

В.Н. Залесский¹О.Б. Дынник²

¹Национальный научный центр «Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско»

²Медицинское научно-практическое объединение «Медстрой», Киев

Ключевые слова:

микрочастицы, кровь, синовиальная жидкость, ревматические заболевания, патогенез.

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ РОЛЬ МИКРОЧАСТИЦ КЛЕТОК КРОВИ И СИНОВИАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Резюме. Представлен анализ современных данных о роли микрочастиц клеток крови и синовиальной жидкости в патогенезе ревматических заболеваний. Являясь продуктами клеточных процессов, микрочастицы выступают в качестве сравнительно новых элементов регуляторных каскадов внутриклеточной сигнализации и межклеточного взаимодействия в процессе воспаления при ревматических заболеваниях, а также важного фактора прогрессирования.

ВВЕДЕНИЕ

Микрочастицы — гетерогенная популяция покрытых оболочкой везикул микроскопических размеров, включающих субклеточные белковые молекулы, участвующие в процессах внутриклеточной сигнализации и межклеточного взаимодействия при воспалении. Микрочастицы могут высвобождаться в межклеточное пространство практически всеми типами клеток после их активации или гибели вследствие апоптоза, а в зависимости от места их образования могут различаться биохимическим составом и биологическими свойствами (Abid M. N. et al., 2003; VanWijk M.J. et al., 2003; Brogan P.A. et al., 2004). Стимулами, инициирующими выход микрочастиц из клеток в повышенных количествах, являясь ионы кальция, внутриклеточная концентрация которых приводит к перегруппировке структур цитоскелета и последующему отрыву микрочастиц от плазматической мембраны (Salzer U. et al., 2002).

При изучении особенностей микрочастиц на уровне различных систем *in vitro* установлена их потенциально важная роль в качестве медиаторов межклеточного взаимодействия (Abid M. N. et al., 2003). Оказалось, что эти субклеточные структуры могут выполнять функцию транспортеров биологически активных молекул между клетками, наряду с участием в регуляции различных процессов, в частности воспаления, гемокоагуляции, сосудистых реакций, апоптоза и клеточной пролиферации (Abid M. N. et al., 2003; Distler J.H. et al., 2005a). В рамках затронутых проблем микрочастицы являются важнейшими звеньями патогенеза ревматических заболеваний, в том числе ревматоидного артрита, системных васкулитов, а также антифосфолипидного синдрома (Brogan P.A. et al., 2004; Bergckmans R.J. et al., 2005).

Первые сведения о микрочастицах, называемых также микровезикулами, появились в 1967 г., когда P. Wolf описал присутствие фрагментов тромбоцитов в плазме крови человека. Автор отметил

сравнительно небольшие размеры микрочастиц и наличие окружающей их мембраны. Долгое время микрочастицы рассматривали как продукты активации тромбоцитов, в связи с чем они получили название тромбоцитарные частицы (platelet dusts). Однако оказалось, что микрочастицы являются не инертной анатомической частью клетки, их продуцирующей, но обладают определенной биологической активностью, в частности при тромбообразовании (Hoffman M. et al., 1992).

Наряду с тромбоцитами многие другие клетки отличаются способностью к высвобождению микрочастиц, в том числе — макрофаги, моноциты, Т- и В-клетки, нейтрофильные гранулоциты, эритроциты, клетки эндотелия, гладкомышечные клетки, эпителиоциты и клетки опухолевых линий. Эта «вездесущность» лишь только подтвердила их более глобальную роль в фундаментальных механизмах межклеточной регуляции по сравнению с влиянием на локальное микротромбообразование (Freyssinet J.M., 2003). Обладая крайне малыми размерами с диаметром 0,1–1 мкм (200–700 нм перед выходом из клетки), они имеют хорошо контрастируемый цитомембранный слой электронно-плотного материала, хорошо видимого под электронным микроскопом. Также отмечено образование микрочастиц в результате отрыва от клеточной мембраны при апоптозе или в результате экзоцитоза, с потерей симметрической структуры мембранных липидов родительской клетки. Появление фосфатидилерина на внешней поверхности мембраны микрочастиц зарегистрировано с помощью присоединения к нему аннексина V (индикация апоптоза), который в настоящее время широко используется в качестве молекулярной метки (Залесский В.Н. и соавт., 2004), в частности с целью идентификации и количественного определения микрочастиц из апоптирующих клеток. Современные методы разделения микрочастиц основаны на использовании протеомного анализа (Дынник О.Б., Залесский В.Н., 2006; Залесский В.Н., Дынник О.Б.,

2005; 2006а, б) экспрессии белковых маркеров методом спектроцитометрии в потоке, а также с помощью традиционного дифференциального центрифугирования.

Одной из причин выхода микрочастиц из клеток является апоптоз, при развитии которого микрочастицы существенно отличаются от апоптотических телец. Апоптоззависимое сморщивание клетки, внутриядерная конденсация хроматина способствуют образованию «вздутый» участков клеточной мембраны (Colemann M. et al., 2001). Развитие апоптоза завершается фрагментацией и образованием апоптотических телец клетки. В отличие от микрочастиц, которые покидают клетку на ранних стадиях апоптоза, формирование апоптотических телец происходит на конечной стадии программируемой клеточной гибели.

Микрочастицы имеют отличительные особенности от экзосом — везикул, покидающих спонтанно эукариотические клетки, или в результате их активации. Экзосомы образуются внутриклеточно из мультивезикулярных телец и выходят в межклеточное пространство в результате слияния мультивезикулярных телец с мембраной клетки (Denzer K. et al., 2000; Gasser O. et al., 2003). Хотя экзосомы образуются внутри клетки, они могут быть функционально активны. Так, экзосомы из В-клеток после присоединения к фолликулярным дендритным клеткам функционировали в качестве антигенов, а в сочетании с цитотоксическими Т-лимфоцитами вызывали гибель клеток-мишеней (Monleon I. et al., 2001). Они могут фиксироваться на поверхности липидного слоя мембраны (при этом диаметр везикул достигает 50–100 нм), а также присоединяться к поверхностным рецепторам Т-клеток человека (Blancherd N. et al., 2002).

