

В.И. ШЕБЕКО
Витебский государственный
медицинский университет,
Витебск, Беларусь

УДК 611-018.74:612.017.1

ДИСФУНКЦИЯ ЭНДОТЕЛИЯ ПРИ АКТИВАЦИИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Сосудистый эндотелий испытывает постоянное влияние системы комплемента, и это влияние может усиливаться при воспалении. Установлено, что продукты активации системы комплемента приводят ко множественному изменению функции эндотелиальных клеток. Фактически эндотелий можно рассматривать как главную мишень для системы комплемента. Вероятно, изменение редокс-состояния эндотелиоцитов является важнейшим механизмом нарушения функции эндотелия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: комплемент, эндотелий.

ENDOTHELIUM DISFUNCTION BY COMPLEMENT ACTIVATION

V.I. SHEBEKO

Vitebsk Medical University, Belarus

Vascular endothelium is continuously exposed to complement-mediated challenge, and this is enhanced during inflammation. It is now clear that complement activation products have many diverse effects on endothelial cells. In fact, the endothelium may be a major target of the complement system. A change in the redox-state of the endothelial cells is probably the most important mechanisms of alteration of their function during complement activation.

KEY WORDS: complement, endothelium.

Механизмы повреждающего действия системы комплемента на органы и ткани изучены недостаточно, хотя очевидно, что они являются комплексными. Патогенное влияние системы комплемента определяется как непосредственным действием анафилатоксинов (C3a, C4a, C5a) и их дезаргининовых форм (C3a-дезарг, C5a-дезарг), мембраноатакующего комплекса (C5b-9), промежуточных комплексов (C5b-7, C5b-8), гемолитически неактивных комплексов (iC5b67, iC5b-9) и растворимых мембраноатакующих комплексов (SC5b-9), так и активацией ряда клеток-мишеней [12, 30, 37, 59]. Основными клетками-мишенями для системы комплемента считаются, прежде всего, нейтрофилы, а также моноциты-макрофаги, тучные клетки и тромбоциты [39]. Однако эндотелиоциты кровеносных сосудов тоже могут быть чрезвычайно важными клетками-мишенями для системы комплемента.

Особенность местоположения эндотелиоцитов кровеносных сосудов предопределяет постоянное влияние системы комплемента (СК), как составной части кро-

ви, на эти клетки. Поэтому эндотелий традиционно рассматривался в качестве мишени для повреждающего действия мембраноатакующих комплексов и нейтрофилов, активированных СК. Основным следствием прямого или опосредованного воздействия СК на эндотелий считалось его повреждение с результирующим увеличением сосудистой проницаемости и увеличением миграции лейкоцитов в ткань [23, 61]. В 1989 году нами было обосновано предположение о том, что активация СК способна приводить к множественному нарушению функции эндотелиоцитов кровеносных сосудов, в том числе и к нарушению эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса [3, 44]. За прошедшие 10 лет с момента формулировки гипотезы получено достаточно большое количество экспериментальных данных подтверждающих справедливость ее основных положений [9, 16, 29, 51, 53, 55]. Поэтому мнение P. Ward'a, о том, что "в настоящее время имеются основания предполагать, что эндотелий может быть важной мишенью для системы комплемента, по

крайней, мере такой же важной как нейтрофилы”, выказанное им во время получения премии Рауса - Вайпла 1996 года, кажется вполне естественным и его, пожалуй, вряд ли можно отнести к разряду предположений [60].

Обнаружение локального синтеза компонентов системы комплемента и определение механизмов неиммунной ее активации позволяет считать, что эндотелий может испытывать действие системы комплемента не только со стороны крови, но и со стороны сосудистой стенки. Инфильтрирующие сосудистую стенку моноциты/макрофаги способны образовывать все компоненты системы комплемента и это может иметь большое значение в локальной ее активации, например, при иммунокомплексных васкулитах и атеросклерозе. Сами эндотелиоциты синтезируют C1s, C2, C4, C1-INH, C3, B, H, I и компоненты мембраноатакующего комплекса [13, 40]. Более того, синтез компонентов альтернативного пути в эндотелиоцитах может значительно усиливаться при действии на них цитокинов, причем в этих условиях увеличивается также активация системы комплемента вблизи эндотелиоцитов [20, 33,] (рис.1).

Пути влияния системы комплемента на эндотелий

Воздействие системы комплемента на эндотелий можно разделить на “случайное” и “сфокусированное”. При “сфокусированном” воздействии, активация системы комплемента происходит на поверхности эндотелия, что наблюдается, например, при взаимодействии антител с антигенами, представленными на поверхности эндотелиоцитов. Антитела к сосудистому эндотелию обнаруживаются при системной красной волчанке, ревматоидном артрите, склеродермии, гранулематозе Вегенера, болезни Kawasaki, болезни Бехчета, синдроме вызванной гепарином тромбоцитопении, синдроме антифосфолипидных антител, а также при других синдромах и заболеваниях [1, 11]. Естественно, что в такой ситуации воздействие комплемента на эндотелий будет максимальным. Усиленное образование белков теплового шока 60 в эндотелиальных клетках при действии цитокинов, активных форм кислорода и других неблагоприятных воздействиях, вероятно, является одной из важнейших причин активации системы комплемента на поверхности эндотелиоцитов. Активация комплемента в этих условиях является следствием взаимодействия

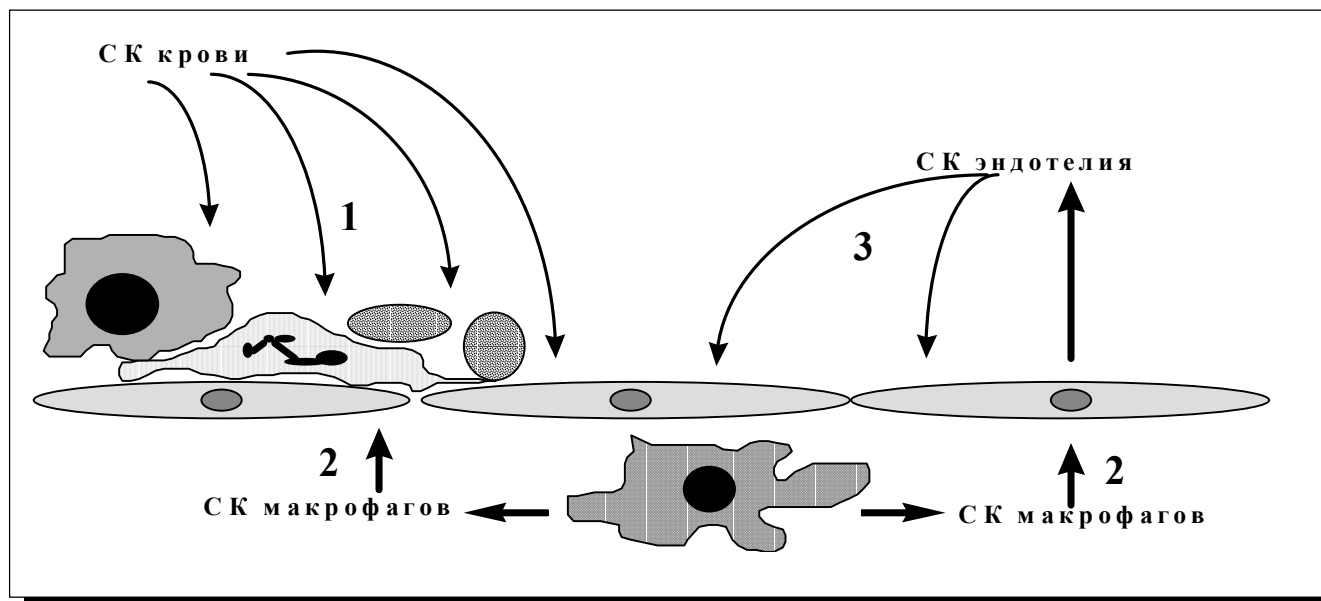


РИС. 1. Три пути влияния системы комплемента на эндотелиальные клетки кровеносных сосудов.

