

Экспериментальное обоснование механизмов действия Meso-Eye C71™: влияние на состояние кровеносных сосудов



Premierpharm

КОМПАНИЯ PREMIERPHARM –
ОФИЦИАЛЬНЫЙ
И ЭКСКЛЮЗИВНЫЙ
ПРЕДСТАВИТЕЛЬ КОМПАНИИ
AVG LAB LLC (США)
НА ТЕРРИТОРИИ РФ

ООО «ПРЕМЬЕР ФАРМ»
МОСКВА, УЛ. ТЕСТОВСКАЯ, Д. 10,
ММДЦ «МОСКВА-СИТИ»,
БЦ «СЕВЕРНАЯ БАШНЯ», ПОД. 1
ТЕЛ.: (495) 795-07-11

В. АШАПКИН

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Л. КУТУЕВА

младший научный сотрудник НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Е. ВОЛКОВА

доктор медицинских наук, профессор, директор научно-образовательного департамента ООО Premierpharm

Б. ВАНЮШИН

доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий отделом НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Мешки или темные круги под глазами, которые утром бывают более заметными, чем накануне вечером, могут указывать на усиление локального кровотока и повышение проницаемости кровеносных сосудов (КС) вследствие воспалительного процесса. Накопление межклеточной жидкости (МЖ) в периферических тканях является результатом ультрафильтрации плазмы крови с содержащимися в ней молекулами через эндотелиальный слой артериальной и венозной капиллярной сети. Движущей силой этого процесса является баланс гидростатического и осмотического давления между внутренним пространством микрососудов кровеносной системы и межклеточным пространством окружающей ткани. Обратный захват межклеточной жидкости и ее возвращение в кровеносную систему осуществляет главным образом лимфатическая система. Вместе с плазмой в между-

точное пространство выходят также белки и малые молекулы. Специальный матрикс из гликопротеинов и гликозаминогликанов (гликокаликс), находящийся на внутренней поверхности эндотелиальных клеток (ЭК) и между ними, играет роль своеобразного сита с порами различных размеров, которое регулирует скорость фильтрации и состав МЖ. Усиленная продукция МЖ, способствующая возникновению отеков, может наблюдаться при повышенном венозном давлении, увеличенной проницаемости эндотелия и гипопроотеинемии. Повышенное венозное давление приводит к избыточной фильтрации плазмы из венул и кровеносных капилляров (например, при правосторонней застойной сердечной недостаточности, регургитации крови при недостаточности трехстворчатого клапана, глубоком тромбозе вен). Локальное воспаление увеличивает проницаемость капилляров и венул, ускоряя попадание белка и жидкости в межклеточное

пространство даже при нормальном давлении. Продукция МЖ может увеличиться в 10–20 раз, что превышает возможности лимфотока и вызывает выраженный отек. Гипопротеинемия индуцирует формирование отека даже в условиях нормального давления и проницаемости сосудов. В этом случае отек образуется из-за сниженного онкотического давления в кровеносных сосудах, способствующего оттоку жидкости в межклеточное пространство.

Состояние КС в значительной степени определяется экспрессией генов, кодирующих функционально важные белки эндотелиальных клеток. Мы исследовали эффекты препарата MesoEye C71™ на экспрессию таких генов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали культивируемые эндотелиальные клетки HMVEC-D (human dermal microvascular endothelial cells), полученные из микрососудов кожи человека и представляющие собой смесь эндотелиальных клеток кровеносных и лимфатических сосудов (компания Lonza, CC-2543). После размораживания клетки культивировали на среде EGM-2 MV BulletKit (компания Lonza, CC-3202) при температуре 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂ в пластиковых чашках Петри в течение 2 пассажей. Для оценки влияния MesoEye C71™ на клетки препарат добавляли к среде (из расчета 10 мкл на 1 мл среды) перед началом третьего пассажа и выращивали клетки до формирования монослоя. Контрольные клетки росли в аналогичных условиях, но без добавления препарата. По окончании третьего пассажа среду удаляли, а к клеткам добавляли реагент, стабилизирующий РНК, - RNeasy Protect Cell Reagent (компания Qiagen, Германия). После открепления клеток от поверхности чашек Петри под ▷