Известна еще одна форма, характеризующая процесс выхода везикул из клетки, — эктосома (Gasser O. et al., 2003). Авторы связывают экспрессию эктоцитоза (*expression ectocytosis*) с процессом высвобождения микровезикул и последующим наружно-продольным ориентированным (*right-side-out*) продвижением. Большинство микрочастиц, вышедших из моноцитов, нейтрофильных гранулоцитов, тромбоцитов и фибробластов корреспондируются именно с этой формой везикул. В то же время терминологически микрочастицы и эктосомы не являются синонимами, о чем свидетельствуют их структурные и функциональные различия (Gasser O. et al., 2003).

В последние десятилетия получили развитие исследования, подтвердившие существенную роль микрочастиц в процессах тромбообразования. Открылись более широкие их функциональные возможности: от инертных мелких клеточных «обломков» до клеточных регуляторов основных звеньев патогенеза многих воспалительных заболеваний (van Wijk M.J. et al., 2003; Distler J.H. et al., 2005b). Результаты начальных исследований процесса тромбообразования *in vitro* свидетельствуют о том, что микрочастицы промотируют коагуляцию (Hoffman M. et al., 1992). Этот эффект

обусловлен способностью микрочастиц локализовывать поверхностный отрицательный заряд для присоединения факторов коагуляции, а также участвовать в перераспределении мембранно-ассоциированного тканевого фактора плазмы крови (Schechter A.D. et al., 2000; Joop K. et al., 2001) и индукции высвобождения тканевого фактора моноцитами (Sabatier F. et al., 2002). Отмечено влияние микрочастиц на регуляцию сосудистого кровотока. Так, в условиях *in vivo* микрочастицы модулировали (дилатация-релаксация) тонус мезентериальных сосудов с помощью понижения экспрессии NO-синтазы и сверхэкспрессии кавеолина (Martin S. et al., 2004). Подобным образом тромбоцитассоциированные микрочастицы могли повышать экспрессию циклооксигеназы (ЦОГ)-2 в клетках сосудистого эндотелия и тем самым усиливать вазодилатирующий эффект через повышение продукции простагландинов (Barry O.P. et al., 1998).

В качестве комплексных транспортерных структур иммунологически активных молекул микрочастицы регистрировали в повышенных количествах при возникновении таких патологических состояний, как острый коронарный синдром (Bernal-Mizrachi L. et al., 2003), сепсис (Nieuwland R. et al., 2000), системное воспаление (Ogura H. et al., 2001), множественный склероз (Larkin M., 2001). Отмечена важная роль микрочастиц в патогенезе ревматических заболеваний, в том числе ревматоидного артрита (Berckmans R.J. et al., 2002), системного васкулита (Brogan P.A. et al., 2004) и антифосфолипидного синдрома (Combes V. et al., 1999).

Данное аналитическое исследование включает рассмотрение круга вопросов, связанных с молекулярными механизмами влияния микрочастиц крови и синовиальной жидкости на функциональное состояние каскадов внутриклеточной сигнализации и межклеточного взаимодействия в процессе воспаления у больных с прогрессирующими ревматическими заболеваниями.

СОВРЕМЕННЫЕ МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ ОСНОВЫ МИКРОВЕЗИКУЛООБРАЗОВАНИЯ

Образование и последующий выход микрочастиц во внеклеточное пространство происходит в результате апоптотической гибели клетки или ее активации. Активное высвобождение микрочастиц из клеток отмечают после их стимуляции *in vitro* различными провоспалительными агентами, такими как: цитокины — фактор некроза опухоли (TNF)- α или интерлейкин (IL)-1; также после стимуляции химическими соединениями: форболовый эфир, конамицин, конканавалин А и др. (van Wijk M.J. et al., 2003; Distler J.H. et al., 2005a). Образование микрочастиц является результатом процесса реорганизации структуры цитоскелета (Mills J.C. et al., 1998; Colemann M. et al., 2001; Freyssinet J.M., 2003; van Wijk M.J. et al., 2003).

J.C. Mills и соавторы (1998) продемонстрировали интенсивное фосфорилирование молекул фермента

миозин L-С-киназы (MLCK) в процессе выпячивания мембраны апоптотически измененных (линия PC 12) клеток мышинной феохромоцитомы. В процессе апоптоза роль MLCK-фосфорилирования оказалась достаточно существенной для образования микро-частиц, что подтвердили наблюдения о блокаде высвобождения микро-частиц при использовании ингибиторов MLCK, в частности — KT5926, ML-7 и ML-9 (Mills J.C. et al., 1998). M. Colemann и соавторы (2001) идентифицировали Rho-ассоциированную киназу-1 (ROCK-1) в качестве ключевого фермента сигнального Rho-каскада, который активируется MLCK-фосфорилированием и инициирует процесс высвобождения микро-частиц. Отмечен вклад каспаз в активацию ROCK-1 и установлено, что выход микро-частиц из клетки можно заблокировать панкаспазным ингибитором z-VAD-fruk.

В ряде исследований (Nieminen A.L. et al., 1988; Miyoshi H. et al., 1996;) продемонстрирован кальцийзависимый механизм выхода микро-частиц из клетки, подтвержденный при использовании блокирующих его хелатных комплексов, в частности EGTA. Следует отметить, что концентрация кальция в зоне везикулообразования оказалась существенно выше по сравнению с соседними участками. Данный эффект локального повышения уровня внутриклеточного кальция был изучен на гепатоцитах, обработанных гидропероксидом (Nieminen A.L. et al., 1988). В результате электронно-микроскопических исследований выявлены признаки диссоциации плазматической мембраны в зоне везикулообразования, что свидетельствует о деградации белков цитоскелета, в частности талина и α -актинина в участках их присоединения к плазматической мембране гепатоцита в результате действия гидропероксида.

