

ФАКТОРЫ РОСТА И МОЛЕКУЛЫ АДГЕЗИИ ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ КАК МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МИШЕНИ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ПЕПТИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРОТИВ АТЕРОСКЛЕРОЗА

В.В. Малинин¹, доктор медицинских наук, профессор,
А.О. Дурнова², кандидат биологических наук, **В.О. Полякова**², доктор биологических наук

¹Медико-биологический научно-производственный комплекс «Цитомед»,

²НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта СЗО РАМН

E-mail: vopol@yandex.ru

Изучена экспрессия молекул адгезии (ICAM-1, E-селектин) и факторов роста (PDGF, bFGF, TGFβ) в культурах клеток эндотелия человека в норме и при атеросклерозе. Установлено, что при атеросклерозе экспрессия ICAM-1, E-селектина, bFGF, TGFβ снижается, тогда как синтез ростового фактора PDGF не изменяется. Изучение биологической активности пептида Lys-Glu-Trp показало возможность его применения как потенциального лекарственного средства для молекулярной таргетной терапии атеросклероза.

Ключевые слова: молекулы адгезии, факторы роста, эндотелий, атеросклероз, трипептид

THE GROWTH FACTORS AND ADHESION MOLECULES OF VESSEL ENDOTHELIUM AS TARGETS FOR CREATION OF PEPTIDE DRUGS AGAINST ATHEROSCLEROSIS

V.V. Malinin¹, A.O. Durnova², V.O. Polyakova²

¹Medical-Biological Research-Industrial Complex «Cytomed»; ²The Research Institute of Obstetrics and Gynecology named after D.O. Ott of the North-West Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

The expression of adhesion molecules (ICAM-1, E-selectin) and growth factors (PDGF, bFGF, TGF-β) was investigated in cultures of human endothelial cells in health and atherosclerosis. Expression of ICAM-1, E-selectin, bFGF, TGF-β was shown to decline in atherosclerotic endothelium, but the synthesis of PDGF didn't change. The investigation of biological effects of peptide Lys-Glu-Trp has shown the possibility of its using as a potential drug for molecular target therapy of atherosclerosis.

Key words: adhesion molecules, growth factors, endothelium, atherosclerosis, tripeptide

В основе развития атеросклероза лежит дисфункция эндотелиальных клеток, которые регулируют тонус сосудов, модулируют гемостаз, влияют на сосудистую проницаемость и контролируют рост кровеносных сосудов [2, 3]. Роль эндотелия в регуляции этих функций опосредована экспрессией сигнальных молекул, важнейшими из которых являются факторы роста и молекулы адгезии [4].

Наиболее хорошо изученными представителями группы факторов роста, регулирующих функциональную активность эндотелиоцитов, являются тромбоцитарный фактор роста (PDGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF) и трансформирующий фактор роста (TGFβ) [5]. PDGF является молекулой, регулирующей клеточный цикл; участвует в процессе свертывания крови и опосредованно влияет на пролиферацию клеток сосудистого эндотелия. Среди белков, синтез которых индуцируется в фибробластах при добавлении PDGF, ключевым является bFGF. Этот аспект имеет важное значение в механизме раз-

вития атеросклероза, когда сопряженно вследствие патологических изменений тромбоцитов, макрофагов и гладкомышечных клеток эндотелиоциты вырабатывают PDGF, bFGF и TGFβ. С другой стороны, эндотелиальные клетки являются мишенями факторов роста. Например, митоз эндотелиальных клеток индуцируется bFGF [10].

Основные эффекты TGFβ при атеросклерозе связаны с усилением хемотаксической активности моноцитов, стимуляции синтеза белков экстрацеллюлярного матрикса, модуляции протеолитической и миграционной активности клеток, а также ингибированием пролиферации и поддержанием дифференцированного состояния клеток [8]. При исследовании роли цитокина TGFβ в регуляции процессов, сопровождающих межклеточные взаимодействия в ходе развития атеросклеротического поражения аорты человека, изучение экспрессии TGFβ, а также белков Smad 2, 3, 4, служащих специфическими маркерами транскрипционной активности клеток, возникаю-

щей в ответ на сигнал TGF β , показало, что система TGF β в нормальной интиме магистральных артерий не активна [6]. Система активируется при атеросклерозе на стадии образования липофиброзной бляшки, когда сигнальный путь TGF β (Smad) вовлечен в регуляцию транскрипции, пролиферации и дифференцировки моноцитов/макрофагов и гладкомышечных клеток [11].

Другим фактором, определяющим склонность к образованию атеросклеротических бляшек, является адгезивная способность эндотелия сосудов. При развитии атеросклероза адгезию моноцитов и нейтрофилов на поверхности эндотелия активируют молекулы адгезии E-селектин и ICAM-1 [7]. При этом активированные нейтрофилы активируют перекисное окисление белков и липидов. Роль селектинов в развитии атеросклероза подчеркивается тем фактом, что у мышей, дефицитных по E-селектину, при скрещивании с мышами, лишенными этого гена (knockout – KO), не происходит развития атеросклероза. Синтез молекул адгезии могут индуцировать цитокины. Так, интерлейкин-1 и фактор некроза опухолей усиливают синтез эндотелиальными клетками VCAM-1 и ICAM-1 [9].

