Н.В. Короткова, Р.Е. Калинин, И.А. Сучков, Н.Д. Мжаванадзе, А.А. Никифоров, В.О. Поваров, А.В. Максимова

Артериовенозный фенотип эндотелиоцитов влияет на экспрессию эндотелий специфичных белков

ФГБОУ ВО РязГМУ им. И.П. Павлова Минздрава России

Резюме. Эндотелиальные клетки являются внутренней выстилкой артерий, вен и лимфатических сосудов. Они играют важную роль в биохимических процессах, обеспечивая тканевое дыхание и метаболизм. Уровень метаболизма в них зависит от скорости кровотока, в связи с тем, что они расположены на границе между кровью и другими тканями. Иначе говоря, гемодинамические факторы определяют механизмы взаимодействия эндотелиоцитов с другими типами клеток и влияют на формирование фенотипа эндотелия, на способность к экспрессии различных наборов молекул, в том числе клеточной адгезии, и биологически активных веществ, таких, как оксид азота. Целью представленного исследования явилось изучение разницы в концентрации молекул адгезии P- и E- селектинов, индуцибельной и эндотелиальной синтаз оксида азота (II) при артериальной и венозной патологии нижних конечностей. Было обнаружено, что как при артериальной, так и при венозной патологии в сыворотке крови меняется концентрация эндотелий-специфичных белков: E-селектина и eNOS, а также меняется концентрация P-селектина и iNOS. При артериальной патологии концентрация P-селектина ниже в 3,9 раза, и E-селектина ниже в 1,3 раза; при венозной патологии-P-селектина в 2,6 раз, E-селектина в 1,12 раза ниже по сравнению с контролем. При артериальной патологии уровень индуцибельной NO синтазы выше в 2 раза, эндотелиальной NO синтазы выше в 1,3 раза по сравнению со здоровыми людьми. При этом уровень обеих синтаз у пациентов с венозной патологией практически не отличается от доноров.

Ключевые слова: артериовенозный фенотип, артериальная и венозная патология, селектины, синтазы оксида азота (II).

Актуальность. Эндотелий признан в настоящее время базисом всей системы кровообращения. И с момента начала его изучения швейцарским патоморфологом Вильгельмом Гисом (W. His, 1865), который и предложил термин «эндотелий», до сегодняшнего момента, современная медицина накопила значительный объем сведений о его структуре, свойствах, функциях и, конечно же, о большом количестве молекул, которые он способен синтезировать в нормальном состоянии и при патологии, называемой эндотелиальной дисфункцией и сопровождающей ряд заболеваний, в том числе кардиоваскулярных [1,2]. Сегодня мы знаем, что эндотелий это эндокринный орган, несмотря на то, что в сосуде он представлен одним пластом клеток мезенхимального происхождения; мы знаем о таких его функциях, как вазомоторная, ангиогенная, адгезивная и гемостатическая; согласно функциям выделяют и виды его дисфункции [3]. Изучение биохимических особенностей функционирования эндотелия позволило сформулировать концепцию о его дисфункции, которая ассоциирована с большим количеством сердечно-сосудистых заболеваний, таких, как артериальный и венозный тромбозы, острый инфаркт миокарда, острое нарушение мозгового кровообращения, артериальная гипертензия, варикозное расширение вен нижних конечностей, атеросклероз периферических артерий [4]. Кардиоваскулярные заболевания в первой половине нынешнего столетия занимают лидирующие позиции в структуре причин заболеваемости, инвалидизации и

смертности населения, являясь актуальной медико-социальной проблемой, вследствие чего интерес к изучению биохимических изменений функционирования эндотелия при патологии не угасает [5, 6, 7].

Говоря об эндотелии в целом, нельзя не упомянуть о его различиях в сосудах разных органов, а также о различиях артериального, венозного и лимфатического типа эндотелиоцитов. Известно, что артериальная, венозная и лимфатическая дифференцировка определяется генетически на ранних стадиях онтогенеза до формирования сосудов и, собственно, всей системы кровообращения [8]. На ранних этапах эмбрионального развития в ходе этой дифференцировки происходит активация определённых генов. В артериальных эндотелиоцитах начинается экспрессия таких маркерных генов и, впоследствии, синтез таких белков, как нейропилин 1, Notch-1, -4, -5; эфрин B2. В венозных эндотелиоцитах экспрессируются эфрин B4, нейропилин 2, эндомуцин. На более поздних сроках эмбриогенеза и во взрослом организме артериовенозная специализация проходит под влиянием гемодинамических факторов, которые в различных участках сосудистого русла отличаются [9].

