Биомедицинская химия, 2014 том 60, вып. 2, с. 246-257.

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 612.017.1:57.052

ВЛИЯНИЕ СТИМУЛЯЦИИ АДЕНОЗИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ МИЕЛОИДНЫХ КЛЕТОК НА МИГРАЦИЮ ЛЕЙКОЦИТАРНОГО ИНФИЛЬТРАТА ПРИ ТЕРМИЧЕСКОМ ПОВРЕЖДЕНИИ

К.С. Юрьева*, К.В. Невская, А.Н. Дзюман, О.П. Иккерт, В.В. Иванов, И.В. Салтыкова, А.Э. Сазонов, Л.М. Огородова

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Сибирский государственный медицинский университет” Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Московский тракт, 2, 634050 Томск; тел.: 8 (3822) 53–28–97; факс: 8 (3822) 53–33–09; эл. почта: yuryevaksenia@gmail.com

Аденозин – эндогенный пуриновый нуклеозид, образующийся в процессе метаболизма ATP и обладающий свойствам сигнальной молекулы. Концентрация аденозина повышается при гипоксии и при повреждении клеток. Было обнаружено, что локальная концентрация аденозина существенно повышается при ожоге, но его эффекты в очаге повреждения практически не изучены. Циркулирующие миелоидные клетки несут на своей поверхности специфические рецепторы к аденозину, и при ожоге мигрируют в зону повреждения. Мы показали, что миелоидные клетки при стимуляции аденозиновых рецепторов уже через 72 ч после начала культивирования приобретали отличный от не стимулированных аденозином клеток антигенный фенотип – сохраняли экспрессию моноцитарного маркера CD14 при развитии экспрессии маркеров дендритных клеток: CD209, CD1a. Такие клетки имели также более высокий уровень экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов и хемоаттрактантов (IL-6, IL-8, IL-1β). Инъецированные в очаг термического повреждения, миелоидные клетки модифицированные аденозином увеличивали объёмную плотность смешанного клеточного инфильтрата (гранулоцитов, моноцитов, фибробластов) на 7 сутки. Таким образом, мы установили, что одним из эффектов аденозина в очаге термического повреждения является повышение миграции гранулоцитов и моноцитов в ответ на повышенную наработку паракринных факторов миелоидными клетками.

Ключевые слова: аденозин, моноциты, ожог, паракринные факторы.

ВВЕДЕНИЕ. Аденозин – эндогенная сигнальная молекула, образующаяся в процессе метаболизма ATP [1]. Концентрация аденозина во внеклеточной среде существенно повышается при повреждении целостности клеток и при гипоксии [2]. Эффекты аденозина опосредуются

* - адресат для переписки

4-мя подтипами специфических аденозиновых рецепторов, определяемых на поверхности различных типов клеток практически во всех тканях. Рецепторы обладают разными пороговыми концентрациями активации и опосредуют различные эффекты аденозина [3-7].

Роль аденозина в патогенезе многих заболеваний (астма, ХОБЛ, ишемическое повреждение, артрит, воспалительные заболевания кишечника, сепсис) широко исследована [8-10], однако при термическом поражении его эффекты изучены недостаточно. Ожоги, как и другие повреждения, в динамике заживления проходят три фазы: альтерации, пролиферации и репарации [11]. В фазу альтерации происходит массивная гибель клеток из-за термического воздействия и развивающейся воспалительной реакции, что, как предполагается, сопровождается наработкой внеклеточного аденозина [12]. Действительно, в одной из немногих работ, посвященных данной теме, было показано увеличение концентрации аденозина в ожоговом экссудате до 1,13±0,52 мМ [13]. Таких локальных концентраций аденозина достаточно для стимуляции всех подтипов аденозиновых рецепторов на клетках, вовлеченных в воспалительный процесс [14].

В очаге термического повреждения специфические рецепторы к аденозину на своей поверхности имеют фибробласты, эпителиальные и эндотелиальные клетки, клетки иммунной системы. Однако результирующий эффект стимуляции этих рецепторов при ожоге не изучен. Ответ на данный вопрос актуален, поскольку при других патологиях, тканях и концентрациях, аденозин имеет многообразные эффекты, вплоть до противоположных. Так, например, в тканях легких, кожи, печени при восстановлении после повреждения стимуляция аденозиновых рецепторов на фибробластах ведёт к усилению наработки межклеточного матрикса, а в сердце – к снижению уровня продукции матрикса [15].

По отношению к иммунным клеткам аденозин обладает модулирующим действием, и, в зависимости от пути трансдукции сигнала, его эффекты могут быть как про-, так и противовоспалительными [16-19]. Причём иммуномодуляция происходит не только за счёт прямого действия на клетку, но и посредством контроля секреции паракринных факторов, продуцируемых эффекторными клетками. Действительно, в области термического повреждения на третьи сутки были определены повышенные концентрации провоспалительных паракринных факторов (IL-6, KC (Keratinocyte chemoattractant)) [20]. В нескольких исследованиях было показано, что миелоидные клетки, дифференцированные в присутствии неселективного стимулятора аденозиновых рецепторов, характеризуются повышенной экспрессией мРНК ряда паракринных факторов, в том числе и IL-6. [21-23]. Все это является косвенными признаками, указывающими на возможное участие аденозина в процессах регуляции цитокиновой продукции при ожогах.

Для характеристики эффектов аденозина на миелоидные клетки в очаге термического повреждения, в первую очередь, мы оценили влияние аденозина в экспериментах *in vitro*. Был смоделирован режим стимуляции аденозиновых рецепторов, соответствующий начальным стадиям повреждения. Оценивались уровни экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов, а также изменение антигенного фенотипа клеток. Для определения эффектов непосредственно при термическом повреждении миелоидные клетки, предварительно модифицированные аденозином, инъецировали в области модельного ожога и оценивали гистологические показатели регенерации ткани.

МЕТОДИКА.

Выделение и культивирование миелоидных клеток. Исследование было проведено на культуре моноцитов, полученных из периферической крови 30 здоровых доноров. Все доноры были осведомлены о целях исследования и подписали информированное согласие на участие в эксперименте. Моноциты получали методом двухступенчатого градиентного центрифугирования. Мононуклеарные клетки выделяли из 30 мл периферической крови методом градиентного центрифугирования с фиколлом (ρ=1,077 г/см^3) (“ПанЭко”, Россия). Выделение моноцитов из мононуклеарной фракции проводили с использованием двойного градиента плотности перколла (1,130 г/мл, pH 8,5-9,5, 25°C) (“Sigma”, США). Моноциты, собранные с раздела фаз, использовали для приготовления суспензии с концентрацией моноцитов 5×10^5 клеток/мл. Суспензию готовили на основе среды RPMI-1640 (“Панэко”, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячей сыворотки (ЭТС) (“Sigma-Aldrich”, США), 50 мкМ β-меркаптоэтанола (“Sigma-Aldrich”, США), 2 мМ L-глутамина (“Панэко”, Россия), раствор антибиотика и антимикотика (100 ед/мл пенициллина, 1 мг/мл стрептомицина, 2,5 мг/мл амфотерицина Б (AntibioticAntimycoticSolution “Sigma-Aldrich”, США), 110 мг/л пирувата натрия (“Панэко”, Россия) (полная среда RPMI).

Содержащую моноциты суспензию помещали в 24-луночные пластиковые культуральные планшеты (“Nunclon”, Дания) в объёме 1 мл на лунку. Инкубировали в течение 1 часа при 37°C и 5% CO_2. Далее клетки ресуспендировали и отбирали из каждой лунки по 1 мл среды с неадгезировавшими клетками, взамен добавляя по 1 мл полной среды RPMI с добавлением IL-4 (“ProSpec”, США) и GM-CSF (“ProSpec”, США) в рабочей концентрации 20 нг/мл и культивировали 3 суток. Для стимуляции аденозиновых рецепторов использовали негидролизуемый аналог аденозина – N-этилкарбоксамидоаденозин (NECA) в концентрации 100 мкМ.

Проточная цитофлюориметрия. Уровень экспрессии поверхностных кластеров дифференциации оценивали с помощью флуорохром-конъюгированных моноклональных антител CD1a (“Dako”, Бельгия), CD14, CD209 (“BD Pharmingen”, США) на проточном цитофлуориметре FACSCantoII (“BectonDickinson”, США) по стандартному протоколу. Для этого, $0,5\times10^6$ 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 флюорохрома.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Выделение общей РНК из моноцитов проводили с использованием набора для выделения общей РНК “QiagenRNeasyMinikit” (“Qiagen”, США), согласно инструкции производителя. Синтез комплементарной ДНК (кДНК) проводили с использованием набора реактивов “Promega” (США) на ДНК-амплификаторе (“AppliedBiosystems”, США), согласно инструкции производителя. Полимеразную цепную реакцию в реальном времени проводили на детектирующем термоциклере ДТ-96 (“ДНК-Технология”, Россия). Пары праймеров для генов аденозиновых рецепторов (A_1, A_{2A}, A_{2B} и A_3) были взяты из ранее опубликованных работ. Подбор остальных праймеров производился с использованием программы IDT'sPrimerQuest, находящейся в свободном доступе в сети интернет (http://idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/). Для амплификации ДНК использовали следующие праймеры: A_1-рецептор, прямой праймер: 5'-CTACTTCCACACCTGCCTC-3', обратный: 5'-GTCACCACCATCTTGTAC-3'; A_{2A}-рецептор, прямой праймер: 5'-GAGCTCCATCTTCAGTCTCC-3', обратный:

5'-GCATGGGAGTCAGGCCGATG-3; A_{2B}-рецептор, прямой праймер: 5'-GTC-GACAGATACCTGGCCATC-3', обратный: 5'-CAGTTGTTGGTGGCACTGTC-3'; A_3-рецептор, прямой праймер: 5'-GTTGTCCGCAAGGCTGACC-3', обратный: 5'-CAAATGACTGATTACAGAG-3'; IL-6, прямой праймер: 5'- TGAAAGCAGCAAAGAGGCACTG-3', обратный: 5'-TTTCACCAGGCA-AGTCTCCTCA-3'; IL-8, прямой праймер: 5'-TCAGAGACAGCAGAGCACA-CAA-3', обратный: 5'-GGCCAGCTTGGAAGTCATGTTT-3'; IL-1β, прямой праймер: 5'- ATCTGTACCTGTCCTGCGTGTT-3', обратный: 5'-TCTGCTTGA-GAGGTGCTGATGT-3'; β-актин, прямой праймер: 5'-CGCCCCAGGCACCA-GGGC-3', обратный: 5'-GGCTGGGGTGTTGAAGGT-3'.

Экспериментальная модель ожога у мышей. В экспериментах участвовали 36 мышей линии C57Bl/6JY массой 25-28 г. Исследования проводились согласно “Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных” (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.1987 г.) и Федеральному Закону “О защите животных от жестокого обращения” от 01.09.1997 г., а также с соблюдением конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 году, и директивы 86/609 ЕЭС, основанной на тексте соглашения “Dr. Robert Hubrecht, Current EU Legislation Controlling Animal Experiments”, и по согласованию с локальным этическим комитетом.

Мышам линии C57BL/6 наносился ожог диаметром 1 см в области спины. В результате воздействия у мышей формировался ожог IIIб-IV степени. Случайным образом мыши были разделены на 3 подгруппы, по 5 животных в каждой. Сразу после нанесения ожога животным опытной группы вокруг раны вводили суспензию модифицированных клеток костного мозга. В качестве контроля, животным второй группы инъецировали немодифицированные клетки, а животным третьей – физиологический раствор. На 7 сутки мышей каждой группы подвергали CO_2-асфиксии и забирали материал для гистологического исследования. Гистологические препараты готовили по стандартной методике. Окрашивали гематоксилин-эозином. Для выявления коллагеновых волокон и оценки их зрелости дополнительно окрашивали по методу Ван-Гизона. Морфометрическое исследование проводили с использованием компьютерной программы ImageJ1.46 (режим доступа http://rsbweb.nih.gov/ij/).

Суспензию клеток костного мозга получали следующим образом. Клетки костного мозга вымывали из бедренных и большеберцовых костей мыши, эритроциты лизировали ACK буфером. Клетки культивировали в среде RPMI, с добавлением 10% ЭТС, 50 мкМ β-меркаптоэтанола, 2 мМ L-глутамина, раствор антибиотика и антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 1 мг/мл стрептомицина, 2,5 мг/мл амфотерицина Б), 110 мг/л пирувата натрия, по 20 нг/мл IL-4 и GM-CSF (Invitrogen, США). Для стимуляции аденозиновых рецепторов использовали негидролизуемый аналог аденозина NECA в концентрации 100 мкМ. Инкубировали в течение 3 суток при 37°C и 5% CO_2. Затем отмывали от ростовой среды и ресуспендировали в физиологическом растворе для инъекций.

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде выборочного среднего±стандартная ошибка среднего, либо медианы (Me) и верхнего и нижнего квартилей (Q_1—Q_3).

Для определения соответствия распределения количественных признаков нормальному закону использовали критерий согласия Колмогорова – Смирнова.

Для выборок, не распределенных по нормальному закону, проверка статистической значимости равенства выборочных средних независимых выборок осуществлялась с помощью U-критерия Манна-Уитни, зависимых – с помощью критерия Вилкоксона. Нормально распределенные выборки обсчитывались с помощью *t*-критерия Стьюдента.

Различия считали статистически значимыми при уровне $p<0{,}05$. Все статистические вычисления производились при помощи программы GraphPadPrism 5.0 (“GraphPadSoftware”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Характеристика аденозин-модифицированных клеток. Моноциты периферической крови здоровых доноров, изолированные методом двухступенчатого градиентного центрифугирования, культивировали в присутствии IL-4 и GM-CSF в течение 3 суток. Для стимуляции аденозиновых рецепторов в первые сутки культивирования в среду добавляли негидролизируемый аналог аденозина 5'-N-этилкарбоксамидоаденозин (NECA), растворенный в диметилсульфоксиде. Концентрация NECA в среде для культивирования составляла 100 мкМ. Сравнение проводили с моноцитами, культивированными с добавлением 1 мкМ диметилсульфоксида (DMSO).

Оценивали базальный уровень экспрессии мРНК 4 подтипов аденозиновых рецепторов (A_1, A_{2A}, A_{2B}, A_3) в моноцитах периферической крови через 72 ч после начала культивирования (рис. 1а). Была обнаружена преимущественная экспрессия A_{2B} аденозинового рецептора (0,542±0,061% мРНК β-актина). Определялись также A_{2A} и A_3 подтипы рецепторов на более низком уровне экспрессии (0,074±0,011% и 0,071±0,015% мРНК β-актина соответственно). Рецептор A_1 практически отсутствовал (0,008±0,002% мРНК β-актина).

При стимуляции аденозиновых рецепторов NECA (рисунок 1б) экспрессия мРНК A_{2B} рецептора значимо не изменялась и составляла 0,503±0,076 % от мРНК β-актина. В тоже время уровень экспрессии мРНК A_3 возрастал и достигал равных с A_{2B} значений: 0,505±0,089 % от мРНК β-актина. Повышался уровень экспрессии мРНК A_{2A} 0,2±0,021% от мРНК β-актина.

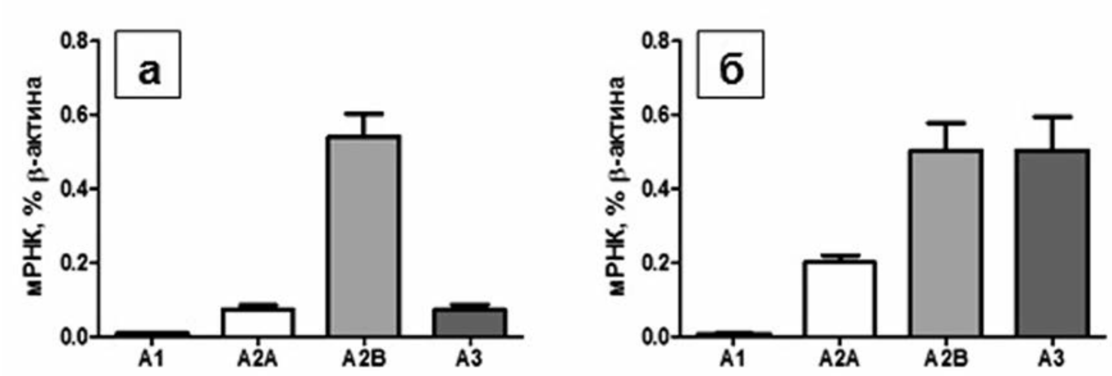

Рисунок 1.
Экспрессия мРНК аденозиновых рецепторов в миелоидных клетках через 72 ч после начала культивирования в присутствии (б) или отсутствии (а) аналога аденозина NECA.

При цитофлуориметрическом исследовании было выявлено, что через 72 ч после начала культивирования миелоидные клетки начинали экспрессировать на своей поверхности паттерн-распознающие (CD209) и антиген-представляющие (CD1a) молекулы, что говорит о начальных стадиях дифференцировки в дендритные клетки. В то же время сохранялась экспрессия моноцитарного маркера – CD14. Причем при стимуляции аденозиновых рецепторов миелоидные клетки обладали сниженной плотностью CD1a на поверхности клеток: 11,85% (7,283%-51,17%) – по сравнению с 44,74% (36,74%-58,85%) CD1a позитивных клеток в нестимулированной культуре ($p<0,0001$). Кроме того, после обработки аналогом аденозина NECA дифференцирующиеся клетки продолжали экспрессировать CD14 на высоком уровне, в то время как нестимулированные клетки практически теряли эту способность (34,87% (15,30%-69,66%) и 5,66% (1,313%-33,30%) клеток для стимулированной и нестимулированной культур соответственно, $p=0,006$). Поверхностная экспрессия CD209 в стимулированной культуре была выше (80,03% (64,85%-87,11%) клеток), чем в нестимулированной (66,20% (53,66%-79,00%) клеток), $p=0,0294$.

При последовательном гейтировании популяции миелоидных клеток по переднему и боковому светорассеянию и положительных по наличию CD209 на точечной гистограмме распределения CD1a и CD14 в культуре клеток с добавлением NECA была обнаружена отличная от контрольной культуры популяция (рис. 2). Эта популяция клеток одновременно несла на своей поверхности маркер моноцитов CD14 и дендритных клеток CD209 при низкой или отсутствующей экспрессии CD1a ($CD1a^-/CD14^+/CD209^+$).

В культуре клеток при стимуляции аденозиновых рецепторов содержалось 39,74% (25,45%–60,52%) $CD1a^-/CD14^+/CD209^+$ клеток, тогда как в контрольной культуре лишь 4,59% (0,30%-9,95%) клеток обладали соответствующим иммунофенотипом.

Таким образом, модифицированные в присутствии NECA миелоидные клетки характеризовались преимущественной экспрессией A_{2B} и A_3 аденозиновых рецепторов и наличием популяции клеток со специфическим иммунофенотипом ($CD1a^-/CD14^+/CD209^+$) в культуре.

Модифицированные аденозином миелоидные клетки имеют больший уровень экспрессии мРНК провоспалительных паракринных факторов. Проводили оценку уровней экспрессии мРНК ряда паракринных факторов обладающих провоспалительной активностью IL-6, IL-1β, IL-8 (рис. 3).

Через 72 ч после начала культивирования было обнаружено существенное повышение уровней экспрессии мРНК всех паракринных факторов в аденозин-модифицированных миелоидных клетках по сравнению с не модифицированными ($p<0,05$).

Модифицированные аденозином миелоидные клетки in vivo при ожоге вызывают увеличение объемной плотности смешанного клеточного инфильтрата. Мы изучали эффекты модифицированных аденозином миелоидных клеток в очаге термического повреждения. Для этого сразу после нанесения ожога внутрикожно на расстоянии 5 мм от края раны инъецировали аутологичные клетки костного мозга мыши, культивированные трое суток в присутствии IL-4 и GM-CSF, с добавлением 100 мкМ NECA (опытная группа) или его растворителя DMSO (контрольная группа). В таких условиях клетки костного мозга диффернцировались в направлении миелоидных клеток и формировали колонии, аналогично миелоидным клеткам периферической крови человека. В присутствии аналога аденозина в клетках костного мозга мыши усиливалась экспрессия провоспалительного фактора – ИЛ-6, и хемоаттрактанта – CXCL1 – функционального гомолога ИЛ-8 человека ($p<0,05$) (рис. 4)

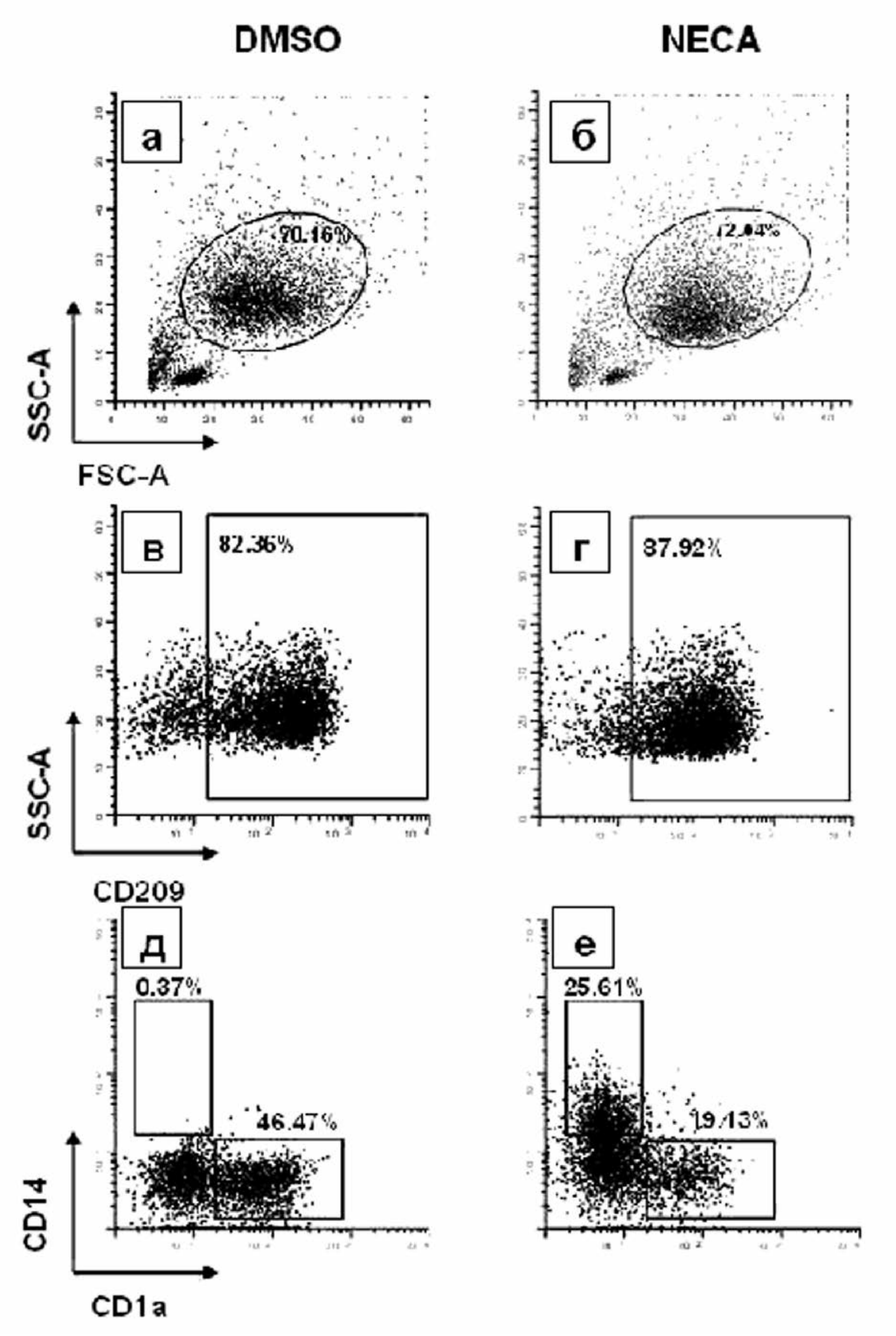

Рисунок 2.
Цитофлуориметрическая характеристика миелоидных клеток через 72 ч после начала культивирования в присутствии (NECA) или отсутствии (DMSO) аналога аденозина. Представлено последовательное гейтирование миелоидных клеток по показателям переднего и бокового светорассеянья (а, б), позитивных по CD209 (в, г), и их распределение по экспрессии CD1a и CD14 на поверхности (д, е).

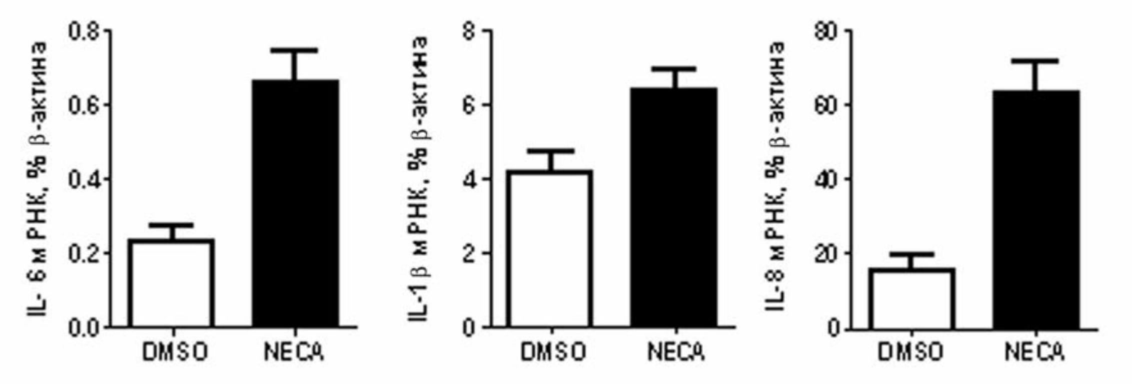

Рисунок 3.
Экспрессия мРНК IL-6, IL-8, IL-1β в миелоидных клетках через 72 ч после начала культивирования в присутствии (NECA) или отсутствии аналога аденозина (DMSO).

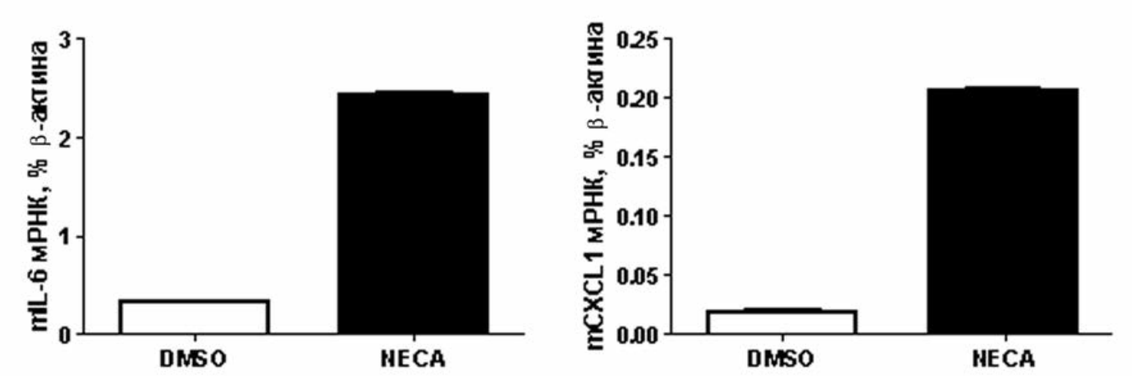

Рисунок 4.
Экспрессия мРНК IL-6, CXCL1 в клетках костного мозга мыши через 72 ч после начала культивирования в присутствии (NECA) или отсутствии аналога аденозина (DMSO).

На 7-е сутки после термической травмы и аутологичной трансплантации в коже, особенно в глубоких слоях дермы на границе с гиподермой, и в гиподерме присутствовал обильный смешанный инфильтрат, представленный в основном гранулоцитами, фибробластами и макрофагами (моноцитами). Между клетками выявлялись многочисленные полнокровные сосуды, устроенные по типу синусоидов. Результаты морфометрии показали, что объемная плотность клеточного инфильтрата в опытной группе составила 13,1±1,58 $мм^3/мм^3$, тогда как при введении немодифицированных клеток костного мозга – 9,4±0,42 $мм^3/мм^3$. Состав клеточного инфильтрата при этом совпадал. Объемная плотность клеточного инфильтрата в контрольной группе, при введении физ.раствора, составила 7,6±0,37 $мм^3/мм^3$. Здесь наблюдался диапедез эритроцитов, дегранулировавшие тучные клетки, фибробласты, макрофаги, гранулоциты.

ОБСУЖДЕНИЕ. Неселективная стимуляция аденозиновых рецепторов на миелоидных клетках через 72 ч культивирования приводила к образованию популяции клеток с одновременной экспрессией моноцитарного маркера CD14 и поверхностных антигенов, характерных для дендритных клеток CD209, CD1a. В то же время в отсутствие аналога аденозина миелоидные клетки теряли моноцитарный маркер и находились на ранних стадиях дифференцировки в дендритные клетки. Аденозиновые рецепторы в миелоидных клетках после 72 ч культивирования определялись в следующем соотношении: преимущественная экспрессия A_{2B} подтипа, при наличии A_{2A} и A_3 рецепторов и отсутствии A_1. Такое соотношение уровней мРНК различных подтипов аденозиновых рецепторов имеет большее сходство с профилем экспрессии рецепторов в моноцитах периферической крови, чем с дифференцированными дендритными клетками, опубликованными в работе Новицкого С.В. [23]. Дифференцированные дендритные клетки в этой работе характеризовались преимущественной экспрессией A_1 аденозинового рецептора. То есть в нашем эксперименте клетки, находящиеся на ранних стадиях дифференцировки в дендритные клетки по антигенному фенотипу, не изменяли уровни экспрессии мРНК аденозиновых рецепторов в этом направлении дифференцировки. Одновременно уже через 72 ч культивирования миелоидных клеток в присутствии аналога аденозина (NECA) соотношение уровней экспрессии мРНК аденозиновых рецепторов в большей степени соответствовало дифференцированным формам дендритных клеток, культивированных в присутствии аденозина. Дифференцировка в работе Новицкого и др. происходила также в присутствии 100 мкМ NECA, и на 6 сутки определялся антигенный фенотип, аналогичный нашему эксперименту, то есть была зафиксирована одновременная экспрессия поверхностных антигенов дендритных клеток и моноцитов.

Таким образом, мы подтвердили изменение хода дифференцировки миелоидных клеток в присутствии аденозина. Причем культивированные в присутствии аденозина миелоидные клетки уже через 72 ч обладают характерными для конечной стадии своей дифференцировки признаками: соответствующими антигенным фенотипом и соотношением уровней экспрессии мРНК генов аденозиновых рецепторов. Кроме того нами было показано увеличение уровня экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов и хемоаттрактантов (IL-6, IL-8, IL-1β) в миелоидных клетках уже через 72 ч после начала культивирования в присутствии аденозина.

Повышение концентрации аденозина в области термического повреждения в острую фазу воспаления обеспечивает микроокружение для дифференцировки таких клеток *in vivo* из миелоидных предшественников. Для введения в область ожога аденозин-модифицированных миелоидных клеток была использована 72 часовая культура клеток костного мозга мыши. 72 ч соответствуют острой фазе воспалительного процесса и моделируют дифференцировку миелоидных клеток при максимальной концентрации аденозина. По литературным данным, клетки костного мозга мыши при модификации аденозином в дифференцировочной среде дендритных клеток претерпевают те же изменения, что и моноциты периферической крови человека [23]. После модификации аденозином клетки костного мозга мыши обладают сниженной экспрессией антиген-представляющих молекул при одновременной экспрессии поверхностных маркеров дендритных клеток, а также наблюдали повышение уровня экспрессии мРНК таких паракринных факторов, как VEGF, CXCL1 (функционального гомолога IL-8), IL-6. [21, 23]. Мы показали, что при наших условиях, уже через 72 ч после начала культивирования клетки костного мозга мыши *in vitro* формируют колонии, характерные для миелоидных клеток человека, полученных из моноцитов периферической крови. Полученные в таких условиях клетки костного мозга мыши в ответ на стимуляцию аденозиновых рецепторов имели повышенную экспрессию паракринных факторов ИЛ-6 и CXCL1, аналогичную миелоидным клеткам периферической крови человека. Применение миелоидных клеток мышиного происхождения было необходимо, чтобы избежать реакции иммунного отторжения трансплантата, а также из-за видоспецифичности ряда паракринных факторов.

На 7 сутки после введения аденозин-модифицированных миелоидных клеток в область ожога мы наблюдали обильный смешанный инфильтрат. Мы связываем усиленную миграцию клеток (моноцитов, макрофагов, гранулоцитов) в очаг термического повреждения с паракринной активностью дифференцированных в присутствии аденозина миелоидных клеток. IL-6 является хемоаттрактантом для миелоидных клеток [24]. Известны эффекты IL-8 на миграцию нейтрофильных гранулоцитов в очаги поражения. И синергичное действие IL-1β, в результате индукция основного хемотаксического фактора для нейтрофилов – макрофагального воспалительного белка-2 (MIP-2). Кроме того, IL-1β приводит к повышению экспрессии адгезионных молекул на эндотелии капилляров и способствует выходу лейкоцитов из кровяного русла [25].

Таким образом, мы установили, что одним из эффектов аденозина в очаге термического повреждения является повышение миграции гранулоцитов и миелоидных клеток. В то же время повышение уровней экспрессии плейотропных паракринных факторов в миелоидных клетках под действием аденозина, а также наличие аденозиновых рецепторов на других клетках в области ожога, предполагают наличие и других эффектов аденозина, которые необходимо изучить для комплексной оценки роли аденозина в очаге термического повреждения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Проведенное исследование обнаружило эффект аденозина на дифференцировку миелоидных клеток и миграцию лейкоцитарного инфильтрата в область ожога. Принимая во внимание важную роль паракринной функции миелоидных клеток в процессах регуляции воспаления и регенерации, мы планируем дальнейшее использование описанного нами подхода для изучения роли аденозина и аденозиновых рецепторов в очагах термического повреждения.

Работа выполнена на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздравсоцразвития России, при финансовой поддержке гранта ФЦП “Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007—2013 годы” ГК № 16.512.11.2249.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Gorlach A*. (2005) Circ. Res., **97**, 1-3.
2. *Hasko G., Cronstein B.* (2004) Trends in Immunology, **25**(1), 33-39.
3. *Hasko G., Pacher P.* (2008) J. Leukoc. Biol, **3**, 447–455.
4. *Feoktistov I., Goldstein A.E., Ryzhov S., Zeng D., Belardinelli L., Voyno-Yasenetskaya T., Biaggioni I.* (2002) Circ. Res., **90**, 531 – 538.
5. *Palmer T.M., Stiles G.L.* (1995) Neuropharmacology, **34**, 683–694.
6. *Young H.W., Molina J.G., Dimina D., Zhong H., Jacobson M., Chan L.N., Chan T.S., Lee J.J., Blackburn M.R.* (2004) J. Immunol., **173**, 1380–1389.
7. *Zhao Z., Yaar R., Ladd D., Cataldo L.M., Ravid K.* (2002) Microvasc Res., **63**, 61–69.

8. *Hasko G., Linden J., Cronstein B., Pacher P.* (2008) Nat. Rev. Drug Discov., **7**(9), 759-770.
9. *Reece T.B., Ellman P.E, Maxey T.S., Crosby I.K., Warren P.S., Chong T.W., LeGallo R.D., Linden J., Kern J.A., Tribble C.G., Kron I.L.* (2005) J. Thorac. Cardiovasc. Surg., **129**, 1137-1143.
10. *Luijk B., van den Berge M., Kerstjens H.A., Postma D.S., Cass L., Sabin A., Lammers J.W.* (2008) Allergy, **63**, 75-80.
11. *Schwacha M., Nickel E., Daniel T.* (2008) Mol. Med., **14**(9-10), 628-633.
12. *Fredholm B.B.* (2007) Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair, Cell Death Differ., **14**, 1315-1323.
13. *Shaked G., Gurfinkel R., Czeiger D., Douvdevani A., Sufaro Y.* (2007) Burns, **33**, 352-354.
14. *Shulte G.* (2002) Adenosine receptor signaling and the activation of mitogen-activated protein kinases, Stockholm, Repo Print.
15. *Cronstein B.N.* (2011) F1000 Biol. Rep., **3**, 21-27.
16. *Cronstein B.N.* (1994) J. Appl. Physiol., **76**, 5–13.
17. *Ham J., Rees D.A.* (2008) Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, **8**, 244–254.
18. *Palmer T.M., Trevethick M.A.* (2008) Br.J.Pharmacol., **153**, 27–34.
19. *Kreckler L.M., Gizewski E., Wan T.C., Auchampach J.A.* (2009) J. Pharmacol. Exp. Ther., **331**, 1051–1061.
20. *Ryzhov S., Novitskiy S.V., Goldstein A.E., Biktasova A., Blackburn M.R., Biaggioni I., Dikov M.M., Feoktistov I.* (2011) J. Immunol., **187**, 6120-6129.
21. *Wilson J.M., Kurtz C.C., Black S.G, Ross W.G, Alam M.S., Linden J., Ernst P.B.* (2011) J. Immunol, **186**, 6746-6752.
22. *Ryzhov S., Zaynagetdinov R., Goldstein A.E., Novitskiy S.V., Blackburn M.R., Biaggioni I., Feoktistov I.* (2008) J. Pharmacol. Exp. Ther., **324**, 694-700.
23. *Novitskiy S.V., Ryzhov S., Zaynagetdinov R., Goldstein A.E., Huang Y., Tikhomirov O.Y., Blackburn M.R., Biaggioni I., Carbone D.P., Feoktistov I., Dikov M.M.* (2008) Blood, **112**, 1822-1831.
24. *Clahsen T., Schaper F.* (2008) J. Leukoc. Biol., **84**, 1521-1529.
25. *Варюшина Е.А, Розломий В.Л., Александров Г.В., Рыбальченко О.В., Потокин И.Л., Исаева Е.Н., Симбирцев А.С.* (2010) Цитокины и воспаление, **2**, 7-12.

Поступила: 22. 10. 2012.

STIMULATION OF ADENOSINE RECEPTORS ON MYELOID CELLS ENHANCE LEUKOCYTE MIGRATION AT THE SITE OF BURN INJURY

K.S. Yuryeva, K.V. Nevskaya, A.N. Dzuman, O.P. Ikkert, V.V. Ivanov, I.V. Saltikova, A.E. Sazonov, L.M. Ogorodova

Siberian State Medical University, Moskovkiy trakt, 2, Tomsk, 634050 Russia;
tel.: 8 (3822) 53–28–97; fax: 8 (3822) 53–33–09; e-mail: yuryevaksenia@gmail.com

Adenosine, endogenous purine nucleoside, is an ATP metabolite that also acts as an extracellular signaling molecule. The concentration of extracellular adenosine rises during hypoxia and cell damage leading to numerous pleiotropic effects. Although a high concentration of adenosine was found at burn injury, the effect has not been well elucidated. We have studied human peripheral blood myeloid cell, due to their expression of specific adenosine receptors and capacity to migrate to the site of burn injury. We have shown that myeloid cells after 72 hours of stimulation of adenosine receptors develop altered expression of surface antigens: preserved monocyte's marker CD14 with already expressed dendritic cell markers (CD209, CD1a). Whereas untreated cells have already lost monocyte marker in 72 hours, and express CD1a more abundantly. Adenosine modified myeloid cells express also higher levels of mRNA of proinflammatory cytokines and chemoattractants (IL-6, IL-8, IL-1β). Using mouse model of the burn injury we have shown, that adenosine modified bone marrow derived myeloid cells injected in the site of the injury promote migration of granulocytes, monocytes, macrophages, and fibroblasts on the 7^{th} day after burn. Thus, stimulation of adenosine receptors alters differentiation and function of myeloid cells. In the site of burn injury adenosine modified myeloid cells augment cell migration due to paracrine factors.

Key words: adenosine, monocyte, burn injury, paracrine factor.