Кроме того, установлено, что с возрастом в областях с высокой степенью полиплоидии эндотелиальных клеток существенно возрастают адгезивные свойства эндотелия, что может обуславливать локальность межклеточных взаимодействий (лейкоциты – эндотелий) и способствовать развитию атеросклеротических поражений в этих зонах. Исследование экспрессии молекул адгезии (ICAM-1 и E-селектина) для лейкоцитов, проникающих в интиму на ранних этапах атерогенеза, выявило прямую зависимость между степенью полиплоидии и уровнем экспрессии этих молекул.

Таким образом, поиск веществ, молекулярными мишенями действия которых являются факторы роста и молекулы адгезии, позволит расширить перспективы в создании лекарственных препаратов, способных успешно предотвращать развитие атеросклеротического поражения сосудов.

Целью работы явилось изучение влияния пептида Lys-Glu-Trp [1] на экспрессию факторов роста и молекул адгезии в клетках эндотелия сосудов при атеросклерозе.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Материал аорты без патологических изменений был получен от эмбриона человека (21 нед гестации). Ткань атеросклеротической аорты человека (диаметром 0,2 см, 4 фрагмента) получена при операции аортокоронарного шунтирования. Материал брали в стерильных условиях, затем помещали его в стерильную емкость с физиологическим раствором.

Путем ферментативной диссоциации с помощью коллагеназы из фрагментов сосудов была получена

первичная диссоциированная культура ткани эндотелия. Выделение первичной культуры осуществляли на чашках Петри (Sarstedt), обработанных раствором фибриногена (Gibco), последующее культивирование проводили во флаконах объемом 50 мл (Sarstedt, 25 см²).

Среда для культивирования клеток содержала 87,5% M199, 10% FBS, 1,5% HEPES, 1% PES и L-глутамин. Пассирование клеток производили через 3 дня на 4-й, посевная концентрация составляла примерно $3 \cdot 10^5$ клеток на флакон. Культивирование проводили до 3-го пассажа (для эндотелия, пораженного атеросклерозом) и до 7-го пассажа (для нормально-го эндотелия), на котором клетки были рассеяны на 24-луночный планшет для иммуноцитохимического окрашивания.

Все культуры (нормального и пораженного атеросклерозом эндотелия) были разделены на 3 группы: 1-я – контрольная (без введения трипептида), 2-я – с добавлением трипептида в концентрации 4 мкг/мл и 3-я – с добавлением трипептида в концентрации 40 мкг/мл.

Для иммуноцитохимического исследования использовали первичные моноклональные антитела к маркерам ICAM-1 (1:200, LifeSpan), E-селектину (1:50, Santa Cruz), PDGF (1:50, Dako), bFGF (1:50, Dako), TGF β (1:50, Dako) и вторичные антитела – биотинилированные антимишечные иммуноглобулины (Dako). Пермеабиллизацию проводили 0,5% раствором тритона X100. Визуализацию реакции выполняли с применением пероксидазы хрена и диаминобензидина («EnVision Detection System», Peroxidase/DAB, Rabbit, Mouse). Результаты иммуноцитохимического окрашивания оценивали морфометрическим методом на микроскопе «Nikon Eclipse» E400 с помощью цифровой камеры «Nikon» DXM1200 и программного обеспечения «Videotest Morphology 5.2». В каждом случае анализировали 5 полей зрения при $\times 200$. Площадь экспрессии рассчитывали как отношение площади, занимаемой иммунопозитивными клетками, к общей площади клеток в поле зрения и выражали в %.

Статистическая обработка данных включала подсчет среднего арифметического, стандартного отклонения и доверительного интервала для каждой выборки и проводилась в программе Statistica 6.0. Для анализа вида распределения использовали критерий Шапиро–Уилка. Для проверки статистической однородности нескольких выборок были использованы непараметрические процедуры однофакторного дисперсионного анализа (критерий Крускала–Уоллиса). В случаях, когда дисперсионный анализ выявлял статистически значимую неоднородность нескольких выборок, для последующего выявления неоднородных групп применяли процедуры множественных сравнений с помощью U-критерия Манна–Уитни. Критический уровень

достоверности нулевой гипотезы об отсутствии различий принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В контрольной группе в культурах клеток нормального эндотелия экспрессия маркеров ICAM-1, E-селектина, bFGF и TGFβ была в 2–8 раз выше, чем соответствующие показатели для эндотелиоцитов, полученных от пациентов с атеросклерозом (см. таблицу).

