

ИММУННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ПОВРЕЖДЕНИЯ ЭНДОТЕЛИЯ У БЕРЕМЕННЫХ И ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ СИНТЕТИЧЕСКОГО АНАЛОГА ЛЕЙ-ЭНКЕФАЛИНА – ДАЛАРГИНА: КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

И.С. Липатов, Н.А. Якимова, Ю.В. Тезиков, Э.В. Бобряшова,¹
П.П. Пурыгин, И.А. Потапова, Ю.П. Зарубин ²

В эксперименте на культуре эндотелиальных клеток изучено цитотоксическое действие антиэндотелиальных антител и сенсibilизированных к эндотелию сосудов лимфоцитов, полученных из крови беременных женщин с гемоваскулярными нарушениями. Полученные данные позволили выделить иммунные механизмы повреждения эндотелиальной клетки при осложнённом течении гестации и доказать цитопротективное и иммуномодулирующее действие синтетического аналога лей-энкеφαлина – даларгина, опосредованное через Δ - и μ -рецепторы эндотелия сосудов и иммунокомпетентных клеток.

Введение

В настоящее время получены данные, указывающие, что эндотелий сосудов и гладкомышечные клетки являются активными взаимосвязанными структурами в норме и патологии, участвующими в синтезе биологически активных веществ, в регуляции свёртывания крови, в многочисленных реакциях иммунологического и метаболического гомеостаза [1,2]. Исследованиями ряда авторов доказано, что эндотелий сосудов является самостоятельной регулирующей системой, выделяющей наиболее мощные вазопрессоры и вазодилататоры (эндотелины, простагландины, эндотелийрелаксирующий фактор, брадикинин, ангиотензиноген), взаимодействующей с иммунокомпетентными клетками и продуктами иммунологических реакций и являющейся основой гематоэнцефалического, гемоплацентарного и гистогематических барьеров. Сосудистые нарушения лежат в основе генеза большинства заболеваний, являющихся наиболее частой причиной инвалидизации и летальности людей трудоспособного возраста (ИБС, гипертоническая болезнь, патология почек, гестоз и др.).

¹Липатов Игорь Станиславович, Якимова Наталья Анатольевна, Тезиков Юрий Владимирович, Бобряшова Эльвира Владимировна, кафедра акушерства и гинекологии, Самарский государственный медицинский университет

²Пурыгин Пётр Петрович, Потапова Ирина Анатольевна, Зарубин Юрий Павлович, кафедра органической химии, Самарский государственный университет

Известен ряд механизмов, которые ведут к повреждению эндотелия сосудов и развитию эндотелиальной дисфункции: гемодинамический, наследственный, гуморальный [2,3]. Иммунные механизмы повреждения эндотелия изучены недостаточно, хотя известно, что там, где возникают нарушения функции или структуры сосудистой стенки, имеют место иммунные реакции клеточного и гуморального характера [4], выражающиеся в появлении сенсibilизированных к эндотелию лимфоцитов (СЭЛ), антиэндотелиальных антител (АЭАТ).

Углублённое изучение свойств активно действующих в организме человека субстратов (АЭАТ, СЭЛ) возможно лишь при изолированном исследовании *in vitro*. В эксперименте также можно проследить конкретные механизмы действия веществ, свойства которых до конца не изучены. Одним из таких является даларгин – регуляторный пептид, синтетический аналог лей-энкефалина, обладающий центральным и периферическим влиянием и оказывающий своё действие за счёт связывания со специфическими опиатными рецепторами Δ - и μ -типа, обнаруженными в эндотелии, макрофагах, лимфоцитах, тромбоцитах, эндометрии, плаценте, клетках АПУД-системы и других структурах организма [5]. Регуляторные пептиды опосредуют процессы накопления и сохранения энергии, т. е. участвуют в глубинных механизмах поддержания гомеостаза, оказывают триггерное действие на фоне максимальной избирательности по отношению к клеткам-мишеням [6].

