

Аденозинзависимая регуляция экспрессии паракринных факторов в моноцитах венозной крови человека

Рыжов С.В., Юрьева К.С., Горемыкин К.В., Короткая Е.В., Салтыкова И.В., Яковлева Ю.А., Куликов Е.С., Фёдорова О.С., Кремер Е.Э., Фаттахов Н.С., Сазонов А.Э.

Adenosine-dependent regulation of paracrine factors expression in human venous blood monocytes

Ryzhov S.V., Yuryeva K.S., Goremykin K.V., Korotkaya Ye.V., Saltykova I.V., Yakovleva Yu.A., Kulikov Ye.S., Fyodorova O.S., Kremer Ye.E., Fattakhov N.S., Sazonov A.E.

Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

© Рыжов С.В., Юрьева К.С., Горемыкин К.В. и др.

Проведено исследование экспрессии поверхностных маркеров: CD1a, CD14, CD209, а также экспрессии мРНК-аденозиновых рецепторов типов A₁, A_{2A}, A_{2B} и A₃, интерлейкина-6 и -8 (ИЛ-6 и ИЛ-8), фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF) в моноцитах человека. В данных клетках выявлено наличие широкого спектра индивидуальных различий в аденозинзависимой регуляции экспрессии паракринных факторов (ИЛ-6, ИЛ-8 и VEGF).

Ключевые слова: моноциты, аденозин, аденозиновые рецепторы, паракринные факторы, интерлейкин-6, интерлейкин-8, фактор роста эндотелия сосудов.

The flow cytometry analysis of human peripheral blood monocytes separated by a two step density gradient centrifugation is reported. The expression of mRNA level of adenosine receptor (AdoR) subtypes (A₁, A_{2A}, A_{2B} and A₃) and interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in monocytes were determined using real-time PCR. We found considerable variation across individuals in mRNA expression levels of paracrine factors after the stimulation of adenosine receptors. Our findings suggests the role of adenosinergic system accounted for interindividual differences in monocyte activation.

Key words: monocyte, adenosine, adenosine receptors, paracrine factors, interleukin 6, interleukin 8, vascular endothelial growth factor.

УДК 612.114:612.112.95:576.3

Введение

Моноциты играют значительную роль в патогенезе различных воспалительных заболеваний: ревматоидного артрита, бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких [1, 2, 24]. Помимо выполнения фагоцитарной и антигенпредставляющей функции моноциты также участвуют в паракринной регуляции [2—5, 26]. Они секретируют отдельные компоненты системы комплемента, факторы, усиливающие свертывание крови (тромбоксаны, тромбопластины) [30] и стимулирующие фибринолиз (активаторы плазминогена) [31], активные формы кислорода [17, 20], ряд цитокинов: интерлейкины (ИЛ) -1 β , -8,

-10, -13, -4, -12, фактор некроза опухолей α (tumor necrosis factor- α — TNF- α), трансформирующий фактор роста β (transforming growth factor- β — TGF- β), интерфероны α и β [1—5, 12, 15, 19, 24]. Посредством выброса тех или иных факторов моноциты регулируют активность клеток иммунной системы и имеют центральное иммунорегуляторное значение в развитии воспаления [2, 26].

Во время острой фазы воспаления моноциты периферической крови мигрируют в ткань, где в зависимости от микроокружения происходит их активация. Одним из компонентов микроокружения является аденозин, концентрация которого существенно повышена

в зоне воспаления. Аденозин — эндогенный нуклеозид, промежуточный продукт пуринового метаболизма — играет важную роль в регуляции тканевого гомеостаза. Концентрация аденозина в норме находится в пределах наномолярных значений. Его количество в тканях существенно повышается при повреждении клеток и при гипоксии, достигая концентрации десятков и сотен микромолей [10, 11, 15, 21]. Аденозин осуществляет свои эффекты посредством активации АР. На сегодняшний день открыты четыре подтипа аденозиновых рецепторов: А₁, А_{2А}, А_{2В} и А₃ [7, 15, 16, 33].

Аденозин через экспрессированные на моноцитах АР снижает индуцированную липополисахаридами продукцию TNF-α [35], повышает секрецию ИЛ-10 и фактора роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor — VEGF) [8]. Это позволило определить характер влияния аденозина как противовоспалительный. В дендритных клетках, полученных из моноцитов, аденозин способствует продукции цитокинов острой фазы воспаления, таких как ИЛ-6 и ИЛ-8 [23], которые в зависимости от места и характера воспалительного процесса либо усугубляют его развитие, либо, наоборот, снижают интенсивность воспалительных реакций [32]. Однако же роль аденозина и АР в регуляции экспрессии мРНК этих цитокинов в моноцитах остается невыясненной. Изучение эффектов стимуляции АР в ходе активации моноцитов способствует пониманию молекулярных механизмов развития воспаления.

Цель работы — изучение эффектов стимуляции аденозиновых рецепторов в регуляции экспрессии мРНК ИЛ-6 и ИЛ-8, а также VEGF у здоровых людей.

