной адгезии: Р- и Е-селектинов,

суперсемейства иммуноглобулинов (ICAM-1 и VCAM-1) и провоспалительных цитокинов (IL-1b и IL-6).

2. Патофизиологическая роль растворимых молекул клеточной адгезии (на примере Е-селектина и ЕТ-1) может быть связана, в отличие к экспрессируемым на клеточной поверхности, с сохранением их функциональной активности и влиянием на секрецию цитокинов (посредством связывания и блокирования юкстакринного активационного механизма). Циркулирующие молекулы клеточной обладают основными свойствами цитокинов - плейотропностью, растворимостью, индуцибельностью и избыточным синтезом.

3. Тромбообразование и высокие напряжения сдвига являются адекватными стимулами для включения иммунокомпетентными клетками провоспалительной цитокиновой программы при атеросклерозе и шеддингом или интернализацией циркулирующих форм молекул клеточной адгезии.

4. Представления о селективном механизме активации при воздействии высоких напряжений сдвига представляет большой практический интерес: ни один их анитаггрегантов не блокирует селектин-зависимую адгезию. Это предполагает перспективность поиска антиселектиновых препаратов в качестве принципиально новых антитромботиков.

5. Предлагаемый новый междисциплинарный подход подтвердил гипотезу о нарушении регуляции межклеточных взаимодействий и в настоящее время является адекватным для углубления представлений о молекулярных и клеточных механизмах атерогенеза и требует дальнейшего развития в нескольких направлениях:

- исследование диагностической значимости циркулирующих молекул клеточной адгезии и возможности их использования для фармакологического мониторинга;

- исследование возможности использования растворимых рецепторов к цитокинам и препаратов на основании антител к молекулам адгезии для подавления запуска тромбообразования при осложнениях атеросклероза: в качестве антитромботиков (ингибиторы интегринов тромбоцитов и препаратов для профилактики синдрома "ишемии-реперфузии").

#### Литература

1. Пальцев М.А., Иванова А.А. Межклеточные взаимодействия.-М.: Медицина.-1995.- 224 с.
2. Nicola N.A. Guidebook to Cytokines and Their Receptors.- Oxford: A Sambrook and Tooze Publication and Oxford University Press.-1994.-261 p.
3. Marcus A.J., Safier L.B., Broeckman M.J. et al. Thrombosis and inflammation as multicellular process: significance of cell-cell interactions.// *Thromb. Haemost.* 1995.- V.74.- P. 213-217.
4. М. Ферстрате, Ж. Фермиллен. Тромбозы: пер. с англ.- М.: Медицина.-1986.-336 с.
5. Santoro S.A., Zutter M.M. The  $\alpha 2 b 1$  integrin: a collagen receptor on platelets and other cells // *Thromb. Haemost.*-1995.-V.74, № 3.- P. 813-822.
6. Кузник Б.И., Васильев Н.В., Цыбиков Н.Н. Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма.-М.: Медицина.-1989.-320 с.
7. Dinarello C.A. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism// *Blood*.-1991.- V. 77.- P. 1627-1652.
8. Koch A.E., Poverini P.J., Kunkel S.L. et al. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis // *Science*.- 1992.- V. 258.- P. 1798-1801.
9. Kunkel S.L., Standiford T., Kashara K. et al. Interleukin-8 -the major neutrophil chemotactic factor in the lung // *Exp. Lung Res.*-1991.-V.17.- P.-17-23.
10. Rennick D., Berg D., Holland J. Interleukin-10: an overview // *Progr. Growth Factors Res.*-1992.-V.4 - P.207-227.
11. Bogdan C., Vodovotz Y., Natanth C. Macrophage deactivation by IL-10 // *J. Exp. Med.*-1991.-V.-174.-P.-1549-1555.
12. Kishimoto T. The biology of Interleukin-6 // *Blood*.-1989.-V.-74.-P.1-10.
13. Furie B., Furie B.C. The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes: role of P-selectin and P-selectin ligand, PSGL-1// *ibid.* -p. 224-227.

14. O'Brien J.R. *Shear-induced platelet aggregation* // *Lancet*. - 1990. - V. 335. - N 8691. - P. 711-713.
15. Shatil S.J. *Function and regulation of  $\beta_3$  integrins in haemostasis and vascular biology* // *Thromb. Haemost.* - 1995. - V. 74. - P. 213-217.