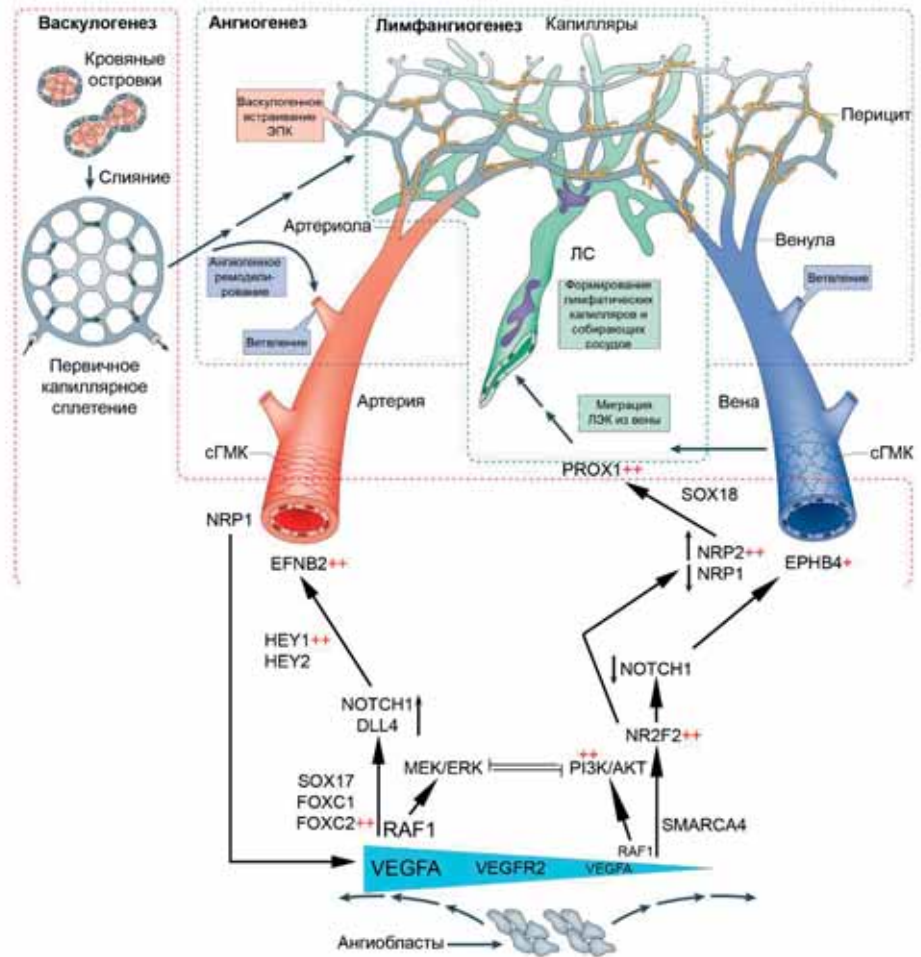


РИС. 1. Генетические программы дифференцировки артериальных, венозных и лимфатических сосудов.

Активность фактора транскрипции SHH в ното хорде запускает экспрессию гена VEGFA в сомитах и формирование градиента концентрации VEGFA. В области высоких концентраций VEGFA индуцируется артериальная дифференцировка через активизацию сигнального пути MEK/ERK, а в области низких – венозная дифференцировка через активизацию сигнального пути PI3K/AKT. Продолжение артериальной спецификации включает активизацию сигнального пути DLL4/NOTCH1 факторами транскрипции SOX17, FOXC1 и FOXC2 и индукцию экспрессии EFNB2 и NRP1. Последний обеспечивает механизм положительной обратной связи, функционируя как корцептор для VEGFA. Условием венозной дифференцировки является супрессия сигнального пути MEK/ERK со стороны PI3K/AKT и индукция фактора транскрипции NR2F2 (COUP-TFII). Последний ингибирует артериальную дифференцировку, уменьшая экспрессию NOTCH1 и NRP1 и стимулируя экспрессию NRP2 и других венозных маркеров. Субпопуляция венозных ЭК позже начинает экспрессию SOX18 и PROX1 и дифференцируется в лимфатические эпителиальные клетки. Постоянная поддержка артериально-венозной дискриминации зависит от межклеточной «отталкивающей» коммуникации посредством сигнального пути EFNB2-EPHB4. Красными плюсами показаны гены, экспрессия которых стимулируется MesoEye C71™: + - в 1,5–2 раза, ++ - в 2–5 раза.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ MESO-EYE C71™: ВЛИЯНИЕ НА СОСТОЯНИЕ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

действием реагента образующуюся суспензию переносили в стерильные пластиковые микропробирки и хранили несколько суток в холодильнике до выделения РНК.

