

На правах рукописи

НЕВСКАЯ

Ксения Владимировна

**РОЛЬ МОДИФИЦИРОВАННЫХ АДЕНОЗИНОМ МОНОЦИТОВ В
РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОЖИ ПРИ ОЖГОВОЙ ТРАВМЕ**

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

ТОМСК - 2015

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

Доктор медицинских наук

Сазонов

Алексей Эдуардович

Официальные оппоненты:

Доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»

Сенников

Сергей Витальевич

Доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии и экспериментальной терапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д. Гольдберга»

Скурихин

Евгений Германович

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Защита состоится « » _____ 2015 г. в ____⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.01 при Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 634050, г. Томск, Московский тр., 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России и на сайте <http://www.ssmu.ru>.

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Петрова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Современная регенеративная медицина основывается на инновационных методах терапии болезней. Широкие возможности применения клеточных технологий в области регенеративной медицины делают их основой для разработки подходов к терапии ожоговых ран. Наиболее перспективным направлением в лечении ожогов с использованием клеточных технологий на данный момент является применение стволовых клеток [F.M. Wood et al., 2006; Z. Sheng et al., 2009; E. Bey et al., 2010]. Однако, несмотря на доказанный положительный эффект, терапия стволовыми клетками, во-первых, не является безопасной для всех пациентов, в том числе из-за риска онкологических осложнений [D.Thirabanjan et al., 2010]. Во-вторых, выделение и культивирование стволовых клеток - трудоемкий и дорогостоящий процесс. В-третьих, проблемой остается отсутствие правовой базы применения стволовых клеток в ряде стран, в том числе в Российской Федерации.

Поскольку внедрение терапии стволовыми клетками в широкую клиническую практику на данный момент достаточно проблематично, разработка альтернативных способов лечения ожогов вызывает особый интерес. Существует все больше доказательств в пользу гипотезы о том, что регенеративный эффект стволовых клеток обусловлен секрецией широкого спектра цитокинов [E.M. Horwitz et al., 2009; L. da Silva Meirells et al., 2009; D. Kyurkchiev et al., 2014], которые, в то же время, не являются уникальными и вырабатываются, хотя и в меньшей степени, также дифференцированными клетками периферической крови. Следует отметить, что последние, в отличие от стволовых, практически не обладают онкогенной активностью. Так, например, широким спектром секретируемых цитокинов обладают моноциты [D. Nagorsen et al., 2006; M. Rossol et al., 2011]. Их легко выделить из крови человека в количестве, достаточном для культивирования и последующей аутологической трансплантации.

Поскольку уровень секреции моноцитами ряда цитокинов, необходимых для стимуляции регенеративных процессов, недостаточно высок, целесообразным является исследование путей и механизмов, позволяющих изменять их экспрессионную и секреторную активность. В ряде исследований было продемонстрировано, что эндогенный пуриновый нуклеотид аденозин способен стимулировать продукцию цитокинов различными клетками, в том числе моноцитами [S. Gessi et al., 2010; К.В. Горемыкин и соавт., 2011; P. Ondrackova et al., 2013]. Поэтому изучение роли модифицированных аденозином моноцитов в репаративной регенерации кожи при ожоговой травме представляется весьма актуальным. Научной концепцией настоящего исследования является предположение о том, что модифицированные аналогом аденозина 5'-N-этилкарбоксамидоаденозином (NECA) моноциты будут обладать измененным цитокиновым профилем, вследствие чего стимулировать регенеративные процессы в поврежденной ткани на модели ожоговой раны.

Степень разработанности темы исследования. Большое количество исследований посвящено изучению роли аденозина как участника важных физиологических и патологических процессов организма (ангиогенез, воспаление, канцерогенез и т.д.) [H. Cho et al., 2007; A.N. Clark et al., 2007; M.C. Montesinos et al., 2007; S. Ryzhov et al., 2008; A.Ahmad et al., 2009; К.В. Горемыкин и соавт., 2011; M. Aghaei et al., 2009; F.S. Farhat et al., 2012; L. Antonioli et al., 2013; K. Golembiowska et al., 2013; S. Shirali et al., 2013]. Однако как в отечественной, так и в зарубежной литературе работы, посвященные исследованию регенеративного потенциала модифицированных аденозином моноцитов *in vivo*, не представлены.

Цель исследования: установить роль модифицированных аденозином моноцитов в репаративной регенерации кожи при ожоговой травме.

Задачи исследования:

1. Определить иммунофенотипический профиль стимулированных и нестимулированных аденозином моноцитов.
2. Определить уровень экспрессии мРНК 4 типов аденозиновых рецепторов стимулированными и нестимулированными аденозином моноцитами.
3. Определить цитокиновый профиль стимулированных и нестимулированных аденозином моноцитов.
4. Осуществить экспериментальную оценку регенеративного потенциала модифицированных клеток *in vivo* на модели ожоговой раны.

Научная новизна. Впервые дана сравнительная характеристика влияния различных режимов стимуляции моноцитов аналогом аденозина NECA на иммунофенотипический и цитокиновый профиль моноцитов. Получены новые данные о влиянии NECA на экспрессию поверхностных маркеров моноцитов и дендритных клеток (CD1a, CD14, CD209). Установлено, что добавление аналога аденозина в культуральную среду приводит к увеличению экспрессии иммунофенотипического маркера моноцитов CD14, снижению экспрессии маркера незрелых дендритных клеток CD1a. Экспрессия маркера зрелых дендритных клеток CD209 возрастает либо остается неизменной в зависимости от режима стимуляции аналогом аденозина. Выявлено значительное количество клеток с иммунофенотипом $CD1a^{-}CD14^{+}CD209^{+}$ при культивировании моноцитов с NECA.

Впервые продемонстрировано изменение экспрессии мРНК генов аденозиновых рецепторов при различных режимах стимуляции моноцитов NECA. В частности установлено, что мРНК генов A1 и A2B аденозиновых рецепторов вне зависимости от стимуляции экспрессируется с одинаковой частотой, а уровень экспрессии A2A и A3 рецепторов повышается при стимуляции NECA.

В данной работе впервые изучено влияние различных режимов стимуляции NECA на экспрессию мРНК генов цитокинов моноцитов (IL1B, IL6, IL8, IL10, IP10, FGFB, VEGF, TGFB) и концентрацию цитокинов в кондиционной среде (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, β FGF, TGF β , VEGF).

Показано увеличение экспрессии мРНК генов IL1B, IL6, IL8, IL10, IP10, FGFB, VEGF при стимуляции моноцитов аналогом аденозина. Установлено, что концентрация VEGF в кондиционной среде моноцитов при добавлении NECA значительно возрастала, тогда как уровень продукции IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, β FGF, TGF β вне зависимости от режима стимуляции оставался неизменным.

В проведенном исследовании впервые продемонстрировано уменьшение площади ожоговой раны при введении вокруг области повреждения модифицированных аденозином моноцитов.

Теоретическая и практическая значимость. Полученные результаты о влиянии стимуляции аденозиновых рецепторов на иммунофенотипический и цитокиновый профиль моноцитов способствуют пониманию механизмов влияния аденозина на течение процессов воспаления и регенерации. Эти данные могут являться основой разработки новых лекарственных средств для терапии воспалительных заболеваний. Выявленный в рамках настоящего исследования высокий регенеративный потенциал модифицированных аденозином моноцитов, проявляющийся в значительном увеличении темпов заживления дефекта кожных покровов, может быть использован для разработки новых подходов в области регенеративной и эстетической медицины. Увеличение скорости заживления ожоговой раны, наблюдаемое в эксперименте, свидетельствует о возможности применения модифицированных аденозином моноцитов, в первую очередь, для лечения ожоговых больных.

Используемые в настоящей работе культуральные, иммунологические и молекулярно-биологические методы могут быть рекомендованы для включения в программу подготовки курсовых и дипломных работ студентов на базе подразделения клеточных технологий и иммунологии Научно-образовательного центра «Клиническая и экспериментальная иммуногенетика» ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России.

Методология и методы исследования. В исследовании были использованы современные методы, позволяющие оценить влияние аденозиновой стимуляции на профиль моноцитов. Оценку иммунофенотипического профиля исследуемых клеток проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием моноклональных антител к характеристическим маркерам дифференцировки моноцитов в дендритные клетки (CD1a, CD14, CD209). Для изучения влияния аналога аденозина на уровень экспрессии моноцитами мРНК генов аденозиновых рецепторов и цитокинов были использованы молекулярно-биологические подходы: выделение мРНК из клеток, постановка реакции обратной транскрипции, проведение полимеразной цепной реакции в реальном времени с красителем SYBR Green. Определение концентрации цитокинов в кондиционной среде модифицированных моноцитов осуществляли методом иммуноферментного анализа. С использованием планиметрического и гистологического анализа проводили оценку регенеративного потенциала модифицированных аденозином моноцитов *in vivo* на модели ожоговой раны у крыс линии Wistar.

Планиметрическое исследование области дефекта кожных покровов в динамике проводили с использованием программного обеспечения ImageJ. Оценку гистологических изменений ожоговой раны осуществляли с применением стандартных гистологических методов – окраски гематоксилин-эозином и по методу Ван Гизона.

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ «GraphPad Prism5».

Положения, выносимые на защиту:

1. Моноциты, модифицированные аденозином *in vitro*, обладают измененным иммунофенотипическим и цитокиновым профилем. Под влиянием аденозина моноциты изменяют направление своей дифференцировки, приобретая иммунофенотип CD1a⁻CD14⁺CD209⁺. Стимулированные клетки характеризуются повышенной экспрессией мРНК генов цитокинов, способных оказывать моделирующее влияние на регенеративные процессы - IL1B, IL6, IL8, IL10, IP10, FGFB, VEGF.

2. Моноциты, модифицированные аденозином *in vitro*, обладают высоким регенеративным потенциалом при введении вокруг области ожоговой раны у крыс. Закрывание дефекта кожных покровов и эпителизация ожоговой раны у животных, которым вводили аденозин-модифицированные моноциты, происходит в ускоренные сроки.

Степень достоверности и апробация результатов работы. Результаты диссертационной работы имеют высокую степень достоверности, что обеспечивается большим объемом проанализированных образцов, использованием современных методов исследования (культивирование, проточная цитофлуориметрия, полимеразная цепная реакция в реальном времени, иммуноферментный анализ, планиметрический анализ, гистологический анализ) и статистической обработки полученных данных.

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на V Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2013), конкурсе научно-инновационных проектов в рамках Общероссийского научно-практического мероприятия - Эстафета «Вузовская наука-2013» (Томск, 2013; Москва, 2013), 88-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Казань, 2014), LLXV ежегодной итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины – 2014» (Санкт-Петербург, 2014), XV конференции «Молодежь и медицинская наука в XXI веке» (Киров, 2014), Международной XIII научной конференции студентов и молодых ученых «Медицина завтрашнего дня» (Чита, 2014), Международном форуме «Фармацевтика и медицинские изделия» (Томск, 2014), научном семинаре совместно с НИИФКИ (Новосибирск, 2014), научных семинарах научно-образовательного центра «Клиническая и экспериментальная иммуногенетика» (Томск, 2013-2014), ученом совете Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск, 2014).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 2 полнотекстовых журнальных статьи в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки. Получен патент Российской Федерации на изобретение «Способ модификации моноцитов периферической крови для повышения их паракринной активности при аутологической трансплантации» №2497947 от 15 августа 2012 г.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (глава 1), главы «Материал и методы исследования» (глава 2), главы «Результаты и обсуждение собственных исследований» (глава 3), заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Диссертация иллюстрирована 49 рисунками и 4 таблицами. Библиографический список содержит 237 работ, из которых 220 принадлежит зарубежным авторам.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность проведенного исследования; степень разработанности темы исследования; цель и задачи работы; научная новизна; теоретическая и практическая значимость работы; методология и методы исследования; положения, выносимые на защиту; степень достоверности и апробация результатов.

Первая глава представляет собой обзор литературы, в котором представлены данные о роли аденозина в физиологических и патологических процессах, эффектах стимуляции аденозиновых рецепторов, влиянии аденозина на процессы регенерации, а также информация об эпидемиологии и подходах к терапии ожоговых травм.

Во второй главе приведено описание дизайна и объекта исследования, используемого материала и методов. Исследование проводили на базе Научно-образовательного центра «Клиническая и экспериментальная иммуногенетика» ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (г. Томск), эксперименты *in vivo* выполняли на базе лаборатории биологических моделей (руководитель лаборатории – канд. биол. наук Иванов В.В.), гистологическую оценку образцов - на кафедре морфологии и общей патологии ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (зав. кафедрой – д-р мед. наук, профессор Суходоло И.В.). Работа выполнена при финансовой поддержке гранта ФЦП ГК № 16.512.11.2249.

В соответствии с поставленными целями и задачами исследование было проведено в два этапа. На первом этапе были проведены работы по изучению профиля аденозин-модифицированных моноцитов человека. В исследование был включен материал 30 практически здоровых доноров обоего пола (средний возраст $25,1 \pm 1,3$ лет). Все доноры были осведомлены о целях исследования и подписали информированное согласие на участие в эксперименте. Критерии включения пациентов в исследование: возраст от 18 до 55 лет; отсутствие клинических проявлений аллергических заболеваний на момент обследования и

в анамнезе; данные клинического исследования: концентрация сывороточного IgE в пределах референтных значений для соответствующего возраста.

Периферическую венозную кровь здоровых доноров собирали из локтевой вены утром натощак в стерильную вакуумную пробирку с гепарином (Green Vac-Tube с Li-гепарином, 16*100 мм, «Green Cross», Корея) в объеме 30 мл. Методами градиентного центрифугирования с использованием градиентов фикола (пл. 1,077 г/см³, ПанЭко, Россия) и перколла (пл. 1,131 г/см³, рН=8.5–9.5, «Sigma», США) получали моноцитарную фракцию. Культивирование клеток осуществляли с добавлением IL-4 и GM-CSF («ProSpec», США). В качестве стимулятора использовали негидролизуемый аналог аденозина - 5'-N-этилкарбоксамидоаденозин (NECA) в концентрации 30 мкМ или 100 мкМ. Культивирование проводили в течение 24 или 72 часов (в зависимости от режима стимуляции) в CO₂ - инкубаторе во влажной атмосфере 5% CO₂ при +37°C. Для определения исследуемых параметров в отсутствие стимуляции (в качестве контроля) к клеткам добавляли растворитель NECA – диметилсульфоксид (DMSO).

Исследование экспрессии поверхностных кластеров дифференцировки проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием моноклональных антител к маркеру моноцитов CD14 и маркерам дендритных клеток CD1a и CD209.

Для оценки экспрессии мРНК генов цитокинов предварительно проводили выделение РНК из моноцитарной фракции и реакцию обратной транскрипции. Методом ПЦР в реальном времени в присутствии SYBR Green I определяли уровень мРНК генов IL1β, IL6, IL8, IL10, IP10, FGFB, VEGF, TGFB. Уровень экспрессии мРНК генов цитокинов выражали по отношению к экспрессии мРНК β-актина.

Определение базального и стимулированного NECA уровней секреции цитокинов IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, βFGF, TGFβ, VEGF в кондиционной среде культур моноцитов проводили методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «R&D Systems» (США) согласно инструкции производителя.

На втором этапе исследования регенеративный потенциал модифицированных аденозином моноцитов оценивали *in vivo* на модели ожоговой раны. Эксперимент проводили на 108 крысах самцах линии Wistar массой 200-230 г. Животных содержали в условиях вивария на стандартной диете, предусматривающей свободный доступ к воде и пище. Содержание и все манипуляции, которым подвергались животные, соответствуют правилам лабораторной практики (GLP); Приказу МЗ РФ №267 от 19.06.2003г. «Об утверждении правил лабораторной практики»; Федеральному Закону «О защите животных от жестокого обращения» от 01.09.1997 г.; конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, принятой Европейским союзом в 1986 году; директивы 86/609 ЕЭС, основанной на тексте соглашения «Dr. Robert Hubrecht, Current EU Legislation Controlling Animal Experiments».

Кровь у крыс забирали методом кардиопункции в стерильные вакуумные пробирки с гепарином (Green Vac-Tube с Li-гепарином, 16*100 мм, «Green Cross», Корея). Выделение мононуклеарной фракции из гепаринизированной крови проводили с использованием градиентного центрифугирования на градиенте фиколла (пл.1,077 г/см³, ПанЭко, Россия), после чего выделяли моноциты методом адгезии к пластику. Для стимуляции клеток добавляли негидролизуемый аналог аденозина - NECA в концентрации 100 мкМ и инкубировали 72 часа в CO₂ - инкубаторе во влажной атмосфере 5% CO₂ при +37°C. В качестве контроля к клеткам добавляли растворитель NECA – диметилсульфоксид (DMSO).

Изучение регенеративного потенциала модифицированных аденозином моноцитов осуществляли на модели ожоговой раны [Куценко, 2007]. Термический ожог моделировали у предварительно наркотизированных животных контактным способом с поражением поверхности кожи с помощью металлического стержня с постоянной температурой накаливания 200°C при времени экспозиции 10 сек. В результате воздействия у животных формировался ожог IIIб степени площадью 4,9 см². После моделирования ожога методом случайной выборки животных делили на 3 группы (по 20 в каждой): 1й группе (контрольной) вокруг раны, отступая от краев раны 5 мм, стерильно вводили 1 мл физиологического раствора; 2й группе - суспензию моноцитов, инкубированных с DMSO; 3й группе - суспензию моноцитов, стимулированных NECA. Ожоговая рана у всех животных в течение первых 3 суток была закрыта стерильной повязкой на нетканой основе («Silkofix», Египет). После нанесения ожога крысы содержались в индивидуальных клетках. Через 3, 7, 14 и 21 сутки по 5 крыс каждой группы подвергали CO₂-асфиксии. Планиметрический анализ области повреждения проводили с использованием компьютерной программы ImageJ. Для гистологической оценки образцов использовали кусочки кожи объёмом около 0,7 см³, в которых присутствовала область повреждения и пограничная с ожогом зона. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Для выявления коллагеновых волокон и оценки их зрелости дополнительно окрашивали по методу Ван Гизона. Микропрепараты изучали на микроскопе Axioskop 40 («Carl Zeiss», Германия).

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ «GraphPad Prism5». Проверку на соответствие выборок нормальному закону распределения осуществляли с помощью критерия Шапиро-Вилка. Сравнение количественных данных, подчиняющихся нормальному закону распределения, проводили при помощи Т-критерия Стьюдента. Сравнение количественных показателей, не подчиняющихся нормальному закону распределения, осуществляли при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни. Межгрупповые различия данных в трех независимых группах оценивали с помощью критерия Крускала-Уоллиса с учетом поправки на множественное сравнение. Критической величиной уровня значимости различий считали $p < 0,05$.

Третья глава включает описание результатов исследования и их обсуждение. Дифференцировка моноцитов в дендритные клетки существенно зависит от микроокружения. Известно, что наличие в среде аденозина, сопровождающееся стимуляцией аденозиновых рецепторов, искажает дифференцировку моноцитов [S.V. Novitskiy et al., 2008]. Вследствие этого появляется отдельная популяция клеток, характеризующаяся измененной функциональной активностью и экспрессией поверхностных маркеров. Для изучения изменения иммунофенотипа моноцитов под влиянием NECA проводили оценку экспрессии ряда поверхностных маркеров, таких как CD1a, CD14, CD209 через 24 или 72 часа от начала культивирования согласно выбранному режиму стимуляции. Было показано, что оба экспериментальных режима стимуляции аналогом аденозина NECA влияли на иммунофенотип моноцитов однонаправлено: повышая экспрессию CD14 и снижая экспрессию CD1a по сравнению с нестимулированной культурой клеток. Эти данные согласуются с результатами исследований, демонстрирующих изменение пути дифференцировки моноцитов под влиянием аналога аденозина NECA [A.R. Elia et al., 2008]. Однако в ходе анализа важно оценивать не только индивидуальную экспрессию маркеров, но и их одновременное присутствие на поверхности клеток. Так совместная экспрессия CD1a и CD209 при отсутствии CD14 говорит об иммунофенотипе дендритных клеток. Под действием аденозина дендритные клетки меняют направление своей дифференцировки и становятся альтернативно-активированными или модифицированными клетками, что в первую очередь устанавливается их иммунофенотипированием. Модифицированные клетки характеризуются фенотипом CD1a⁻CD14⁺CD209⁺. Подобный фенотип достоверно чаще встречается в культуре после стимуляции аденозиновых рецепторов. В проведенном нами исследовании эффективность модификации по содержанию CD1a⁻CD14⁺CD209⁺ клеток от общего количества моноцитов периферической крови составляет 57,5% (56,58-64,53) при модификации 30мкМ NECA в течение 24 часов и 59,74% (57,46-60,52) при модификации 100мкМ NECA в течение 72 часов. Полученные нами данные согласуются с проведенными ранее исследованиями модификации моноцитов NECA с использованием других режимов стимуляции [К.В. Горемыкин и соавт., 2011; S.V. Novitskiy et al., 2008].

Известно, что профиль аденозиновых рецепторов определяет характер ответа клетки на стимуляцию аденозином. В рамках проведенного исследования установлена преимущественная экспрессия мРНК гена A2B аденозинового рецептора моноцитами периферической крови. Стимуляция моноцитов NECA приводит к значительному повышению уровня экспрессии мРНК генов A2A и A3 рецепторов. Согласно данным литературы, изменение экспрессии аденозиновых рецепторов играет важную роль в разрешении воспалительного процесса. Так A1 и A2B рецепторы опосредуют преимущественно провоспалительные реакции, а A2A и A3 – противовоспалительные. Например, одной из ключевых функций A1 является быстрое повышение аффинности Fcγ-рецепторов, что указывает на роль

A1 рецепторов в развитии Fcγ-рецептор-опосредованного фагоцитоза [G. Nasko et al., 2007]. Активация A2B рецепторов на дендритных клетках вызывает увеличение секреции преимущественно провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 [S.V. Novitskiy et al., 2008]. Стимуляция A2A рецепторов макрофагов приводит к противовоспалительным эффектам за счет снижения продукции активных форм кислорода и изменения секреции цитокинов [A. Thiele et al., 2004]. Активация A3 рецептора приводит к снижению секреции IL-12 в RAW 264.7 линии мышинных макрофагов и человеческих моноцитов [A. la Sala, 2005], что подтверждает противовоспалительную роль A3 рецептора. Таким образом, можно предположить, что после модификации аденозином моноциты приобретают преимущественно противовоспалительный фенотип.

Для изучения цитокинового профиля моноцитов при стимуляции NECA были выбраны следующие факторы, регулирующие процессы воспаления, ангио- и фиброгенеза: IL1B, IL6, IL8, IL10, IP10, FGFB, VEGF, TGFB. В проведенном нами исследовании установлено, что стимуляция моноцитов 30 мкМ аналога аденозина NECA в течение 24 часов приводит к повышению уровня экспрессии мРНК генов IL1B, IL8, IL10, IP10, FGFB, VEGF. Культивирование же в течение 72 часов с добавлением 100 мкМ NECA приводит к повышению уровня экспрессии мРНК генов IL1B, IL6, IL8, IL10, IP10, FGFB, VEGF. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1- Экспрессия мРНК генов цитокинов при различных режимах культивирования, М±m, % β-актина

Цитокины	Режим культивирования			
	DMSO, 24 часа	30 мкМ NECA, 24 часа	DMSO, 72 часа	100 мкМ NECA, 72 часа
IL1B	11,79±1,91	22,97±4,39*	4,12±0,61	6,33±0,63*
IL6	0,20±0,05	0,30±0,04	0,23±0,04	0,66±0,08*
IL8	32,59±7,29	90,63±18,45*	15,07±4,28	62,91±8,35*
IL10	0,18±0,02	0,64±0,07*	0,46±0,011	1,93±0,19*
IP10	0,87±0,08	1,54±0,12*	1,07±0,17	4,29±0,65*
TGFB	2,55±0,27	2,61±0,26	3,53±0,43	2,91±0,3
FGFB	0,51±0,04	0,8±0,07*	0,53±0,08	1,81±0,03*
VEGF	0,50±0,05	1,01±0,13*	0,51±0,06	1,08±0,12*

Примечание:

* p<0,05 по сравнению с показателями при добавлении DMSO (для соответствующего режима культивирования).

Таким образом, стимуляция моноцитов аналогом аденозина приводит к изменению экспрессии мРНК генов цитокинов различной функциональной активности. Учитывая одновременное повышение экспрессии факторов, противоположных по своим эффектам, нельзя сделать однозначный вывод об изменении профиля моноцитов в сторону про-/противовоспалительного, фиброгенного/фибростатического или ангиогенного/ангиостатического.

Ряд исследователей изучали влияние стимуляторов аденозиновых рецепторов на экспрессию мРНК генов цитокинов моноцитами. Например, в исследовании Р. Ondrackova и коллег уровни экспрессии мРНК генов провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6, IL-8 и противовоспалительного IL-10 в моноцитах свиньи увеличивались под влиянием NECA [Р. Ondrackova et al., 2013]. Также Р. Ondrackova и соавторы, изучив влияние антагонистов рецепторов аденозина, пришли к выводу, что стимуляция и ингибирование продукции цитокинов аденозином опосредуется A2A рецептором. Необходимо отметить, что эти данные полностью согласуются с результатами проведенного нами исследования. Во-первых, при стимуляции аналогом аденозина NECA вне зависимости от режима культивирования моноцитов повышался уровень экспрессии мРНК генов A2A аденозиновых рецепторов. Во-вторых, стимуляция NECA приводила к увеличению уровня экспрессии мРНК генов цитокинов.

Для наиболее полной оценки влияния аналога аденозина NECA на цитокиновый профиль моноцитов была изучена концентрация IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IP-10, TGF β , β FGF, VEGF в кондиционной среде. В результате исследования было установлено, что достоверное повышение уровня секреции при стимуляции NECA наблюдалось только для сосудисто-эндотелиального фактора роста, который является основным ангиогенным фактором, оказывает влияние на рост, миграцию и пролиферацию клеток эндотелия мелких сосудов (таблица 2). Концентрация данного цитокина в кондиционной среде культур моноцитов при стимуляции 30 мкМ NECA в течение 24 часов повышалась в 23 раза, а при стимуляции 100 мкМ NECA в течение 72 часов – в 37,5 раза. Тем не менее, необходимо отметить, что секреция цитокинов может происходить не только сразу после процесса транскрипции и наработки соответствующего экспрессионного продукта, но и в ряде случаев только после активации определенных рецепторов (TLR, Fc γ , цитокиновых рецепторов и других) [A.S. Stanley et al., 2010]. Нехватка данных стимулов при культивировании моноцитов *in vitro* приводит к отсутствию секреции цитокинов и сохранению неизменной концентрации в кондиционной среде после стимуляции клеток. Однако можно предположить, что, попадая в очаг повреждения, моноциты начнут взаимодействовать с окружающими клетками, произойдет активация рецепторов, следствием чего будет являться выброс цитокинов, стимулирующих процессы регенерации.

Исходя из результатов исследования *in vitro*, наиболее оптимальной для аутологической трансплантации в область ожоговой раны *in vivo* с целью стимуляции регенеративных процессов была выбрана модификация моноцитов

100 мкМ НЕСА с последующим культивированием в течение 72 часов. Данный режим был выбран ввиду наибольшей концентрации VEGF в кондиционной среде клеточных культур, усиленного эффекта на уровень экспрессии генов целевых цитокинов, а также увеличенного количества модифицированных клеток по результатам цитофлуориметрии.

Таблица 2 - Концентрация цитокинов в кондиционной среде моноцитов периферической крови при различных режимах культивирования, Me (Q₂₅-Q₇₅), пг/мл

Цито- кины	Режим культивирования			
	DMSO, 24 ч	30мкМ NECA, 24 ч	DMSO, 72 ч	100мкМ NECA, 72ч
IL-1β	2,77 (0,62-9,80)	5,26 (1,29 -64,78)	3,43 (0,06-45,64)	4,80 (3,71-28,59)
IL-6	108,62 (65,14-262,71)	149,20 (69,86-300,12)	84,02 (50,76-366,30)	85,43 (71,75-337,81)
IL-8	3268,25 (1991,12- 5106,34)	3555,13 (2620,46- 4806,17)	2431,32 (793,41- 4547,33)	1949,15 (896,11- 4424,46)
IL-10	23,35 (18,85-34,38)	29,01 (20,15-36,01)	25,50 (20,40-31,82)	31,11 (19,90-47,29)
IP-10	47,40 (44,39-50,37)	44,39 (42,87-48,89)	51,09 (44,77-59,59)	47,87 (42,87-224,90)
TGFβ	40,06 (37,56-44,68)	40,36 (37,80 -45,39)	40,79 (39,06-42,77)	40,95 (39,47-43,67)
βFGF	240,92 (235,80-256,31)	246,83 (238,73-264,81)	250,40 (237,24-258,66)	243,12 (229,23-263,72)
VEGF	1,21 (0,03-2,95)	27,94* (8,42-58,95)	0,10 (0,07-0,36)	37,54* (9,09-75,04)

Примечание:

* p<0,05 по сравнению с показателями при добавлении DMSO (для соответствующего режима культивирования).

Исследования регенеративного потенциала модифицированных аденозином моноцитов *in vivo* были выполнены на модели ожоговой раны у крыс. Изучение скорости заживления дефекта кожных покровов после введения стимулированных аденозином клеток проводили в сравнении с применением стандартной повязки, используемой в комбустиологии. Результаты планиметрического анализа представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Площадь ожоговой раны у экспериментальных животных, Me (Q₂₅-Q₇₅), см²

Экспериментальные группы	Сутки			
	3	7	14	21
Контрольная группа (введение физиологического раствора)	4,61 (4,35-5,14)	4,65 (4,01-4,98)	3,09 (2,11-3,91)	1,11 (1,04-1,50)
Опытная группа 1 (введение моноцитов, культивируемых с DMSO)	4,80 (4,54-5,52)	5,06 (4,79-5,36) *	2,63 (1,65-4,33)	1,30 (0,29-1,54)
Опытная группа 2 (введение аденозин-модифицированных моноцитов)	4,62 (3,71-5,00)	4,41 (3,67-4,74) **	2,43 (1,33-2,85)	0,15 (0,00-0,43) *,**

Примечание:

* p<0,05 по сравнению показателями животных контрольной группы

** p<0,05 по сравнению показателями животных опытной группы 1

На 21 сутки эксперимента во всех экспериментальных группах наблюдалась положительная динамика, причем в группе введения аденозин-модифицированных моноцитов площадь ожоговой раны была наименьшей. Максимальное уменьшение площади дефекта кожных покровов (по сравнению с первыми сутками эксперимента) происходило в группе введения модифицированных моноцитов – на 96,9%, в то время как в контрольной группе она уменьшилась на 77,4%; в группе введения моноцитов, культивируемых с DMSO, – на 73,4%. Макроскопические изменения ожоговой раны на 21 сутки эксперимента представлены на рисунке 1.

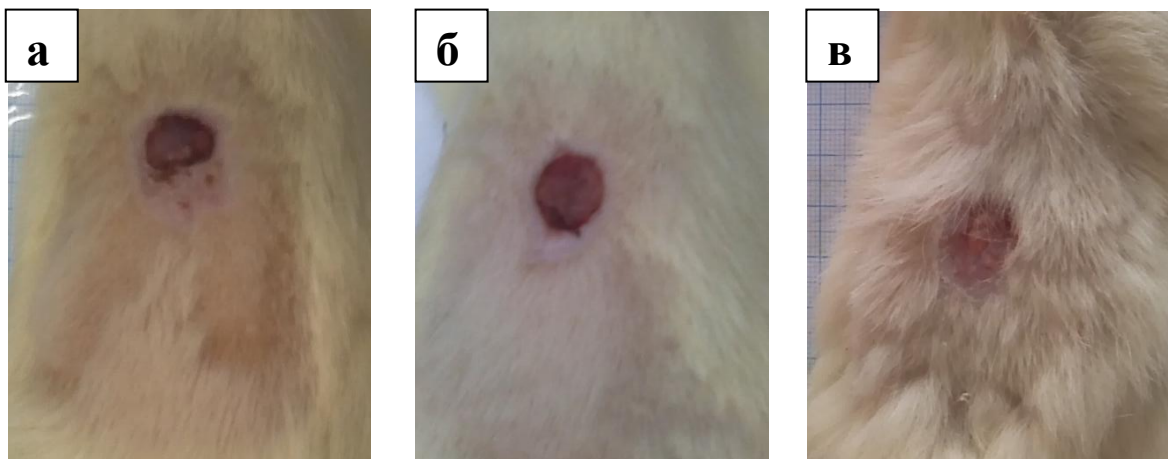


Рисунок 1 - Состояние ожоговой раны у крыс на 21 сутки эксперимента (а – с введением физиологического раствора; б – с введением моноцитов, культивируемых с DMSO; в – с введением аденозин-модифицированных моноцитов)

Можно предположить, что подобный эффект при введении модифицированных клеток связан с широким спектром секретируемых ими цитокинов. Известно, что первым этапом регенерации является процесс воспаления. Согласно данным исследования *in vitro*, стимулированные аденозином моноциты экспрессируют повышенные количества мРНК генов хемоаттрактантов (IL8, IP10), что может являться основой для усиления продукции этих цитокинов и активной миграции клеток в очаг воспаления. Повышенные количества IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 оказывают стимулирующее влияние на миграцию клеток в очаг воспаления и их активацию, способствуя интенсификации очищения раны от некротических масс. Следующими этапами регенерации являются фиброгенез, ангиогенез, коллагеногенез и эпителизация. По современным представлениям, важную роль в перечисленных выше процессах играют цитокины IP-10, β FGF и VEGF. Известно, что β FGF является стимулятором роста и пролиферации фибробластов, синтеза коллагена, способствует ускорению процессов ангиогенеза и миграции кератиноцитов (что ускоряет эпителизацию). VEGF является стимулятором роста сосудов, неотъемлемым участником процессов ангиогенеза. Необходимо отметить, что аденозин-модифицированные моноциты экспрессируют повышенные количества мРНК гена IP10, лимитирующего перечисленные выше процессы, предотвращая тем самым избыточный и нефизиологичный рост составляющих кожного покрова и образование рубцов. В результате секретируемые аденозин-модифицированными моноцитами цитокины способны, воздействуя на все этапы регенеративного процесса, стимулировать восстановление кожного покрова.

Для оценки регенеративных процессов в области ожоговой раны также был проведен гистологический анализ образцов. На 3 сутки после термического воздействия морфологические изменения указывают на ожог IIIб степени. Поврежденная и некротизированная часть кожи, подвергшаяся термическому воздействию (струп), включает в себя большую часть сальных желез и волосяных фолликулов и занимает, в большинстве случаев, $\frac{1}{2}$ слоя дермы. Характер повреждений и тканевых реакций указывает на успешность моделирования термического ожога. На 3 сутки во всех группах можно отметить отек и полнокровие сосудов дермы и гиподермы, но в группах введения моноцитов, инкубированных с NECA и DMSO, эти явления носят более выраженный характер. В группе введения немодифицированных моноцитов воспалительная инфильтрация присутствует только в гиподерме, в то время как в группе введения аденозин-модифицированных моноцитов инфильтрация наблюдается как на границе струпа и дна раны, так и в гиподерме, что может свидетельствовать о более высокой скорости демаркации зоны некроза от здоровых тканей.

На 7 сутки после воздействия у крыс с введенными вокруг раны моноцитами появляются признаки репарации эпидермиса – под струпом и над ним. Сам струп в области, прилегающей к эпидермису, пронизан редкими сосудами микроциркуляторного русла, выявляется инфильтрат, состоящий

преимущественно из сегментоядерных клеток. Инфильтрат можно наблюдать также на границе струпа с дном раны (демаркационное воспаление) и в гиподерме. Отмечается полнокровие сосудов дермы и гиподермы. Инфильтрация и полнокровие сосудов носят более выраженный характер по сравнению с 3 сутками.

К 14 суткам во всех экспериментальных группах отек и инфильтрация носят гораздо менее выраженный характер, что свидетельствует об окончании пика воспалительной реакции. На 14 сутки происходит отторжение струпа у части животных контрольной группы и группы введения моноцитов, инкубированных с DMSO, в то время как в группе введения модифицированных моноцитов рана освобождается от некротических масс у всех крыс. Во всех группах эти процессы сопровождаются развитием грануляционной соединительной ткани, которая выстилает рану или находится непосредственно под струпом. Эпителизация раневой поверхности определяется не во всех случаях, чаще новообразованный эпидермис имеет 1-2 – рядную форму пласта.

На 21 сутки эксперимента у всех животных отмечаются признаки репарации эпидермиса в области ожоговой раны (рисунок 2). Однако в контрольной группе эпидермис инфильтрирован сегментоядерными лейкоцитами, наблюдается полнокровие сосудов дермы и гиподермы, отек, что может указывать на воспаление, присоединившееся в ходе заживления. В группах введения вокруг раны моноцитов можно наблюдать сформировавшийся эпидермис, как правило, обычного строения. Однако в группе введения аденозин-модифицированных моноцитов эпидермис связан с дермой непрочной, подэпителиально определяется слой рыхло расположенных коллагеновых волокон, имитирующий сосочковый слой кожи. Необходимо отметить, что только в этой экспериментальной группе в дерме регенерируют волосные фолликулы, что можно трактовать как восстановление структуры дермы со всеми ее производными. Отсутствие каких-либо сосудистых реакций и инфильтрата после введения аденозин-модифицированных моноцитов позволяет говорить о нормальном ходе процесса заживления.

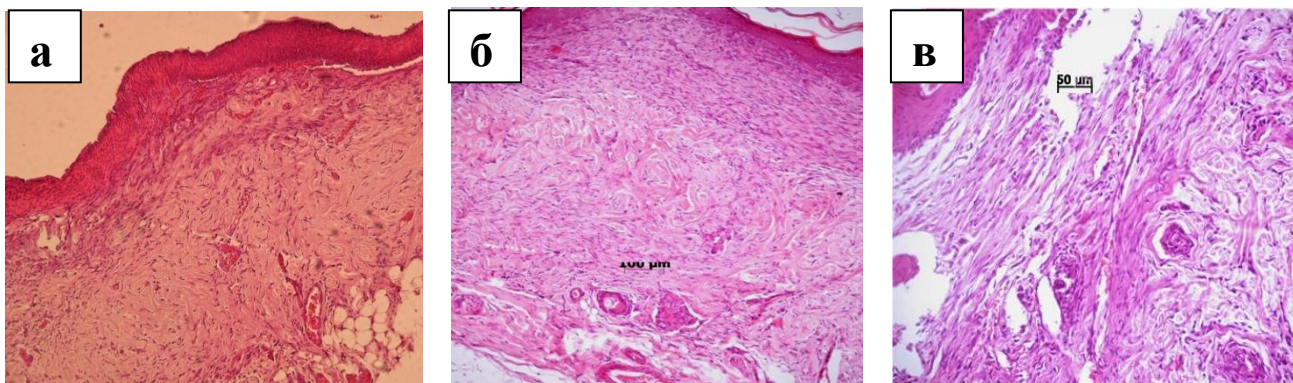


Рисунок 2 - Участок кожи крысы на 21 сутки эксперимента (а – с введением физиологического раствора, ув. 100; б – с введением моноцитов, культивируемых с DMSO, ув. 200; в – с введением аденозин-модифицированных моноцитов, ув. 400). Окраска гематоксилином и эозином.

Таким образом, в экспериментах *in vivo* мы наблюдали значительное ускорение заживления ожогового дефекта кожных покровов в группе животных, которым вводили аденозин-модифицированные моноциты. Причем в данной группе отмечалась не только полная регенерация кожи, но и восстановление волосяных фолликулов, что может свидетельствовать о сохранении структуры дермы со всеми ее производными. Необходимо отметить, что современные методы терапии ожоговой раны не позволяют сохранять дериваты кожи. Применение аденозин-модифицированных моноцитов может позволить ожоговым больным не только сократить время пребывания в стационаре (за счет сокращения сроков регенерации), но и повысить качество жизни, сохранив волосяной покров. Эффект модифицированных моноцитов в виде восстановления волосяных фолликулов может также являться основой для разработки терапевтических подходов в области эстетической медицины.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках проведенного исследования было получено несколько важных научных результатов. При исследовании профиля модифицированных аденозином моноцитов установлено, что добавление аналога аденозина NECA в культуральную среду приводит к изменению моноцитами направления дифференцировки в дендритные клетки и приобретению промежуточного иммунофенотипа ($CD1a^-CD14^+CD209^+$). Такие клетки характеризуются увеличением экспрессии мРНК генов A2A и A3 аденозиновых рецепторов по сравнению с интактными клетками. Аденозин-модифицированные моноциты также характеризуются измененным цитокиновым профилем. В частности, происходит повышение экспрессии мРНК генов IL1B, IL6, IL8, IL10, IP10, FGFB, VEGF. Таким образом, исходя из результатов исследований *in vitro*, можно говорить о том, что активация аденозиновых рецепторов приводит к запуску каскадов сигнальных путей, следствием чего является увеличение экспрессии мРНК генов и секреции цитокинов (рисунок 3). Секретируемые цитокины, в свою очередь, способны регулировать процессы воспаления, ангио-, фибро-, коллагеногенеза и эпителизации, приводя к ускорению регенерации, что было показано в эксперименте *in vivo* на модели ожоговой раны у крыс. Согласно данным планиметрического исследования, введение вокруг раны аденозин-модифицированных клеток приводит к более быстрому заживлению дефекта кожных покровов. При анализе гистологических образцов установлено отсутствие каких-либо патологических отклонений в процессе заживления у животных после введения аденозин-модифицированных моноцитов. Только в данной экспериментальной группе в дерме регенерировали волосяные фолликулы, что свидетельствует не только о заживлении раны в ускоренные сроки, но и о восстановлении нормальной структуры кожи.

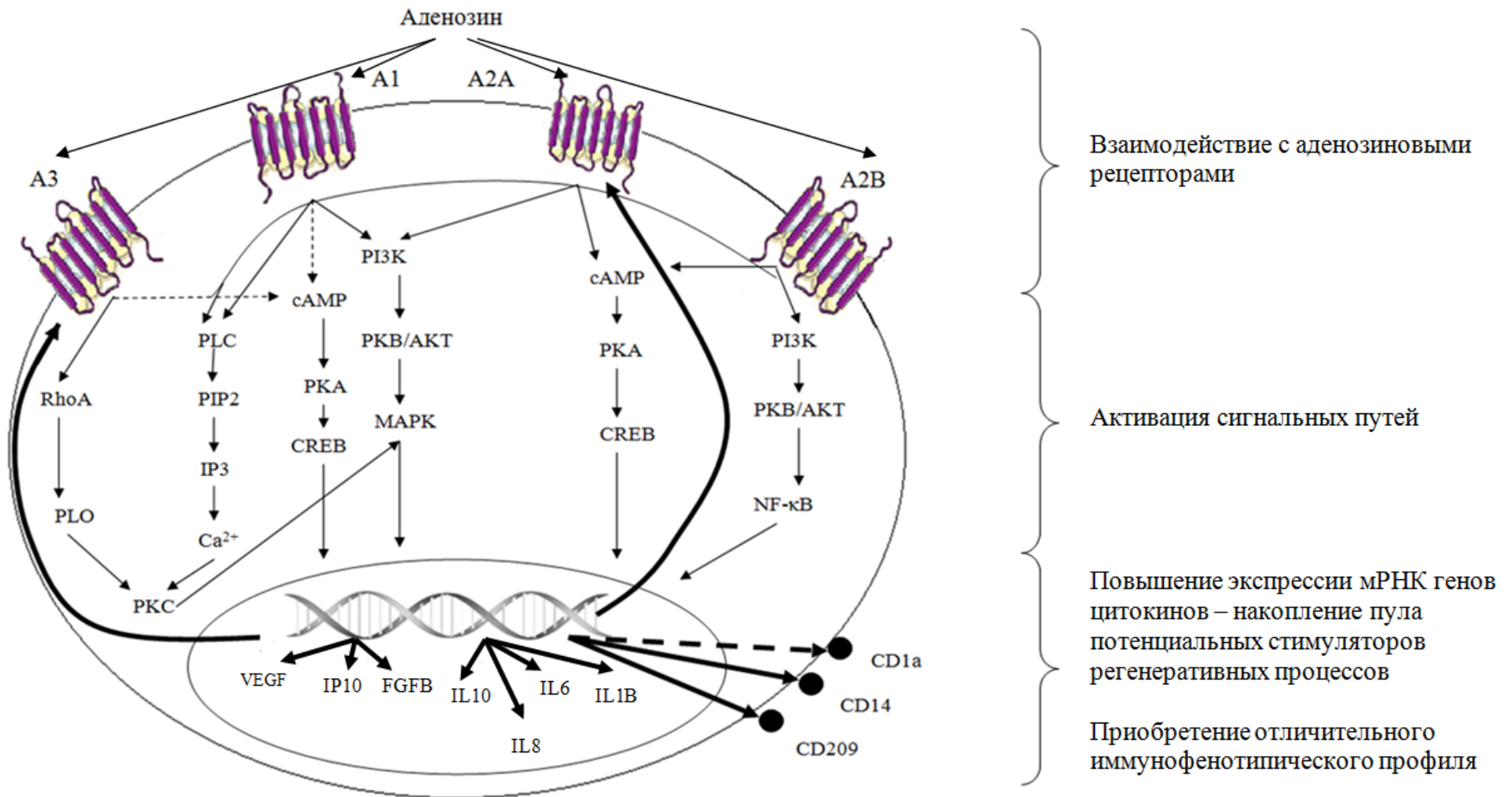


Рисунок 3 - Схема влияния стимуляции аденозиновых рецепторов аналогом аденозина NECA на профиль моноцитов на основании данных литературы и результатов собственных исследований (выделены жирным шрифтом).

Обозначения:

—→ - стимулирующее влияние

- - -→ - ингибирующее влияние

ВЫВОДЫ

1. При стимуляции моноцитов аналогом аденозина NECA происходит изменение пути дифференцировки клеток, характеризующееся приобретением иммунофенотипа CD1a-CD14+CD209+. С точки зрения иммунофенотипических характеристик клеток наиболее эффективным режимом модификации моноцитов является стимуляция 100 мкМ NECA с последующим культивированием в течение 72 часов по сравнению с 30 мкМ NECA и культивированием в течение 24 часов.

2. Аденозин-модифицированные моноциты обладают повышенной экспрессией мРНК генов A2A и A3 аденозиновых рецепторов, уровень экспрессии мРНК генов A1 и A2B рецепторов остается неизменным. Базально наибольшим уровнем экспрессии мРНК у моноцитов обладает ген A2B аденозинового рецептора.

3. Добавление NECA в культуральную среду приводит к увеличению экспрессии моноцитами мРНК генов функционально разнонаправленных цитокинов, регулирующих процессы воспаления, ангио-, фибро-, коллагеногенеза и эпителизации (IL1B, IL6, IL8, IL10, VEGF, FGFB, IP10). Стимуляция моноцитов NECA приводит к увеличению концентрации сосудисто-эндотелиального фактора роста в кондиционной среде. С точки зрения изменения цитокинового профиля модификация моноцитов 100 мкМ NECA с последующим культивированием в течение 72 часов является более эффективной, чем добавление 30 мкМ и культивирование в течение 24 часов.

4. Введение модифицированных аденозином моноцитов вокруг ожоговой раны у крыс приводит к ускорению заживления дефекта кожных покровов. По результатам гистологического исследования у данных животных не отмечается нарушение хода регенеративного процесса. Введение модифицированных клеток, в отличие от введения животным физиологического раствора и немодифицированных моноцитов, приводит к сохранению волосяных фолликулов.

ПЕРЕЧЕНЬ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Пат. 2497947 Российская Федерация МПК C12N 5/0786. Способ модификации моноцитов периферической крови для повышения их паракринной активности при аутологической трансплантации / А.Э. Сазонов, К.С. Юрьева, К.В. Хворилова, Е.Э. Кремер, О.П. Иккерт, И.В. Салтыкова. - №2012134942/10, заявл. 15.08.2012, опубл. 10.11.2013, Бюл. №31.

2. Модификация миелоидных клеток аденозином для повышения их регенеративного потенциала при аутологической трансплантации / К.В. Невская, К.С. Юрьева, Е.Э. Иванюк, А.Н. Дзюман, В.В. Иванов, А.Э. Сазонов // Сборник тезисов V Всероссийской научно-практической конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина». – Москва. - 2013. – С. 50.

3. 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 // Биомедицинская химия. – 2014. – Т.60, №2. – С. 246-257 (англ. Stimulation of adenosine receptors on myeloid cells enhances 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 // Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical chemistry. – 2014. – Vol. 8, N4. – P. 336-342).

4. Невская, К.В. Влияние стимуляции аденозиновых рецепторов на паракринную функцию моноцитов / К.В. Невская // Сборник трудов XV-ой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке». - Киров. – 2014. – С 314-315.

5. Невская, К.В. Особенности цитокинового профиля стимулированных аденозином моноцитов *in vitro* / К.В. Невская, Е.Э.Иванюк, О.П. Иккерт // Сборник тезисов 88-ой Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых. – Казань. – 2014. – С. 182.

6. Невская, К.В. Роль стимуляции аденозиновых рецепторов моноцитов в процессах ангио- и фиброгенеза / К.В. Невская // Тезисы LXXV научно-практической конференции «Актуальные вопросы экспериментальной и клинической медицины. – Санкт-Петербург. – 2014. – С.48.

7. Невская, К.В. Роль стимуляции аденозиновых рецепторов моноцитов в разрешении воспалительного процесса / К.В. Невская // Материалы XII межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых, посвященной 60-летию СНО Читинской государственной медицинской академии. Часть II. – Чита. – 2014. – С.71.

8. Особенности цитокинового профиля моноцитов при стимуляции аденозиновых рецепторов *in vitro* / К.В. Невская, Л.М. Огородова, К.С. Юрьева, Е.Э. Иванюк, О.П. Иккерт, И.В. Салтыкова, А.Э. Сазонов // Цитокины и воспаление. – 2014. – Т. 13, №1. – С. 67-70.

Условные сокращения

CD	- cluster of differentiation (кластер дифференцировки)
DMSO	- dimethyl sulfoxide (диметилсульфоксид)
βFGF	- fibroblast growth factor (фактор роста фибробластов)
FITC	- fluorescein isothiocyanate (флюоресцин изотиоционат)
GM-CSF	- granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор)
Ig	- immunoglobulin (иммуноглобулин)
IL	- interleukin (интерлейкин)
IP10	- interferon gamma-induced protein (интерферон-гамма-индуцируемый протеин)
NECA	- 5'-N-ethylcarboxamidoadenosine (5'-N- этилкарбоксамидоаденозин)
PE	- phycoerythrin (фикоэритрин)
PerCP	- peridinin Chlorophyll Protein Complex (перидинин-хлорофилл протеин)
TGFβ	- transforming growth factor (трансформирующий фактор роста)
VEGF	- vascular endothelial growth factor (фактор роста эндотелия сосудов)