В настоящее время описана так называемая «функциональная гетерогенность» эндотелия, которая подразумевает отличный друг от друга синтез биологически активных веществ эндотелием разных отделов сердечно-сосудистой системы. Например, известно, что эндотелиоциты легочных артерий накапливают фактор фон Виллебранда (*vWF*) и P-селектин в тельцах Вейбеля-Палладе (*Weibel-Palade*), но эндотелиоциты легочных капилляров также способны к синтезу указанных молекул даже не имея последних; Ангиотензинпревращающий фермент в большей степени синтезируется в артериях легких, нежели мозга. Селектин L не экспрессируется эндотелием клубочков почек в отличие от эндотелия другой локализации, например, эндотелия костного мозга [10].

Артериальный эндотелий обладает более плотными контактами и почти непроницаем для растворимых молекул. В отличие от него венозный эндотелий более проницаем, вследствие чего является основным местом перемещения лейкоцитов в ткани [11].

На первом этапе трансвазации лейкоцитам в связывании с эндотелиоцитами и другими клетками помогают молекулы межклеточной адгезии. Один из классов таких молекул - селектины, гликопротеины, имеющие трансмембранную локализацию, а в роли таких клеток выступают эндотелиоциты: для P– и E–селектинов, тромбоциты – для P-селектина, все типы лейкоцитов – для L селектина.

Целью настоящего исследования явилось изучение разницы в экспрессии эндотелий-специфичных белков: E-селектина и eNOS, а также P-селектина и iNOS при патологии артерий и вен нижних конечностей.

Материал и методы исследования. Дизайн исследования был одобрен на заседании ЛЭК РязГМУ (протокол № 9 от 15.04.2020). В исследование вошло 30 здоровых доноров (контрольная группа или Группа 1), 120 пациентов с патологией

сосудов нижних конечностей: 60 пациентов с заболеваниями артерий – атеросклерозом и артериальным тромбозом (Группа 2); 60 пациентов с патологией вен – острым венозным тромбозом и варикозной болезнью вен нижних конечностей (Группа 3). Материалом для исследования послужила сыворотка крови. У пациентов и практически здоровых доноров однократно до начала любого вида лечения утром натощак забиралась кровь, после центрифугирования которой получали сыворотку.

Количественное определение концентрации P- и E- селектинов и NO-синтаз производили с использованием сэндвич-метода ИФА. Использовали микропланшеты, сорбированные антителами, специфичными к соответствующему селектину или NO-синтазе. Стандарт/образец добавляли в определенные лунки планшета, после чего авидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP), добавляли в лунки и инкубировали. После добавления тетраметилбензидина гидрохлорида отмечали изменение цвета в лунках, содержащих селектин, антитела с биотином и авидин с пероксидазой хрена. Ферментативная реакция прекращали добавлением раствора серной кислоты. Оптическую плотность измеряли фотометрическим методом на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (microplatereader) (Awareness technology Inc. PalmCity, FL 34990, USA) на длине волны 450±10 нм. Результаты выражали в нг/мл.

Полученные результаты анализировали методами непараметрической статистики с использованием программы IBM SPSS Statistics 26 (StatSoftInc., США). Нормальность распределения выборки оценивали по критерию Колмогорова-Смирнова. Для определения статистической значимости различий непрерывных величин использовали U-критерий Манна-Уитни, данные представляли в формате (Me [Q1; Q3]), где Me – медиана, Q1 - нижний квартиль, Q3 - верхний квартиль, min-минимальное и max-максимальное значения и межквартильный размах. Различия между показателями считались статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение. Начиная своё исследование, мы сконцентрировали внимание на различиях между изучаемыми показателями у здоровых людей (Группа 1) и пациентов с патологией, как артерий, так и вен (Группа 2 и Группа 3 объединены в одну группу «патология»), то есть, между здоровыми донорами и пациентами с заболеваниями сосудов нижних конечностей. Были отмечены следующие тенденции и статистически значимые отличия (Таблица 1).

Говоря о разнице между группой контроля и группой с патологией сосудов нижних конечностей, мы отметили, что концентрация P-селектина была ниже при сосудистой патологии (артерий и вен) по сравнению с контрольной группой в 3,3 раза ($p<0,001$). Та же тенденция отмечалась и для селектина E, его концентрация была ниже в 1,2 раза по сравнению с группой здоровых лиц ($p=0,043$). Уровень iNO-синтазы был более высоким при патологии сосудов нижних конечностей, чем у здоровых людей, но данное отличие не явилось статистически значимым. Уровень eNO-синтазы практически не менялся.