между экспрессированными на эндотелиоцитах белками теплового шока 60 и перекрестно реагирующими антителами, направленными против бактериальных белков теплового шока 65. Относительно “сфокусированное” воздействие комплемента на эндотелий может наблюдаться при отложении иммунных комплексов на базальных мембранах сосудов.

Стимулом для активации комплемента на поверхности эндотелия вполне может быть и прямое повреж-

дение эндотелиоцитов различными патогенами. Так, эндотелиоциты, подвергнутые предварительной гипоксии и последующей реоксигенации, активируют комплемент по классическому пути, несмотря на повышение экспрессии CD46 (“мембранный кофакторный протеин”) и CD55 (“фактор, ускоряющий разрушение”) на их мембранах [19]. Механизм такой активации системы комплемента включает предварительную стимуляцию образования в эндотелии активных

форм кислорода и активацию фактора транскрипции NF-κB. Совсем недавно был установлен еще один очень важный механизм активации комплемента. Оказалось, что вызванное цитокинами (интерлейкин-1, фактор некроза опухоли и γ-интерферон) сокращение эндотелиоцитов с обнажением субэндотелиального внеклеточного матрикса, запускает активацию комплемента по альтернативному пути с образованием на субэндотелиальном слое стабильных C3-конвертаз [28]. Следует еще раз отметить, что названные выше цитокины способны значительно усиливать продукцию компонентов системы комплемента в эндотелиоцитах. Кстати, на субэндотелиальном матриксе находится только один из протеинов, регулирующих активацию комплемента - "фактор, ускоряющий разрушение" (CD46). Этот протеин жестко прикреплен к субэндотелиальному матриксу и поэтому может вызывать распад только тех конвертаз, которые находятся в непосредственной близости от него, а значит, его активность в субэндотелии должна быть достаточно низкой [27].

Под "случайным" воздействием комплемента на эндотелий следует понимать такие условия, когда активация системы комплемента вызвана самыми различными причинами, но при этом причины активации комплемента прямо не связаны с эндотелием. Это может наблюдаться при септическом шоке, нейтрализации гепарина протамином, остром панкреатите, механической травме и др. В этом случае эндотелиоциты являются такими же объектами воздействия системы комплемента, как и другие клетки.

Влияние комплемента на экспрессию молекул адгезии для лейкоцитов на эндотелии

Среди всего возможного спектра влияния системы комплемента на эндотелий наиболее хорошо изучено ее влияние на экспрессию молекул адгезии эндотелиоцитами и на функцию эндотелиоцитов, связанную с их участием в регуляции гемостаза/фибринолиза. Увеличение адгезивных свойств эндотелия по отношению к лейкоцитам определяется действием C5a и мембраноатакующего комплекса C5b-9 на эндотелиоциты [60]. При этом, как C5a, так и комплекс C5b-9 увеличивают экспрессию P-селектина на эндотелии. Влияние C5a зависит от наличия специфических рецепторов на эндотелиоцитах [62]. Количество рецепторов для C5a приблизительно составляет 1000 на клетку [60]. Необходимо подчеркнуть, что число C5a-рецепторов на эндотелии может увеличиваться при воспалении [24]. Пик экспрессии P-селектина в условиях внутривенного введения фактора яда кобры приходится на 15-20 минуты после инъекции этого активатора комплемента. Анафилатоксин C3a также способен увеличивать

экспрессию P-селектина на эндотелии, но этот эффект C3a не является прямым, а связан с предварительным освобождением гистамина [22]. Стимуляция адгезии нейтрофилов к эндотелию при действии мембраноатакующего комплекса опосредуется не только экспрессией P-селектина, но и образованием фактора активации тромбоцитов в эндотелиальных клетках [36]. Очень интересными кажутся наблюдения, указывающие на возможность усиления экспрессии на эндотелии ELAM-1, ICAM-1 и VCAM-1 в условиях действия цитолитически неактивных форм мембраноатакующего комплекса, которые могут накапливаться в процессе активации комплемента *in vivo*. Экспонирование iC5b6789 с эндотелиоцитами приводит к зависимому от времени и дозы повышению экспрессии на клетках названных молекул адгезии [55]. При этом, повышение экспрессии ELAM-1, ICAM-1 и VCAM-1 на эндотелиоцитах сопровождается увеличением содержания в них соответствующих м-РНК.

Продукты активации системы комплемента не только прямо повышают экспрессию молекул адгезии на эндотелиоцитах, но и обладают свойством потенцировать аналогичное действие на эндотелий других медиаторов воспаления. Например, значительное увеличение экспрессии на эндотелии ICAM-1 и E-селектина в условиях влияния очень низких концентраций фактора некроза опухоли обеспечивается действием мембраноатакующего комплекса C5b-9 и, возможно, C5a [34]. Недавно было установлено, что компонент системы комплемента C1q способен выступать в роли кофактора, необходимого для стимуляции экспрессии E-селектина и ICAM-1 на эндотелии при действии на него иммунных комплексов [38].

Еще одним важным следствием активации системы комплемента на поверхности эндотелиоцитов является увеличение экспрессии генов, кодирующих хемокины [48]. Увеличение экспрессии генов интерлейкина-8, MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) в эндотелиоцитах имеет две фазы - раннюю (через 3 часа) и позднюю (через 12 часов после активации комплемента). Увеличение экспрессии генов RANTES (regulated upon activation normal T expressed and secreted) отмечается через 12 часов после активации комплемента. Поздняя фаза экспрессии генов хемокинов в эндотелии требует предварительного образования интерлейкина-1 в эндотелиоцитах. Повышение экспрессии генов хемокинов, скорее всего, является следствием формирования мембраноатакующих комплексов на эндотелиальных клетках [48]. Интересно, что связывание компонента C1q с рецептором cC1qR на эндотелиоцитах приводит к синтезу интерлейкина-8, интерлейкина-6 и хемоаттрактантного протеина-1 для моноцитов. Агрегированные им-

муноглобулины М потенцируют такое действие C1q на эндотелиоциты [57].

Влияние системы комплемента на регуляцию эндотелиоцитами гемостаза/фибринолиза

Влияние продуктов активации системы комплемента на регуляцию эндотелием гемостаза/фибринолиза представляется разнонаправленным. С одной стороны, продукты активации системы комплемента могут усиливать прокоагулянтную активность эндотелиоцитов, что может быть связано с действием C5a, мембраноатакующих комплексов и цитолитически неактивных комплексов iC5b6789 [29, 55]. Анафилатоксин C5a способен приводить к освобождению гепарансульфата с поверхности эндотелия [43]. Кроме того, C5a увеличивает экспрессию тканевого фактора на эндотелии, причем действие C5a сопровождается повышением содержания м-РНК тканевого фактора в эндотелиоцитах [29]. Мембраноатакующий комплекс также повышает экспрессию тканевого фактора на эндотелии через увеличение синтеза м-РНК тканевого фактора. Характерно, что мембраноатакующий комплекс предварительно стимулирует освобождение интерлейкина-1 из эндотелиоцитов, который далее посредством аутокринного и паракринного действия увеличивает активность тканевого фактора на эндотелии [45]. Действие цитолитически неактивной формы мембраноатакующего комплекса iC5b6789 на эндотелиальные клетки тоже сопровождается увеличением экспрессии тканевого фактора на эндотелиоцитах [55].