Сравнительно подробно изучена роль фермента — кальпаин μ -кальцийзависимой цитозольной протеазы, расщепляющего талин и α -актинин (Fox J.E. et al., 1985). В исследовании (Miyoshi H. et al., 1996) установлено некоторое запаздывание процесса везикулообразования при его кальпаин- μ -зависимой активации, что, по мнению авторов, может быть связано либо с процессом хелат-кальциевого взаимодействия, либо с действием кальпептина, предупреждающего деградацию талина и α -актинина и соответственно высвобождение частиц из клетки. В тромбоцитах гликопротеин IIb-IIIa также связывают с процессом выхода микро-частиц (Gemmel C. et al., 1993), что подтверждается возможностью его редукции с помощью блокирующих антител к гликопротеину IIb-IIIa и его лиганду RGDS.

Установлено (Jimenez J.J. et al., 2003), что клетки сосудистого эндотелия способны к высвобождению фенотипически различных микро-частиц при стимуляции этого процесса с помощью TNF- α по сравнению с апоптозом, характеризующимся фенотипически сходным белковым составом микро-частиц. Аналогично этому конститутивно экспрессируемые клеточные маркеры (CD-31, CD-105) преимущественно проявлялись на микро-частицах апоптотических эндотелиоцитов, что подтверждалось

более интенсивной окраской этих микро-частиц анексином по сравнению с микро-частицами, вышедшими из TNF- α -обработанных клеток эндотелия. Эти данные могут свидетельствовать о значительной гетерогенности структуры микро-частиц, выходящих из клеток одного и того же вида, несмотря на их подобие.

Известно, что оболочка микро-частиц является производной плазматической мембраны клетки и состоит преимущественно из липидов и протеинов. В зависимости от типа клеток и механизма везикулообразования состав микро-частиц варьирует. В процессе выпячивания участка клеточной мембраны в зоне везикулообразования отмечена асимметрия расположения ее фосфолипидов. Данные анализа компонентов микро-частиц, выделенных из периферической крови здоровых доноров, свидетельствуют о том, что фосфолипидный состав микро-частиц включает около 60% липидов (Weerheim A. et al., 2002), из них 30% составляют сфингомиелин и фосфатидилэтаноламин. Содержание фосфатидиларгина, фосфатидилинозитола, лизофосфатидилхолина, лизофосфатидиларгина, лизофосфатидилэтаноламина выявлено в следовых количествах. В крови здоровых доноров около 75% микро-частиц — производные тромбоцитов. Однако состав оболочки микро-частиц отличается от компонентов структуры мембраны тромбоцитов. Так, в составе мембраны тромбоцитов содержание фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина составляет 30 и 35% общего содержания липидов соответственно (Weerheim A. et al., 2002). При этом лизолипиды не выявлены.

В изолированных микро-частицах из синовиальной жидкости больных артритом выявлены фосфатидилхолин, сфингомиелин, фосфатидилэтаноламин и лизолипид в количестве 20–25% общего содержания липидов каждый, в то время как фосфатидиларгин — в следовых количествах (Fonzcade O. et al., 1995). Дальнейшее использование биоаналитических (протеомных) методов определения липидного состава микро-частиц позволило выявить различное содержание липидных компонентов в зависимости от типа клеток-везикулопродукторов. По сравнению с микро-частицами, выделенными из крови, значительное количество микровезикул, присутствующих в синовиальной жидкости пациентов с артритами в активной фазе, оказалось производными клеток воспаления; в этих образцах синовиальной жидкости тромбоцитарные микро-частицы выявлены в крайне малом количестве (Berckmans R.J. et al., 2002). Альтернативным объяснением различного состава микро-частиц, по мнению авторов, могло служить то, что субстрат воспаления в области артритически измененных суставов является триггером высвобождения микро-частиц с различным липидным составом их оболочек, несмотря на происхождение микровезикул от одного и того же типа клеток.

На своей поверхности микро-частицы несут поверхностные антигены своих «родительских» клеток. По существу эти антигены позволяют идентифицировать тип клеток-родителей, в частности

CD42 α -тромбоцитов, или CD3-T-клеток (Distler J.H. et al., 2005b). Однако микрочастицы также различаются по экспрессии молекул на поверхности клеток-родителей. Анализ этих феноменов был детально проведен в отношении эритроцитов. Микрочастицы, высвобождающиеся из эритроцитов, в ответ на действие ионов кальция и кофеина A23187, оказались насыщенными гликозилфосфатидилинозитолсвязанными протеинами, в частности ацетилхолинэстеразой и деструктивным фактором акселерации (DFA — decay accelerating factor) (Butikofer P. et al., 1989). Эритроцитарные микрочастицы содержали мембраносвязанный белок стоматин, а также белки синоксин и сорцин, которые отличались способностью к кальцийзависимой транслокации из цитозоля в клеточную мембрану (Salzer U. et al., 2002). К тому же экспрессия поверхностных молекул на микрочастицах существенно изменялась в зависимости от стадии активации, а также от поверхностной концентрации молекул эндотелиальной адгезии-1 на тромбоцитах и E-селектина, содержание которого на микрочастицах было достоверно выше по сравнению с клетками эндотелия в контроле (Abid M. N. et al., 2003).

