

Под действием никотинамид ингибирует экспрессию тканевого фактора моноцитами, вызванную эндотоксином

J.S. UNGERSTEDT, K. HEIMERSOON,* T. SÖDERSTRÖM and M.HANSSON*

Исследование коагуляции, Отделение хирургических наук, а также клинической иммунологии и гемотрансфузиологии, Медицинский факультет, Каролинская больница, Каролинский институт, Стокгольм, Швеция

Для ссылок на данную статью: Ungerstedt JS, Heimersson K, Söderström T, Hansson M. Nicotinamide inhibits endotoxin-induced monocyte tissue factor expression. J Thromb Haemost 2003; 1: 2554-60

Аннотация: *Предпосылки:* Тканевый фактор (ТФ) — основной активатор коагуляции крови *in vivo*. Его усиленная экспрессия на активированных моноцитах связана с тромботическими осложнениями и летальным исходом при сепсисе, ДВС-синдроме и ишемической болезни сердца. *Цель:* Исследовать воздействие производной витамина В никотинамида на экспрессию ТФ и CD11b моноцитами под действием эндотоксинов, а также на растворимый рецептор интерлейкина(ИЛ)-6 и время до начала реакции гемокоагуляции. *Методы:* Эксперименты проводились на суспензиях лейкоцитов периферической крови человека, а также цельной крови восьми здоровых добровольцев. Для оценки влияния эндотоксинов на ТФ, CD11b, ИЛ-6 и общей реакции коагуляции плазмы с добавлением активированных аутогенных лейкоцитов применялись реометрия свободными колебаниями (измерение времени до начала реакции гемокоагуляции) и проточная цитометрия. *Результаты:* В результате добавления эндотоксина увеличилась экспрессия ИЛ-6, ТФ и CD11b, а также произошло прокоагулянтное изменение времени до начала реакции гемокоагуляции. 4 ммоль л⁻¹ никотинамида привели к ингибированию экспрессии ТФ и ИЛ-6, а также нормализации времени до начала реакции гемокоагуляции. При 16 ммольл⁻¹ никотинамида также снижается объем CD11b. Уровень экспрессии ТФ на моноцитах относительно величины времени до начала реакции гемокоагуляции можно полностью подавить путем блокирования ТФ ингибирующими антителами. *Заключения:* Полученные результаты демонстрируют способность никотинамида к ингибированию активации коагуляции, связанной с эндотоксикозом. Ранее мы уже продемонстрировали, что никотинамид обладает сильным противовоспалительным действием. Все больше доказательств говорит о том, что никотинамид имеет терапевтический потенциал при модулировании болезненных состояний со значительной активацией коагуляции и воспалительных процессов, в частности, при сепсисе и ДВС-синдроме.

Ключевые слова: коагуляция, эндотоксин, воспаление, моноцит, тканевый фактор.

Введение

Тканевый фактор (ТФ) — трансмембранный одноцепочный гликопротеин 47-kDa из 263 аминокислот суперсемейства цитокиновых рецепторов. ТФ — основной физиологический активатор коагуляции *in vivo*^[1], который в норме не образуется на клетках внутрисосудистого пространства. Активация эндотоксинами лимфоцитов и гранулоцитов, в отличие от моноцитов, не приводит к экспрессии ТФ^{[2], [3]}.

При грамотрицательном сепсисе эндотоксины из стенок бактерий попадают в кровь и вызывают сильную ответную реакцию организма-хозяина. Активация моноцитов приводит к экспрессии транскрипционного фактора нескольких генов под воздействием Nfκβ, включая провоспалительные цитокины и ТФ^[4], последний из которых является основным фактором, вызывающим ДВС-синдром^[5]. ТФ играет важную роль в патогенезе нескольких болезненных состояний. У пациентов с ишемической болезнью сердца сильное действие прокоагулянтов схожих с ТФ связано с тромботическими осложнениями^[6]. Рост экспрессии ТФ на моноцитах также отмечается у пациентов с сепсисом, в отличие от контрольной группы без сепсиса^[7]. У животных ингибирование коагуляции антителами ТФ или их лигандом, активированным фактором (F)VII предотвращает активацию коагуляции и смерть от септического шока под действием эндотоксинов^{[8], [9], [10]}.

Коагуляция и воспалительный ответ на эндотоксин тесно взаимосвязаны. Активация коагуляции за счет ТФ включает несколько этапов системных воспалительных ответов, играющих важную роль в патогенезе травм с сепсисом^{[11], [12], [13]}. Таким образом, снижение ответа ТФ на эндотоксин имеет множество преимуществ для больных с сепсисом. После активации эндотоксина подготовленный β₂-интегрин CD11b/CD18 выделяется на моноцитах и гранулоцитах^{[14], [15]}. Как и с ТФ, CD11b/CD18 растет на циркулирующих моноцитах у пациентов с сепсисом^{[7], [16]}, а также ишемической болезнью сердца^[17]. Активированные моноциты, выделяющие CD11b/CD18, запускают действие прокоагулянтов^[18], т.к. CD11b/CD18 имеет связывающую способность и может протеолитически активировать FX^{[19], [20]}, а независимая активация цепочки коагуляции ТФ — напротив. Физиологическое значение этого пути, тем не менее, не определено.

Для писем: Dr J. Ungerstedt, Coagulation Research, Clinical Chemistry Building L25, Karolinska Hospital, S-171 76 Stockholm, Sweden. Тел.: +4685 1776871; факс: +4683 12438; e-mail: johanna.ungerstedt@ks.se

Получено 24 января 2003г., принято 25 июня 2003г.

© 2003 International Society on Thrombosis and Haemostasis

Таким образом, моноциты участвуют как в провоспалительных, так и в прокоагуляционных процессах, что может иметь патофизиологическое значение при сепсисе и ДВС-синдроме.

Никотинамид продемонстрировал целый ряд противовоспалительных свойств, в частности, ингибирование выделения TNF α под действием эндотоксинов в суспензиях мононуклеарных клеток периферической крови и в опытах с мышами^{[21], [22]}. Мы недавно показали, что в цельной крови никотинамид пропорционально количеству снижает выработку четырех основных провоспалительных цитокинов под действием эндотоксинов: интерлейкина (ИЛ)-1 β , -6 и 8, а также TNF α ^[23].