Выделение и очистку суммарной РНК из клеток осуществляли с помощью набора RNeasy Mini Kit (компания Qiagen, Германия) по прописи, рекомендованной фирмой-производителем. Полученные образцы РНК использовали для синтеза первой цепи кДНК с помощью набора обратной транскрипции Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit (компания Thermo Scientific, США) по рекомендованной производителем прописи. В качестве матрицы на каждую реакцию обратной транскрипции объемом 20 мкл использовали 200 нг очищенной суммарной РНК. Полученную реакционную смесь применяли непосредственно как матрицу для ПЦР из расчета 1 мкл смеси на реакцию объемом 25 мкл. Количественную ПЦР с флуоресцентно мечеными гибридизационными зондами (TaqMan qPCR) проводили с помощью набора qPCRmix-HS (компания «Евроген», Россия) и термоциклера ДТ-322 (компания «ДНК Технология», Россия). В качестве внутреннего стандарта использовали референсный ген GAPDH. Концентрацию его транскриптов измеряли в тех же самых ПЦР смесях, используя гибридизационный зонд, меченый другой флуоресцентной меткой: динамику амплификации кДНК для исследуемых генов измеряли по росту флуоресценции в канале Fam, а динамику амплификации кДНК для референсного гена – в канале Hex. Уровень экспрессии каждого гена измеряли в трех параллельных экспериментах на независимо полученных образцах клеток (биологические параллели). Для каждого образца проводили минимум три параллельные ПЦР в соседних лунках прибора (технические параллели). Полученные данные импортировали в программу Microsoft Excel 2003 и обрабатывали статистически, при-

нимая концентрацию мРНК референсного гена во всех образцах за 1. Конструирование олигонуклеотидных праймеров и гибридизационных зондов для количественной ПЦР осуществляли с помощью онлайн-сервиса IDT PrimerQuest (<https://eu.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Index>), а их синтез – в компании «Синтол» (Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

РАЗВИТИЕ И БАЗОВАЯ ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

На первом этапе мы исследовали влияние MesoEye C71™ на экспрессию генов, детерминирующих развитие и фенотипические свойства эндотелиальных клеток в различных отделах кровеносной системы. Каждый из этих отделов выполняет свою специфическую функцию и имеет соответствующие особенности организации. Артерии, подверженные высокому давлению крови, имеют толстую многослойную оболочку, тогда как в венах она намного тоньше. Вены служат главным местом выхода лейкоцитов из кровотока в окружающие ткани.

Все ЭК имеют общее происхождение. На ранних стадиях эмбрионального развития часть мезодермальных клеток дифференцируется в прогениторные эпителиальные клетки (ангиобласты), образующие нерегулярную тубулярную сеть – первичное сосудистое сплетение. На более поздних этапах эмбриогенеза происходит интенсивное ремоделирование этих ранних сосудов, приводящее к формированию артерий, вен и капилляров (рис. 1). Это сложный процесс, контролируемый специальной генетической программой и происходящий до начала функционирования кровотока у эмбриона.

С началом сердцебиений ЭК подвергаются гемодинамическим воздействиям, сильно изменяющим их функциональные свойства, такие как организация внеклеточного матрикса (ВКМ), цитоскелета, межклеточных контактов и многие другие. ЭК участвуют в рекрутировании сосудистых гладкомышечных клеток (сГМК) и перицитов, защищающих эндотелий от избыточных эффектов гемодинамических сил и регулирующих кровотоки. Позднее из эпителиальных клеток кардинальной вены образуется лимфатическая система.

Следующим этапом дифференцировки является приобретение ЭК специфических черт, отвечающих потребностям органов, в которых они находятся. Например, в микрососудах мозга особое строение контактов между эпителиальными клетками обеспечивает максимально жесткий контроль проницаемости эндотелия для компонентов плазмы и клеток воспаления (гематоэнцефалический барьер). В других органах, таких как печень и костный мозг, стенки кровеносных капилляров имеют поры (синусы), позволяющие им динамически изменять проницаемость. Посткапиллярные венулы экспрессируют сложную систему белков адгезии, хемокинов и специализированных межклеточных контактов, регулирующих выход иммунных клеток к очагам инфекции. Органоспецифические характеристики ЭК индуцируются и поддерживаются благодаря их постоянному взаимодействию с окружающими тканями. При этом сохраняется высокая пластичность эпителиальных клеток, позволяющая им при определенных условиях превращаться друг в друга.