Микрочастицы участвуют в процессе транспортировки рецепторов клеточной поверхности между клетками. В результате такого переноса рецепторы интегрируются в клеточную мембрану клеток, подготавливая этим их мембрану для восприятия новых биологических стимулов. Оказалось, что горизонтальный (вдоль клеточной мембраны) перенос микрочастиц играет важную роль в патогенезе вирусных иммунодефицитных (HIV) состояний у человека. Так, в работе М. Маск и соавторов (2000) отмечена возможность высвобождения CCR5-белка из микрочастиц-транспортеров у поверхности клеток китайского хомячка в культуре, а также мононуклеаров периферической крови (PBMCs) и экспрессирования на их поверхности. После коинкубации CCR5-5+микрочастицы с CCR5+PBMCs, а также с моноцитами, или Т-клетками, CCR5-белок удалось зарегистрировать на клеточной поверхности методом флуоресцентного анализа в проточной кювете. Стимуляция CCR5-рецептора и его лиганда (RANTES CCL5) тормозила перенос CCR5-белка макрофагами, подтверждая этим возможность функциональной интеграции его в мембрану. После переноса CCR5 макрофагами отмечено CCR5-PBMCs-зависимое инфицирование макрофагов при HIV-инфекции, которое авторы связывают с известной ролью CCR5-белка в качестве рецепторной молекулы (Mask M. et al., 2000).

Наряду с полученными результатами исследований геометрии распределения белковых рецепторных молекул на поверхности микрочастиц существуют данные относительно внутриклеточной их локализации. Так, С. They и соавторы (2001) установили локализацию ядерных белков-гистонов внутри везикул, высвободившихся из дендритных клеток. Микрочастицы из моноцитарных (линия THP-1) клеток после активации их АТР-рецептора

(P2X7) накапливали белок IL-1 β (MacKenzie A. et al., 2001). Основывая свои предположения на различных механизмах микровезикулообразования, авторы отметили возможность внутривезикулярного представительства как цитозольных, так и ядерных белков. Эти молекулы в целом определяют уровень биологической активности микрочастиц, что до настоящего времени в рамках оценки протеомного профиля микровезикул изучено недостаточно.

Однако более подробно исследована роль микрочастиц в качестве внутриклеточных транспортеров. Так, О.Р. Barry и соавторы (1999) изучали альтернативные изменения функциональной активности клеток, механизмы их влияния на трансцеллюлярный метаболизм липидов. В этом исследовании тромбоцитарные микрочастицы стимулировали экспрессию ЦОГ-2 и продукцию простагландинов на поверхности клеток эндотелия. Результаты анализа данных свидетельствуют о том, что фракция жирных кислот отмечалась высокой чувствительностью к микровезикулярной стимуляции. В частности, процесс стимуляции удавалось проводить *in vitro* с помощью арахидоновой кислоты, выделенной из тромбоцитарных микрочастиц.

РОЛЬ МИКРОЧАСТИЦ В ПАТОГЕНЕЗЕ РЕВМАТИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В исследованиях *in vitro* выявлена существенная роль микрочастиц с провоспалительной активностью в патогенезе ревматических заболеваний. Тромбоцитарные микрочастицы промотируют адгезию и прокатывание (rolling) лейкоцитов, содержащих провоспалительные цитокины, по внутренней поверхности сосуда, а также инициируют процесс высвобождения микровезикул из различных типов клеток *in vitro* (Aupaix K., et al., 1997; Nieuwland R. et al., 2000; Minagar A. et al., 2001; Knijff-Dutmer E.A. et al., 2002).

Подобно апоптотизирующим клеткам, микрочастицы инициируют реакцию воспаления, активируя внутриклеточный сигнальный каскад комплемента. Выявлены комплексы белковых компонентов сигнального C1q-каскада комплемента, присоединенного к микрочастицам, высвобождающимся из апоптотизирующих клеток Jurkat (Nanta A.J. et al., 2002). Компоненты сигнального C1q-каскада, присоединенные к микрочастицам, активируют пути регуляции комплемента в клетке, что подтверждается локализацией его рецепторных фрагментов (C3 и C4) на поверхности микрочастиц. Подтверждения этим данным *in vivo* получены с помощью выявления популяции людей с C1q-положительными микрочастицами в плазме крови. Именно раннее установление рецепторных фрагментов на поверхности микрочастиц позволило отметить триггерную роль активации провоспалительных реакций в запуске внутриклеточного сигнального каскада комплемента (Nanta A.J. et al., 2002).

В процессе присоединения к клеткам тромбоцитарные микрочастицы могут активировать процесс взаимодействия между нейтрофильными гранулоцитами, в том числе и локализованными на

эндотелиоцитарной поверхности, контактирующей с кровотоком (Forlow S.B. et al., 2000). В этих экспериментах, даже в случае блокировании эффектов L-селектина, тромбоцитарные микрочастицы инициировали агрегацию нейтрофильных гранулоцитов и их адгезию к эндотелию. Тромбоцитарные микрочастицы промотируют формирование межклеточных контактов, индуцированных молекулами адгезии, и способствуют развитию провоспалительных реакций (Forlow S.B. et al., 2000).

Наряду с тромбоцитарными микрочастицами микровезикулы, высвобождающиеся из других типов клеток, также отмечаются провоспалительной активностью. Так, микрочастицы, вышедшие из f-MLP-стимулированных полиморфонуклеаров, индуцировали экспрессию IL-6 и моноцитарный белок хемоаттаксиса 1 (MCP-1) на клетках эндотелия (Mesri M., Alteri D.C., 1999). В тоже время отмечено, что уровни TNF- α , IL-1 β и тромбоцитсвязанного фактора роста оставались неизменными при условии признаков неспецифической активации. Данные анализа молекулярных механизмов этой стимуляции свидетельствуют о том, что блокирующие антитела к молекулам адгезии (β -2-интегрин, ICAM-1) или к TNF- α не редуцировали индукцию IL-6 и MCP-1. Микрочастицы также не активировали NF- κ B или ERK-1 сигнальные пути в клетках эндотелия. Однако не выявлена поддержка регулировки процесса тирозинфосфорилирования JNK-1 после стимуляции микрочастицами полиморфонуклеарных клеток (Mesri M., Alteri D.C., 1999). Отметим, что данные, полученные O. Gasser и J.A. Schifferli (2004), подтверждают гипотезу о том, что микрочастицы могут при определенных условиях проявлять противовоспалительную активность. В этих экспериментах микрочастицы, вышедшие из f-MLP-стимулированных полиморфонуклеаров, тормозили экспрессию противовоспалительного цитокина TGF (трансформирующий фактор роста β_1) на поверхности макрофагов (Gasser O., Schifferli J.A., 2004). В противоположность этому выход провоспалительных цитокинов TNF- α IL-8 и IL-10, индуцированный зимозаном или хипополисахаридом, подвержен дозозависимой редукции, инициированной микрочастицами. В то же время блокирование связывания фосфатидиларгина на поверхности микрочастиц, с его рецепторами на макрофагах, тормозило высвобождение TNF- α , но не других цитокинов. Однако нейтрализующие антитела к TGF- β блокировали высвобождение TNF- α , IL-8 и IL-10, что подтверждало противовоспалительный эффект микрочастиц, контролируемый вторичным медиатором, — TGF- β (Gasser O., Schifferli J.A., 2004).