Цель настоящего исследования — дальнейшее изучение потенциала модулирующей роли никотинамида при активации коагуляции и воспалительных процессов под действием эндотоксинов. Влияние никотинамида экспрессию ТФ на моноцитах, CD11b и ИЛ-6 под действием эндотоксинов оценивалось на примере суспензии клеток лейкоцитов человека, а также цельной крови. Воздействие уровня экспрессии ТФ моноцитами на процессы коагуляции определялось путем пробы на коагуляцию с измерением времени до начала реакции гемокоагуляции. Метод измерения времени до начала реакции гемокоагуляции определяет начало коагуляции под действием тромбина после насыщения CaCl₂ цитратной цельной крови или плазмы[24], по аналогии с естественной средой крови без добавления искусственных активаторов или ингибиторов.

Методы и материалы

Образцы крови

В исследовании принимали участие восемь здоровых добровольцев в возрасте от 24 до 50 лет, каждый из которых дал свое информированное согласие. Кровь забиралась из локтевой вены в пробирки Vacutainer™, пробирки ЭДТК 5 мл (Vacutainer EDTA; Terumo, Лёвен, Бельгия) для опытов по проточной цитометрии, а также 5 мл пробирки с 0,129 моль л⁻¹ тринатриевого цитрата (Becton Dickinson, Плимут, Великобритания) для анализов времени до начала реакции гемокоагуляции. Для анализов цельной крови использовали 5 мл пробирки с добавлением антикоагулянта, гепарина натрия (Becton Dickinson). Количество клеток лейкоцитов определялось автоматическим гематологическим инструментом (MicroDiff II, Beckman Coulter, Фуллертон, шт. Калифорния, США).

Пробирки с цитратом сразу же центрифугировались при 2000 \times г на 15 мин. при комнатной температуре, а плазма разделялась на аликвоты и сохранялась при -70 $^{\circ}$ С до проведения анализа времени до начала реакции гемокоагуляции.

Исследование было одобрено местным комитетом по вопросам этики.

Опыты с суспензией лейкоцитов

Кровь ЭДТК в среднем содержит 5,7 \times 10⁶ лейкоцитов мл⁻¹ (диапазон 4,1 — 10,0, $n=8$), из которых примерно 5% (2 — 9%) моноцитов было разделено на аликвоты по стерильным полистироловым пробиркам (Becton Dickinson) (200 мкл на пробирку). Эритроциты были гемолизированы путем добавления 4 мл раствора для лизиса NH₄Cl-ЭДКТ (0,15 моль л⁻¹ NH₄Cl, 10 ммоль л⁻¹ KHCO₃, 0,1 ммоль л⁻¹ ЭДКТ pH 7,2). Образцы инкубировали в течение 10 мин. При +15 $^{\circ}$ С и центрифугировали 5 мин. при 300 \times г, 4 $^{\circ}$ С. Осадок лейкоцитов затем дважды промывался трис-буферным

солевым раствором (ТБС) и буфером без эндотоксина (с содержанием эндотоксина <0,125 М.Е. мл⁻¹).

Эндотоксин (липополисахарид из *Escherichia coli* O26B6; Difco, Детройт, шт. Мичиган, США; маточный раствор 3,33 мг мл⁻¹) разбавляли 1640 RPMI-раствором без эндотоксина до получения концентрации эндотоксина 10 нг мл⁻¹ и добавляли 0-40 ммоль л⁻¹ никотинамида (маточный раствор разбавляли RPMI-раствором до 0,41 моль л⁻¹). В RPMI-раствор добавляли 5% термоинактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) до получения итогового объема образца в 1 мл. Один образец, содержащий суспензию лейкоцитов, был подвергнут анализу без инкубации для получения исходного уровня экспрессии ТФ (С1). Один образец, содержащий только суспензию лейкоцитов (С2), и один образец с суспензией лейкоцитов и эндотоксином (С3) инкубировали для получения фонового и максимального уровней экспрессии ТФ. В качестве контроля был добавлен образец, инкубированный с суспензией лейкоцитов и 40 ммоль л⁻¹ никотинамида без эндотоксина, обозначенный С2+никотинамид.

Образцы суспензии лейкоцитов инкубировали при 37 $^{\circ}$ С в 4,8% CO₂ в течение 4 часов. Жизнеспособность лейкоцитов, определенная с помощью теста с трипановым синим, во всех случаях превышала 99%. После инкубации клеточные суспензии центрифугировали в течение 5 мин. при 300 \times г, 4 $^{\circ}$ С, а надосадочная жидкость хранилась при -70 $^{\circ}$ С до проведения анализа. Для получения концентрации клеток 2 \times 10⁶ лейкоцитов мл⁻¹ клеточная масса вымывалась фосфатно-буферным солевым раствором (ФБС), а осадок из пробирок дублирующих исследований ресуспендировали в 200 мкл ФБС. После этого 150 мкл клеточной суспензии разводили в 1 мл 1% параформальдегида и, чтобы зафиксировать, хранили при 4 $^{\circ}$ С 1 — 2 часа перед анализом методом проточной цитометрии. Оставшиеся 50 мкл клеточной суспензии, содержащей около 0,5 \times 10⁶ лейкоцитов, 5% которых — моноциты, использовались для анализа времени до начала реакции гемокоагуляции.

Опыты с цельной кровью

Для подтверждения результатов опытов с суспензиями лейкоцитов также проводились эксперименты с цельной кровью. Гепаринизированная цельная кровь добровольцев, содержащая 5,8, 6,4 и 6,5 \times 10⁶ лейкоцитов на мл⁻¹ соответственно, около 5% (2 — 9%) которых составляли моноциты, разделили на аликвоты по 1 мл и поместили в стерильные полистироловые пробирки (Becton Dickinson). Добавили никотинамид (0 — 40 ммоль л⁻¹ в ТБС), а затем эндотоксин (итоговой концентрации 10 нг мл⁻¹) и получили общий объем 1,1 мл. После 4 часов инкубации при 37 $^{\circ}$ С в 4,8% CO₂ 200 мкл цельной крови подвергли лизису (см. выше), зафиксировали параформальдегидом и оценили путем проточной цитометрии. Оставшуюся кровь 15 мин. центрифугировали при 2000 \times г, комнатной температуре, а плазма была разделена на аликвоты и заморожена при -70 $^{\circ}$ С до проведения анализа.