Целью настоящего исследования явилось выяснение иммунных механизмов повреждения эндотелиальных клеток при осложнённом течении беременности антиэндотелиальными антителами и сенсibilизированными лимфоцитами в эксперименте и определение влияния на них регуляторного пептида даларгина.

1. Методика исследования

В качестве объекта-мишени для изучения цитотоксических свойств АЭАТ и СЭЛ использовалась культура эндотелиальных клеток, выращиваемых в модифицированных чашках Петри с использованием среды 199, коллагена в качестве основы, антибиотиков [7,8]. Культивированный эндотелий забирался из пуповины доношенных, зрелых плодов с 0 (I) группой крови, резус-положительных от матерей с физиологическим течением беременности (в крови плодов АЭАТ не определялись, СЭЛ отсутствовали). Диссоциация клеток достигалась сочетанным ферментно-механическим способом [7]. Энзимное воздействие на межучточные структуры осуществлялось с 0,1 М хелатирующим агентом ЭДТА. Взвесь эндотелиальных клеток получали путём многократного создания турбулентного потока жидкости в результате введения среды 199 в сосуд пуповины под давлением. Разделение клеток (эндотелиальных, повреждённых, ядер, эритроцитов) проводили в градиенте плотности фикол-гипак ($1,077 \text{ г/см}^3$) низкоскоростным центрифугированием. После промывывания проводилась оптическая реагрегация диссоциированных клеток в среде 199. Контроль концентрации клеток ($2 \cdot 10^6$) и определение содержания неповреждённых клеток осуществляли с помощью гемоцитометра. Культивирование проводилось в течение 96 ч, затем для обозначения повреждённых клеток использовалась витальная окраска культуры 0,25 % раствором трипанового синего. С помощью светового микроскопа подсчитывался процент живых и повреждённых клеток. АЭАТ и СЭЛ изучались в крови беременных женщин с гемоваскулярными повреждениями, составляющими основу симптомокомплексов гестоза, невынашивания, синдрома задержки развития плода [1,3].

Уровень АЭАТ в сыворотке крови беременных определялся по стандарту На-

ционального Института Аллергии и Инфекционных Заболеваний (США) по технике перекрёстной пробы к моноцитам, имеющим общие антигены с эндотелиоцитами [4,9]. Для исследований использовалась сыворотка крови беременных с индексом цитотоксичности к моноцитам от 10 до 70%.

Лимфоциты выделяли по Х. Фримелю (1987). Процент СЭЛ определяли методом специфического розеткообразования [10]. Их количество при физиологической беременности было от 4 до 20%, при осложнённой беременности – от 18 до 46%. Общее содержание лимфоцитов во взвеси – $2 \cdot 10^4$ мл⁻¹. Компоненты вносились по 0,04 мл, среда – 0,12 мл. Лимфоциты в связи с их активным ростом в среде вносили за 12 часов до окончания культивирования для проявления ими лишь цитотоксических свойств.

Серии опытов:

- 1) эндотелий, среда, сыворотка беременных с АЭАТ, комплемент;
- 2) эндотелий, среда, лимфоциты;
- 3) эндотелий, среда, сыворотка с АЭАТ, лимфоциты (для изучения цитотоксического действия лимфоцитов, опосредованного антителами);
- 4) контроль N 1 – эндотелий, среда;
- 5) контроль N 2 – эндотелий, среда, комплемент;
- 6) контроль N 3 – эндотелий, среда, даларгин;
- 7) контроль N 4 – эндотелий, среда, сыворотка беременных без АЭАТ;
- 8) контроль N 5 – эндотелий, среда, лимфоциты беременных с физиологической гестацией (СЭЛ < 5 %).

Цитотоксическое действие АЭАТ, СЭЛ изучено у 51 женщины: у 18 – с физиологическим течением беременности и у 33 – с осложнённой угрозой прерывания, гестозом, синдромом задержки развития плода гестацией. Контрольную группу составили 15 беременных женщин с физиологическим течением беременности, в сыворотке которых не обнаруживались АЭАТ, СЭЛ выявлялись менее 5%.