Известна особенность микрочастиц вызывать противовоспалительные эффекты при индукции апоптоза иммунокомпетентных клеток. K. Joop и соавторы (2001) установили, что иммунокомпетентные клетки могут высвобождать микрочастицы, несущие на своей поверхности Fas лиганд. И наоборот, растворимые молекулы Fas лиганда, являющиеся исходно слабыми медиаторами цито-

токсичности, в результате их транслокации на поверхности микрочастиц становятся по своей биологической эффективности сравнимыми с клеточным Fas лигандом, способствующим гибели как В-, так и Т-клеток. Оказалось, что микрочастицы, вышедшие из Т-клеток, индуцируют апоптоз макрофагов (линия RAW 264.7) и тем самым триггеризируют высвобождение микрочастиц погибающих (dying) макрофагов (Distler J.H. et al., 2005a), что позволяет в будущем надеяться на более избирательный контроль микрочастицами механизмов управления воспалительной реакцией.

Потенциальная роль микрочастиц в развитии ревматических заболеваний впервые отмечена V. Combes и соавторами (1999) при изучении механизмов внутрисосудистого тромбообразования. Авторы зарегистрировали уменьшение времени микротромбообразования при выходе микрочастиц из TNF- α -стимулированных клеток сосудистого эндотелия человека. При отсутствии стимулирующих влияний время микротромбообразования уменьшалось до 20%. В условиях использования фактора VII плазмы крови получено лишь незначительное уменьшение времени микротромбообразования после высвобождения эндотелиальных микрочастиц, что свидетельствовало о прокоагулянтной активности эндотелиоцитассоциированных микровезикул, связанной главным образом с процессом внутриклеточного микровезикулообразования (Combes V. et al., 1999).

Е.А. Knijff-Dutmer и соавторы (2002) отметили достоверное увеличение выхода микрочастиц из тромбоцитов в кровотоке у больных ревматоидным артритом. Количество тромбоцитарных микрочастиц было более высоким в активной фазе заболевания, чем в фазе ремиссии, а также зависело от количества вовлеченных в процесс суставов. Однако корреляция отсутствовала между количеством микрочастиц и уровнем С-реактивного белка, а также степенью седиментации эритроцитов.

Корреляционная взаимосвязь между количеством микрочастиц и фазой активности заболевания не установлена в работе R.J. Berckmans и соавторов (2002). Авторы не отметили увеличения количества микрочастиц, вышедших из тромбоцитов, у больных ревматоидным артритом по сравнению с контролем и предположили, что это было связано с несовершенным дизайном исследования — отсутствием групп сравнения пациентов по количеству суставов, вовлеченных в воспалительный процесс. Хотя обе группы авторов (Berckmans R.J. et al., 2002; Knijff-Dutmer E.A. et al., 2002) использовали одни и те же методы выявления и выделения микрочастиц, а также один и тот же поверхностный антиген (глокопротеин IIIa), межгрупповые различия все же привели к выявлению дискордантных результатов. Эти различия могли быть обусловлены различной длительностью заболеваний у больных ревматоидным артритом. К тому же сравнение степени седиментации эритроцитов и средних значений количества набухших и спокойных суставов, а также количества больных, получавших

антиревматические лекарственные препараты в двух стадиях исследований, свидетельствовало о том, что активность ревматического процесса у пациентов с ревматоидным артритом была более высокой (Knijff-Dutmer E.A. et al., 2002).

Анализ данных количества микрочастиц, вышедших из других типов клеток периферической крови, свидетельствовал об отсутствии различий между уровнями содержания Т- и В-клеточных микровезикул, а также — моноцитарных, гранулоцитарных и эритроцитарных микрочастиц у пациентов с различными формами артритов по сравнению со здоровыми добровольцами в контроле (Berckmans R.J. et al., 2002). Тем не менее, авторы зарегистрировали повышенное содержание микрочастиц в синовиальной жидкости больных с различными формами артритов. В этих исследованиях большое (>40%) количество микрочастиц имело макрофагальную природу, в то время как только незначительное их число имело Т-клеточную и гранулоцитарную принадлежность (20–25% каждой клеточной линии). В-клеточные, тромбоцитарные и эритроцитарные микрочастицы присутствовали в синовиальной жидкости только в незначительных (<10%) количествах (Berckmans R.J. et al., 2002). Тканевый фактор, находящийся на поверхности микрочастиц, также был выявлен в синовиальной жидкости вместе с микрочастицами индуцируемой генерацией тромбина, который обуславливал процесс фактор VII-зависимого механизма у некоторых пациентов с ревматоидным артритом. Эти данные подтверждали активное участие микрочастиц в отложении фибрина в суставах, хотя его уровни, по мнению авторов, в периферической крови могли быть невысокими.