Анализ проточной цитометрией

После фиксации клеточные суспензии, содержащие $1 - 2 \times 10^6$ лейкоцитов в зависимости от количества клеток лейкоцитов донора, дважды промывали и разводили в 100 мкл ФБС. Анализ четырехцветной проточной цитометрией выполнялся на проточном цитометре Epics XL (Coulter Inc, Хайялия, шт. Флорида, США), который проходил ежедневную калибровку на оптическую и флуоресцентную юстировку, а также на интенсивность люминесценции стандартизованными флуоросферами (Flow-Check™, Flow Set™ и Beckman Coulter, соответственно).

Использовались напрямую соединенные моноклональные антитела (МАт): анти-CD14^{ECD}, анти-CD45^{PC5} и анти-CD11b^{PE} с контролями изотипов мышей IgG1^{FITC} и мышей IgG1^{PE} (все производства Beckman Coulter, Марсель, Франция) и противочеловеческий ТФ^{FITC} (American Diagnostica, Гринвич, шт. Коннектикут, США). Все образцы инкубировали при комнатной температуре по 10 мин. с 10 мкл каждого МАт. Для получения отрицательного контроля к анти-ТФ и анти-CD11b одна часть образца инкубировалась с контролями изотипов для флуоресцеинизотиоцианата (FITC) и фикоэритрина (PE) вместе с МАт анти-CD14^{ECD} и CD45^{PC5}.

Для анализа экспрессии ТФ и CD11b на моноцитах последние идентифицировали как CD45- и CD14-положительные клетки, было установлено не менее 2000 случаев положительных реакций. Данные представлены в виде средней интенсивности люминесценции (СИЛ), произвольной единицы для получения количественных измерений объема субстанции.

Время до начала реакции гемокоагуляции

Время до начала реакции гемокоагуляции определяли при 37°C с помощью прибора, работающего по принципу реометрии свободными колебаниями (ReoRox4; Global Hemostasis Institute, GHI, Линчопинг, Швеция), по вышеописанному методу [24]. В двух словах, прибор магнитным путем провоцирует колебания образца, которые регистрируются оптическим детектором колебаний. Во время процесса коагуляции, т.е. желирования образца, увеличение вязкости вызывает снижение частоты колебаний. В настоящий момент учитываются числовые отклонения от первоначальных параметров колебаний — время начала коагуляции. Для измерения времени до начала гемокоагуляции образцы суспензии клеток лейкоцитов C1, C2, C3 и C2+никотинамид добавляли к аутогенной цитрированной плазме. Для каждого испытания аутогенную цитрированную плазму размораживали, и к 385 мкл плазмы добавляли 65 мкл CaCl₂ (0,1 моль л⁻¹, итоговая концентрация CaCl₂ — 13,8 ммоль л⁻¹) и 20 мкл суспендированных в ФБС клеток (примерно $0,2 \times 10^6$ лейкоцитов). После этого 430 мкл непосредственно помещали в полиамидную пробирку для образцов (GHI) и анализировали время до начала реакции гемокоагуляции. Все измерения дублировались. Метод оценки времени до начала гемокоагуляции воспроизводится с низким коэффициентом отклонений [24].

Анализ подавления

Агонисты поликлональных антител ТФ (Ig, продукт № 4501; American Diagnostica), моноклональное антитело IgG1 к CD11b (Beckman Coulter) и антитело контроля для изотипов (IgG1; Beckman Coulter) инкубировали с суспензией лейкоцитов в течение 20 мин., после чего проводились измерения времени до начала гемокоагуляции, как и описано выше, в аутогенной плазме с добавлением лейкоцитов. Антитело ТФ разбавляли 1:20 — 50 мкг мл⁻¹,

итоговой концентрации при оценке времени до начала гемокоагуляции.

Для получения антител CD11b и контролей изотипов в каждом испытании добавлялось по 20 мкл антител, которых, по информации производителя, достаточно для опытов с титрованием для 5×10^5 клеток.

Анализ интерлейкина-6

ИЛ-6 определяли по надосадочной жидкости клеточной суспензии путем хемиллюминисцентного иммуноанализа с помощью прибора Immulite и реагентов производства DPC Diagnostic Products Corporation (Лос-Анджелес, шт. Калифорния, США) [25]. Предел регистрации данного исследования — 5 пг мл⁻¹, эталонные уровни для плазмы относительно здоровых испытуемых (<9,7 пг мл⁻¹) приняты в соответствии с рекомендациями производителя.

Статистический анализ

Для сопоставления отличий между образцами и соответствующими образцами, стимулированными эндотоксинами (C3), использовалось программное обеспечение для ПК Statistica® с применением теста сопряженных пар для взаимозависимых образцов Wilcoxon. $P < 0,05$ считалось значительным.

Коэффициент корреляции r^2 рассчитывался с помощью MSN Excel®.

Результаты

Ответ на эндотоксин

ТФ можно обнаружить только на поверхности моноцитов, в отличие от лимфоцитов и гранулоцитов (результаты не приводятся). Оптимальная концентрация эндотоксина определялась в первоначальных экспериментах. Плато экспрессии ТФ моноцитами отмечалось после инкубации с 1 нг — 100 мкг мл⁻¹ эндотоксинов. Экспрессия ТФ моноцитами у неинкубированных образцов (C1), образцов инкубированных без эндотоксинов (C2) и с 10 нг мл⁻¹ эндотоксина (C3) определялась путем проточной цитометрии и выражалась в виде средней интенсивности люминесценции (СИЛ) популяции моноцитов. Приводится один показательный опыт с моноцитами в клеточной суспензии (рис. 1a) и цельной крови (рис. 1b). Экспрессия ТФ моноцитами в контролях C1 — C3 в суспензиях лейкоцитов от всех восьми добровольцев показана на рис. 2(a), где также отображен контроль, инкубированный только с никотинамидом (C2+никотинамид).

Прокоагулятивные изменения в суспензиях лейкоцитов при добавлении эндотоксина также отражаются на времени до начала реакции гемокоагуляции. Клетки лейкоцитарных суспензий, активированные эндотоксином, соединили с аутогенной плазмой и проанализировали методом реометрии свободными колебаниями. Было отмечено значительное сокращение времени до начала реакции гемокоагуляции, означающее начало коагуляции в образце, инкубированном с эндотоксином, C3 (в среднем 3,7 мин., диапазон 2,8 — 5,2) по сравнению с контролем C2 (в среднем 4,6 мин., диапазон 3,9 — 6,1) (рис. 2b). В опытах с суспензией лейкоцитов по экспрессии ТФ сравнили C1 (среднее СИЛ — 0,65, диапазон 0,47 — 1,1) и C2 (среднее 1,21, диапазон 0,63 — 1,6): отмечено увеличение экспрессии ТФ после 4 часов инкубации, в

том числе, без стимуляции эндотоксином, $P < 0,05$ (рис. 1а

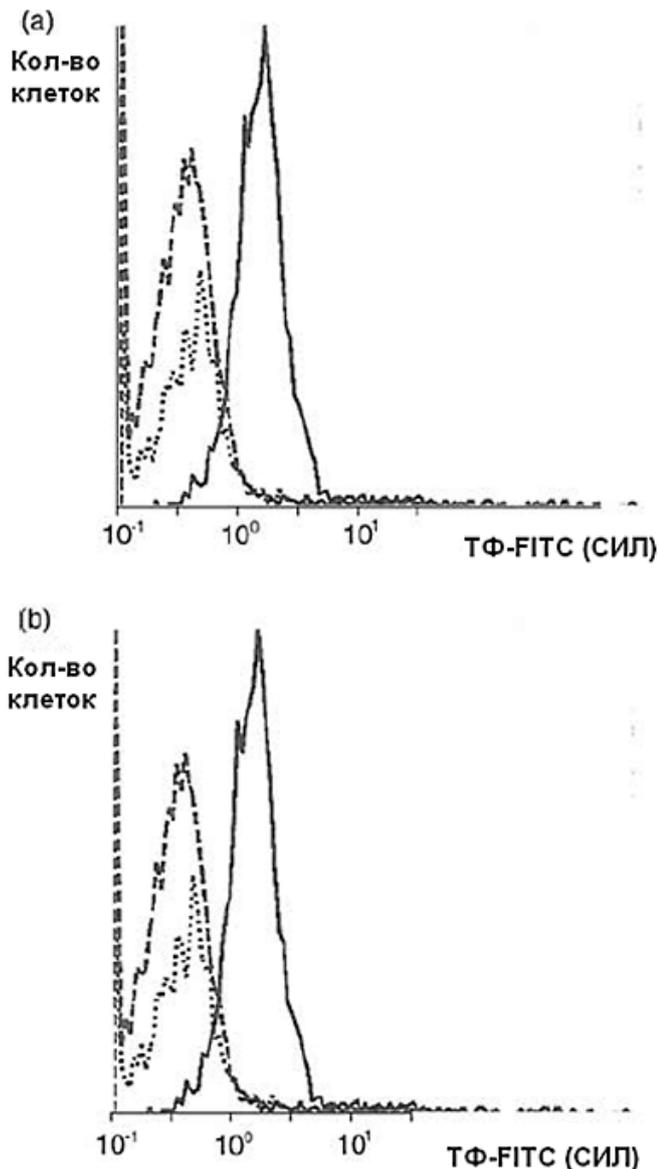


Рис. 1: Экспрессия тканевого фактора моноцитами (СИЛ) в: (а) суспензии лейкоцитов и (б) цельной крови (...) без инкубации (С1); (—) после 4 ч инкубации без эндотоксина (С2); (-) инкубированной с 10 ng ml^{-1} эндотоксина (С3).

и 2а). Спонтанная активация в образце с клеточной суспензией С2 также отразилась на показателях времени до начала реакции гемокоагуляции, где С2 (в среднем 4,6 мин., диапазон 3,9 — 6,1) было значительно ниже С1 (в среднем 6,3 мин., диапазон 5,2 — 7,3), $P < 0,05$ (рис. 2б) и на экспрессии CD11b, определенной в виде СИЛ (среднее значение С1 — 5, диапазон 0 — 9,4; а среднее С2 — 34, диапазон 26 — 47) (рис. 2с). Спонтанная активация, вероятно, произошла из-за добавления ЭБС, который, как известно, вызывает активацию клеток. В опытах с цельной кровью подобная спонтанная активация не отмечалась. Примечательно, что в суспензиях лейкоцитов, инкубированных с ЭБС, но без эндотоксина, а с 40 мкмоль л^{-1} никотинамида (С2+никотинамид), никотинамид ингибировал активацию ТФ, времени до начала реакции гемокоагуляции и CD11b ($P < 0,05$ при сравнении С2 с С2+никотинамид на предмет ТФ, времени до начала реакции гемокоагуляции и CD11b) под действием ЭБС (рис. 2а-с).

Действие никотинамида на экспрессию ТФ моноцитами и время до начала реакции гемокоагуляции

Никотинамид вызвал пропорциональное дозе снижение ТФ на моноцитах в суспензиях лейкоцитов, стимулированных эндотоксином (рис. 3а).

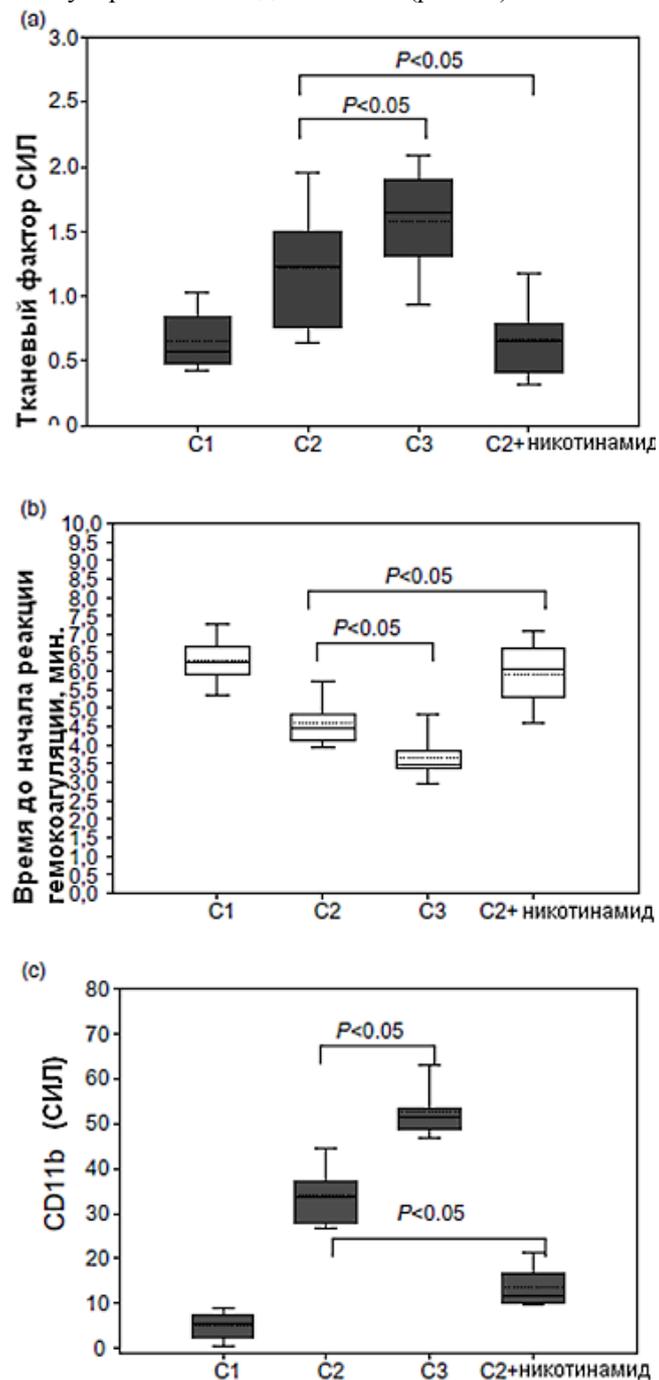


Рис. 2: Опыты с контролями на суспензиях лейкоцитов, $n=8$, отражающие: (а) экспрессию тканевого фактора моноцитами; (б) время до начала реакции гемокоагуляции; и (с) экспрессию CD11b на поверхности моноцитов. С1 — неинкубированные лейкоциты (нет одного образца); С2 — лейкоциты, инкубированные 4 ч без эндотоксина; и С2+никотинамид=лейкоциты, инкубированные 4 ч с 40 мкмоль л^{-1} никотинамида, без эндотоксина. На диаграммах в квадратах показаны линии, соответствующие 5 и 95 процентам; пунктиром нанесены средние значения.

Данные по экспрессии ТФ показаны отдельно для каждого пациента, поскольку его уровни отличаются у разных пациентов, это явление называется феноменом высокого/низкого иммунного ответа[26],[27]. При 4 мкмоль л^{-1} никотинамида среднее измеренное СИЛ экспрессии ТФ составило 1,5 (диапазон 0,8 — 1,8), $n=8$, которое равнялось экспрессии ТФ у контролей, инкубированных без эндотоксина, С2 [среднее 1,4

(диапазон 0,9 — 2,1)], т.о. иллюстрируя значительное снижение ($P<0,05$) относительно образца С3.

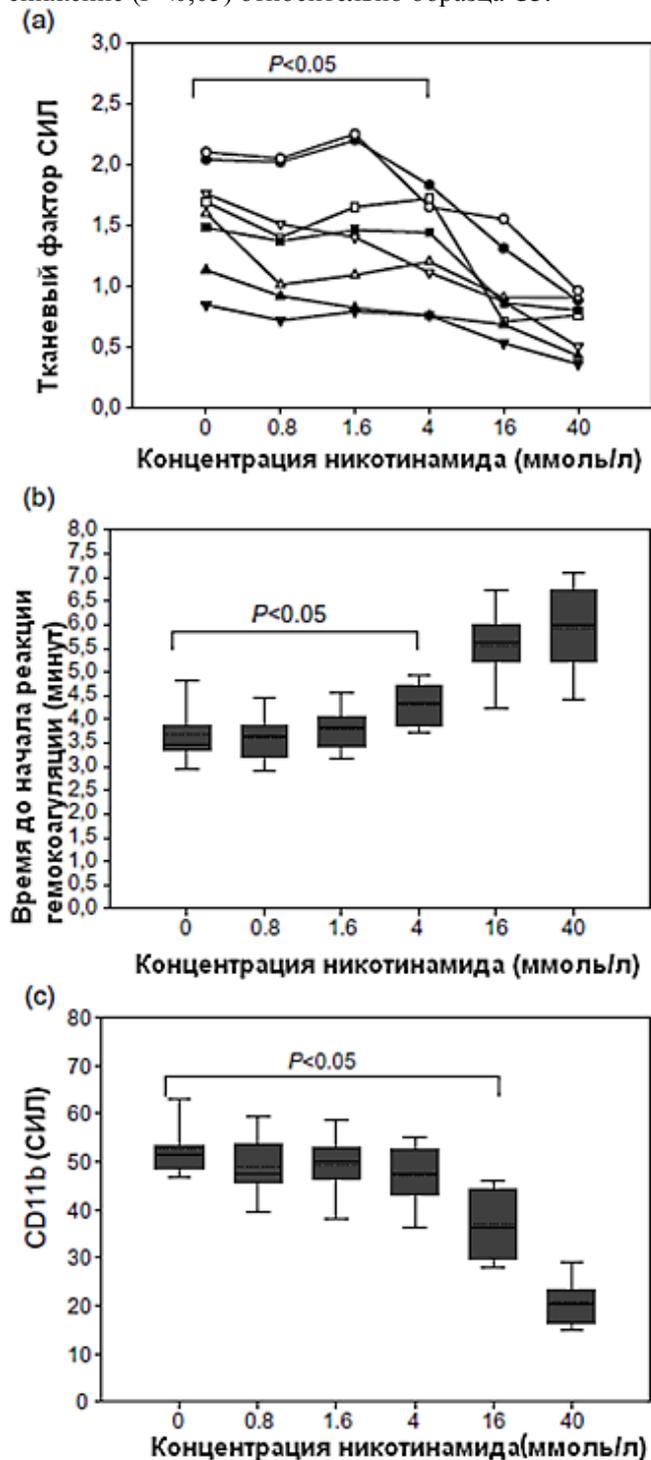


Рис. 3: Действие никотинамида на суспензии лейкоцитов, стимулируемые эндотоксином, $n=8$. (а) Экспрессия тканевого фактора моноцитами; (б) время до начала реакции гемокоагуляции; и (с) экспрессия CD11b моноцитами. В случае (а) каждая линия соответствует отдельному пациенту, поскольку у пациентов неодинаковый уровень экспрессии тканевого фактора. Диаграммы в квадратах (б) и (с) отражают линии 5 и 95 процентов; пунктиром нанесены средние значения. Значительное снижение тканевого фактора и увеличение времени до начала реакции гемокоагуляции относительно контроля С3 наблюдается при концентрации никотинамида в 4 — 40 ммоль $л^{-1}$, в то время как CD11b падает при уровне никотинамида ≥ 16 ммоль $л^{-1}$.

При 40 ммоль $л^{-1}$ никотинамида экспрессия ТФ под действием эндотоксина полностью прекращалась (среднее 0,9, диапазон 0,53 — 0,969), т.е. достигала уровня неинкубированного контроля С1 (среднее 0,65, диапазон 0,47 — 1,1). Аналогичные результаты были получены и с цельной кровью 1 (результаты не приводятся).

Дозированное увеличение концентрации никотинамида восстанавливало активацию коагуляции под действием эндотоксинов, определяемую по времени до начала реакции гемокоагуляции, до первоначально уровня, без стимуляции эндотоксином (рис. 3б). Значительное увеличение времени до начала реакции гемокоагуляции по сравнению с образцом С3 (среднее 3,7, диапазон 2,8 — 5,2), $P<0,05$ наблюдалось при концентрации никотинамида свыше 4 ммоль $л^{-1}$ (среднее 4,3, диапазон 3,7 — 5,0).

Действие никотинамида на параметры воспалительных процессов

После 4 ч стимуляции суспензий лейкоцитов 10 нг $мл^{-1}$ эндотоксина отмечен ожидаемый рост провоспалительного цитокина ИЛ-6 до среднего значения 180 пг $мл^{-1}$, диапазон 90 — 130 пг $мл^{-1}$, $n=8$ [23], [28]. В ответ на увеличение концентрации никотинамида уровни ИЛ-6 снижались, а при 16 ммоль $л^{-1}$ никотинамида уровни ИЛ-6 были ниже предела обнаружения. При концентрации никотинамида в 16 ммоль $л^{-1}$ также снижалась поверхностная экспрессия CD11b на моноцитах, определенная как СИЛ (среднее 37, диапазон 28 — 46, по сравнению с уровнями CD11b в С3, где среднее составило 53 при диапазоне 46 — 65) (рис. 3с). CD11b также выделяется на гранулоцитах и также ингибируется при концентрации никотинамида ≥ 16 ммоль $л^{-1}$ (результаты не приводятся).

Корреляция экспрессии ТФ моноцитами в суспензии лейкоцитов, CD11b и времени до начала реакции гемокоагуляции

При оценке степени корреляции для компенсации индивидуальных отличий пациентов в поверхностной экспрессии отношение каждого результата к показателям соответствующего контроля С3 рассчитывалось для ТФ и CD11b. Отмечена корреляция экспрессии ТФ моноцитами и времени до начала реакции гемокоагуляции ($r^2=0,48$). Также выявлена корреляция CD11b на моноцитах и времени до начала реакции гемокоагуляции ($r^2=0,62$), а также ТФ на поверхности моноцитов и CD11b. Все корреляции были значительными; $P<0,001$. Это демонстрирует, что по мере увеличения экспрессии ТФ и CD11b усиливается активация коагуляции, определяемая по времени до начала реакции гемокоагуляции.

Действие ингибирующих антител

Для оценки воздействия ТФ и CD11b, соответственно, на изменение времени до начала реакции гемокоагуляции, вызванной эндотоксинами, ингибирующие антитела 20 мин. инкубировали с активированными клетками, а затем измеряли время до начала реакции гемокоагуляции. Антитела ТФ полностью блокировали прокоагуляционные изменения времени до начала реакции гемокоагуляции под действием эндотоксинов, в то время как антитела CD11b и изотипического контроля никакого эффекта не произвели (рис. 4).

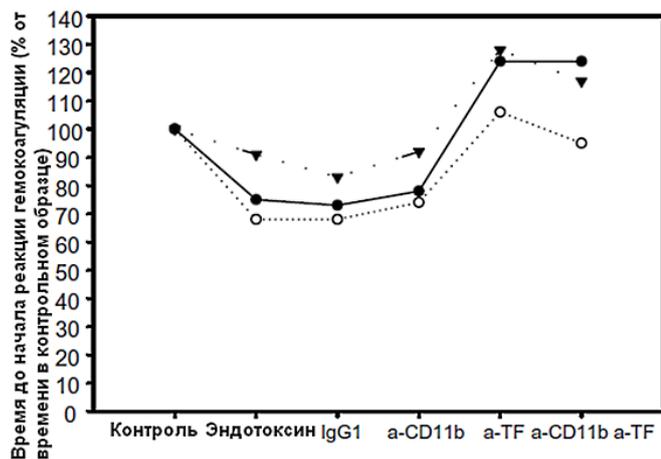


Рис. 4 Действие ингибирующих антител к ТФ и CD11b на время до начала реакции гемокоагуляции после стимуляции эндотоксином, $n=3$.

Пояснения

В настоящем исследовании описывается ранее неизвестное ингибирующее действие никотинамида на прокоагуляционные изменения, связанные с эндотоксикозом. Суспензии с человеческими лейкоцитами и цельную кровь 4 часа инкубировали с эндотоксином и 0 — 40 ммоль $л^{-1}$ никотинамида: отмечено выраженное сокращение экспрессии ТФ моноцитами как в суспензиях лейкоцитов, так и в цельной крови.

Поскольку известно, что ответ моноцитов варьируется в зависимости от местного окружения, эксперименты с клеточными суспензиями необходимо подтвердить на цельной крови [29]. Однако, в настоящем исследовании результаты в суспензиях с лейкоцитами и цельной крови совпали.

Прокоагуляционные изменения под действием эндотоксина определялись по времени до начала реакции гемокоагуляции, вызванной никотинамидом. До этого время до начала реакции гемокоагуляции изменялось ковариантно с доказанными анализами коагулирующей активности, в частности, активированным частичным тромбопластиновым временем, протромбиновым временем, растворимым фибрином и D-димером, корректно определяющими гипо- и гиперспособность пациентов к коагуляции [24], [30].

Поскольку у пациентов с нейротравмами исход зависит от степени коагуляционного вмешательства, время до начала реакции гемокоагуляции может служить показателем прогноза [30]. Хотя ТФ — основной активатор коагуляции *in vivo* и в больших количествах сопряжен с тяжелыми заболеваниями и смертностью, для него не существует стандартных испытаний. В настоящем исследовании мы демонстрируем, что активация коагуляции под действием эндотоксина, определяемая через время до начала реакции гемокоагуляции, полностью подавляется антителом ТФ. Это согласуется с существующими взглядами о том, что ТФ — главный причинный фактор ДВС-синдрома [5]. Поскольку изменения уровня ТФ влияли на время до начала реакции гемокоагуляции, что также демонстрируется их взаимозависимостью, предполагаем возможность использования в клинической практике времени до начала реакции гемокоагуляции в качестве общего анализа коагулирующей активности с учетом влияния на коагуляцию экспрессии ТФ моноцитами. Наши результаты также иллюстрируют значимость ингибирования ТФ при клиническом сепсисе и ДВС-синдроме, поскольку подобное подавление не только оказывает антитромботическое действие, но может также снизить объем выработки ТФ-

зависимых медиаторов воспаления, в частности, провоспалительных цитокинов [8 – 10], [31]. Мы уже продемонстрировали, что никотинамид ингибирует синтез провоспалительных цитокинов под действием эндотоксина в цельной крови [23], что получило подтверждение в настоящем исследовании: никотинамид ингибирует выработку провоспалительных ИЛ-6 под действием эндотоксина в суспензиях лейкоцитов.

Инкубирование суспензий лейкоцитов с эндотоксином привело к значительному увеличению уровня CD11b на моноцитах и гранулоцитах, который снижался в ответ на добавление никотинамида в концентрациях ≥ 16 ммоль $л^{-1}$. Без ТФ активированные моноциты способны превращать FX в Fxa с помощью CD11b/CD18, обеспечивая альтернативный способ активации коагуляции [19]. Тем не менее, физиологическая значимость этого явления оспаривается, а результаты настоящего исследования говорят о том, что за активацию коагуляции под действием эндотоксина полностью отвечает ТФ, здесь определяемый через время до начала реакции гемокоагуляции. Сильная зависимость анализов коагуляции с измерением времени до начала реакции гемокоагуляции и экспрессии ТФ от CD11b может быть параллельным явлением, поскольку и коагуляция, и воспаление вызываются за счет стимуляции эндотоксином.

Действие никотинамида также может проявляться через ингибирующие свойства синтетазы полиАДФ-рибозы (ПАРП), поскольку ПАРП — репаративный фермент ДНК, активируемый в результате генотоксического стресса, в частности от эндотоксина. На основе более ранних открытий предполагается, что ингибирующее действие никотинамида на провоспалительные цитокины, запущенные эндотоксином, связано не с подавлением ПАРП [23]. Влияние никотинамида на коагуляцию и воспалительные процессы позволяет предположить механизм с участием ядерного фактора κB , фактора транскрипции, связанного с выработкой провоспалительных цитокинов, а также ТФ [32]. Однако, этот механизм нуждается в дальнейших исследованиях. У пациентов с сепсисом отмечено увеличение экспрессии ТФ на моноцитах по сравнению с контролями от пациентов без сепсиса [7]. В экспериментальных моделях антитела ТФ способны предотвратить смерть от септического шока [8,9]. Данное исследование демонстрирует, что никотинамид подавляет экспрессию ТФ моноцитами, вызванную эндотоксином. Мы уже показали, что никотинамид значительно уменьшает и регулирует выработку провоспалительных цитокинов после стимуляции эндотоксином [23].

Согласно исследованиям переносимости никотинамида, его пероральное назначение в дозировке 3 — 6 г в течение нескольких месяцев проходило без побочных эффектов [33], что говорит о его низкой токсичности. После единичного перорального приема никотинамида в дозе 6 г его концентрация в плазме составляет около 1 ммоль $л^{-1}$ [34]. Мы считаем, что инъекции никотинамида, в отличие от перорального приема лекарства, позволят

достигнуть концентраций в 10 ммоль л⁻¹ без сильных побочных эффектов.

Таким образом, предполагаем, что никотинамид обладает терапевтическим потенциалом при модулировании болезненных состояний со значительной активацией коагуляции и воспалительных процессов, в частности сепсиса и ДВС-синдрома.

Благодарности

Авторы благодарят профессора Альфа Сольеви (Alf Sollevi) за то, что открыл нам никотинамид. Мы также благодарим Румияна Джилали-Мерцуг (Rumijana Djilali-Merzoug) и Лену Сандлунд (Lena Sandlund) за проведение анализов с ИЛ-6. Финансовая поддержка оказана Шведским фондом изучения проблем сердца и легких.

- [1] Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991; 66: 67-79.
- [2] Rivers RP, Hathaway WE, Weston WL. The endotoxin-induced coagulant activity of human monocytes. *Br J Haematol* 1975; 30: 311-6.
- [3] Österud B, Rao LV, Olsen JO. Induction of tissue factor expression in whole blood: lack of evidence for the presence of tissue factor expression in granulocytes. *Thromb Haemost* 2000; 83: 861-7.
- [4] Muller JM, Ziegler-Heitbrock HWL, Bauerle PA. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 1993; 187: 233-56.
- [5] Österud B, Bjorklid E. The tissue factor pathway in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Haemost* 2001; 27: 605-17.
- [6] Moons AH, Levi M, Peters RJ. Tissue factor and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 2002; 53: 313-25.
- [7] Vickers J, Russwurm S, Dohrn B, Portele T, Spangenberg P, Reinhart K, Losche W. Monocyte tissue factor (CD 142) and Mac-1 (CD11b) are increased in septic patients. *Thromb Haemost* 1998; 79: 1219-20.
- [8] Warr TA, Rao LV, Rapaport SI. Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity. *Blood* 1990; 75: 1481-9.
- [9] Taylor FB Jr, Chang A, Ruf W, Morrissey JH, Hinshaw L, Catlett R, Blick K, Edgington TS. Lethal *E. coli* septic shock is prevented by blocking tissue factor with monoclonal antibody. *Circ Shock* 1991; 33: 127-34.
- [10] Biemond BJ, Levi M, ten Cate H, Soule HR, Morris LD, Foster DL, Bogowitz CA, van der Poll T, Buller HR, ten Cate JW. Complete inhibition of endotoxin-induced coagulation activation in chimpanzees with a monoclonal Fab fragment against factor VII/VIIa. *Thromb Haemost* 1995; 73: 223-30.
- [11] Biemond BJ, Levi M, ten Cate H, Soule HR, Morris LD, Foster DL, Bogowitz CA, van der Poll T, Buller HR, ten Cate JW. Complete inhibition of endotoxin-induced coagulation activation in chimpanzees with a monoclonal Fab fragment against factor VII/VIIa. *Thromb Haemost* 1995; 73: 223-30.
- [12] Cunningham MA, Romas P, Hutchinson P, Holdsworth SR, Tipping PG. Tissue factor and factor VIIa receptor/ligand interactions induce proinflammatory effects in macrophages. *Blood* 1999; 94: 3413-20.
- [13] Bokarewa MI, Morrissey JH, Tarkowski A. Tissue factor as a proinflammatory agent. *Arthritis Res* 2002; 4: 190-5.
- [14] Miller LJ, Bainton DF, Borregaard N, Springer TA. Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface. *J Clin Invest* 1987; 80: 535-44.
- [15] Jones DH, Anderson DC, Burr BL, Rudloff HE, Smith CW, Krater SS, Schmalstieg FC. Quantitation of intracellular Mac-1 (CD11b/CD18) pools in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 1988; 44: 535-44.
- [16] Lin RY, Astiz ME, Saxon JC, Saha DC, Rackow EC. Relationships between plasma cytokine concentrations and leukocyte functional antigen expression in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1994; 22: 1595-602.
- [17] Mazzone A, De Servi S, Mazzucchelli I, Fossati G, Gritti D, Canale C, Cusa C, Ricevuti G. Increased expression of CD11b/CD18 on phagocytes in ischaemic disease: a bridge between inflammation and coagulation. *Eur J Clin Invest* 1997; 27: 648-52.
- [18] Dackiw AP, Nathens AB, Marshall JC, Rotstein OD. Integrin engagement induces monocyte procoagulant activity and tumor necrosis factor production via induction of tyrosine phosphorylation. *J Surg Res* 1996; 64: 210-5.
- [19] Dackiw AP, Nathens AB, Marshall JC, Rotstein OD. Integrin engagement induces monocyte procoagulant activity and tumor necrosis factor production via induction of tyrosine phosphorylation. *J Surg Res* 1996; 64: 210-5.
- [20] Elemer GS, Edgington TS. Monoclonal antibody to an activation neopeptide of alpha M beta 2 inhibits multiple alpha M beta 2 functions. *J Immunol* 1994; 152: 5836-44.
- [21] Fukuzawa M, Satoh J, Muto G, Muto Y, Nishimura S, Miyaguchi S, Qiang XL, Toyota T. Inhibitory effect of nicotinamide on in vitro and in vivo production of tumor necrosis factor-alpha. *Immunol Lett* 1997; 59: 7-11.
- [22] Pero RW, Axelsson B, Siemann D, Chaplin D, Dougherty G. Newly discovered anti-inflammatory properties of the benzamides and nicotinamides. *Mol Cell Biochem* 1999; 193: 119-25.
- [23] Ungerstedt JS, Blomback M, Söderström T. Nicotinamide is a potent inhibitor of proinflammatory cytokines. *Clin Exp Immunol* 2003; 131: 48-52.
- [24] Ungerstedt JS, Kallner A, Blomback M. Measurement of blood and plasma coagulation time using free oscillating rheometry. *Scand J Clin Lab Invest* 2002; 62: 135-40.
- [25] Babson AL, Olson DR, Palmieri T, Ross AF, Becker DM, Mulqueen PJ. The IMMULITE assay tube: a new approach to heterogeneous ligand assay. *Clin Chem* 1991; 37: 1521-2.
- [26] Österud B. Cellular interactions in tissue factor expression by blood monocytes. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1995; 6: S20-5.
- [27] Österud B. The high responder phenomenon: enhancement of LPS induced tissue factor activity in monocytes by platelets and granulocytes. *Platelets* 1995; 6: 119-25.
- [28] van der Poll T, de Jonge E, Levi M. Regulatory role of cytokines in disseminated intravascular coagulation. *Semin Thromb Hemost* 2001; 27: 639-51.
- [29] Österud B. Tissue factor expression in monocytes: in vitro compared to ex vivo. *Thromb Haemost* 2000; 84: 521-2.
- [30] Ungerstedt JS, Grenander A, Bredbacka S, Blomback M. Clotting onset time may be a predictor of outcome in human brain injury: a pilot study. *J Neurosurg Anesthesiol* 2003; 15: 13-8.
- [31] Welty-Wolf KE, Carraway MS, Miller DL, Ortel TL, Ezban M, Ghio AJ, Idell S, Piantadosi CA. Coagulation blockade prevents sepsis-induced respiratory and renal failure in baboons. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 1988-96.
- [32] Pahl HL. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18: 6853-66.

[33] Knip M, Douek IF, Moore WP, Gillmor HA, McLean AE, Bingley PJ, Gale EA. Safety of high-dose nicotinamide: a review. *Diabetologia* 2000; 43: 1337-45.

[34] Stratford MR, Rojas A, Hall DW, Dennis MF, Dische S, Joiner MC, Hodgkiss RJ. Pharmacokinetics of nicotinamide and its effect on blood pressure, pulse and body temperature in normal human volunteers. *Radiother Oncol* 1992; 25: 37—42.

Авторские права принадлежат журналу *Journal of Thrombosis & Haemostasis* и являются собственностью Blackwell Publishing Limited. Содержимое работы нельзя копировать или отправлять по e-mail на различные сайты или в массовой рассылке без явного письменного согласия на то владельца авторских прав. Тем не менее, пользователи могут распечатывать, загружать или отправлять статьи по электронной почте для личного пользования