Формирование мембраноатакующего комплекса на эндотелиоцитах приводит к еще двум важным следствиям: (1) секреции высокомолекулярных мультимеров фактора фон Виллебранда из эндотелия и (2) увеличению протромбиназной активности эндотелиоцитов, вследствие везикулизации их мембраны [26]. Повышение протромбиназной активности эндотелия в этих условиях зависит от образования и освобождения с поверхности эндотелия мембранных везикул диаметр которых не превышает 1 микрона. Формирующиеся мембранные везикулы содержат инкорпорированные комплексы C5b-9 и экспрессируют связывающие участки для фактора Va. Обратим внимание на то, что эндотелиальные клетки остаются при этом жизнеспособными, а активность тромбомодулина на них не изменяется. Еще один механизм уменьшения антикоагуляционных свойств эндотелиоцитов при внутрисосудистой активации системы комплемента состоит в подавлении функции АДФазы на поверхности этих клеток [16].

В то же время, формирование комплексов C5b67 на мембране эндотелиальных клеток стимулирует связы-

вание плазминогена с эндотелием [18]. Присоединение к названному комплексу компонента C8 и особенно компонента C9 еще больше увеличивает связывание плазминогена с эндотелием. Предполагается, что связанный с мембраной клетки C9 может не только обеспечивать присоединение плазминогена к эндотелию, но еще и усиливать активацию этого зимогена активатором плазминогена тканевого типа [18]. Однако, активация системы комплемента может также стимулировать образование ингибитора активатора плазминогена-1 и подавлять образование активатора плазминогена в эндотелии [32].

Вообще между эндотелием, комплементом и системой свертывания крови имеется очень тесное взаимодействие. В 1996 году было установлено, что постоянно присутствующий на эндотелиоцитах рецептор для C1q, связывающий глобулярные “головки” молекулы C1q (gC1q-R), одновременно является рецептором для фактора Хагемана и высокомолекулярного кининогена [31]. Плотность C1q-рецепторов на эндотелиоцитах достаточно высокая ($3,7 \times 10^5$ - $5,7 \times 10^6$ рецепторов на клетку). Предполагается, что взаимодействие фактора XII с рецептором для C1q приводит к аутоактивации фактора XII и образованию XIIa. Далее, XIIa действует на прекалликреин, связанный с высокомолекулярным кининогеном, превращая его в калликреин. Обозначенный выше процесс аутоактивации фактора XII обеспечивает поддержание базальной активности внутреннего пути свертывания крови и контролируется C1-ингибитором и α_2 -макрोगлобулином. Кстати, gC1q-R, присутствующий на поверхности тромбоцитов и нейтрофилов, тоже может вносить вклад в механизмы базальной и стимулированной активации внутреннего пути свертывания крови [17]. Обсуждая явление аутоактивации фактора XII на C1q-рецепторе, необходимо вспомнить о том, что одна из активных форм фактора Хагемана (XII_f), образующаяся в результате протеолиза фактора XIIa калликреином, активирует систему комплемента по классическому пути.

Можно предполагать, что влияние системы комплемента на регуляцию эндотелием свертывания крови и фибринолиза представляется гораздо более широким, чем это обозначено выше. Оно может быть реализовано через изменение редокс-регуляции функции эндотелиоцитов [7].

Влияние системы комплемента на эндотелий-зависимую регуляцию сосудистого тонуса

В процессе изучения влияния продуктов активации системы комплемента (активированной зимозаном плазмы крови) на функцию сердца мы обнаружили, что даже кратковременное их действие значительно

нарушает способность коронарных сосудов к сокращению в ответ на быстрое увеличение коронарного перфузионного давления [2]. Анализ результатов этих экспериментов привел нас к предположению о том, что в условиях активации системы комплемента может возникать нарушение функции эндотелия кровеносных сосудов, в том числе, и нарушение эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса [3, 44].

Прямые доказательства нарушения эндотелийзависимой регуляции тонуса артериальных сосудов при внутрисосудистой активации системы комплемента были впервые представлены нами в 1993-1994 годах [4, 5]. Эксперименты показали, что при внутрисосудистой активации системы комплемента увеличивается образование оксида азота в сосудистой стенке и, одновременно с этим, нарушается эндотелийзависимая вазодилатация. В 1994 - 1997 годах несколько исследовательских групп подтвердили наши данные, продемонстрировав либо повышение продукции NO в сосудах, либо нарушение эндотелийзависимого расширения артериальных сосудов в условиях моделирования активации системы комплемента [15, 16, 21, 53]. При этом, только одна группа исследователей обратила внимание

на то, что нарушению эндотелийзависимой вазодилатации при моделировании активации системы комплемента сопутствует увеличение продукции NO в эндотелиоцитах [21].

Оказалось, что характер нарушения NO-зависимой регуляции сосудистого тонуса в существенной мере определяется продолжительностью активации системы комплемента. Кратковременная активация комплемента приводит к неустойчивому повышению образования оксида азота в сосудистой системе. Длительная активация системы комплемента вызывает устойчивое повышение продукции NO в сосудистой стенке и, одновременно, нарушает агонистиндуцированную продукцию NO в эндотелиоцитах [10]. По-видимому, структуры и механизмы эндотелиоцитов, ответственные за эндотелийзависимое расширение сосудов при усилении действия напряжения сдвига имеют более высокую чувствительность к повреждению в условиях внутрисосудистой активации системы комплемента по сравнению с таковыми, ответственными за эндотелийзависимую вазодилатацию при действии ацетилхолина, гистамина и других гуморальных эндотелийзависимых вазодилататоров [8].