Другой особенностью микровезикулярной активности у больных ревматоидным артритом явился биостимулирующий эффект микрочастиц на фибробласты (Distler J.H. et al., 2005b). Проведенная оценка влияния моноцитарных и Т-клеточных микрочастиц на фибробласты синовиальной жидкости свидетельствовала об (~80-кратной) индукции дозозависимого синтеза матриксной металлопротеиназы (MMP)-1, MMP-3, MMP-9 и т-РНК микрочастицами от обоих типов клеток. Причем этот процесс не являлся следствием неспецифической активации, так как не выявлена индукция синтеза следующих молекул: MMP-2, MMP-14 катепсина К, тканевого ингибитора металлопротеиназы (TIMP)-1, TIMP-2 или TIMP-3. Микрочастицы стимулируют синтез не только матриксных металлопротеиназ, но и противовоспалительных цитокинов (IL-6, IL-8, MCP-1 и MCP-2) синовиоцитами синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом (Berckmans R.J. et al., 2005). Эти цитокины могли вовлекать в процесс большее количество клеток воспаления и тем самым активировать его течение в суставах, что в свою очередь усиливало процесс еще большего высвобождения микровезикулярных структур в синовиальную жидкость.

На основании модифицированного сценария патогенеза ревматоидного артрита, предложенного

J.H. Distler и соавторами (2005b), отмечена способность микрочастиц запускать провоспалительный процесс в тканях, окружающих больной сустав, а также участвовать в процессах костной деструкции и разрушения хрящевой ткани. Оптимизированный механизм позволил детализировать роль NF-κB в данном процессе. На основании использования процедуры IκB-трансфецирования фибробластов продемонстрирована роль NF-κB-зависимых сигнальных каскадов в индукции процесса стимуляции MMP5-синтеза микрочастицами синовиальной жидкости. Отметим, что нейтрализующие антитела против TNF-α, растворимый TNF-рецептор, а также антагонист IL-1-рецептора не способны редуцировать индукцию процесса стимуляции синтеза MMP-5 микрочастицами, что подтвердило предположения о том, что активация фибробластов синовиальной жидкости микрочастицами возможна независимо от участия TNF-α и IL-1. Предполагаемая роль микрочастиц в качестве суставных эффекторных комплексов не только делает, по мнению авторов, возможной стимуляцию биосинтеза матриксных металлопротеиназ и цитокинов, но и оптимизирует процесс резистентности больных с ревматическими заболеваниями к действию биологических модуляторов воспаления (цитокинов), в частности TNF-α и IL-1.

Однако полученными данными проблема изучения механизмов стимулирующего действия микрочастиц не ограничена. В то время, как одни микрочастицы обладают функцией связывания (эффektorная реакция), другие (пока еще малоизученные) способны активировать поверхностные рецепторы, участвующие в транспорте биоактивных молекул через мембрану или интернализации их в цитозоль. Так как в составе микрочастиц выявлены молекулы нуклеиновых кислот и отдельные фракции ядерных белков-гистонов (Distler J.H. et al. 2005a), возможно, что рецепторы ядерной мембраны так же могут быть вовлеченными в процесс биостимуляции. Активация NF-κB находится в соответствии с биостимулирующим действием микрочастиц, однако будущие исследования должны показать, какие микрочастицы и от каких клеток активируют фибробласты, а также какие клетки могут выполнять функцию клеток-мишеней при стимулирующем действии.

Результаты сравнения микрочастиц в крови у подростков с системным васкулитом с количеством микрочастиц в крови пациентов с некоторыми ревматическими заболеваниями и в контроле свидетельствуют о том, что у основной массы больных с васкулитами, болезнью Кавасаки или узелковой формой панартериита (кроме немногих пациентов с полиангиитом и гранулематозом Вагенера) по сравнению с контролем отмечен высокий уровень эндотелийассоциированных микрочастиц, позитивных по E-селектину или эндоглину, но не позитивных для ICAM-1. Отсутствие различий отмечено только между больными васкулитами различных групп. Причем отмечен высокий уровень содержания в крови не только эндотелиальных, но и тром-

боцитарных микрочастиц, а также высокий уровень частиц обоих видов. Достоверная положительная корреляция согласно Бирмингемской шкале активности васкулита отмечена между количеством эндотелиальных микрочастиц, общим уровнем их содержания в крови, а также уровнем маркерных белков-реактантов острой фазы воспаления, в частности С-реактивного белка и степенью седиментации эритроцитов (Distler J.H., et al., 2005b).

Имеющиеся в литературе данные свидетельствуют о том, что повышение уровня микрочастиц в периферической крови и синовиальной жидкости регистрируют у большинства пациентов с ревматическими заболеваниями и что микрочастицы являются важным звеном их патогенеза, оказывая постоянное воздействие на микрососудистую сеть в области пораженных суставов. Поскольку процессы клеточной гибели и клеточной активации — достаточно частые события в зоне суставного воспаления, микрочастицы, выходя из клеток и взаимодействуя в дальнейшем с ними, еще больше стимулируют воспалительный процесс после инкорпорирования в структуру этих клеток. При этом Т-клеточная активация лидирует в процессе биостимуляции воспаления микрочастицами по сравнению с активацией фибробластов. Также, вероятно, существенную роль играют иммуносупрессивные реакции в результате того, что некоторые типы микрочастиц могут формировать апоптотный сценарий клеточной гибели. Аналогично эффектам цитокинов активация микрочастиц может зависеть как от клеточного микроокружения, так и от баланса активности, возникающего в результате межклеточного взаимодействия различных типов клеток.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного анализа роли микрочастиц клеток крови и синовиальной жидкости в патогенезе ревматических заболеваний отмечено участие новых сигнальных комплексов (мембраносвязанных микрочастиц, биомолекул клеточной поверхности), генерируемых как в процессах клеточной гибели (апоптоз), так и клеточной активации, в развитии фундаментальных процессов воспаления. Микрочастицы могут индуцировать процессы локального и системного воспаления, а также потенцировать процесс повреждения окружающих ревматический очаг тканей. На своей поверхности микрочастицы содержат потенциально важные маркерные молекулы для разработки более селективных антиревматических препаратов в будущем. Являясь продуктами внутриклеточных процессов, микрочастицы появляются в качестве сравнительно новых элементов сигнальных каскадов в клетке и межклеточного взаимодействия в процессах воспаления при ревматических заболеваниях, а также рассматриваются как важный фактор их прогрессирования.