Материал и методы

Исследование было проведено на моноцитах, полученных из венозной крови (ВК) 14 практически здоровых добровольцев (8 женщин и 6 мужчин, средний возраст составил $29,8 \pm 3,2$ года). Критерии включения в исследование: возраст от 18 до 50 лет, обоюбого пола; отсутствие атопических заболеваний (аллергический ринит, атопический дерматит, бронхиальная астма) и атопии по данным анамнеза; отсутствие острых заболеваний бронхолегочной системы и обострения хронических заболеваний в течение 4 нед до взятия крови.

Кровь брали из локтевой вены утром натощак в количестве 30 мл. Мононуклеарные клетки выделяли

из 20 мл ВК методом градиентного центрифугирования с фиколлом ($1,077 \text{ г/см}^3$) («ПанЭко», Россия). Выделение моноцитов из мононуклеарной фракции проводили с использованием двойного градиента плотности перколла ($1,13 \text{ г/мл}$; pH 8,5—9,5; температура $25 \text{ }^\circ\text{C}$) («Sigma», США). Моноциты, собранные с раздела фаз, использовали для приготовления суспензии с концентрацией моноцитов $5 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл. Суспензию готовили на основе среды RPMI-1640 («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) («Sigma-Aldrich», США), 50 мкмоль β-меркаптоэтанола («Sigma-Aldrich», США), 2 ммоль L-глутамина («ПанЭко», Россия), 50 ед./л пенициллина («ПанЭко», Россия), 50 г/л стрептомицина («ПанЭко», Россия), 11 мг/л пирувата натрия («ПанЭко», Россия) (полная среда RPMI).

Содержащую моноциты суспензию помещали в 24-луночные пластиковые культуральные планшеты («Nunclon», Дания) в объеме 1 мл на лунку. Инкубировали в течение 1 ч при температуре $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и 5% CO₂. Затем клетки ресуспендировали и отбирали из каждой лунки по 1 мл среды с неадгезировавшими клетками, взамен добавляя по 1 мл полной среды RPMI с добавлением ИЛ-4 («ProSpec», США) и GM-CSF («ProSpec», США) в рабочей концентрации 20 нг/мл. Для стимуляции АР использовали негидролизующий аналог аденозина — N-этилкарбоксамидоаденозин (NECA) в концентрации 30 мкмоль.

Уровень экспрессии поверхностных кластеров дифференциации оценивали с помощью флуорохром-конъюгированных моноклональных антител CD1a («Dako», Бельгия), CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD45, CD209 («BD Pharmingen», США) на проточном цитофлуориметре FACSCalibur («Becton Dickinson», США) по стандартному протоколу. Для этого $0,5 \cdot 10^6$ клеток ресуспендировали в 100 мкл буфера с соответствующими моноклональными антителами в концентрации 1 мкг/мл. Инкубировали в течение 20 мин на холоде. Анализ производили после отмывки от флуорохрома.

Выделение общей РНК из моноцитов проводили с применением набора для выделения общей РНК Qiagen RNeasy Mini kit («Qiagen», США) согласно инструкции производителя. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили при помощи набора реактивов Promega (США) на ДНК-амплификаторе (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя.

ля. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на детектирующем термоциклере ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Пары праймеров для генов AP (A_1 , A_{2A} , A_{2B} и A_3), ИЛ-8, ИЛ-8(A), ИЛ-6 и β -актина были взяты либо из ранее опубликованных работ, либо подобраны специально для выполнения работ по госконтракту № 02.740.11.5150. Подбор праймеров производился в программе Primer 3, находящейся в свободном доступе в сети Интернет (<http://frodo.wi.mit.edu/>). Для амплификации ДНК были взяты следующие праймеры: A_1 -рецептор, прямой праймер: 5'-СТАСТТССАССТГССТС-3', обратный — 5'-GTCACCACCATCTTGTAC-3'; A_{2A} -рецептор, прямой праймер: 5'-GAGCTCCATCTTCACTCTCC-3', обратный — 5'-GCATGGGAGTCAGGCCGATG-3'; A_{2B} -рецептор, прямой праймер: 5'-GTTCGACAGATACCTGGCCATC-3', обратный — 5'-CAGTTGTTGGTGGCACTGTC-3'; A_3 -рецептор, прямой праймер: 5'-GTTGTCCGCAAGGCTGACC-3', обратный — 5'-CAAATGACTGATTACAGAG-3'; ИЛ-8, прямой праймер: 5'-TGCCAAGGAGTGCTAAAG-3', обратный — 5'-TCCACAACCCTCTGCAC-3'; ИЛ-6, прямой праймер: 5'-CACAGACAGCCACTCACCTC-3', обратный — 5'-TTTTCTGCCAGTGCCTCTTT-3'; VEGF, прямой праймер: 5'-GGGCAGAATCATCACGAAGTG-3', обратный — 5'-ATTGGATGG CAGTAGCTGCG-3'; β -актин, прямой праймер: 5'-CGCCCCAGGCACCAGGGC 3', обратный — 5'-GGCTGGGGTGTGTAAGGT 3'.