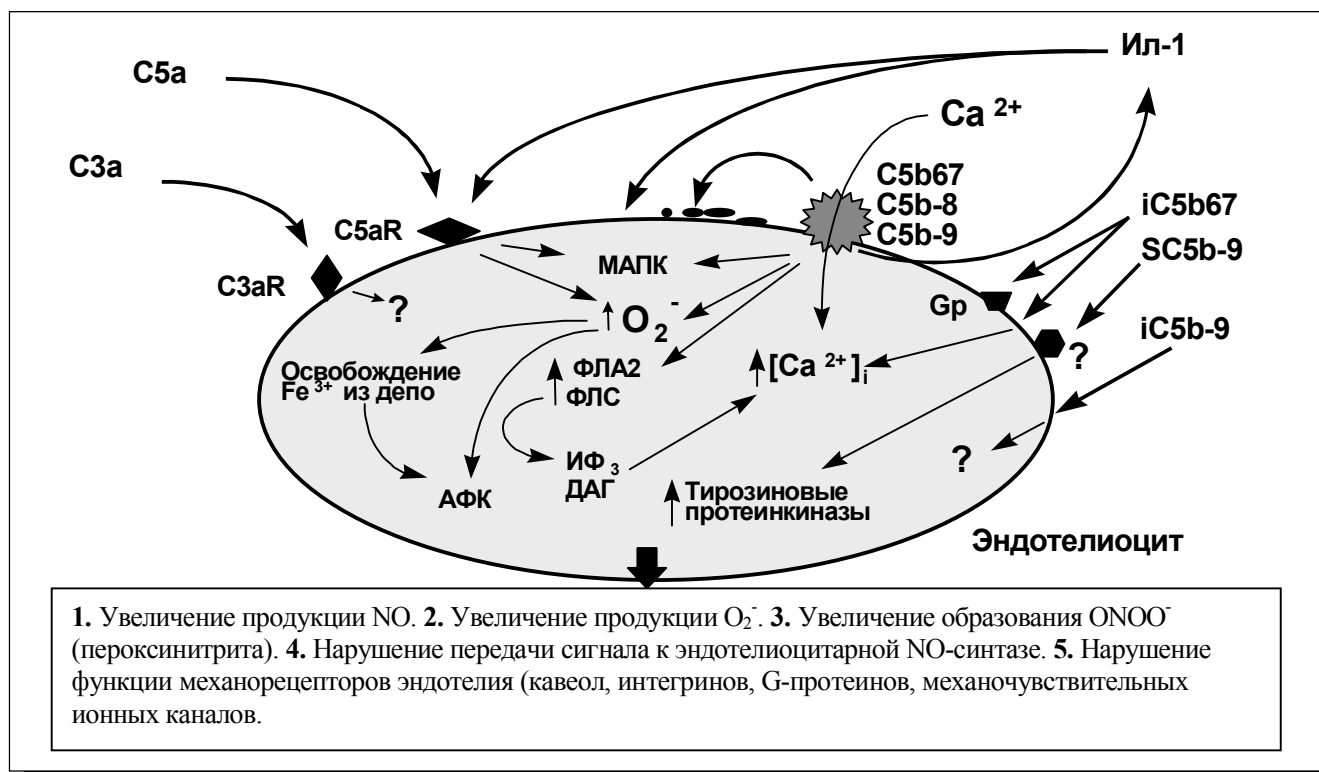


РИС. 2. Некоторые следствия прямого влияния продуктов активации системы комплемента на эндотелиоциты имеющие отношение к нарушению NO-зависимой регуляции сосудистого тонуса.

(Принятые сокращения: ФЛА2 - фосфолипаза A2, ФЛС - фосфолипаза C, ИФ₃ - инозитолтрифосфат, ДАГ - диацилглицерол, АФК - активные формы кислорода, МАПК - митогенактивируемые протеинкиназы).

Первоначальное увеличение активности NO-синтазы в эндотелиоцитах при действии на них продуктов активации системы комплемента, вероятно, опосредовано быстрым повышением концентрации кальция в цитоплазме. Действительно, увеличение содержания кальция в цитоплазме отмечается уже через одну минуту после образования мембраноатакующего комплекса на мембране клетки, при наличии кальция во внеклеточной среде. Если кальций отсутствует во внеклеточной среде, тогда увеличение его внутриклеточного содержания обнаруживается через 3 минуты после формирования мембраноатакующего комплекса на мембране клетки [14]. Стойкое увеличение активности NO-синтазы в эндотелиоцитах при активации системы комплемента может быть опосредовано изменением действия Ca^{2+} -независимых механизмов регуляции функции этого фермента (например, фосфорилирование NO-синтазы и ассоциированных с NO-синтазой протеинов, а также изменение взаимодействия между кавеолином-1 и NO-синтазой).

По всей видимости, при длительной активации системы комплемента наблюдается неоднозначное изменение эндотелийзависимой регуляции сосудистого тонуса (рис. 2). Неоднозначность изменения NO-зависимой регуляции сосудистого тонуса при длительной активации комплемента может определяться: (1) балансом между образованием NO и супероксида, а значит, выраженностью продукции пероксинитрита в эндотелиоцитах; (2) выраженностью образования супероксиддисмутазы в эндотелиоцитах; (3) количеством мембраноатакующих комплексов, формирующихся на мембране эндотелиоцитов; (4) скоростью элиминации мембраноатакующих комплексов с мембраны эндотелиальных клеток; (5) степени нарушения функции системы тиоредоксина и глутатиона в эндотелиоцитах; (6) характером и степенью изменения редокс-состояния эндотелиоцитов. Здесь же необходимо заметить, что представленные рассуждения учитывают только непосредственное влияние продуктов активации системы комплемента на эндотелий. Однако активированные системой комплемента клетки крови и резидентные макрофаги сосудистой стенки тоже оказывают существенное влияние на NO-зависимую регуляцию сосудистого тонуса [6]. Поэтому, характер нарушения эндотелийзависимой и, в частности, NO-зависимой регуляции сосудистого тонуса при активации системы комплемента представляется сложным, динамичным и зависящим от конкретных условий, даже без учета возможности изменения функции сосудистых гладкомышечных клеток.

Механизмы возникновения дисфункции эндотелия в условиях активации системы комплемента

Возникновение дисфункции эндотелия в условиях активации системы комплемента, во-первых, может быть следствием воздействия стимулированных системой комплемента клеток-мишеней на эндотелиоциты и, во-вторых, следствием прямого влияния продуктов активации комплемента на эндотелиальные клетки [6].

Стимулированные системой комплемента нейтрофилы способны нарушать функциональные свойства эндотелиоцитов и даже вызывать повреждение эндотелиальных клеток. Последнее связано с действием на эндотелиоциты активных форм кислорода, образующихся в нейтрофилах при “дыхательном взрыве”, а также с действием лизосомальных ферментов, освобождающихся из нейтрофилов при экзоцитозе [6]. Следует подчеркнуть, что при стимуляции нейтрофилов инактивируются ингибиторы сериновых протеиназ (серпины) вследствие их окисления и протеолиза, а поэтому действие лизосомальных сериновых протеиназ максимально выражено. Прилипшие к эндотелиоцитам нейтрофилы, стимулированные продуктами активации системы комплемента, не обязательно вызывают гибель эндотелиоцитов, потому что последние обладают достаточно мощными системами защиты. К таковым относятся NO, простагландин, фактор, блокирующий адгезию нейтрофилов, антиоксидантные ферменты и др. [6]. Влияние активированных нейтрофилов на эндотелиальные клетки, вероятнее всего, заключается в изменении их фенотипа. Обратим особое внимание на то, что нейтрофилы могут усиливать влияние системы комплемента на эндотелиоциты. Это связано с тем, что нейтрофилы синтезируют и содержат во вторичных гранулах пропердин, который они освобождают при стимуляции [63]. Пропердин является позитивным регулятором активации системы комплемента, так как он обеспечивает стабилизацию C3 и C5-конвертаз и, тем самым, увеличивает продолжительность их функционирования. Поэтому, освобождение пропердина из прилипших к эндотелию, стимулированных нейтрофилов, повышает базальную активность альтернативного пути активации системы комплемента. Далее, это вызывает увеличение образования C5a, который еще больше усиливает освобождение пропердина из нейтрофилов. Если принять во внимание тот факт, что нейтрофилы содержат и секретируют кроме пропердина еще C3 и фактор В, а также секретируют активирующие комплемент эластазу и катепсин G, то способность нейтрофилов усиливать активацию комплемента вблизи эндотелия может быть очень выраженной.