При этом экспрессия фактора роста PDGF в нормальных эндотелиоцитах и пораженных атеросклерозом эндотелиоцитах достоверно не различалась. Таким образом, на молекулярном уровне функциональная активность эндотелиоцитов при развитии атеросклероза значительно снижается, что выражается в снижении экспрессии ряда сигнальных молекул – маркеров адгезии и клеточного роста ICAM-1, E-селектина, bFGF, TGFβ, однако протеин PDGF оказывается не вовлеченным в этот процесс. Исследуемый в культуре нормальных эндотелиоцитов трипептид оказывал разнонаправленное действие в концентрациях 4 и 40 мкг/мл: в меньшей концентрации он способствовал снижению площади экспрессии E-селектина на 67%, а в большей – повышал синтез протеина PDGF на 32% по отношению к соответствующему контролю. В культурах клеток эндотелия, полученных от пациентов с атеросклерозом сосудов, трипептид в концентрациях 4 и 40 мкг/мл оказывал однонаправленное ингибирующее действие на экспрессию сигнальных молекул E-селектина, bFGF и PDGF (см. таблицу).

Полученные данные свидетельствуют о том, что из всех изученных сигнальных молекул мишенью

ВЛИЯНИЕ ПЕПТИДА LYS-GLU-TRP НА ПЛОЩАДЬ ЭКСПРЕССИИ МОЛЕКУЛ АДГЕЗИИ И ФАКТОРОВ РОСТА В ЭНДОТЕЛИИ СОСУДОВ В НОРМЕ И ПРИ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ

Маркерный белок	Группа	Площадь экспрессии, %	
		норма	атеросклероз
ICAM	1-я	7,21±1,41	2,64±0,59*
	2-я	5,63±0,76	2,33±0,37
	3-я	5,58±0,40	1,77±0,45
E-селектин	1-я	11,25±1,58	4,2±2,07*
	2-я	6,68±2,0**	2,29±0,38**
	3-я	10,77±2,77	1,67±0,30**
PDGF	1-я	6,13±1,53	5,88±1,44
	2-я	6,27±1,18	2,03±0,45**
	3-я	9,28±2,60**	2,54±0,77**
bFGF	1-я	13,89±1,59	4,19±1,20*
	2-я	12,21±1,53	2,48±0,80**
	3-я	12,53±2,96	1,03±0,23**
TGFβ	1-я	16,21±4,46	2,91±0,50*
	2-я	13,39±0,89	3,37±0,83
	3-я	12,60±2,34	3,8±0,75

* – p<0,05 по сравнению с нормой, ** – с показателем в контроле.

действия пептида Lys-Glu-Trp в большей степени является E-селектин, синтез которого, однако, не коррелирует с развитием атеросклеротического поражения сосудов. Таким образом, установлено, что молекулы адгезии и факторы роста участвуют в развитии атеросклероза, а измерение уровня их экспрессии в культуре эндотелиоцитов может служить адекватной моделью для поиска биологической активности потенциальных лекарственных средств пептидной природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малинин В.В. Средство для коррекции метаболического синдрома // Патент РФ № 2458935. 2012. 9 с.
2. Полянец А.А., Мозговой П.В., Фролов Д.В. и др. Влияние активности воспаления сосудистой стенки на отдаленные результаты реконструктивных операций у пациентов, страдающих облитерирующим атеросклерозом аорты и артерий нижних конечностей // Биомед. журн. – 2011; 12: 410–9.
3. Сергиенко И.В., Семенова А.Е., Масенко В.П. Влияние терапии статинами на динамику уровней сосудистого эндотелиального фактора роста и фактора роста фибробластов у больных ишемической болезнью сердца // Кардиология. – 2007; 8: 4–7.
4. Торшин И.Ю., Громова О.А. Сосудистые заболевания сердца, мозга и молекулярные гены. Часть 2: роль молекулярных генов в системе гемостаза и формировании атеросклероза // Трудный пациент. – 2008; 4: 28–35.
5. Andrae J., Gallini R., Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine // Genes Dev. – 2008; 22 (10): 12761–312.
6. Bell D. Markers for progression of coronary disease // Pharmacotherapy. – 2001; 21: 190–4.
7. Berliner J., Navab M., Fogelman A. et al. Atherosclerosis: basic mechanism oxidation, inflammation, and genetic // Circulation. – 1995; 91: 2488–96.
8. Kalinina N., Agrotis A., Antropova Y. Smad expression in human atherosclerotic lesions: evidence for impaired TGF-beta/Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. – 2004; 24 (8): 1391–6.
9. Kleemann R., Bureeva S., Perlina A. et al. A systems biology strategy for predicting similarities and differences of drug effects: evidence for drug-specific modulation of inflammation in atherosclerosis // BMC Syst. Biol. – 2011; 12: 1235–9.
10. Przybylski M. A review of the current research on the role of bFGF and VEGF in angiogenesis // J. Wound Care. – 2009; 18 (12): 516–9.
11. Toma I., McCaffrey T. Transforming growth factor-β and atherosclerosis: interwoven atherogenic and atheroprotective aspects // Cell. Tissue. Res. – 2012; 347 (1): 155–75.