Результаты представлены в виде выборочного среднего M и стандартной ошибкой среднего m , медианы Me , верхнего и нижнего квартилей (Q_1 — Q_3).

Для определения соответствия распределения количественных признаков нормальному закону использовали критерий согласия Колмогорова—Смирнова с поправкой Лиллиефорса. Так как проверка показала, что ни одна из выборок не была распределена по нормальному закону, проверка статистической значимости равенства выборочных средних независимых выборок осуществлялась с помощью U -критерия Манна—Уитни, зависимых — с помощью критерия Вилкоксона.

Для выявления взаимосвязей между показателями, оценки их силы и направления применяли корреляционный анализ Спирмена. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Все статистические вычисления производились при помощи про-

грамм GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, США) и SPSS (IBM, США).

Результаты исследования

В результате выделения на градиенте фикола была получена фракция мононуклеарных клеток (МНФ) ВК человека, представленная лимфоцитами и моноцитами. Для начальной характеристики клеточных субпопуляций были использованы показатели бокового (SSC) и переднего (FSC) светорассеивания, полученные с использованием проточной цитофлуориметрии. Согласно ее результатам, моноциты составили 14—23% от числа клеток МНФ (рис. 1,а, область R1). Лимфоциты, характеризующиеся низкими сигналами SSC/FSC, представляли 70—80% клеточной массы МНФ (рис. 1,а, область R2).

После разделения лимфоцитов и моноцитов с использованием градиента плотности перколла клеточная фракция, собранная с раздела фаз, содержала $(74,2 \pm 5,5)\%$ клеток, имеющих средние показатели SSC/FSC, характерные для моноцитов (рис. 1,б, область R1). Для дальнейшей характеристики фракции использовали антитела к специфическим клеточным маркерам — CD14, экспрессирующегося на поверхности моноцитов, и к поверхностному антигену дендритных клеток CD209. Данные проточной цитофлуориметрии для области R1 представлены на рис. 1,в. Свыше 70% $((79,0 \pm 6,0)\%)$ клеток, полученных выделением на двойном градиенте перколла, экспрессировали CD14 (правый нижний квадрант). Минорная фракция клеток CD14⁺ $((1,3 \pm 0,6)\%)$ также несла на своей поверхности CD209 (правый верхний квадрант). Экспрессия CD209 находилась в пределах низких значений флуоресценции, что характерно для предшественников дендритных клеток в ВК. Около 20% $((19,0 \pm 3,0)\%)$ клеток в области левого нижнего квадранта были охарактеризованы как негативные по двум исследованным маркерам (CD14 и CD209).

С целью определения присутствия лимфоцитов в моноцитарной области, установленной по значениям SSC/FSC (рис. 1,в, область R1), были использованы антитела к специфическим маркерам, включающим CD3, маркер Т-лимфоцитов, и CD19, маркер В-лимфоцитов. Свыше 90% $((93,2 \pm 4,1)\%)$ клеток не обладали способностью связывать антитела к CD3 или CD19 (рис. 1,г). Минорная фракция клеток $((6,2 \pm 2,0)\%)$ характеризовалась низкими значениями флуоресцен-

ции в областях, положительных для CD19 (рис. 1, левый верхний квадрант), CD3 (правый нижний квадрант) и CD3/CD19 (правый верхний квадрант). Однако же значения флуоресценции оказались существенно

ниже значений, характерных для лимфоцитов в области R2 (лимфоцитарная область по значениям SSC/FSC), использованных в качестве положительного контроля (данные в статье не приведены).

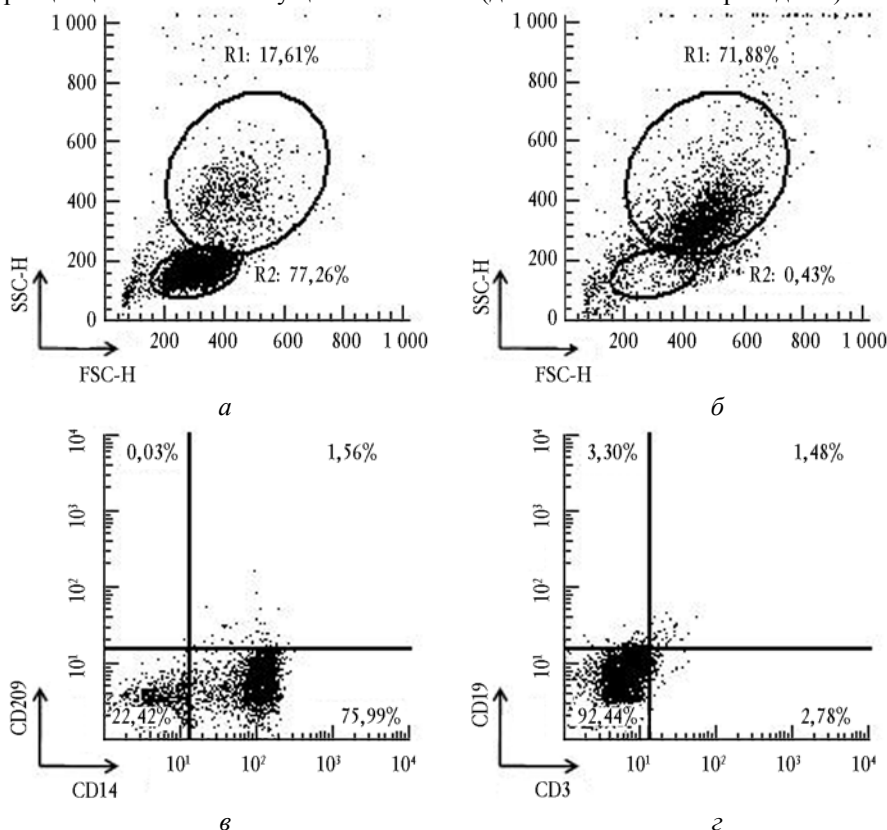


Рис. 1. Популяции: *а* — мононуклеарных клеток венозной крови здоровых обследуемых. Представлено распределение клеток на две популяции: лимфоциты и моноциты — в зависимости от сигналов бокового SSC и переднего светорассеивания FSC. Ограничена область лимфоцитов R2 и моноцитов R1; *б* — клеток во фракции, собранной с границы раздела фаз после разделения МНК ВК на градиенте перколлы. Области лимфоцитарной и моноцитарной популяций установлены как при анализе мононуклеарной фракции. Распределение: *в* — клеток, связавшихся с моноклональными антителами CD14-FITC и CD209-PerCy5.5, после выделения моноцитарной области; *г* — клеток, связавшихся с монокло-

антителами CD3-FITC и CD19-PE, после выделения моноцитарной области

На рис. 2 приведены данные, характеризующие уровень экспрессии четырех типов АР в выделенной популяции клеток. АР типа А₂ (А_{2А} и А_{2В}) представлены более высоким уровнем экспрессии мРНК по сравнению с типами А₁ и А₃. Уровень экспрессии АР А_{2А} составил 0,036% (0,011—0,084%) от уровня экспрессии β-актина, уровень экспрессии А_{2В} — 0,022% (0,006—0,040%). Экспрессия мРНК АР типов А₁ и А₃ была на порядок ниже обнаруженной для А₂ и составила 0,001% (0—0,005%) и 0,001% (0—0,003%), соответственно. Необходимо отметить, что, несмотря на существенные индивидуальные различия в экспрессии АР в каждом отдельном наблюдении, экспрессия

мРНК типа А₂ превышала таковую для рецепторов А₁ или А₃. Полученные данные подтверждают результаты предыдущих исследований [18], в которых впервые было обнаружено преобладание рецепторов типа А₂ над А₁ и А₃ в МНФ ВК человека.

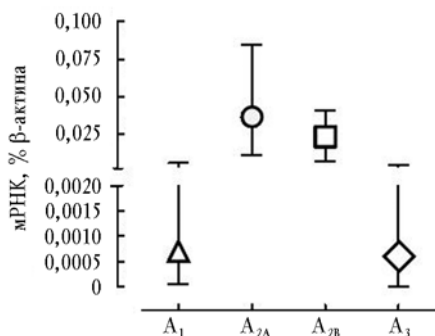


Рис. 2. Экспрессия подтипов аденозиновых рецепторов в моноцитарной фракции клеток, выделенной из венозной крови человека. мРНК была получена из клеток после выделения моноцитов с использованием градиента перколлы. Данные 14 независимых выделений нормализованы по уровню экспрессии β-актина, представлены в виде медианы *Me* и значений интерквартильного размаха (Q_1 — Q_3)

Обнаружено, что в МНФ, полученных от разных людей, эффекты от стимуляции АР негидролизуемым аналогом аденозина (NECA) проявляются по-разному. По изменению уровня продукции того или иного паракринного фактора все обследуемые разделялись на две подгруппы. Подгруппа 1 состояла из доноров, у которых было выявлено увеличение экспрессии мРНК при инкубации с NECA. Подгруппа 2 включала наблюдения, в которых экспрессия мРНК снижалась или же не отличалась от уровня, определенного при отсутствии стимуляции (таблица). Распределение по подгруппам для ИЛ-6, -8 и VEGF различалось. В зависимости от уровня секреции ИЛ-8 в подгруппу 1 было включено 8 человек. В этой подгруппе наблюдалось увеличение экспрессии мРНК ИЛ-8 при стимуляции в 3 раза ($p < 0,01$). Подгруппа 2 состояла из 6 доноров, у которых не было обнаружено существенных различий

между базальной и стимулированной экспрессией мРНК ИЛ-8. Уровень мРНК ИЛ-6 повышался под действием NECA у большего количества доноров. Подгруппу 1 составили 10 человек, у которых наблюдалось увеличение экспрессии ИЛ-6 в 6,5 раза ($p < 0,01$). У 4 человек (подгруппа 2) не выявлено статистически значимых эффектов от действия аналога аденозина. Повышение экспрессии мРНК VEGF под действием NECA в подгруппе 1 составило 4,3 раза ($p < 0,01$). Интересно отметить, что во второй подгруппе происходило статистически значимое снижение уровня экспрессии в 2,1 раза, не наблюдаемое для интерлейкинов (ИЛ-6 и -8).

Проведенный корреляционный анализ не показал строгих взаимосвязей между уровнями экспрессии АР и паракринных факторов. При этом была обнаружена сильная (ранговый коэффициент корреляции Спирмена $r^2 = 0,864$; $p = 0,001$) корреляционная зависимость между уровнями экспрессии мРНК АР A_1 и A_{2A} .

Чтобы определить, существует ли зависимость между уровнями экспрессии АР и влиянием NECA на изменения в уровне мРНК паракринных факторов, сравнили экспрессию типов АР в подгруппах 1 и 2. Среди всех изученных факторов статистически значимые различия найдены только для подгрупп по ИЛ-8 (рис. 3). Уровень экспрессии мРНК для рецепторов A_3 относительно такового для β-актина в подгруппе 1 оказался существенно ниже, чем в подгруппе 2 (рис. 3,б): 0,0001% (0—0,0004%) против 0,0043% (0,0020—0,0168%) соответственно ($p < 0,05$).

Экспрессия мРНК паракринных факторов в подгруппах с разным ответом на стимуляцию аденозиновых рецепторов (*Me* (Q_1 — Q_2))

Уровень экспрессии мРНК, % от β-актина	ИЛ-8		ИЛ-6		VEGF	
	Подгруппа 1 (n = 8)	Подгруппа 2 (n = 6)	Подгруппа 1 (n = 10)	Подгруппа 2 (n = 4)	Подгруппа 1 (n = 8)	Подгруппа 2 (n = 6)
Базальный	0,59 (0,43—2,24)	3,54 (2,06—7,65) $p_2 = 0,081$	0,006 (0,029—0,250)	0,087 (0,28—0,145) $p_2 = 0,053$	0,069 (0,029—0,250)	0,148 (0,089—0,224) $p_2 = 0,345$
NECA-стимулированный	1,96 (1,02—6,67) $p_1 < 0,01$	2,06 (1,50—3,93) $p_1 = 0,065$	0,134 (0,089—1,468) $p_1 < 0,01$	0,024 (0,016—0,036) $p_1 = 0,125$	0,134 (0,089—1,467) $p_1 < 0,01$	0,073 (0,048—0,182) $p_1 = 0,031$

Примечание. *n* — количество пациентов; p_1 — уровень статистической значимости различий при сравнении с базальным уровнем; p_2 — уровень статистической значимости различий при сравнении между подгруппами.

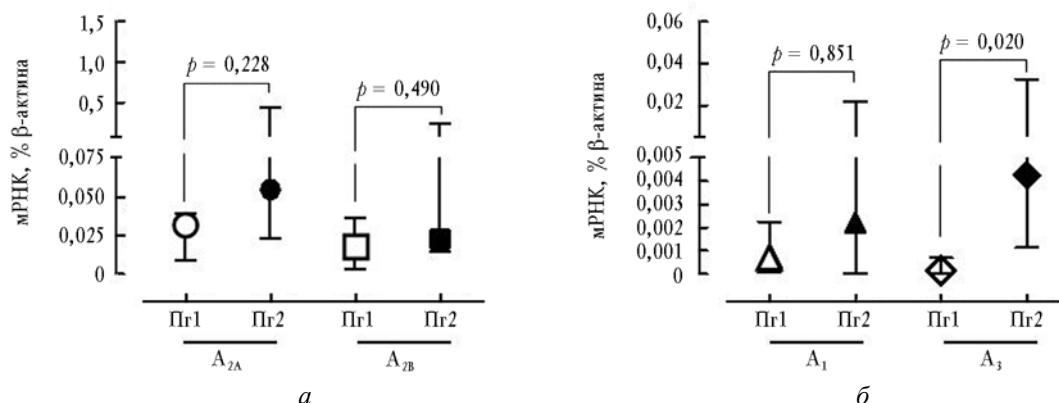


Рис. 3. Экспрессия мРНК подтипов аденозиновых рецепторов в подгруппе 1 (Pr1), характеризующейся повышением экспрессии мРНК ИЛ-8 при стимуляции NECA, а также в подгруппе 2 (Pr2), без стимуляции NECA. Оценка уровня статистической значимости различий была проведена

с помощью критерия Манна—Уитни

Обсуждение

Среди известных и получивших наибольшее распространение методов выделения моноцитов ВК из мононуклеаров выделяют два: иммуноспецифический, с использованием антител к всеобщему маркеру моноцитов — CD14, и адгезионный, простой и доступный метод, основанный на избирательной способности моноцитов (в отличие от большинства лимфоцитов) быстро и прочно прикрепляться к поверхности пластика. Недостатком первого метода является стимуляция молекул CD14, коактиваторов Toll-like-рецепторов, что оказывает эффект на экспрессию и секрецию цитокинов и ростовых факторов [34, 29]. Второй метод, несмотря на очевидную легкость в исполнении, плохо поддается контролю, требует последующего снятия моноцитов с пластика, если необходима высокая плотность клеток в культуре, и приводит к обогащению моноцитарной фракции преимущественно клетками с высокой экспрессией интегриновых рецепторов CD11b/CD18 [9, 22, 25, 28].

В данной работе использовался метод, основанный на разделении моноцитов и лимфоцитов МНФ с помощью изокинетического центрифугирования в градиенте перколла. Данный подход позволил получить моноцитарную фракцию с чистотой выше 70%. Моноциты ВК включают несколько субпопуляций разной степени зрелости и с различной направленностью дифференцировки: в макрофаги либо в дендритные клетки. Согласно данным проточной цитофлуориметрии, клетки моноцитарной фракции, полученные в исследовании, включали несколько субпопуляций:

характеризующиеся высокой плотностью моноцитарного антигена — CD14, негативные по CD14, а также коэкспрессирующие CD209, что характерно для начальных этапов дифференцирования моноцитов и клеток-предшественников в дендритные клетки [27].

В ранее проведенных собственных исследованиях показано, что длительная активация AP (более 5 дней) при культивировании моноцитов ВК приводит к формированию специфической клеточной популяции с высокой экспрессией ИЛ-6, -8 и VEGF [23]. Долговременное повышение уровня внеклеточного аденозина и стимуляция рецепторов характерны для хронических воспалительных процессов [15, 18]. В настоящей работе были исследованы краткосрочные эффекты аденозиновой регуляции функций моноцитов. Обнаружены существенные индивидуальные различия (достигающие порядковых величин) в уровнях базальной (нестимулированной) экспрессии мРНК каждого из исследуемых факторов. Эти различия, очевидно, являются отражением индивидуальных особенностей регуляции внутриклеточного метаболизма каждого донора.

Неожиданным оказалось наличие разнонаправленных изменений экспрессии мРНК паракринных факторов в ответ на стимуляцию AP негидролизруемым аналогом аденозина. Аденозинзависимое повышение экспрессии ИЛ-6, -8 и VEGF, опосредованное активацией AP A₂, в особенности A_{2B}, описано в литературе [6, 14, 23]. Однако, ориентируясь на полученные собственные результаты, можно сказать, что стимуляция аденозиновых рецепторов NECA не всегда приводит к увеличению мРНК паракринных факторов

(ИЛ-6, -8 и VEGF). Была зарегистрирована экспрессия A_2 AP, преобладающая над экспрессией A_1 и A_3 , в каждом из наблюдений. Наличие строгих корреляционных связей между экспрессией AP подтипов A_{2A} , A_{2B} и влиянием NECA на уровень экспрессии мРНК паракринных факторов обнаружить не удалось. Тем не менее выявленные индивидуальные различия в аденозиновой регуляции экспрессии паракринных факторов при подтвержденной экспрессии AP A_2 ранее не были описаны в научной литературе. Это наблюдение представляется важным для разработки новых методов лекарственной терапии с помощью ингибиторов AP. В настоящее время несколько таких препаратов, антагонистов A_2 -рецепторов, находятся на разных стадиях клинических испытаний [36]. Проведенное исследование указывает на необходимость более детального изучения механизмов, лежащих в основе индивидуальных особенностей аденозиновой регуляции до применения таких препаратов в клинической практике.

Результаты данной работы позволили идентифицировать модулирующую функцию AP типа A_3 в регуляции экспрессии мРНК ИЛ-8. Из литературы известно, что в повышении продукции ИЛ-8 участвуют A_{2B} -рецепторы [12, 13, 23]. Обнаружено, что в моноцитах ВК с высокой экспрессией мРНК AP типа A_3 NECA не вызывает повышения синтеза мРНК ИЛ-8. Это позволяет предположить, что активация A_3 играет роль своеобразного ограничителя работы внутриклеточных сигнальных путей, включающихся при активации A_{2B} и приводящих к усилению экспрессии ИЛ-8. Поскольку ранее эффекты A_{2B} были показаны в основном на клеточных линиях, у которых экспрессия подтипов аденозиновых рецепторов, как правило, находится на постоянном уровне, вполне объяснимо, почему эта роль A_3 до настоящего момента оставалась невыясненной.

Заключение

Проведенное исследование показало наличие широкого спектра индивидуальных различий в аденозинзависимой регуляции экспрессии паракринных факторов в моноцитах венозной крови человека.

В частности, у одних пациентов наблюдается повышение секреции паракринных факторов (ИЛ-6, -8, VEGF) под действием аналога аденозина, у других — нет. При этом не установлено строгих корреляцион-

ных связей между уровнями экспрессии аденозиновых рецепторов и паракринных факторов. Однако же обнаружено, что в моноцитах ВК с высокой экспрессией мРНК AP типа A_3 аналог аденозина не вызывает повышения синтеза мРНК ИЛ-8. Это наблюдение позволяет предположить, что активация A_3 играет роль своеобразного ограничителя работы внутриклеточных сигнальных путей, включающихся при активации A_{2B} и приводящих к усилению экспрессии ИЛ-8.

Принимая во внимание важную роль паракринной функции моноцитов в регуляции воспаления, необходимо дальнейшее использование описанного подхода для изучения роли аденозина и аденозиновых рецепторов в различных патофизиологических процессах.

Работа выполнена на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории СибГМУ (г. Томск) при поддержке гранта ФЦП 1.5 № 02.740.11.5150.

Литература

1. Геренг Е.А., Суходоло И.В., Плешко Р.И. и др. Морфологические и биохимические маркеры воспалительных реакций в слизистой оболочке бронхов при тяжелой форме бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких // Бюл. сиб. медицины. 2009. Т. 8, № 3. С. 11—16.
2. Маянский Д.Н. Хроническое воспаление. М.: Медицина, 1991. 270 с.
3. Наследникова И.О., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Молекулярные основы противовирусной стратегии организма. Томск: Из-во Том. ун-та, 2005. 128 с.
4. Рязанцева Н.В., Наследникова И.О., Зима А.П. и др. Молекулярные механизмы изменения продукции ФНО- α мононуклеарами крови при хроническом вирусном гепатите С // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2005. Т. 139, № 2. С. 191—195.
5. Уразова О.И., Новицкий В.В., Помогаева А.П. Мононуклеары крови при инфекционном мононуклеозе у детей. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2003. 166 с.
6. Ben Addi A., Lefort A., Hua X. Modulation of murine dendritic cell function by adenine nucleotides and adenosine: Involvement of the A_{2B} receptor // Eur. J. Immunol. 2008. V. 38. P. 1610—1620.
7. Bruns R.F., Lu G.H., Pugsley T.A. Characterization of the A_2 adenosine receptor labeled by [3H]NECA in rat striatal membranes // Mol. Pharmacol. 1986. V. 29. P. 331—346.
8. Clark A.N., Youkey R., Liu X. et al. A_1 adenosine receptor activation promotes angiogenesis and release of VEGF from monocytes // Circ Res. 2007. V. 101. № 11. P. 1130—1108.
9. Eue I., Pietz B., Storck J. et al. Transendothelial migration of 27E10+ human monocytes // Int. Immunol. 2000. № 12. P. 1593—1604.
10. Fredholm B.B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair // Cell Death Differ.

2007. V. 14. P. 1315—1323.
11. *Fredholm B.B., Ijzerman A.P., Jacobson K.A. et al.* International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors // *Pharmacol. Rev.* 2001. V. 53. P. 527—552.
 12. *Feoktistov I., Biaggioni I.* Adenosine A2b receptors evoke interleukin-8 secretion in human mast cells. An enprofylline-sensitive mechanism with implications for asthma // *J. Clin. Invest.* 1995. V. 96, № 4. P. 1979—1986.
 13. *Gessi S., Fogli E., Sacchetto V. et al.* Adenosine modulates HIF-1{alpha}, VEGF, IL-8, and foam cell formation in a human model of hypoxic foam cells // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2010. V. 30, № 1. P. 90—97.
 14. *Haskó G., Csóka B., Németh Z.H. et al.* A2B adenosine receptors in immunity and inflammation // *Trends in Immunology.* 2009. V. 30, № 6. P. 263—270.
 15. *Haskó G., Linden J., Cronstein B., Pacher P.* Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases // *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2008. № 7 (9). P. 759—770.
 16. *Jin X., Shepherd R.K., Duling B.R., Linden J.* Inosine binds to A3 adenosine receptors and stimulates mast cell degranulation // *J. Clin. Invest.* 1997. V. 100. P. 2849—2857.
 17. *Köhl R., Preiss S., von Knethen A., Brüne B.* Oxidized low-density lipoprotein depletes PKCalpha and attenuates reactive oxygen species formation in monocytes/macrophages // *Cardiovasc. Res.* 2006. V. 71, № 3. P. 574—585.
 18. *Lambrecht B.N.* Lung dendritic cells: targets for therapy in allergic disease // *Curr. Mol. Med.* 2008. № 8 (5). P. 393—400.
 19. *Le Moine O., Stordeur P., Schandené L. et al.* Adenosine enhances IL-10 secretion by human monocytes // *J. Immunol.* 1996. V. 156, № 11. P. 4408—4414.
 20. *Lim H.S., Patel J.V., Lip G.Y.* Reactive oxygen species production by circulating monocytes: insights from pathophysiology to clinical hypertension // *J. Hum. Hypertens.* 2006. V. 20, № 5. P. 307—309.
 21. *Linden J.* Molecular approach to adenosine receptors: receptor-mediated mechanisms of tissue protection // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. V. 41. P. 775—787.
 22. *Meerschaert J., Furie M.B.* The adhesion molecules used by monocytes for migration across endothelium include CD11a/CD18, CD11b/CD18, and VLA-4 on monocytes and ICAM-1, VCAM-1, and other ligands on endothelium // *J. Immunol.* 1995. V. 154. P. 4099—4012.
 23. *Novitskiy S.V., Ryzhov S., Zaynagetdinov R.* Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function // *Blood.* 2008. V. 112, № 5. P. 1822—1831.
 24. *Parihar A., Eubank T.D., Doseff A.I.* Monocytes and Macrophages Regulate Immunity through Dynamic Networks of Survival and Cell Death // *J. Innate Immun.* 2010. № 2 (3). P. 204—215.
 25. *Petit-Bertron A.F., Fitting C., Cavaillon J.M., Adib-Conquy M.* Adherence influences monocyte responsiveness to interleukin-10 // *J. Leukoc. Biol.* 2003. V. 73, № 1. P. 145—154.
 26. *Rees A.J.* Monocyte and macrophage biology: an overview // *Semin Nephrol.* 2010. V. 30, № 3. P. 216—233.
 27. *Relloso M., Puig-Kröger A., Muñoz Pello O. et al.* DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-β, and anti-inflammatory agents // *J. Immunol.* 2002. V. 168. P. 2634—2643.
 28. *Rothe G., Gabriel H., Kovacs E. et al.* Peripheral Blood Mononuclear Phagocyte Subpopulations as Cellular Markers in Hypercholesterolemia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996. V. 16. P. 1437—1447.
 29. *Schilling J.D., Martin S.M., Hunstad D.A. et al.* CD14- and Toll-Like Receptor-Dependent Activation of Bladder Epithelial Cells by Lipopolysaccharide and Type 1 Piliated *Escherichia coli* // *Infect. Immun.* 2003. V. 71. P. 1470—1480.
 30. *Stachowska E. et al.* Prostaglandin E2 (PGE2) and thromboxane A2 (TXA2) synthesis is regulated by conjugated linoleic acids (CLA) in human macrophages // *J. Physiol. Pharmacol.* 2009. V. 60. № 1. P. 77—85.
 31. *Tabengwa E.M., Wheeler C.G., Yancey D.A. et al.* Alcohol-induced up-regulation of fibrinolytic activity and plasminogen activators in human monocytes // *Alcohol Clin. Exp. Res.* 2002. V. 26, № 8. P. 1121—1127.
 32. *Tilg H., Dinarello C.A., Mier J.W.* IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators // *Immunol Today.* 1997. V. 18, № 9. P. 428—432.
 33. *Van Calker D., Muller M., Hamprecht B.* Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells // *J. Neurochem.* 1979. V. 33. P. 999—1005.
 34. *Vasselon T., Hanlon W.A., Wright D.A., Detmers P.A.* Toll-like receptor 2 (TLR2) mediates activation of stress-activated MAP kinase p38 // *J. of Leukocyte Biology.* 2002. V. 71. P. 503—510.
 35. *Zhang J.G., Hepburn L., Cruz G. et al.* The role of adenosine A2A and A2B receptors in the regulation of TNF-alpha production by human monocytes // *Biochem. Pharmacol.* 2005. V. 69, №6. P. 883—889.
 36. *Zhou Y., Schneider D.J., Blackburn M.R.* Adenosine signaling and the regulation of chronic lung disease // *Pharmacol. Ther.* 2009. V. 123. P. 105—116.

Поступила в редакцию 16.02.2011 г.

Утверждена к печати 01.04.2011 г.

Сведения об авторах

С.В. Рыжов — канд. мед. наук, ассистент-профессор отделения кардиологии медицинского факультета Университета Вандербилта (г. Нэшвилл, США).

К.С. Юрьева — студентка 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

К.В. Горемыкин — аспирант кафедры биохимии и молекулярной биологии СибГМУ (г. Томск).

Е.В. Короткая — студентка 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

Рыжов С.В., Юрьева К.С., Горемыкин К.В. и др. *Аденозинзависимая регуляция экспрессии паракринных факторов...*

И.В. Салтыкова — канд. мед. наук, мл. научный сотрудник ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).

Ю.А. Яковлева — студентка 6-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

Е.С. Куликов — канд. мед. наук, ассистент кафедры госпитальной терапии с курсом спортивной медицины и реабилитации СибГМУ (г. Томск).

О.С. Фёдорова — канд. мед. наук, ассистент кафедры факультетской педиатрии с курсом детских болезней лечебного факультета СибГМУ (г. Томск).

Е.Э. Кремер — аспирант кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии СибГМУ (г. Томск), мл. науч. сотрудник ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).

Н.С. Фаттахов — студент 4-го курса медико-биологического факультета СибГМУ (г. Томск).

А.Э. Сазонов — д-р мед. наук, зам. зав. ЦНИЛ СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Горемыкин Константин Викторович, тел. 8-923-418-1510; e-mail: covigo@mail.ru