Стимулированные системой комплемента нейтрофилы могут оказывать влияние на эндотелий и сосудистую стенку еще и через локальное образование ангиотензина-2 по нейтрофилзависимому пути. При освобождении из азурофильных гранул нейтрофилов эластазы и катепсина G не только проренин превращается в ренин, но и осуществляется прямой протеолиз ангиотензиногена под действием катепсина G с образованием ангиотензина-1 и ангиотензина-2 [6]. Кстати, активированные системой комплемента тучные клетки тоже могут стимулировать локальную продукцию ангиотензина-2 вследствие прямого протеолиза ангиотензиногена освобождающейся из них химазой.

Кроме того, эластаза и катепсин G подавляют стимулированное тромбином освобождение простаглицлина из эндотелиоцитов. Это вносит вклад в механизм повышения коагуляционного потенциала эндотелия и в изменение реологических свойств крови при активации системы комплемента [6].

Влияние активации системы комплемента на функции эндотелия может осуществляться также через моноциты/макрофаги. Активированные мононуклеарные фагоциты действуют на эндотелий, в частности, через освобождение активных форм кислорода, лизосомальных ферментов, интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли.

Кроме опосредованного влияния на эндотелий, зависящего от активации нейтрофилов, моноцитов/макрофагов и тромбоцитов, система комплемента способна оказывать также прямое действие на эндотелиоциты. Возможность прямого влияния комплемента на эндотелий определяется, во-первых, присутствием рецепторов для C5a, C1q и, вероятно, для C3a на эндотелиоцитах, а, во-вторых, нерецепторным (хотя возможно и рецепторное влияние) действием мембраноатакующих комплексов C5b-7, C5b-8, C5b-9, а также цитолитически неактивных комплексов iC5b67, iC5b-9 и SC5b-9 на эндотелиальные клетки. Если на мембране клетки формируется достаточно большое количество мембраноатакующих комплексов, тогда может иметь место ее осмотический лизис [39]. Однако если на ядродержащих клетках образуется сублитическое количество мембраноатакующих комплексов (C5b-9), тогда осмотического повреждению этих клеток не наблюдается, но значительно видоизменяется их функция. Механизмы влияния сублитических доз комплексов C5b-9 на функцию клеток включают: во-первых, увеличение поступления кальция в клетки, во-вторых, изменение концентрации ц-АМФ, в-третьих, активацию фосфолипазы A2 и фосфолипазы C, в-четвертых, активацию протеинкиназы C с последующей активацией киназы митогенактивируемой протеинкиназы, а

затем активацией ERK-1 [37]. Показано, что действие сублитических доз комплексов C5b-9 на клетки может быть опосредовано через активацию G_i-протеина. Такой механизм действия C5b-9 проявляется, по крайней мере, при стимуляции пролиферации сосудистых гладкомышечных и Шванновских клеток мембраноатакующими комплексами [37]. Формирование мембраноатакующих комплексов на мембране ядродержащих клеток может приводить к появлению очень важного феномена. Этот феномен характеризуется возникновением двунаправленного транспорта аутокринных и паракринных сигналов через временно существующие каналы, образованные мембраноатакующими комплексами [12].

Вероятно, действие промежуточных комплексов - C5b-7 и C5b-8 на клетки обеспечивается через включение внутриклеточных сигнальных систем, сходных с теми, которые запускаются мембраноатакующими комплексами C5b-9. Очень важно, что гемолитически неактивные комплексы iC5b67, iC5b-9 и растворимые комплексы SC5b-9 тоже видоизменяют функции эндотелиальных клеток [30, 55, 59]. Эти комплексы могут накапливаться при активации системы комплемента *in vivo*. Действие iC5b67 опосредуется, в частности, через G-протеины и кальций, а SC5b-9 - через $\alpha_v\beta_3$ интегрин с последующей активацией тирозиновых протеинкиназ [58].

Комплексы C5b-9 способны стимулировать секрецию из клеток фактора некроза опухоли, интерлейкина-1, хемоаттрактантного для моноцитов протеина-1, интерлейкина-8, щелочного фактора роста фибробластов и тромбоцитарного фактора роста. Они также стимулируют образование активных форм кислорода в клетках-мишенях [12, 35, 37]. Формирование мембраноатакующих комплексов на клетках может приводить к изменению экспрессии особых генов, получивших название RGC ("response genes to complement"). RGC-1 идентичен гену, кодирующему белок теплового шока 105, RGC-2 - гену поли(АДФ-рибозо) полимеразы, RGC-10 - гену "индуцируемого интерфероном протеина 10", а RGC-32, возможно, представляет собой ген, кодирующий циклинзависимую киназу [37].

Имеются противоречивые сведения об участии мембраноатакующего комплекса в апоптозе. С одной стороны, получены данные о стимуляции апоптоза мембраноатакующим комплексом, а с другой стороны, имеются сведения о способности мембраноатакующего комплекса подавлять апоптоз через активацию G_i-протеина и ERK-киназы [37, 46].

Можно предполагать, что кавеолы эндотелиоцитов являются наиболее значимой мишенью для повреждающего действия продуктов активации системы комп-

лемента. Особое значение кавеол в патогенном действии системы комплемента определяется, прежде всего тем, что в них сконцентрировано огромное количество взаимодействующих между собой рецепторов и белков, обеспечивающих быструю, эффективную и специфическую передачу сигналов от мембраны эндотелиоцита к внутриклеточным мишеням. Поэтому изменение функции кавеол при активации системы комплемента может приводить к множественному нарушению функции эндотелиальных клеток.

Чрезмерное увеличение образования активных форм кислорода в эндотелиоцитах, а также увеличение продукции NO при сопутствующем повышении образования супероксида может вызывать повреждение эндотелиоцитов. Предполагается, что в этих условиях значительно повышается активность фермента поли(АДФ-рибозо) полимеразы в ядре эндотелиоцита, вследствие увеличения количества разрывов ДНК [54]. Это приводит к истощению запасов НАД (субстрата фермента). Уменьшение содержания НАД, являющегося важным коферментом в реакциях образования энергии вызывает истощение запасов АТФ в эндотелиоцитах. Более того, эндотелиоциты потребляют АТФ в попытке ресинтеза НАД. Усиливающийся дефицит энергии в эндотелиоцитах может, в конечном итоге, заканчиваться их гибелью.

Изменение редокс-состояния эндотелия - важнейший механизм нарушения функции эндотелия при активации системы комплемента

Современные знания позволяют рассматривать редокс-регуляцию функции клеток (регуляция через преобладание в клетке процессов окисления или восстановления протеинов и, возможно, других молекул) в качестве одного из фундаментальных механизмов, определяющих динамический характер фенотипа эукариотических клеток [25, 42, 49]. Установлено, что в отличие от высоких концентраций активных форм кислорода, вызывающих окислительное повреждение протеинов, липидов и нуклеиновых кислот, промежуточные концентрации активных форм кислорода через механизмы внутриклеточной сигнализации вовлечены в регуляцию иммунного ответа, межклеточной адгезии, хемотаксиса, клеточной пролиферации, метаболизма, мышечного сокращения, апоптоза и др. [50]. Оказалось также, что активные формы кислорода образуются в клетках (дополнительно к постоянному базальному образованию) в ответ на взаимодействие различных лигандов, таких как цитокины, гормоны и факторы роста со своими клеточными рецепторами, причем лиганд-опосредованная передача внутрикле-

точного сигнала может блокироваться антиоксидантами [50]. Значит, активные формы кислорода вполне могут сами выполнять функцию вторичных посредников в процессе передачи внутриклеточного сигнала, а также могут оказывать существенное влияние на механизмы передачи внутриклеточных сигналов [49]. Ряд биологически активных протеинов, играющих ключевую роль в процессах внутриклеточной сигнализации и регуляции экспрессии генов, характеризуются высокой чувствительностью к действию на них активных форм кислорода в концентрациях значительно ниже тех, которые способны вызывать окислительное повреждение таких протеинов. [50]. $\text{CH}_2\text{-SH}$ группы цистеиновых остатков этих протеинов играют роль "редокс-сенсоров" [50]. Однако в условиях нормальной функции восстанавливающих систем клетки - тиоредоксина и глутатиона, роль "редокс-сенсоров" играют не все, а только некоторые тиоловые группы протеинов, отличающиеся особенно высокой чувствительностью к окислению.

Возможность влияния системы комплемента на редокс-регуляцию функций эндотелиоцитов определяется, с одной стороны, свойством этой системы прямо стимулировать образование активных форм кислорода в эндотелии, а с другой стороны, ее свойством первоначально стимулировать продукцию активных форм кислорода в нейтрофилах, моноцитах и макрофагах с их последующим действием на эндотелий (рис.3). Связывание анафилатоксина C5a со своими рецепторами на эндотелиоцитах прямо стимулирует образование в них супероксида [41]. Характерно, что повышение продукции супероксида в эндотелиоцитах ингибируется коклюшным токсином и стауроспорином. Значит, этот ответ эндотелиальных клеток на C5a опосредован активацией G-протеинов и механизмов, зависящих от протеинкиназы C.

Образование сублитического количества мембраноатакующих комплексов на эндотелиоцитах также стимулирует образование активных форм кислорода в этих клетках [36]. Механизмы такого действия комплексов C5b-9 на эндотелий не известны. Можно предполагать, что повышение продукции активных форм кислорода в эндотелии обеспечивается как через прямое действие мембраноатакующих комплексов, так и через первоначальное образование интерлейкина-1 в эндотелиальных клетках, который далее оказывает аутокринное и паракринное влияние.

Большое значение в регуляции редокс-состояния эндотелиоцитов, возможно, имеют активные формы кислорода, освобождающиеся из стимулированной системой комплемента нейтрофилов, моноцитов и макрофагов. Пероксид водорода не имеет заряда и может

легко проходить через мембрану эндотелиоцитов, а супероксид, вероятно, проникает в эндотелиальные клетки через анионные каналы [25]. Рассматривая пути влияния системы комплемента на редокс-состояние эндотелиоцитов, необходимо учитывать еще и свойство этой системы вызывать синтез интерлейкина-1 в моноцитах. Итак, система комплемента может стимулировать продукцию активных форм кислорода в эндотелиоцитах во-первых, при непосредственном воздействии и, во-вторых, через промежуточный этап образования интерлейкина-1 в эндотелиоцитах и моноцитах/макрофагах.

Мы склонны также считать, что выраженность влияния системы комплемента на редокс-состояние эндотелиоцитов зависит от динамического характера фенотипа этих клеток. Например, повышение чувствительности эндотелия к действию системы комплемента может быть связано с увеличением экспрессии рецепторов для C1q (cC1qR и gC1qR) и для анафилатоксинов C3a и C5a (C3aR и C5aR) на эндотелиоцитах после действия на них фактора некроза опухоли- α , интерферона- γ и липополисахарида. Кстати, интерлейкин-1 и фактор некроза опухоли запускают синтез в эндотелиоцитах фактора/факторов, которые стимулируют дег-

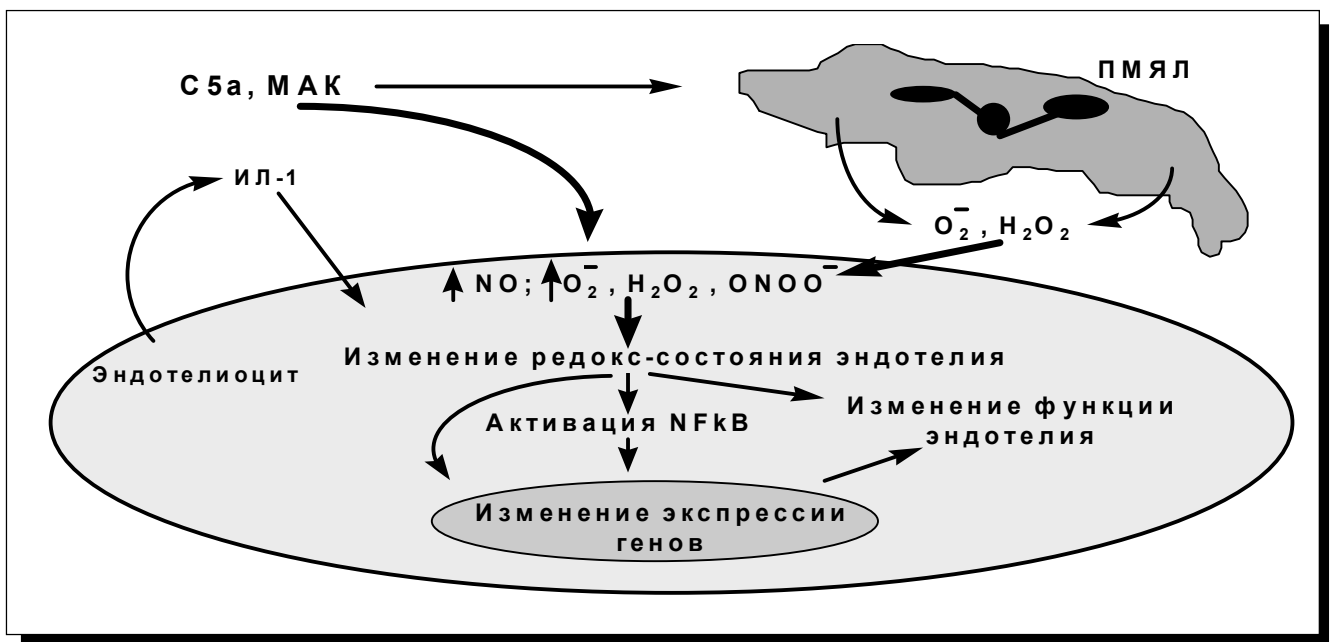


РИС. 3. Предполагаемые механизмы активации NF-kB в эндотелиоцитах в условиях внутрисосудистой и локальной активации системы комплемента.

рануляцию нейтрофилов, в частности освобождение из них эластазы [56]. Освобождающиеся из нейтрофилов эластаза и катепсин-G могут затем увеличивать базальную активность системы комплемента в непосредственной близости к эндотелиоцитам. Действие эластазы опосредуется повышением расщепления компонента C3, а действие катепсина-G, возможно, зависит от обнажения субэндотелиального слоя, вследствие сокращения эндотелиоцитов. Повышение продукции C5a, вероятно, еще больше усиливает активацию системы комплемента через освобождение пропердина из нейтрофилов. Если интерлейкин-1 обладает дополнительно способностью стимулировать образование компонента C3 в эндотелии, вследствие активации NF-kB, то можно допускать существование важных модулирующих свойств у названных цитокинов не только в отношении регуляции выраженности активации системы комплемента, но и в отношении выраженности влияния этой системы на редокс-состояние эндотелиоци-

тов. Имеются основания считать, что продолжительность нахождения сублитического количества мембраноатакующих комплексов в мембране эндотелиоцитов тоже может изменяться после предварительного действия цитокинов.

Можно предполагать, что активация системы комплемента в кровеносных сосудах в достаточной мере компартментализована. Максимальная активация комплемента, скорее всего, наблюдается в пространстве между стимулированными нейтрофилами и эндотелиоцитами в венах, так как именно в этих сосудах формируется пристеночный слой лейкоцитов и происходит их адгезия к эндотелию. Такая компартментализованная активация комплемента в венах способна играть важную роль в усилении адгезии лейкоцитов к эндотелию и в трансмиграции нейтрофилов, в частности, через изменение редокс-состояния эндотелиальных клеток. Кроме того, изменение редокс-состояния эндотелиоцитов в венах, опосредованное активаци-

ей системы комплемента, может формировать сигналы (сигнал), распространяющиеся затем по эндотелиоцитам (например через межклеточные каналы) до капилляров и артериол, приводя к изменению свойств этих сосудов.

Рассмотренная выше возможность прямого и опосредованного через нейтрофилы влияния системы комплемента на эндотелий венул всегда должна учитываться при обсуждении механизмов нарушения эндотелийзависимой регуляции тонуса артериальных сосудов в условиях внутрисосудистой активации системы комплемента *in vivo*.

Особая роль NF-κB в механизмах дисфункции эндотелия при активации системы комплемента

Важность роли NF-κB в механизмах возникновения дисфункции эндотелия при активации системы комплемента становится понятной, если обратить внимание на два факта. Во-первых, активация в эндотелиоцитах NF-κB может приводить к усиленной экспрессии генов, кодирующих образование VCAM-1, E-селектина, ICAM-1, хемоаттрактантного протеина-1 для моноцитов, колониестимулирующего фактора для макрофагов, ингибитора активатора плазминогена-1, тканевого тромбопластина, интерлейкина 6 и 8 и др [64]. Во-вторых, активация в эндотелиоцитах NF-κB может быть вызвана веществами или стимулами, увеличивающими образование в эндотелиоцитах активных форм кислорода и изменяющими их редокс-состояние [47].

Необходимо обратить внимание на постоянное подавление активации NF-κB оксидом азота, образующимся конституциональной NO-синтазой эндотелия (эНОс). Ингибирование эНОс активирует NF-κB. NO стабилизирует комплексы NF-κB / IκBα, предотвращая деградацию IκBα, усиливает образование м-РНК для IκBα и ингибирует активацию NF-κB посредством снижения продукции супероксид-аниона в эндотелиоцитах. Кроме того, NO способен прямо ингибировать взаимодействие NF-κB/Rel с ДНК [7, 9]. Ингибирование связывания p50 с ДНК обеспечивается вследствие модификации редокс-чувствительного остатка цитозина, находящегося в 62 позиции. Этот участок является высоко консервативным в белках семейства NF-κB/Rel [64]. Ингибирующее влияние NO на NF-κB может объяснять подавление продукции в эндотелии колониестимулирующего фактора для макрофагов, хемоаттрактантного протеина-1 для моноцитов, VCAM-1, E-селектина, ICAM-1, интерлейкина 6 и 8.

Так как активация системы комплемента может приводить к увеличению содержания активных форм кислорода в эндотелиоцитах вследствие прямого влия-

ния мембраноатакующего комплекса и C5a на эти клетки, а также вследствие освобождения активных форм кислорода из нейтрофилов/моноцитов, то логично допускать существование возможности активации NF-κB в эндотелиальных клетках при активации комплемента [7] (рис. 2). Имеются экспериментальные доказательства того, что формирование сублитического количества мембраноатакующих комплексов на эндотелиоцитах запускает в них активацию NF-κB, приводя далее к синтезу интерлейкина-8 и хемоаттрактантного протеина-1 для моноцитов [35].

Конечно, изменение фенотипических характеристик эндотелиоцитов в условиях активации системы комплемента определяется не только активацией NF-κB. Несомненно, в этом процессе участвуют и другие редокс-чувствительные регуляторы активности генов эндотелиоцитов. Специфическая картина экспрессии генов эндотелиоцитов при активации системы комплемента в значительной мере будет определяться также биофизическими характеристиками кровотока (ламинарное или осциллирующее напряжение сдвига).

Заключение

Таким образом, система комплемента является одним из важнейших факторов, которые оказывают модулирующее или "повреждающее" действие на эндотелиоциты. При этом действие системы комплемента на эндотелиоциты может быть направлено как из крови, так и из сосудистой стенки. Особенно интересно то, что сами эндотелиоциты синтезируют компоненты альтернативного пути активации комплемента и компоненты мембраноатакующего комплекса. К тому же, синтез компонентов системы комплемента в эндотелиальных клетках усиливается в ряде ситуаций. Поэтому, "эндотелиоцитарная" система комплемента, вероятно, способна оказывать выраженное аутокринное и паракринное влияние.

Воздействие продуктов активации системы комплемента на эндотелиальные клетки может приводить ко множественному нарушению их функции. В частности, продукты активации комплемента нарушают противосвертывающие свойства эндотелия, увеличивают адгезию лейкоцитов к эндотелию, а также нарушают эндотелийзависимую регуляцию сосудистого тонуса. Механизмы влияния системы комплемента на эндотелий только начинают изучаться. Тем не менее, уже сейчас можно предположить, что изменение редокс-состояния клеток, в том числе и эндотелиоцитов, представляет собой один из универсальных механизмов, через который продукты активации системы комплемента оказывают кратковременное и долговременное влияние на многие клеточные функции.

Можно не сомневаться в том, что изучение механизмов и следствий влияния системы комплемента на эндотелий кровеносных сосудов имеет важнейшее значение в понимании патогенеза иммунокомплексных

васкулитов, тромбоза, атеросклероза и других патологических процессов и заболеваний которые так часто наблюдают клиницисты в повседневной практике и которые пока еще не вполне понятны.

Литература

1. Насонов Е. Л. // *materia medica*. - 1998. - №3-4. - С.12-19.
1. Шебеко В. И., Солодков А. П., Родионов Ю. Я. // Доклады АН СССР. 1989. - Т.309, №3. - С. 753-756.
2. Шебеко В. И., Родионов Ю. Я., Солодков А. П. // Витебский медицинский институт. - Депон. ВИНТИ 11.06.1990 г. № 3307-В90. - 24с.
3. Шебеко В. И., Родионов Ю. Я. // Материалы международной конференции, посвященной 35-летию Гродненского медицинского института. - Гродно, 1993. - С. 63-64.
4. Шебеко В. И. // Актуальные проблемы современной медицины: Материалы научной конференции. - Витебск, 1994. - Т.2. - С. 29.
5. Шебеко В. И., Родионов Ю. Я. // Тер. архив. - 1994. - Т.66, №4. - С. 76-82.
6. Шебеко В. И., Родионов Ю. Я. // Мед. новости. - 1997. - №11. - С. 12-17.
7. Шебеко В. И. // Роль монооксида азота в процессах жизнедеятельности. Под ред. В.Н Гурина, В.А. Кульчицкого, А.Г. Чумака. - Минск: Полибиг, 1998. - С.175-177.
8. Шебеко В.И., Родионов Ю.Я.. // Мед. новости. - 1999. - №6. - С.14-17.
9. Шебеко В. И. Эндотелий и система комплемента. // Витебск: ВГМУ, 1999. - 149 с.
10. Юну П., Саложин К. В., Насонов Е. Л., Насонова В. А. // Клини. медицина. - 1995. - №5. - С.5-6.
11. Acosta J. A., Benzaquen L. R., Goldstein D. J., et al. // *Mol. Med.* - 1996. - V.2. - P.755-765.
12. Berge V., Johnson E., Hogasen K. // *APMIS*. - 1997. - V.105. - P.17-24.
13. Berridge M. // *Nature*. - 1993. - V.361. - P.315-325.
14. Cable D. G., Hisamochi K., Schaff H. V. // *Circulation*. - 1997. - V.96. - P.58-63.
15. Candinas D., Koyamada N., Miyatake T., et al. // *Thromb. Haemost.* - 1996. - V.76. - P.807-812.
16. Chebrehiwet B., Peerschke E. I. B. // *Immunobiol.* - 1998. - V.199. - P.225-238.
17. Christiansen V. J., Sims P. J., Hamilton K. K. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* - 1997. - V.17. - P.164-171.
18. Collard C. D., Agah A., Stahl G. L. // *Immunopharmacology*. - 1998. - V.39. - P.39-50.
19. Culpier M., Andreev S., Lemercier C., et al. // *Clin. Exp. Immunol.* - 1995. - V.101. - P.142-149.
20. Cuzzocrea S., Zingarelli B., O'Connor M., et al. // *Br. J. Pharmacol.* - 1997. - V.122. - P.493-503.
21. Foreman K. E., Glosky M. M., Warner R. L., et al. // *Inflammation*. - 1996. - V.20. - P.1-9.
22. Friedl H. P., Till G. O., Trentz O., Ward P. D. // *Am. J. Pathol.* - 1989. - V.135. - P.203-217.
23. Gasque P., Singhrao S. K., Neal J. W., et al. // *Am. J. Pathol.* - 1997. - V.150. - P.31-41.
24. Gutteridge J. M., Mitchell J. // *British Med. Bull.* - 1999. - V.55, N.1. - P.49-75.
25. Hattori R., Hamilton K. K., McEver R. P., Sims P. J. // *J. Biol. Chem.* - 1989. - V.264. - P.9053-9060.
26. Hindmarsh E. J., Marks R. M. // *Eur. J. Immunol.* - 1998. - V.28. - P.1052-1062.
27. Hindmarsh E. J., Marks R. M. // *J. Immunol.* - 1998. - V.160. - P.6128-6136.
28. Ikeda K., Nagasawa K., Horiuchi T., et al. // *Thromb. Haemost.* - 1997. - V.77. - P.394-398.
29. Ishikawa S., Tsukada H., Bhattacharya J. // *J. Clin. Invest.* - 1993. - V.91. - P.103-109.
30. Joseph K., Ghebrehiwet B., Peerschke E. I. B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1996. - V.93. - P.8552-8557.
31. Kalady M. F., Lawson J. H., Sorrell R. D., Platt J. L. // *Mol. Med.* - 1998. - V.4. - P.629-637.
32. Kawakami Y., Watanabe Y., Yamaguchi M., et al. // *Cancer Lett.* - 1997. - V.116. - P.21-26.
33. Kilgore K. S., Shen J. P., Miller B. F., et al. // *J. Immunol.* - 1995. - V.155. - P.1434-1441.
34. Kilgore K. S., Schmid E., Shanley T. P., et al. // *Am. J. Pathol.* - 1997. - V.150. - P. 2019-2031.
35. Kilgore K. S., Ward P. A., Warren J. S. // *Inflammation*. - 1998. - V.22. - P.583-598.
36. Lambris J. D., Reid K. B. M., Volanakis J. E. // *Immunol. Today* - 1999. - V.20. - P.207-211.
37. Lozada C., Levin R. I., Huie M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. - 1995. - V.92. - P.8378-8382.
38. Morgan B. P. // *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* - 1995. - V.32. - P.265-298.
39. Morgan B. P., Gasque P. // *Clin. Exp. Immunol.* - 1997. - V.107. - P.1-7.
40. Murphy H. S., Shayman J. A., Till G. O., et al. // *Am. J. Physiol.* - 1992. - V.263. - P.L51-L59.
41. Nakamura H., Nakamura K., Yodoi J. // *Annu. Rev. Immunol.* - 1997. - V.15. - P.351-369.
42. Platt J. F., Dalmasso A. P., Lindman B. J., et al. // *Eur. J. Immunol.* - 1991. - V.16. - P.15-20.
43. Rodionov Y. Y., Shebeko V. I., Solodkov A. P. // *Constituent Congress International Society for Pathophysiology. Abstracts.* - Moscow, 1991. - P. 119.
44. Saadi S., Holzkmehnt R. A., Patte C. P., et al. // *J. Exp. Med.* - 1995. - V.182. - P.1807-1814.
45. Sato T., Van Dixhoorn M. G., Prins F. A., et al. // *J. Am. Soc. Nephrol.* - 1999. - V.10. - P.1242-1252.

46. Schmitz M. L., Baeuerle P. A. // Immunobiol. - 1995. - V.193. - P.116-127.
47. Selvan R. S., Kapadia H. B., Platt J. L. // J. Immunol. - 1998. - V.161. - P.4388-4395.
48. Sen C. K., Packer L. // FASEB J. - 1996. - V.10. - P.709-720.
49. Sen C. K. // Biochem. Pharmacol. - 1998. - V.55. - P.1747-1758.
50. Shebeko V. I. // J. Mol. Med. - 1997. - V.75,N.5. - P. B19.
51. Shebeko V. I. // J. Vasc. Res. - 1997. - V.34.(Suppl.1). - A.124.
52. Stahl G. L., Reenstra W. R., Frenzl G. // Circ. Res. - 1995. - V.76. - P.575-583.
53. Szabo C. // Free Radic. Biol. Med., - 1996. - V.21. - P.855-869.
54. Tedesco F., Pausa M., Nardon E., et al. // J. Exp. Med. - 1997. - V.185. - P.1619-1627.
55. Tophan M. K., Carveth H. J., McIntyre T. M., et al. // FASEB J. - 1998. - V.12. - P.733-746.
56. van den Berg R. H., Faber-Krol M. C., Sim R. B., Daha M. R. // J. Immunol. - 1998. - V.161. - P.6924-6930.
57. Wang C., Barbashov S., Jack., et al. // Blood. - 1995. - V.85. - P.2570-2578.
58. Wang C., Gerard N. P., Nicholson-Weller A. // J. Immunol. - 1996. - V.156. - P.786-792.
59. Ward P. A. // Am. J. Pathol. - 1996 - V.149. - P.1081-1086.
60. Warren J. S., Ward P. A. // Am. J. Med. Sci. - 1986. - V.292. - P.97-103.
61. Wetsel R. A. // Immunol. Lett. - 1995. - V.44. - P.183-187.
62. Wirthmuller U., Dewald B., Thelen M. // J. Immunol. - 1997. - V.158. - P.4444-4451.
63. Wulczyn E. G., Krappmann D., Scheidereit C. // J. Mol. Med.-1996.-V.74, N.12.-P.749-769.