Выходя из Т-клеток и макрофагов, микрочастицы стимулируют дозозависимое высвобождение провоспалительных цитокинов из фибробластов синовиальной жидкости у больных ревматоид-

ным артритом. Эти и другие цитокины в области суставов способствуют активации мононуклеаров и стимуляции высвобождения новых микрочастиц. Последние могут в дальнейшем усиливать биосинтез цитокинов фибробластами синовиальной жидкости. Микрочастицы, покинувшие Т-клетки и макрофаги, также стимулируют экспрессию матриксных металлопротеиназ на поверхности фибробластов синовиальной жидкости. Поэтому микрочастицы могут вовлекать в процесс соседние участки, расширяя очаг воспаления и способствовать деструкции хрящевой и костной тканей у больных ревматоидным артритом.

ЛИТЕРАТУРА

- Дынник О.Б., Залесский В.Н.** (2006) Современные биоаналитические (протеомные) технологии в лабораторной диагностике ревматических заболеваний. Укр. ревматол. журн., 2: 17–24.
- Залесский В.Н., Фильченков А.А., Дынник О.Б.** (2004) Методы визуализации апоптоза. Журн. АМН Украины, 10(2): 326–338.
- Залесский В.Н., Дынник О.Б.** (2005) Молекулярная медицина: протеомные диагностические технологии. Врач. дело, 1–2: 3–10
- Залесский В.Н., Дынник О.Б.** (2006a) Молекулярно-генетические основы апоптоз-ассоциированных заболеваний сердечно-сосудистой системы и принципы их лечения. Журн. АМН Украины, 12(2): 307–326.
- Залесский В.Н., Дынник О.Б.** (2006b) Оценка диагностических методов протеомного анализа при проведении допинг-контроля у спортсменов. Спорт. медицина, 1: 78–90.
- Abid M.N., Meesters E.W., Osmanovic N. et al.** (2003) Antigenic characterization of endothelial cell-derived microparticles and their detection *ex vivo*. J. Thromb. Haemost., 1: 2434–2443.
- Aupaix K., Hugel B., Martin T. et al.** (1997) The significance of shed membrane particles during programmed cell death *in vitro*, and *in vivo*, in HIV-1 infection. J. Clin. Invest., 99: 1546–1554.
- Barry O.P., Pratico D., Savani R.C. et al.** (1998) Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. J. Clin. Invest., 102: 136–144.
- Barry O.P., Kazanietz M.G., Pratico D. et al.** (1999) Arachidonic acid in platelet microparticles up-regulates cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin formation via protein kinase C/mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. J. Biol. Chem., 274: 7545–7556.
- Bernal-Mizrachi L., Jy W., Jimenez J.J. et al.** (2003) High levels of circulating endothelial microparticles in patients with acute coronary syndromes. Am. Heart J., 145: 962–976.
- Berckmans R.J., Nieuwland R., Tak P.P. et al.** (2002) Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. Arthritis Rheum., 46: 2857–2866.
- Berckmans R.J., Nieuwland R., Kraan M.C. et al.** (2005) Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. Arthritis Res., 7: 2536–2544.
- Brogan P.A., Shah V., Brachet C. et al.** (2004) Endothelial and platelet microparticles in vasculitis of the young. Arthritis Rheum., 50: 927–936.
- Butikofer P., Knypers F.A., Xu C.M. et al.** (1989) Enrichment of two glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins, acetylcholinesterase and decay accelerating factor, in vesicles released from human red blood cells. Blood., 74: 1481–1485.
- Colemann M., Sahai E.A., Yeo M. et al.** (2001) Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK1. Nat. Cell. Biol., 3: 339–345.
- Combes V., Simon A.C., Grau G.E. et al.** (1999) *In vitro* generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. J. Clin. Invest., 104: 93–102.
- Denzer K., van Eijk M., Kleijmeer M.J. et al.** (2000) Follicular dendritic cells carry MHC class II-expressing microvesicles at their surface. J. Immunol., 165: 1259–1265.