Влияние даларгина на цитотоксическое действие АЭАТ и СЭЛ при физиологической беременности изучено у 14 женщин, при осложнённом течении беременности – у 22 женщин. Концентрация даларгина составляла $2 \cdot 10^{-4}$ мг/мл. Полученные результаты подвергнуты обработке с использованием вариационной статистики с заданной вероятностью, равной 95%, с использованием критерия Стьюдента.

2. Результаты исследования

Проведённые исследования показали, что вносимая в культуру эндотелиальных клеток сыворотка беременных без АЭАТ (15 наблюдений) дала следующие результаты: $90,5 \pm 3,55\%$ живых и $9,5 \pm 2,9\%$ повреждённых клеток. Вносимая в культуру взвесь лимфоцитов с содержанием СЭЛ менее 5% (14 наблюдений) дала соответственно следующие результаты: $86,0 \pm 4,4\%$ и $14 \pm 3,8\%$. Вносимые в культуру даларгин, комплемент (по 10 наблюдений) не вызывают значительного отклонения в росте клеток ($93,3 \pm 2,7\%$ и $91,3 \pm 3,3\%$ живых клеток; $6,7 \pm 2,1\%$ и $8,7 \pm 4,6\%$ повреждённых клеток соответственно). Действие АЭАТ и СЭЛ на эндотелиальные клетки при физиологической беременности представлено в табл. 1.

АЭАТ в присутствии комплемента при патологической гестации уменьшает процент живых клеток в 1,8 раза, СЭЛ – в 2 раза, а при их совместном присутствии в среде – более чем в 3 раза.

Таблица 1

Сравнительная оценка цитотоксического действия антиэндотелиальных антител и сенсibilизированных к эндотелию лимфоцитов на культуру эндотелиальных клеток ($M \pm \delta$)

Изучаемый показатель	Количество обследованных	Физиологическая беременность		Количество обследованных	Осложнённое течение беременности	
		% живых клеток	% повреждённых клеток		% живых клеток	% повреждённых клеток
АЭАТ	18	84,1 $\pm$ 9,2	15,9 $\pm$ 8,4	33	46,2 $\pm$ 15,3*	53,8 $\pm$ 13,1*
СЭЛ	14	78,6 $\pm$ 7,6	21,4 $\pm$ 6,2	22	39,6 $\pm$ 14,1*	60,4 $\pm$ 17,1*
АЭАТ и СЭЛ	12	72,2 $\pm$ 8,1	27,9 $\pm$ 7,4	20	21,3 $\pm$ 12,9*	78,7 $\pm$ 14,6*

* – результаты достоверно отличаются от данных по физиологической беременности ($P < 0,05$).

Данные о влиянии даларгина на цитотоксическое действие АЭАТ и СЭЛ представлены в табл. 2. При физиологической гестации это влияние *in vitro* проявляется неотчётливо, и лишь небольшая (статистически не значимая) разница имеет место при введении в среду обоих компонентов (АЭАТ и СЭЛ), а именно этот вариант более близок к условиям *in vivo*.

При беременности, осложнённой сосудистыми расстройствами, регуляторные, цитопротективные свойства даларгина *in vitro* проявляются более отчётливо: цитотоксическое влияние АЭАТ нивелируется в 1,3 раза, влияние СЭЛ – в 1,7 раза; их совместное влияние – более чем в 2 раза.

Таблица 2

Влияние даларгина на цитотоксическое действие антиэндотелиальных антител и сенсibilизированных к эндотелию лимфоцитов ($M \pm \delta$)

Изучаемый показатель	Количество обследованных	Физиологическая беременность		Количество обследованных	Осложнённое течение беременности	
		% живых клеток	% повреждённых клеток		% живых клеток	% повреждённых клеток
АЭАТ	14	86,3 $\pm$ 7,8	13,7 $\pm$ 6,9	22	59,1 $\pm$ 9,9*	40,9 $\pm$ 11,2*
СЭЛ	12	81,0 $\pm$ 5,9	19,0 $\pm$ 6,2	17	64,3 $\pm$ 13,9*	35,7 $\pm$ 12,6*
АЭАТ и СЭЛ	12	92,4 $\pm$ 7,5	17,6 $\pm$ 7,2	15	46,8 $\pm$ 10,3*	53,2 $\pm$ 16,1*
Даларгин (контроль) 10 исследований	–	93,3 $\pm$ 2,7	6,7 $\pm$ 2,1	–	–	–

* – результаты достоверно отличаются от данных по физиологической беременности ($P < 0,05$).

3. Обсуждение результатов

Результаты проведённого исследования позволили выделить возможные иммунные механизмы повреждения эндотелиальной клетки при патологии, связанной с сосудистыми нарушениями: 1 – антителозависимая цитотоксичность (АЭАТ), связанная с активностью комплемента; 2 – цитотоксическое действие иммунных комплексов, имеющее место *in vivo*; 3 – цитотоксическое действие сенсibilизированных лимфоцитов (СЭЛ), осуществляемое посредством изменения структуры мембраны эндотелиоцита; 4 – антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЭАТ, СЭЛ), которая может проявляться при совместном влиянии на клетку антител и лимфоцитов (см. рисунок).

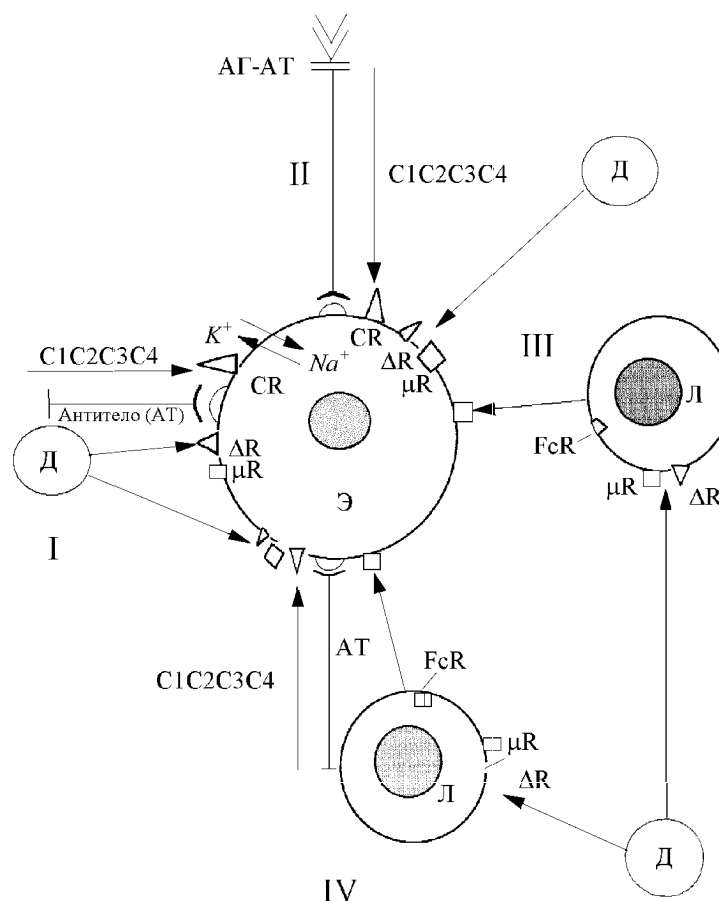


Рис. Иммунные механизмы повреждения эндотелия у беременных и корригирующее влияние на них даларгина: Э – эндотелиальная клетка; Л – лимфоцит; Д – регуляторный пептид даларгин; C1, C2, C3, C4 – фракции комплемента; ΔR и μR – опиатные рецепторы; CR – рецепторы к комплементу); I – антителозависимая цитотоксичность, связанная с активностью комплемента; II – цитотоксическое действие иммунных комплексов; III – цитотоксическое действие сенсibilизированных лимфоцитов; IV – антителозависимая клеточная цитотоксичность

Полученные в ходе эксперимента данные можно экстраполировать на процессы, реально протекающие в организме беременной. АЭАТ являются серологическими маркерами избыточной экспрессии Dг-антигена на мембране эндотелиальных клеток. Распознавание Dг-антигена Т-хелперами обеспечивает второй сигнал, индуцирующий развитие аутоиммунной реакции к сосудистой стенке. С другой стороны, повреждённые клетки эндотелия приобретают способность продуцировать ряд биологических веществ (цитокинов), среди которых наибольший интерес представляют интерлейкин-подобные субстанции и тромбоцитарный фактор роста. Локальная продукция этих медиаторов усиливает адгезию нейтрофилов моноцитов к эндотелию и стимулирует пролиферацию гладкомышечных клеток.

По данным электронной микроскопии [11], стимулом для адгезии и миграции моноцитов в сосудистую стенку служат некоторые гуморальные факторы: турбулентность кровотока, фактор кровяных пластинок, фракции С комплемента, местные хемоаттрактанты сосудистой стенки, фактор гладкомышечных клеток, продукты декомпозиции эластина и коллагена, некрогормоны и др. По-видимому, повреждение сосудистой стенки увеличивает в ней концентрацию тканевых хемоаттрактантов, что способствует миграции моноцитов в эти участки. По нашим данным, в повреждении сосудистой стенки принимает участие и гиперчувствительность замедленного типа [1,4]. Кинетика ответа лимфоцитов на митогены имеет большую скорость, чем кинетика при ответе на антиген, но усиленная проницаемость сосудов, развивающаяся в обоих случаях, содержит компонент, не поддающийся блокаде фармакологическими антагонистами гистамина, кининов и простагландинов, что предполагает действие медиатора, специфичного только для повышенной чувствительности замедленного типа. Лимфокины в результате действия на эндотелий сосудов повышают их проницаемость для белков и циркулирующих клеток (полиморфно-ядерных и макрофагов), а также способствуют агрегации тромбоцитов и продукции тромбиноподобных веществ, которые вслед за тромбозом вызывают окклюзию сосудов. Деградация фибриллярных (коллаген, эластин, базальные мембраны) и аморфных (протеогликаны) компонентов соединительной ткани стенки сосудов может быть следствием выработки нейтральных протеаз и лизосомальных гидролаз полиморфно-ядерными и мононуклеарными лейкоцитами в очаге деструкции при их стимуляции локально продуцированными лимфокинами. Также лимфокины усиливают секрецию лизосомальных ферментов и протеаз (например, коллагеназы) макрофагами. Описанные процессы способствуют в конечном счёте возникновению и прогрессированию воспалительного процесса (в том числе иммунного воспаления) в сосудистой стенке [1,11]. Накопленные к настоящему времени факты подтверждают правильность описанной цепи событий и положений, которые доступны для дальнейшей экспериментальной проверки.

Кроме того, данное исследование позволило доказать не только хорошо описанное регуляторное влияние даларгина на лимфоциты [6,12], но и его мембраностабилизирующее, а в более общем виде – цитопротективное действие. Это заключение следует из того, что при наличии в среде даларгина АЭАТ в 1,3 раза меньше повреждают эндотелиальные клетки. Даларгин же может реализовать свои свойства лишь на структурах, имеющих к нему рецепторы. АЭАТ такими рецепторами не обладают, в то время как вазоактивные, эндотелийпролиферативные эффекты даларгина при различных патологических состояниях хорошо описаны в клинике и эксперименте [5,6,12]. На рисунке представлены и возможные механизмы корригирующего действия даларгина на иммунное повреждение эндотелиальной клетки: цитопротективное действие он оказывает непосредственным влиянием на мембрану эндотелиальной

клетки, на цитотоксические свойства лимфоцитов влияет через Δ - и μ -рецепторы; сочетанием указанных свойств блокирует антителозависимую клеточную цитотоксичность.

Таким образом, исследование показало наличие повреждающего действия АЭАТ и СЭЛ на эндотелий сосудов и позволило выделить возможные иммунные механизмы повреждения эндотелиоцита при патологии, связанной с сосудистыми нарушениями. Коррекция цитотоксического влияния указанных факторов может осуществляться с помощью регуляторного пептида даларгина, обладающего не только иммуномодулирующим влиянием, но и непосредственным цитопротективным действием на эндотелиальную клетку, что открывает новые перспективы в поисках путей лечения патологии, связанной с гемоваскулярными нарушениями.

Литература

- [1] Липатов И.С. Патогенез, диагностика и профилактика сосудистых нарушений на раннем этапе формирования патологической беременности: Дис. ... д-ра мед. наук. М., 1996. 263 с.
- [2] Общая патология человека: Руководство для врачей / Под ред. А.И. Струкова, В.В. Серова, Д.С. Саркисова. М.: Медицина, 1990.
- [3] Липатов И.С., Купаев И.А., Козупица Г.С. Исходы беременности у женщин с патологической прибавкой массы тела, с сосудистой дисфункцией, преходящими отеками и транзиторной протеинурией // Акушерство и гинекология. 1995. N 6. С.16-18.
- [4] Lipatov I.S., Tesicov U.V., Zavalko A.F., Zhavrid O.A. Hestosis forecast based on antigenic systems of endothelial vascular cells and monocytes of peripheric blood // International symposium "Actual questions of diagnostic, prophylaxis end treatment of gestosis": Moscow. 19-20 of november, 1998. P.104-106.
- [5] Ашмарин И.П. Перспективы практического применения и некоторых фундаментальных исследований малых регуляторных пептидов // Вопросы медицинской химии. 1984. N 3. С.2-7.
- [6] Анисимов В.Н., Ворткевич С.М. Тормозящее влияние синтетического аналога лей-энкефалина даларгина на канцерогенез // Вопросы онкологии. 1990. Т.36. N 5. С.556-559.
- [7] Культура животных клеток. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Р. Фрешни. М.: Мир, 1989. 333 с.
- [8] Лимфоциты. Методы: Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. М.: Мир, 1990. 395 с.
- [9] Cerilli J., Brasile L., Clarke J., Galouzis T. The vascular endothelial cellspecific antigen system: three year's experience in monocyte crossmatching. // Transplant. Proc. 1985. 17. N 1. Book 1. P.567-570.
- [10] Фримель Х. Иммунологические методы. М., 1987.
- [11] Липатов И.С., Стрижаков А.Н., Купаев И.А., Тезиков Ю.В. Ультразвуковой анализ сосудов матки и плаценты у женщин с гестозом и другими осложнениями беременности // Материалы Пленума Межведомственного Научного совета по акушерству и гинекологии РАМН, Российской ассоциации акушеров-гинекологов. Чебоксары, 1996. С.58.
- [12] Завалко А.Ф., Купаев И.А., Липатов И.С. Способ лечения эндометриоза // Бюл. Изобретения. 1997. N 2. С.128.

**THE IMMUNE MECHANISMS OF THE DAMAGE OF THE
ENDOTHELIUM OF THE PREGNANT AND
IMMUNOBIOLOGICAL EFFECTS OF THE SYNTHETIC
ANALOGUE OF LEU-ENKEPHALIN – DALARGIN:
CLINICAL-EXPERIMENTAL RESEARCH**

I. Lipatov, N. Yakimova, Y. Tesicov, E. Bobryashova, ³
P. Purygin, I. Potapova, Y. Zarubin ⁴

Cytotoxic action of antiendothelial antibodies and sensitized to the endothelium of vessels of lymphocytes, received from a blood of the pregnant women with hemovascular violations was studied in the experiment on culture of the endothelial cells. Received data allowed to extract immune mechanisms of the damage of the endothelial cells at the complicated flow of the gestation and prove citoprotective and immunomodulating action of synthetic analogue leu-enkefalin – dalargin, intermediate Δ - and μ -receptors of endothelium of the vessels and immunocompetent cells.

³Igor' Lipatov, Natal'ya Yakimova, Yuriy Tesicov, El'vira Bobryashova, chair of obstetrics and gynecology, Samara state medical university

⁴Pyotr Purygin, Irina Potapova, Yuriy Zarubin, chair of organic chemistry, Samara state university.