Таблица 1 – Концентрация изучаемых молекул в крови при артериальной и венозной патологии (совместно), по сравнению с контрольной группой

Показатель	Группа	Медиана	Мин	Макс	Q_1	Q_3	Межквартильный размах
Селектин P, нг/мл	Контроль (гр.1)	131,18	6,85	373,25	110,70	164,32	53,62
	Патология (гр.2+гр.3)	401,88* (p=0,001)	0,37	438,0	200,60	823,01	622,41
Селектин E, нг/мл	Контроль (гр.1)	9,17	4,11	22,27	7,07	14,44	7,37
	Патология (гр.2+гр.3)	7,96* (p=0,043)	1,5	32,59	5,46	11,13	5,67
iNOS, нг/мл	Контроль (гр.1)	0,19	0,01	5,54	0,11	0,28	0,17
	Патология (гр.2+гр.3)	0,24 (p=0,151)	0,01	16,28	0,11	0,69	0,58
eNOS, нг/мл	Контроль (гр.1)	0,12	0,01	0,34	0,08	0,13	0,05
	Патология (гр.2+гр.3)	0,13 (p=0,209)	0,01	0,7	0,09	0,17	0,08

Примечание: * – статистически значимые отличия от контрольной группы ($p \leq 0,05$)

Необходимо отметить, что артериовенозные отличия подразумевают как фенотипические отличия, так и функциональные. Во-первых, это напряжение сдвига: в артериях оно более высокое и достигает 10-40 дин/см^2. В венах отмечается пассивный кровоток с меньшей скоростью: 1-5 дин / см^2. Также в артериях и венах различна степень оксигенации и различны межклеточные соединения типа плотных контактов «zona occludens», расположенных под ними адгезивных контактов типа «zona adhaeren» с участием которых происходит взаимодействие кадгеринов с актиновыми филаментами цитоскелета клетки через прикепляющие белки катенины [12].

Гетерогенностью сосудистого эндотелия вполне можно объяснить разницу в экспрессии изучаемых нами молекул у представителей контрольной группы.

На следующем этапе мы сравнили доноров контрольной группы с Группами 2 и 3 (Таблица 2).

Оказалось, что концентрация изучаемых селектинов была ниже при артериальной и венозной патологии нижних конечностей, но заболевания артерий демонстрировали более выраженные различия. Вполне возможно, это объясняется фактом диапедеза лейкоцитов из сосудистого русла именно из капилляров, вен и мелких вен.

Было отмечено, сыворотка крови от пациентов с артериальной патологией содержала более высокие значения NO-синтаз, нежели сыворотка здоровых людей. Это отличие касалось обеих NO-синтаз, уровень индуцибельной NO-синтазы был выше при патологии артерий в 1,6 раза, эндотелиальной NO-синтазы в 1,3 раза. В настоящее время роль NO, генерируемого iNOs, в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний считается доказанной, если имеется воспаление [13]. Тем не менее, вопрос о ее роли в патогенезе данных заболеваний до сих пор дискутируется [14].

Имеются работы, показывающие ее положительную роль в снижении выраженности атеросклероза. Например, после введения агматина, ингибитора iNOs, кроликам с атеросклерозом, полученным при гиперхолестериновой диете, выраженность атеросклеротических изменений снижалась [15]. В различных экспериментальных моделях на животных было отмечено положительное влияние ингибиторов iNOs на артериальную гипертензию, выраженность оксидативного стресса и нарушение функций сосудов [16].

Таблица 2. Концентрация изучаемых молекул в крови при артериальной и венозной патологии (отдельно), по сравнению с контрольной группой

Показатель	Группа	Медиана	Мин	Макс	Q_1	Q_3	Межквартильный размах
Селектин Р, нг/мл	контроль (гр.1)	131,18	6,85	373,25	110,70	164,32	53,62
	патология (гр.2)	33,20* (p=0,001)	0,37	438,0	13,05	65,30	51,8
	патология (гр.3)	51,30*,**(p =0,001) (p=0,05)	0,4	254,5	28,12	104,93	76,73
Селектин Е, нг/мл	контроль (гр.1)	9,17	4,11	22,27	7,07	14,44	7,37
	патология (гр.2)	7,09 (p=0,079)	1,5	32,59	4,54	10,89	6,35
	патология (гр.3)	8,13 (p=0,079)	2,45	30,1	5,61	11,67	6,06
iNOS, нг/мл	контроль (гр.1)	0,19	0,01	5,54	0,11	0,28	0,17
	патология (гр.2)	0,31 (p=0,135)	0,02	16,28	0,11	1,13	1,03
	патология (гр.3)	0,19 (p=0,135)	0,01	10,31	0,11	0,58	0,47
eNOS, нг/мл	контроль (гр.1)	0,12	0,01	0,34	0,08	0,13	0,05
	патология (гр.2)	0,16 (p=0,062)	0,02	0,7	0,1	0,18	0,08
	патология (гр.3)	0,12 (p=0,108)	0,01	0,19	0,08	0,16	0,08

Примечание. Статистически значимые различия между группами обозначены: * – от уровня контрольной группы ($p \leq 0,05$); ** – между группами 2 и 3 ($p \leq 0,05$)

В нашем исследовании уровень ферментов синтеза оксида азота между патологиями также отличался: артериальная патология демонстрировала увеличение уровня индуцибельной NO-синтазы практически в 2 раза. Венозная патология имела такую же тенденцию для данного фермента, но степень изменения составила 1,6 раза. В отличие от него уровень эндотелиальной синтазы оксида азота не сопровождался изменением.

В современной научной литературе имеются сведения, полученные в экспериментах на культуре эндотелиальных клеток, о стимуляции экспрессию гена Nos при продолжительном воздействии сдвиговых напряжений. Вследствие этого,

продолжительное изменение напряжения сдвига стимулирует высвобождение оксида азота, что, в свою очередь, вносит вклад не только в вазомоторную, но и в другие функции эндотелия, включая адгезивную, регулируя трансмиграцию лейкоцитов, а также влияя на процессы адгезии и агрегации тромбоцитов [17].

Выводы. Артериальная, так и венозная патология нижних конечностей сопровождается снижением синтеза P- и E-селектинов. Патология артерий нижних конечностей ассоциирована с повышением экспрессии индуцибельной и эндотелиальной NO-синтаз; венозная патология нижних конечностей не сопровождается изменением синтеза ферментов, участвующих в синтезе оксида азота. Таким образом, артериовенозная специализация влияет на синтез эндотелийспецифичных белков E-селектина и eNOs, а также P-селектина и iNOs как в норме, так и при патологии.

Литература / References.

1. Шевченко Ю.Л., Асташев П.Е., Матвеев С.А., Гудымович В.Г. Эндотелий – структурная основа системы кровообращения: история проблемы. Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н.И. Пирогова. 2011; (6)2:9-15.

2. Васина Л.В., Власов Т.Д., Петрищев Н.Н. Функциональная гетерогенность эндотелия (обзор). Артериальная гипертензия. 2017;23(2):88–102. DOI:10.18705/1607-419X-2017-23-2-88-1.

3. Васина Л.В., Петрищев Н.Н., Власов Т.Д. Эндотелиальная дисфункция и ее основные маркеры. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2017;16(1):4-15. DOI: 10.24884/1682-6655-2017-16-1-4-15.

4. Ших Е.В., Реброва Е.В. Эндотелиальная дисфункция и регуляторные пептиды. Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. 2023;16(2):205–210. DOI: 10.17116/kardio202316021205.

5. Косолапов В.П., Ярмонова М.В. Анализ высокой сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности взрослого населения как медико-социальной проблемы и поиск путей ее решения. Уральский медицинский журнал. 2021;20(1): 58-64. DOI: 10.52420/2071-5943-2021-20-1-58-64.

6. Калинин Р.Е., Сучков И.А., Климентова Э.А., Егоров А.А., Карпов В.В. Биомаркеры апоптоза и пролиферации клеток в диагностике прогрессирования атеросклероза в различных сосудистых бассейнах. Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2022; (30)2:243-252. DOI: 10.17816/PAVLOVJ88938.

7. Леонченко С.В. Генетические факторы венозного тромбоза в свете персонифицированного подхода к лечению пациентов с венозными тромбоэмболическими осложнениями. Наука молодых (EruditioJuvenium). 2020;8(1):116-123. DOI:10.23888/HMJ202081116-123.

8. Живень М.К., Захарова И.С., Шевченко А.И., Покушалов Е.А., Закиян С.М. Гетерогенность клеток эндотелия. Патология кровообращения и кардиохирургия. 2015; (19) 4–2:104–112.

9. Paz N. G., D'Amore P. A. Arterial versus venous endothelial cells. Cell Tissue Res. 2009; 335: 5-16. DOI: 10.1007/s00441-008-0706-5.

10. Ochoa CD, Wu S, Stevens T. New developments in lung endothelial heterogeneity: von Willebrand factor, P-selectin, and the Weibel–Palade body. Semin Thromb Hemost. 2010;36(3):301–8. DOI: 10.1055/s-0030–1253452.

11. Nolan D.J., Ginsberg M., Israely E., Palikuqi B., Poulos M.G., James D., Ding B.-S., Schachterle W., Liu Y., Rosenwaks Z., Butler J.M., Xiang J., Rafii A., Shido K., Rabbany S.Y., Elemento O., Rafii S. Molecular signatures of tissue-specific microvascular endothelial cell heterogeneity in organ maintenance and regeneration. Dev. Cell. 2013;26(2): 204–19. DOI: 10.1016/j.devcel.2013.06.017.

12. Cahill P.A., Redmond E.M. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. Atherosclerosis. 2016;248: 97–109. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2016.03.007.

13. Галагудза М.М., Бельский Ю.П., Бельская Н.В. Индуцибельная NO-синтаза как фармакологическая мишень противовоспалительной терапии: надежда не потеряна? Сибирский журнал клинической и экспериментальной медицины. 2023;38(1):13-20. DOI:10.29001/2073-8552-2023-38-1-13-20.

14. Lind M., Hayesa A., Caprndab M., Petrovicc D., Rodrigod L., Kruzliake P. et al. Inducible

nitric oxide synthase: Good or bad? Biomed. Pharmacother. 2017;93:370–375. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.06.036.

15. El-Awady M.S., Suddek G.M. Agmatine ameliorates atherosclerosis progression and endothelial dysfunction in high cholesterol-fed rabbits. J.Pharm. Pharmacol. 2014;66(6):835–843. DOI: 10.1111/jphp.12204.

16. Oliveira-Paula G.H., Lacchini R., Tanus-Santos J.E. Inducible nitric oxide synthase as a possible target in hypertension. Curr. Drug Targets. 2014;15(2):164–174. DOI: 10.2174/1389450111314666022.

17. Jufri N.F., Mohamed-ali A., Avolio A. et al. Mechanical stretch: physiological and pathological implicationsfor human vascular endothelial cells // Vasc. Cell.2015. V. 7. № 8. P. 1–13. DOI:10.1186/s13221-015-0033-z.

Abstract.

N.V. Korotkova, R.E. Kalinin, I.A. Suchkov, N.D. Mzhavanadze, A.A Nikiforov
V.O. Povarov , A.V. Maksimova

The arteriovenous phenotype of endotheliocytes affects the expression of endothelial-specific proteins

Ryazan State Medical University

Endothelial cells are the inner lining of arteries, veins, capillaries, and lymphatic vessels. They play an important role in biochemical processes, providing tissue respiration and metabolism. Their metabolic rate depends on the speed of blood flow, due to the fact that they are located on the border between blood and tissues. In other words, hemodynamic factors determine the mechanisms of interaction of endotheliocytes with other cell types and affect the formation of the endothelial phenotype, the ability to express various sets of molecules, including cell adhesion, and biologically active substances such as nitric oxide. The purpose of the presented study was to study the difference in the concentration of adhesion molecules of P- and E-selectins, inducible and endothelial nitric oxide (II) synthases in arterial and venous pathology of the lower extremities. It was found that in arterial and venous pathology the concentration of endothelium-specific proteins in the blood serum changes: E-selectin and eNOS, as well as the concentration of P-selectin and iNOS. In arterial pathology, the concentration of P-selectin is 3,9 times lower, and E-selectin is 1,3 times lower compared to the control; in venous pathology P-selectin is 2,6 times lower, E-selectin is 1,12 times lower. In arterial pathology, the level of inducible NO synthase is in 2 times higher, and endothelial NO synthase is in 1,3 times higher compared to healthy people. At the same time, the level of two synthases, providing synthesis of NO in patients with venous pathology practically does not differ from donors.

Keywords: arteriovenous phenotype, arterial and venous pathology, selectins, nitric oxide (II) synthases.

Сведения об авторах: Короткова Наталья Васильевна – к.м.н., доцент, доцент кафедры биологической химии; ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: fnv8@yandex.ru; Калинин Роман Евгеньевич – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: kalinin-re@yandex.ru; Сучков Игорь Александрович – д.м.н., профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: suchkov_med@mail.ru; Мжаванадзе Нина Джансуговна – д.м.н., доцент, профессор кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: nina_mzhavanadze@mail.ru; Никифоров Александр Алексеевич – заведующий ЦНИЛ, ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: alnik003@yandex.ru; Поваров Владислав Олегович – к.м.н., ассистент кафедры сердечно-сосудистой, рентгенэндоваскулярной хирургии и лучевой диагностики. ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: povarov.vladislav@mail.ru; Максимова Анна Владимировна – ассистент кафедры сестринского дела. ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, e-mail: anna-1781@mail.ru