Прогениторные ЭК (ангиобласты) экспрессируют ряд специфических маркеров, таких как кадгерин 5 (CDH5, также известный как VE-cadherin - vascular endothelial cadherin), PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2), TIE2 (endothelial-specific receptor tyrosine kinase 2) и некоторые другие. Процесс дальнейшей дифференцировки ЭК контролируется координированным влиянием различных факторов транскрипции (рис. 1). Важным индуктором ангиогенеза служит лиганд рецептора VEGFR2 - сосудистый фактор роста VEGFA. Он может активизировать внутриклеточные сигнальные пути, опреде-

ляющие альтернативные направления васкулярной дифференцировки. Высокая активность VEGFA способствует стимуляции сигнального пути ERK/MAPK (extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase) и индуцирует дифференцировку по артериальному типу, а слабая активность ведет к стимуляции сигнального пути PI3K/AKT (phosphoinositide 3-kinase/v-akt murine thymoma viral oncogene homolog) и ингибированию ангиогенеза в пользу венозного направления дифференцировки. В индукции специфических для артериальных ЭК генов центральную роль играет протеин-киназа RAF1, действующая перед ERK. Рецептор NRP1 (neuropilin 1), усиливающий активность VEGFA, специфически экспрессируется в артериальных ЭК. У мышей, мутантных по гену NRP1, артериальная дифференцировка нарушена.

NRP1 играет важную роль в ангиогенезе и у взрослых млекопитающих. VEGFA индуцирует ангиогенез через активацию сигнального пути NOTCH1, участвующего в развитии сердечно-сосудистой системы. Активизация NOTCH1 уменьшает ветвление и рост сосудов, а кроме того, является ключевым индуктором артериального фенотипа.

Помимо VEGFA другим важным активатором пути NOTCH1 является фактор транскрипции SOX17, узнающий участок в промоторной области гена DLL4 (Delta-like 4), кодирующего лиганд NOTCH1. При нулевой мутации SOX17 ЭК не экспрессируют артериальные маркеры и не способны корректно рекрутировать перициты и сГМК. Избыточная активизация экспрессии DLL4, наоборот, приводит к появлению артериальных маркеров в эпителиальных клетках вен. Члены семейства факторов транскрипции FOX также играют важную роль в артериальной дифференцировке ЭК. У мутантных по генам FOXC1 и FOXC2 мышей артериальные маркеры в сосудах не экспрессируются. Возможно, FOXC1 и FOXC2 действуют ниже VEGFA, прямо активизируя экспрессию DLL4 и HEY2. Как показано на рис. 1, MesoEye C71™ умеренно стимулирует экспрессию трех генов, участвующих в артериальной дифференцировке: FOXC2 (в 2,7 раза), HEY1 (в 2,2 раза) и EFNB2 (в 2,2 раза).

Центральную роль в венозной дифференцировке ЭК играет фактор транскрипции NR2F2 (nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2), более известный как COUP-TFII.

Он экспрессируется в венозных, а не артериальных ЭК. При нулевой мутации гена NR2F2 венозные ЭК частично утрачивают экспрессию венозных маркеров и экспрессируют ряд артериальных маркеров. Избыточная экспрессия NR2F2, наоборот, препятствует экспрессии артериальных маркеров и индуцирует экспрессию венозного маркера EPHB4 в артериях. Как уже отмечалось, ЭК сохраняют высокую степень пластичности и при изменениях в экспрессии определенных генов и активности соответствующих сигнальных путей могут приобретать черты альтернативного направления дифференцировки. Механизм действия NR2F2 связан с ингибированием активности сигнального пути NOTCH1, что приводит к индукции венозной дифференцировки за счет подавления артериальной. Активизация NOTCH1, наоборот, подавляет экспрессию гена NR2F2. Индуктором экспрессии NR2F2 является АТФаза SMARCA4 (SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4), также известная как BRG1 (brahma-related gene 1), участвующая в ремоделировании хроматина. Ее инактивация в венозных ЭК приводит к появлению в них артериальных маркеров. Добавление MesoEye™ C71 стимулирует экспрессию трех генов, участвующих в венозной дифференцировке: PI3K (в 2 раза), NR2F2 (в 3 раза) и EPHB4 (в 1,5 раза).

ЗАЩИТА ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И ГИПЕРТЕНЗИИ

Важнейшую роль в регуляции состояния кровеносных сосудов (КС) играет фермент гемоксигеназа 1 (heme oxygenase 1/НМОХ1), катализирующий окислительную деградацию гема до биливердина, монооксида углерода (СО) и свободного железа (рис. 2). Биливердин быстро превращается в билирубин ферментом биливердин-редуктазой (BVR). НМОХ1 индуцируется многими агентами, обладает противовоспалительной активностью и защищает клетки от окислительного стресса. В условиях окислительного стресса и при воспалительных ответах наблюдаются дисфункции эндотелия, характеризующиеся недостаточностью сосудорасширяющих и антиадгезивных веществ, таких как оксид азота (NO) и простагландин (простагландин, препятствующий агрегации тромбоцитов, мощный сосудорасширяющий агент), ▷

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ MESO-EYE C71™: ВЛИЯНИЕ НА СОСТОЯНИЕ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

и одновременно повышенным содержанием сосудосуживающих и проадгезивных веществ, таких как эндотелин 1 (endothelin 1/EDN1), ангиотензин II, тромбоксаны (эйкозаноиды, участвующие в свертывании крови, являются сильными сосудосуживающими агентами).

В результате происходит повышение тонуса сосудов, адгезия клеток воспаления и тромбоцитов на стенках сосудов, пролиферация клеток гладкой мускулатуры сосудов, повышение частоты тромбозов и закупорки сосудов. Эндогенный NO, образующийся в результате активности NO-синтазы (nitric oxide synthase/NOS), является гомеостатическим регулятором сосудистой системы, а его недостаток приводит к различным патологическим состояниям, таким

как гипертония и спазмы сосудов. NO активизирует экспрессию гена HMOX1, а образующийся CO обладает многими эффектами NO, например сосудорасширяющим. Под действием MesoEye C71™ экспрессия гена HMOX1 возрастает примерно в 3 раза. HMOX1 участвует в регуляции ангиогенеза и васкулогенеза в нормальных и патологических условиях. Именно HMOX1 отвечает за индукцию экспрессии генов VEGF в сГМК при гипоксии. В свою очередь, VEGF также индуцирует экспрессию HMOX1 в эпителиальных клетках. Активные формы кислорода (АФК) модулируют образование новых кровеносных сосудов. HMOX1 действует как проангиогенный фактор только в отсутствие воспаления, а при индукции образования кровеносных сосудов медиаторами воспа-

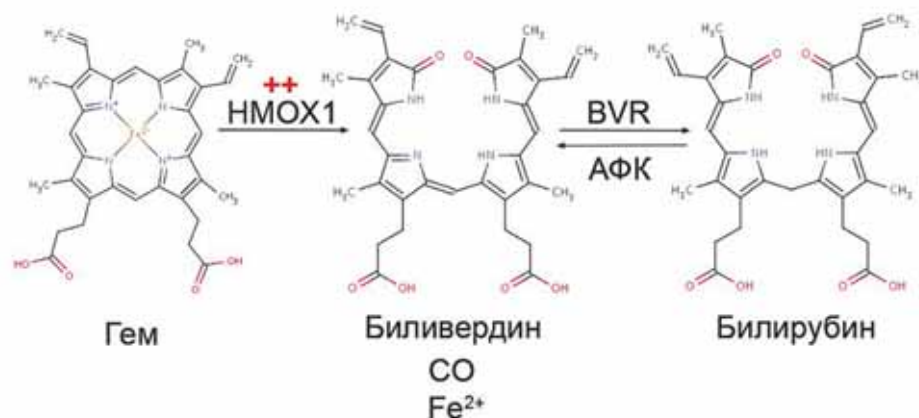


РИС. 2. Путь деградации гема

HMOX1 расщепляет гем до свободного железа (Fe^{2+}), монооксида углерода (CO) и биливердина. Последний быстро превращается в билирубин биливердин-редуктазой (BVR). Активные формы кислорода (АФК) захватываются билирубином, который тем самым защищает клетки от оксидативного стресса. АФК окисляют билирубин до биливердина, который снова превращается в билирубин за счет активизации BVR, завершая каталитический цикл. Двумя красными плюсами показана стимуляция экспрессии гена HMOX1 под действием MesoEye C71™.

ления, наоборот, препятствует ангиогенезу. Она является антагонистом ангиотензина II в отношении его эффектов на пролиферацию сГМК и последующую гипертензию. При индукции экспрессии НМОХ1 у спонтанно гипертензивных крыс происходит нормализация кровяного давления. Превращение неактивной формы ангиотензина I в активную форму ангиотензин II катализируется специфической протеазой – ангиотензин-превращающим ферментом (ACE). Экспрессия гена ACE под действием MesoEye C71™ уменьшается в 1,4 раза. В сумме описанные эффекты демонстрируют наличие у препарата активности, защищающей кровеносные сосуды от окислительного стресса и гипертензии.

ПРОНИЦАЕМОСТЬ СОСУДОВ: СТРУКТУРНЫЕ АСПЕКТЫ

Проницаемость сосудов для жидкостей и белков крови, а также выход лейкоцитов из кровяного русла в окружающие ткани в целом определяются барьером ЭК. Такие медиаторы воспаления и факторы роста, как тромбин, гистамин, брадикинин, VEGFA, TNF (tumor necrosis factor), LPS (липополисахариды), серотонин и оксиданты увеличивают проницаемость сосудов, а аденозин и фосфолипид-сфингозин 1-фосфат (phospho-lipid sphingosine 1-phosphate/S1P) стабилизируют межклеточные соединения в эндотелии, тем самым уменьшая проницаемость. Временное увеличение проницаемости при воспалении необходимо для доставки лимфоцитов, медиаторов воспаления, питательных и других веществ. Но слишком продолжительное увеличение проницаемости может приводить к отекам и образованию тромбов. Очевидно, эти процессы должны быть четко отрегулированы во времени. Проницаемость межклеточных контактов в эн-

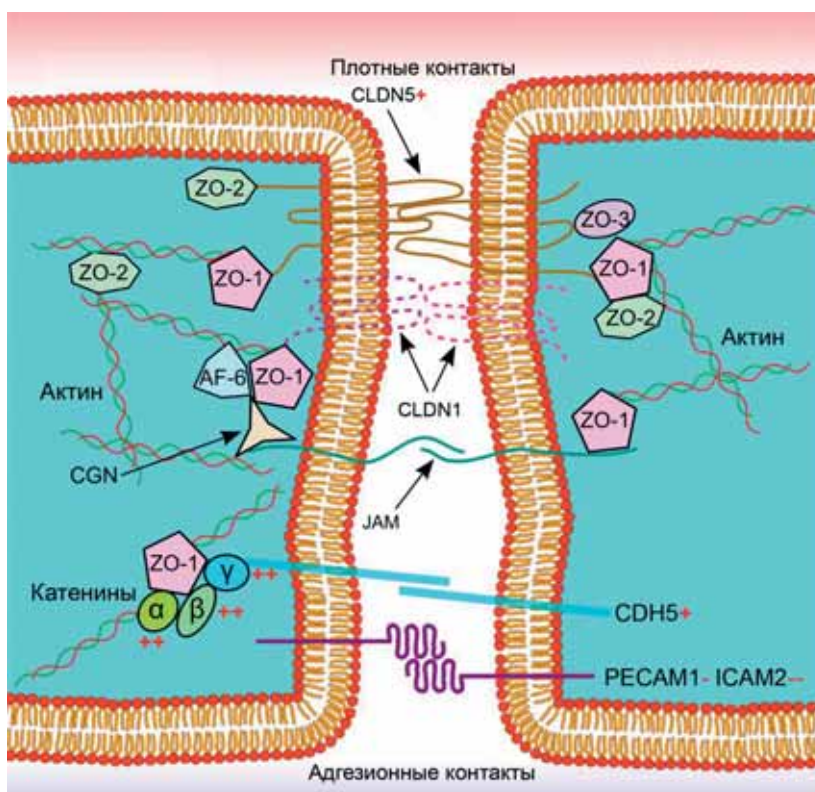


РИС. 3. Архитектура плотных и адгезионных контактов между эндотелиальными клетками

Взаимодействующие петлевые домены молекул клаудина обеспечивают более тесный, чем внеклеточные концевые домены кадгерина контакт между клетками. Цитоплазматические домены клаудина связаны с актиновым цитоскелетом ЭК через адапторные белки ZO-1, ZO-2 и ZO-3, а цитоплазматический домен кадгерина – через катенины β , γ и α , а также ZO-1. Дополнительные связи в области плотных контактов обеспечиваются белком суперсемейства иммуноглобулинов JAM, цитоплазматический домен которого связан с актиновым цитоскелетом через адапторные белки CGN, ZO-1 и AF-6. Молекулы адгезии PECAM1 и ICAM2 в образовании контактов между ЭК не участвуют, но регулируют проникновение лейкоцитов через эндотелий. Красными плюсами показаны гены, экспрессия которых стимулируется MesoEye C71™: + – в 1,5–2 раза, ++ – в 2–5 раз, красными минусами – гены, экспрессия которых уменьшается под действием MesoEye C71™: – – в 1,5–2 раза, -- – в 2–5 раз.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ MESO-EYE C71™: ВЛИЯНИЕ НА СОСТОЯНИЕ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

дотелии кровеносных сосудов повышается под действием VEGFA. Наиболее важным белком адгезионных контактов (adherens junctions) между ЭК является кадгерин 5 (CDH5) (рис. 3). Этот трансмембранный белок обеспечивает кальций-зависимую гомофильную ассоциацию между поверхностью экспрессирующих его клеток. Данный процесс обязателен для образования адгезионных контактов между ЭК и поддержания целостности сосудов. Антитела к кадгерину 5 диссоциируют слои ЭК *in vitro* и индуцируют резкое увеличение проницаемости, сопровождающееся отеками и кровотечениями, *in vivo*. Антитела к другим белкам адгезионных контактов такими выраженными эффектами не обладают. Следовательно, именно кадгерин 5 определяет прочность этих контактов и проницаемость сосудов. Как и другие кадгеринины, он связан с внутриклеточными белками катенинами, что резко повышает его адгезию по отношению к клеткам. Кадгеринины своим С-концом связываются с несколькими белками семейства катенинов: катенином бета-1 (β -catenin/CTNBB1), плакоглобином (plakoglobin/JUP, он же – γ -catenin/CTNNG) и катенином дельта-1 (CTNND1, он же – p120), которые, в свою очередь, соединяются с катенином альфа-1 (α -catenin/CTNNA1). Диссоциация комплексов кадгеринов с катенинами дестабилизирует межклеточные соединения. Молекулы катенина альфа-1 могут связываться одновременно с другими катенинами и актином, тем самым реализуя взаимные влияния межклеточных соединений и актинового цитоскелета. Как уже отмечалось, экспрессия гена VEGFA под действием MesoEye C71™ практически не изменяется. MesoEye C71™ стимулирует экспрессию большинства генов, кодирующих белки адгезионных контактов: CDH5 – в 1,8 раза, CTNBB1 – в 2,4 раза, CTNND1 – в 2,6 раза, JUP – в 3,4 раза. Это

свидетельствует о стабилизации эндотелия и уменьшении проницаемости стенок КС.

Кадгерин 5 не только участвует в образовании адгезионных контактов, он важен и для образования плотных контактов (tight junctions). Стимулирует экспрессию главного компонента плотных контактов клаудина 5 (claudin 5/CLDN5). Уровень экспрессии CLDN5 в разных сосудах напрямую определяет относительное количество плотных контактов и проницаемость их эндотелия. Клаудины пронизывают клеточную мембрану таким образом, что оба конца оказываются в цитоплазме, а средняя часть молекулы – в межклеточном пространстве. Гомофильное взаимодействие между внеклеточными петлевыми доменами клаудинов обеспечивает независимые от катионов кальция и более тесные по сравнению с адгезионными контакты между клетками. В эндотелии плотные контакты на основе CLDN5 не образуют непрерывного барьера, а перемешаны с адгезионными контактами. Их доля максимальна в артериолах, меньше – в капиллярах и еще меньше – в посткапиллярных венулах, что обратно пропорционально коррелирует с проницаемостью эндотелия. Больше всего плотных контактов в эндотелии сосудов мозга, отличающемся наименьшей проницаемостью. Нуль-мутантные по гену CLDN5 мыши погибают от отека мозга сразу после рождения. Экспрессия гена CLDN5 под действием MesoEye C71™ увеличивается в 1,6 раза. Цитоплазматические домены клаудина связаны с актиновым цитоскелетом через адапторные белки ZO-1, ZO-2 и ZO-3 (zonula occludens). В соматических органах проницаемость эндотелия, возможно, зависит также от экспрессии клаудина 1 (CLDN1).

Еще одним компонентом плотных контактов является трансмембранный белок

суперсемейства иммуноглобулинов JAM (junctional adhesion molecule), цитоплазматический домен которого связан с актиновым цитоскелетом через адапторные белки цингулин (CGN), ZO-1 и афадин (AF-6). Ни один из генов, кодирующих перечисленные белки, не изменяет экспрессию под действием препарата. Некоторые компоненты эндотелиальных межклеточных соединений косвенно влияют на их стабильность. Молекулы адгезии, такие как PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1) и ICAM2 (intercellular adhesion molecule 2), присутствуют в межклеточных пространствах эндотелия и способствуют диапедезу лейкоцитов; в формировании межклеточных контактов они, скорее всего, не участвуют. Экспрессия генов PECAM1 и ICAM2 под действием MesoEye C71™ уменьшается соответственно в 1,8 и 3 раза.

Корецептор цитокинов семейства TGF-β эндоглин (endoglin/ENG) играет важную роль в поддержании целостности эндотелия кровеносных сосудов. Мутации ENG приводят к сосудистой дисплазии, частым кровотечениям в различных органах, а нуль-мутантные мыши погибают в середине эмбрионального развития из-за нарушений в развитии сердца и «подтекания» КС. ENG взаимодействует с несколькими белками клеточной адгезии. В монослойных культурах ЭК нуль-мутация ENG в гомозиготной форме увеличивает проницаемость в 3 раза, а в гетерозиготной форме – почти в 2 раза. При этом TGF-β1 и VEGFA не приводят к дополнительному увеличению проницаемости на мутантном фоне. В мутантных клетках повышена экспрессия гена тромбоспондина 1 (thrombospondin 1/THBS1) и его рецепторной тирозин-фосфатазы, дестабилизирующих барьерную функцию эндотелия, и уменьшена экспрессия факторов стабилизации эндотелия VEGFR2 и CDH5. Таким образом, недостаточная экспрессия ENG приводит к дестабилизации и повышению проницаемости эндотелия. MesoEye C71™ увеличивает уровень экспрессии гена ENG в 2,3 раза. Уровень экспрессии гена THBS1 под действием препарата, наоборот, уменьшается в 2,7 раза. Очевидно, в сумме перечисленные эффекты MesoEye C71™ должны кардинально улучшать целостность кровеносных сосудов и уменьшать проницаемость их стенок.

ВЫВОДЫ

Исследование влияния препарата MesoEye C71™ на экспрессию генов, кодирующих функционально важные белки эндотелиальных клеток, показало следующее.

- MesoEye C71™ способствует развитию и поддержанию функциональной целостности КС, стимулируя экспрессию генов артериальной (FOXC2, HEY1 и EFNB2) и венозной (PI3K, NR2F2 и EPHB4) дифференцировки.
- Препарат уменьшает проницаемость эндотелия КС благодаря стимуляции экспрессии генов кадгерина 5 (CDH5), катенина бета-1 (CTNNB1) и катенина дельта-1 (CTNND1).
- MesoEye C71™ оказывает выраженный стабилизирующий эффект на эндотелий КС благодаря стимуляции экспрессии генов главного компонента плотных межклеточных контактов клаудина 5 (CLDN5) и коорецептора цитокинов семейства TGF-β – эндоглина (ENG).
- Средство уменьшает активность генов PECAM1 и ICAM2, способствующих диапедезу лейкоцитов, и гена тромбоспондина 1 (THBS1), дестабилизирующего эндотелий и повышающего проницаемость сосудов.
- MesoEyeC71™ обладает противовоспалительным и спазмолитическим действием, защищает кровеносные сосуды от оксидативного стресса, препятствует агрегации тромбоцитов благодаря стимуляции экспрессии гена гем-оксигеназы 1 (HMOX1) и ингибированию экспрессии гена ангиотензин-превращающего фермента (ACE). Это способствует улучшению локального кровотока.

РЕКОМЕНДУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Freitag F.M. & Cestari T.F. What causes dark circles under the eyes? *J. Cosmet. Dermatol.* 2007, 6, pp. 211–215.
2. Sobel R.K., Carter K.D. & Allen R.C. Periorbital edema: a puzzle no more? *Curr Opin Ophthalmol.* 2012, 23, pp. 405–414.
3. Hansen K.C., Alessandro A.D., Clement C.C. & Santambrogio L. Lymph formation, composition and circulation: a proteomics perspective. *Internat Immunol.* 2015, 27, pp. 219–227.
4. Corada M., Morini M.F. & Dejana E. Signaling pathways in the specification of arteries and veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014, 34, pp. 2372–2377.
5. Loboda A., Jazwa A., Grochot-Przeczek A. et al. Heme oxygenase-1 and the vascular bed: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxidants Redox Signaling.* 2008, 10, pp. 1767–1812.
6. Vestweber D., Winderlich M., Cagna G. & Nottebaum A.F. Cell adhesion dynamics at endothelial junctions: VE-cadherin as a major player. *Trends Cell Biol.* 2009, 19, pp. 8–15.
7. Orsenigo F., Giampietro C., Ferrari A. et al. Phosphorylation of VE-cadherin is modulated by haemodynamic forces and contributes to the regulation of vascular permeability in vivo. *Nature Commun.* 2012.
8. Kluger M.S., Clark P.R., Tellides G. et al. Claudin-5 controls intercellular barriers of human dermal microvascular but not human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013, 33, pp. 489–500.
9. Dejana E. & Orsenigo F. Endothelial adherens junctions at a glance. *J. Cell Sci.* 2013, 126, pp. 2545–2549.
10. Jerkic M. & Letarte M. Increased endothelial cell permeability in endoglin-deficient cells. *FASEB J.* 2015, 29, pp. 3678–3688.