- Distler J.H., Huber L.C., Reich C.F. et al.** (2005a) The release of microparticles by apoptotic cells and their effects on macrophages. *Apoptosis*, 10: 731–741.
- Distler J.H., Jungel A., Huber L.C. et al.** (2005b) The induction of matrix metalloproteinase and cytokine expression in synovial fibroblast stimulated with immune cell microparticles. *Proc. Nat. acad. Sci. USA*, 102: 2892–2897.
- Fonzcade O., Simon M.F., Viode C. et al.** (1995) Secretory phospholipase A2 generates the novel lipid mediator lysophosphatidic acid in membrane microvesicles shed from activated cells. *Cell*, 80: 919–927.
- Forlow S.B., McEver R.P., Nollert M.U.** (2000) Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*, 95: 1317–1323.
- Fox J.E., Goll D.E., Reynolds C.C. et al.** (1985) Identification of two proteins (actin-binding protein and P235) that are hydrolyzed by endogenous Ca²⁺-dependent protease during platelet aggregation. *J. Biol. Chem.*, 260: 1060–1066.
- Freyssinet J.M.** (2003) Cellular microparticles: what are they bad or good for? *J. Thromb. Haemost.* 1: 1655–1662.
- Gasser O., Hess C., Miot S. et al.** (2003) Characterization and properties of ectosomes released by human polymorphonuclear neutrophils. *Exp. Cell. Res.*, 285: 243–257.
- Gasser O., Schifferli J.A.** (2004) Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*, 104: 2543–2548.
- Hoffman M., Monroe D.M., Roberts H.R.** (1992) Coagulation factor IXa binding to activated platelets and platelet-derived microparticles: a flow cytometric study. *J. Thromb. Haemost.*, 68: 74–78.
- Jimenez J.J., Mauro L.M. et al.** (2003) Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *J. Thromb. Res.*, 109: 175–180.
- Joop K., Berckmans R.J., Nieuwland R. et al.** (2001) Microparticles from patients with multiple organ dysfunction syndrome and sepsis support coagulation through multiple mechanisms. *J. Thromb. Haemost.*, 85: 810–820.
- Knijff-Dutmer E.A., Koerts J., Nieuwland R.** (2002) Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 46: 1498–1503.
- Larkin M.** (2001) Raised endothelial microparticles an early marker for multiple sclerosis. *Lancet*, 357: 1679–1687.
- Mack M., Kleinschmidt A., Bruhl H. et al.** (2000) Transfer of the chemokine receptor CCR5 between cells by membrane-derived microparticles: a mechanism for cellular human immunodeficiency virus 1 infection. *Nat. med.*, 6: 769–775.
- MacKenzie A., Wilson H.L., Kiss-Toth E. et al.** (2001) Rapid secretion of interleukin-1beta by microvesicle shedding. *J. Immunology*, 15: 825–835.
- Martin S., Tesse A., Hugel B. et al.** (2004) Shed membrane particles from T-lymphocytes impair endothelial function and regulate endothelial protein expression. *Circulation*, 109: 1653–1659.
- Mesri M., Alteri D.C.** (1999) Leukocyte microparticles stimulate endothelial cell cytokine release and tissue factor induction in a JNK1 signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, 274: 23111–23118.
- Mills J.C., Stone N.L., Erhardt J. et al.** (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J. Cell. Biol.*, 140: 627–636.
- Minagar A., Jy W., Jimenes J.J. et al.** (2001) Elevated plasma endothelial microparticles in multiple sclerosis. *Neurology*, 56: 1319–1324.
- Miyoshi H., Umeshita K., Sakon M. et al.** (1996) Calpain activation in plasma membrane bleb formation during tert-butyl hydroperoxide-induced rat hepatocyte injury. *Gastroenterol.*, 110: 1897–1904.
- Monleon I., Martines-Lorenzo M.J., Monteagudo L. et al.** (2001) Differential secretion of Fas ligand – or APO2 ligand/TNF-related apoptosis-inducing ligand-carrying microvesicles during activation-induced death of human T-cells. *J. Immunology*, 167: 6736–6734.
- Nieminen A.L., Gores G.J., Wray B.E. et al.** (1988) Calcium dependence of bleb formation and cell death in hepatocytes. *Cell Calcium*, 9: 237–246.
- Nieuwland R., Berckmans R.J., McGregor S. et al.** (2000) Cellular origin and procoagulant properties of microparticles in meningococcal sepsis. *Blood*, 95: 930–935.
- Ogura H., Kawasaki T., Tanaka H. et al.** (2001) Activated platelets enhance microparticle formation and platelet-leukocyte interaction in severe trauma and sepsis. *J. Trauma*, 50: 801–809.
- Salzer U., Hinterdorfer P., Hunger U. et al.** (2002) Ca²⁺-dependent vesicle release from erythrocytes involves stomatin-specific lipid rafts, synexin (annexin VII) and sorcin. *Blood*, 99: 2569–2577.
- Schecter A.D., Spirn B., Rossikhina M. et al.** (2000) Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ. Res.*, 87: 126–132.
- Thery C., Boussac M., Veron B. et al.** (2001) Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J. Immunology*, 166: 309–318.
- Weerheim A.M., Kolb A.M., Sturk A. et al.** (2002) Phospholipid composition of cell-derived microparticles determined by one dimensional high-performance thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.*, 302: 191–198.
- Wolf P.** (1967) The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br. J. Haematol.*, 13: 269–288.
- WanWijk M.J., WanBavel E., Sturk A. et al.** (2003) Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc. Res.*, 59: 277–287.

ПОТЕНЦІЙНА РОЛЬ МІКРОЧАСТИНОК КЛІТИН КРОВІ ТА СИНОВІАЛЬНОЇ РІДИНИ У ПАТОГЕНЕЗІ РЕВМАТИЧНИХ ЗАХВОРИВАНЬ

В.М. Залеський, О.Б. Динник

Резюме. Наведено аналіз сучасних даних про роль мікрочастин клітин крові та синовіальної рідини в патогенезі ревматичних захворювань. Будучи постійними продуктами клітинних процесів, мікрочастини виступають у ролі порівняно нових елементів регуляторних каскадів внутрішньоклітинної сигналізації та міжклітинної взаємодії у процесі запалення при ревматичних захворюваннях, а також важливого фактора, що підтверджує їх прогресування.

Ключові слова: мікрочастинки, кров, синовіальна рідина, ревматичні захворювання, патогенез.

POTENTIAL ROLE MICROPARTICLES OF THE BLOOD AND SYNOVIAL FLUID IN THE PATHOGENESIS OF RHEUMATIC DISEASES

V.M. Zalesky, O.B. Dynnyk

Summary. Article represents data on the potential role microparticles of the blood and synovial fluid in the pathogenesis of the rheumatic diseases. Once viewed as by-products of other cellular process, microparticles are emerging as an exciting new element of intracellular signaling and intracellular interaction during inflammatory process with rheumatic diseases patients as an important setting for their progression.

Key words: microparticles, blood cells, synovial fluid, rheumatic diseases, pathogenesis.

Адрес для переписки:

Залесский Вячеслав Николаевич
03680, Киев, ул. Народного ополчения, 5
Национальный научный центр «Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско»