

ОСОБЕННОСТИ АДГЕЗИИ К ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОЦИТОВ CD14⁺⁺CD16⁻ И CD14⁺CD16⁺ ЧЕЛОВЕКА

© Э. А. Старикова,¹ А. М. Лебедева, И. С. Фрейдлин

Институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: Starickova@yandex.ru

В крови у человека и других млекопитающих на основе различий экспрессии поверхностных молекул CD14 и CD16 идентифицированы две субпопуляции моноцитов. На моноцитах, принадлежащих к этим субпопуляциям, экспрессируются разные комбинации адгезионных молекул и рецепторов хемокинов, которые определяют различия во взаимодействии этих клеток с эндотелием и пути их миграции. Цель нашего исследования состояла в изучении способности моноцитов CD14⁺CD16⁺ и CD14⁺⁺CD16⁻ адгезировать к монослою эндотелиальных клеток в отсутствие и в присутствии про- и противовоспалительных цитокинов. Наши исследования показали, что моноциты CD14⁺CD16⁺ сильнее, чем моноциты CD14⁺⁺CD16⁻, адгезируют к интактному монослою эндотелиальных клеток. Адгезивность моноцитов CD14⁺CD16⁺ и CD14⁺⁺CD16⁻ к эндотелиальным клеткам значительно усиливалась в присутствии TNF α и комбинации TNF α с другими цитокинами. IFN- γ и IL-4 не оказывали самостоятельного эффекта на адгезивность моноцитов. Показано, что обе субпопуляции моноцитов могут адгезировать к эндотелию в условиях воспаления, но CD14⁺CD16⁺ могут адгезировать к эндотелию в отсутствие воспаления в 2 раза сильнее, чем моноциты CD14⁺⁺CD16⁻.

Ключевые слова: субпопуляции моноцитов CD14⁺⁺CD16⁻ и CD14⁺CD16⁺, эндотелиальные клетки, адгезия, цитокины.

Принятые сокращения: ICAM-1 — молекула межклеточной адгезии 1 (intercellular adhesion molecule-1), IFN — интерферон, IL — интерлейкин, SDF — фактор стромальных клеток (stromal-derived factor), TNF — фактор некроза опухолей (tumor necrosis factor).

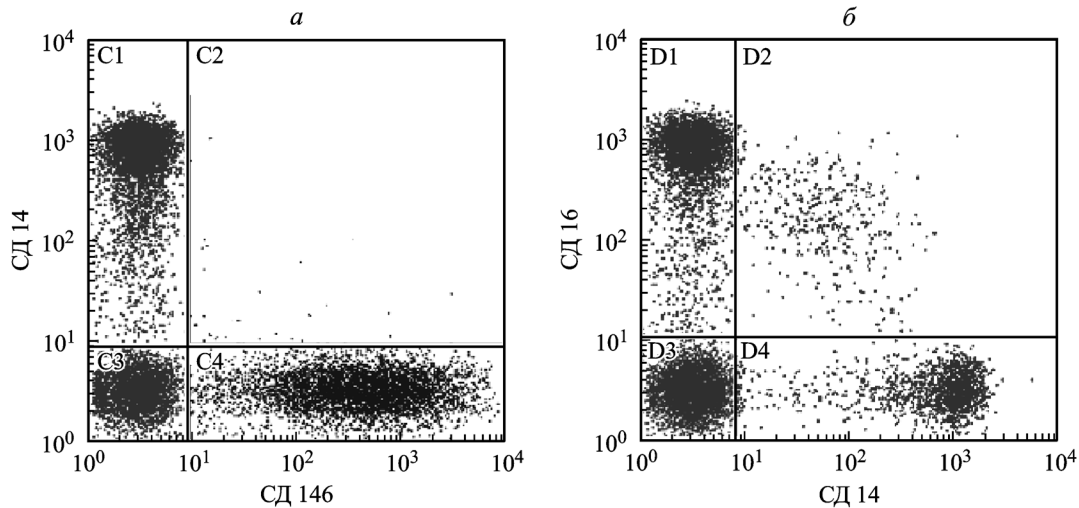
Изучение системы мононуклеарных фагоцитов имеет большую историю, однако данная группа клеток до сих пор привлекает внимание исследователей. В настоящее время у человека и других млекопитающих выявлены субпопуляции моноцитов, которые различаются по уровням экспрессии корцептора липополисахарида CD14 и Fc γ -рецептора CD16. Клетки CD14⁺⁺CD16⁻ описаны как классические моноциты, так как у здоровых людей они составляют 90—95 % от всех моноцитов. На минорную фракцию CD14⁺CD16⁺ у человека в норме приходится 5—10 % моноцитов, в связи с чем их принято называть неклассическими моноцитами (Passlick et al., 1989). Показано, что при некоторых системных инфекционных заболеваниях (гемолитическом уремическом синдроме, бактериальном сепсисе, HIV) количество клеток CD14⁺CD16⁺ минорной субпопуляции в крови повышается до 40 % (Allen et al., 1991; Fingerle et al., 1993; Thieblemont et al., 1995; Fernandez et al., 2005). Данные субпопуляции моноцитов имеют значительные различия в структуре адгезионного аппарата, т. е. экспрессируют на своей поверхности разные адгезионные молекулы и рецепторы к хемокинам (Grage-Griebenow et al., 2000; Weber et al., 2000; Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003; Ziegler-Heitbrock, 2007), что должно отражаться на адгезии субпопуляций моноцитов к эндотелиальным клеткам и определять различия в миграции этих клеток в ткани.

Поэтому цель нашего исследования состояла в сравнительном анализе адгезивности моноцитов человека, принадлежащих к разным субпопуляциям, к монослою эндотелиальных клеток в присутствии или в отсутствие про- и противовоспалительных цитокинов.

Материал и методика

В работе использовали клетки перевиваемой линии EA.hy 926, а также моноциты периферической крови человека. Линия эндотелиальных клеток человека EA.hy 926 была любезно предоставлена д-ром Cora-Jean S. Edgell (Университет Северной Каролины, США). Клетки линии EA.hy 926 воспроизводят основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелиальным клеткам макрососудов.

Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Биолот, Санкт-Петербург) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ICN, США), 100 ЕД./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (АО Самсон, Санкт-Петербург), 2 мМ глутамина (Flow Laboratories, Англия) и НАТ (ICN, США) при 37 °С во влажной атмосфере 5 % CO₂. Пересев производили 1 раз в 2—3 сут в равные количества полной культуральной среды. Для дезинтеграции мо-



Двухмерные гистограммы, отражающие соотношение эндотелиальных клеток и адгезировавших к ним моноцитов разных субпопуляций.

По горизонтали — клетки, меченные антителами против CD146⁺ (маркера эндотелиальных клеток) или CD14 (маркера моноцитов); по вертикали — клетки, меченные антителами против CD14 (а) или CD16 (б). а — соотношение эндотелиальных клеток с маркером CD146⁺ и адгезировавших к ним моноцитов с маркером CD14⁺; б — субпопуляции CD14⁺⁺CD16⁻ и CD14⁺CD16⁺ среди адгезировавших к эндотелию моноцитов.

нослюя клетки инкубировали в растворе Версена в течение 5—10 мин (Биолот, Санкт-Петербург).

Мононуклеары выделяли из периферической крови локтевой вены здоровых доноров обоего пола в возрасте от 20 до 50 лет (Отделение переливания крови, С.-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И. П. Павлова). В качестве антикоагулянта использовали гепарин (20—25 ед. на 1 мл крови). Разделение фракций гранулоцитов и мононуклеаров проводили с помощью осаждения клеток в градиенте плотности Фиколл-Верографина (1.077 г/см³). Жизнеспособность клеток, определяемая с помощью окрашивания 0.2%-ным раствором трипанового синего, составляла не менее 98 %. Мононуклеарные лейкоциты ресуспендировали в полной культуральной среде DMEM/F12 с добавками.

В работе использовали рекомбинантные препараты цитокинов человека: «Рефнолин» (TNF-α) в концентрации 50 ЕД/мл, «Гаммаферон» (IFN-γ) в концентрации 500 ЕД/мл и IL-4 в концентрации 500 ЕД/мл. Цитокины в выбранных концентрациях оказывали максимальное активирующее влияние на свойства эндотелиальных клеток EA.hy 926 при отсутствии цитотоксического эффекта.

За 1 сут до опыта проводили посев эндотелиальных клеток EA.hy 926 в 24-луночный планшет (Sarstedt, Австрия) из расчета 180 тыс. клеток на лунку в 500 мкл полной культуральной среды DMEM/F12 с добавками. После достижения конфлюэнтного монослоя в лунки вносили цитокины TNF-α, IFN-γ или IL-4. Кроме того, использовали две комбинации: TNF-α совместно с IFN-γ и TNF-α совместно с IL-4. Через 24 ч в лунки вносили суспензию мононуклеаров периферической крови из расчета 2 млн клеток на лунку в 0.5 мл полной культуральной среды DMEM/F12 с добавками и инкубировали в течение 1 ч. Не адгезировавшие клетки удаляли двукратной отмывкой теплым раствором Хенкса (Биолот, Санкт-Петербург). После 20-минутной инкубации в растворе Версена содержимое каждой лунки собирали в микропробирки. Для определения количества моноцитов, принадлежащих к исследуемым популяциям, производили окрашивание полученной клеточной суспензии моноклональными анти-

телами к поверхностным молекулам CD14 и CD16 (см. рисунок). Для определения количества эндотелиальных клеток производили окрашивание полученной клеточной суспензии моноклональными антителами к поверхностным молекулам CD146, специфичным для эндотелиальных клеток. Для этого клеточную суспензию инкубировали в присутствии моноклональных антител против CD14, CD16 и CD146 (Beckman Coulter, США) в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. После двукратной отмывки буферным раствором (рН 7.0), содержащим 0.1 % NaN₃ (Helicon, Москва), оценивали результат с помощью проточного цитофлуориметра Coulter Apics Altra (Beckman Coulter, США) (см. рисунок).

Клетки линии EA.hy 926 обладают развитым механизмом контактного торможения, поэтому после достижения конфлюэнтного монослоя и внесения цитокинов количество эндотелиальных клеток во всех лунках остается одинаковым. Это позволяет подсчитывать количество адгезировавших моноцитов относительно количества эндотелиальных клеток. Адгезивность каждой субпопуляции определяли как долю клеток (в %), адгезировавших к эндотелиальному монослою, от исходного числа клеток данной субпопуляции. При сравнении средних величин использовали точный критерий Фишера, рекомендуемый для сравнения долей малых выборок (n < 6) (Гланц, 1999).

Результаты и обсуждение

Исходя из того что моноциты способны конститутивно (в отсутствие воспаления) адгезировать к эндотелию и мигрировать из кровеносного русла в ткани (Imhof, Augrand-Lions, 2004), мы первоначально сравнивали адгезивность моноцитов CD14⁺⁺CD16⁺ и CD14⁺⁺CD16⁻ к монослою интактных эндотелиальных клеток. Исследования показали, что адгезивность моноцитов CD14⁺⁺CD16⁺ в этих условиях была выше (P < 0.01), чем классических моноцитов CD14⁺⁺CD16⁻ (см. таблицу). Согласно классической трехступенчатой модели трансэндотелиальной миграции, прочная адгезия лейкоцитов к эндотелию сосу-

**Различия интенсивности адгезии
к эндотелиальным клеткам моноцитов,
принадлежащих к разным субпопуляциям**

| Инкубация клеток в присутствии | Доля адгезировавших моноцитов, % | |
|-----------------------------------|--|---|
| | субпопуляция CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻ | субпопуляция CD14 ⁺ CD16 ⁺ |
| Культуральной среды (контроль) | 2.9 ± 1.7 (n = 8) | 5.6 ± 1.7 (n = 8) |
| TNFα | 31.8 ± 14.5 (n = 8) ^a | 20.9 ± 6.7 (n = 8) ^a |
| IFNγ | 5.2 ± 2.8 (n = 6) | 6.3 ± 1.9 (n = 6) |
| IL-4 | 3.5 ± 1.9 (n = 6) | 6.1 ± 1.5 (n = 7) |
| TNFα + IFNγ | 61.4 ± 34.9 (n = 6) ^a | 25.4 ± 5.4 (n = 6) ^a |
| TNFα + IL-4 | 30.3 ± 16.9 (n = 7) ^a | 26.5 ± 7.7 (n = 7) ^a |

Примечание. Приведены средние величины и их среднестатистические отклонения. ^aРазличия статистически достоверны по сравнению с контролем при $P < 0.001$. В скобках указано число экспериментов.

дов предвзывает миграцию клеток в субэндотелиальное пространство (Carlos, 1994). Следовательно, полученные нами результаты косвенно подтверждают данные из литературы (Geissmann et al., 2003). В этой работе было показано, что именно моноциты CD14⁺CD16⁺ из кровеносного русла конститутивно мигрируют в селезенку, легкие, печень и мозг в отличие от классических моноцитов CD14⁺⁺CD16⁻, которые конститутивно мигрируют в селезенку, а в условиях воспаления — в очаг воспаления, селезенку и лимфатические узлы.

Адгезию моноцитов к интактному эндотелию могут опосредовать адгезионная молекула ICAM-2 на эндотелиальных клетках и β2-интегрины на моноцитах. β2-интегрины экспрессируются на поверхности моноцитов и CD14⁺CD16⁺, и CD14⁺⁺CD16⁻ (Geissmann et al., 2003). Различия адгезивности этих субпопуляций моноцитов к интактному эндотелию можно объяснить различиями экспрессии хемокиновых рецепторов на этих клетках. Известно, что связывание хемокинов с их рецепторами на лейкоцитах приводит к изменению конформации молекул интегринов и усилению их аффинности (Kim et al., 2003). В функциональных тестах было показано, что моноциты CD14⁺CD16⁺ несут на своей поверхности рецепторы к метаболитическим хемокинам SDF-1 и фракталкину и в 1.5—2 раза активнее, чем моноциты CD14⁺⁺CD16⁻, мигрируют по градиенту этих хемокинов (Ancuta et al., 2003).

Для оценки зависимости адгезивности моноцитов от свойств эндотелиальных клеток мы изучали адгезию моноцитов в условиях, моделирующих разные состояния монослоя эндотелиальных клеток. В частности, проводили преинкубацию эндотелиальных клеток в присутствии про- и противовоспалительных цитокинов. Полученные результаты показали, что только в присутствии TNFα или TNFα в комбинации с IFNγ или IL-4 достоверно повышалась адгезивность моноцитов и классической, и неклассической субпопуляций по сравнению со спонтанным уровнем адгезии моноцитов соответствующих субпопуляций (см. таблицу).

Описанные в литературе различия в структуре адгезионного аппарата моноцитов, принадлежащих к разным субпопуляциям (Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003), никак не отражались на адгезии этих клеток к эндотелиальным клеткам в присутствии цитокинов. Классические моноциты CD14⁺⁺CD16⁻ экспрессируют на своей по-

верхности CD62. Для этих клеток характерен также высокий уровень экспрессии хемокиновых рецепторов — CCR1,2, CXCR2,1 и CCR7 (Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003). Такая структура адгезионного аппарата предполагает способность моноцитов CD14⁺⁺CD16⁻ адгезировать к эндотелию в участках воспаления (Mantovani, 1999; Imhof, Aurrand-Lions, 2004) и к венулам с высоким эндотелием вторичных лимфоидных органов (Von Andrian, Mempel, 2003). Моноциты CD16⁺ различаются более высоким уровнем экспрессии рецепторов CX₃CR1, CCR5 и CXCR4 (Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003). Клетки CD14⁺CD16⁺, вероятно, могут адгезировать к эндотелию там, где секретируются метаболитические хемокины SDF-1α и фракталкин, а также к эндотелию в участках воспаления (Ancuta et al., 2003; Geissmann et al., 2003).

Таким образом, теоретически обе субпопуляции моноцитов могут адгезировать к эндотелию в участках воспаления, но в ответ на разные комбинации воспалительных хемокинов. Известно, что под влиянием TNFα происходит индукция секреции эндотелиальными клетками широкого спектра воспалительных хемокинов, которые являются лигандами для обеих субпопуляций моноцитов (Mantovani et al., 1997; Meager, 1999). Этим можно объяснить одинаково выраженное усиление адгезивности моноцитов разных субпопуляций к эндотелиальным клеткам в присутствии TNFα.

IFNγ и IL-4 не оказывали влияния на адгезивность моноцитов (см. таблицу). Эти цитокины отличаются избирательным влиянием на секрецию хемокинов эндотелиальными клетками, однако их самостоятельный эффект, вероятно, слишком слаб, чтобы повлиять на адгезивность исследуемых субпопуляций моноцитов (Colotta et al., 1992; Marfaing-Koka et al., 1995; Chen, Manning, 1996; Gobeeler et al., 1997; Borgmann et al., 2002).

Результаты наших исследований позволяют предположить, что в условиях воспаления обе субпопуляции будут активно адгезировать к эндотелию сосудов. Однако минорная субпопуляция CD14⁺CD16⁺ способна в 2 раза более интенсивно адгезировать к эндотелию в отсутствие воспаления. Если считать, что способность клеток адгезировать к активированному эндотелию является одним из признаков участия клеток в инициации и развитии воспаления, то широко распространенное в литературе деление субпопуляций моноцитов на воспалительные и резидентные клетки (Strauss-Ayali et al., 2007) представляется условным.

Список литературы

- Гланц С. 1999. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 459 с.
- Allen J. B., Wong H. L., Guyre P. M., Simon G. L., Wahl S. M. 1991. Association of circulating receptor Fcγ RIII-positive monocytes in AIDS patients with elevated levels of transforming growth factor-β. J. Clin. Invest. 87 : 1773—1779.
- Ancuta P., Rao Ravi, Moses A., Mehle A., Shaw S. K., Luscinikas F. W., Gabuzda D. 2003. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16⁺ monocytes. J. Exp. Med. 12 : 1701—1707.
- Borgmann S., Bayer A., Knig W., Ambrosch A., Kraus J. 2002. Contrasting effects of long-term treatment with IFNγ in endothelial cells: increase in IL-6 secretion versus decrease in IL-8 secretion, NF-κB, and AP-1 activation. Endothelium. 3 : 173—178.
- Carlos T. M. 1994. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood. 84 : 2068—2101.

- Chen C., Manning A. 1996. TGF-beta 1, IL-10 and IL-4 differentially modulate the cytokine-induced expression of IL-6 and IL-8 in human endothelial cells. *Cytokine*. 8 : 58—65.
- Colotta F., Sironi M., Borre A., Luini W., Maddalena F., Mantovani A. 1992. Interleukin 4 amplifies monocyte chemotactic protein and interleukin 6 production by endothelial cells. *Cytokine*. 4 : 24—28.
- Fernandez G. C., Ramos M. V., Gomez S. A., Dran G. I., Exeni R., Alduncin M., Grimoldi I., Vallejo G., Elias-Costa C., Isturiz M. A., Palermo M. S. 2005. Differential expression of function-related antigens on blood monocytes in children with hemolytic uremic syndrome. *J. Leukoc. Biol.* 7 : 853—861.
- Fingerle G., Pforte A., Passlick B., Blumenstein M., Strobel M., Ziegler-Heitbrock H. W. 1993. The novel subset of CD14⁺/CD16⁺ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Blood*. 82 : 3170—3176.
- Geissmann F., Jung S., Littman D. R. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*. 19 : 71—82.
- Goebeler M., Yoshimura T., Toksoy A., Ritter U., Brocker E., Gillitzer R. 1997. The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines. *J. Invest. Dermatol.* 108 : 445—451.
- Grage-Griebenow E., Flad H. D., Ernst M., Bzowska M., Skrzeczynska J., Pryjma J. 2000. Human MO subsets as defined by expression of CD64 and CD16 differ in phagocytic activity and generation of oxygen intermediates. *Immunobiology*. 202 : 42—50.
- Imhof B. A., Aurrand-Lions M. 2004. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes. *Nature Rev.* 4 : 432—444.
- Kim M., Carma C. V., Springer T. A. 2003. Bidirectional transmembrane signaling by cytoplasmic domain separation in integrins. *Science*. 301 : 1720—1725.
- Mantovani A. 1999. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol. Today*. 20 : 254—257.
- Mantovani A., Bussolino F., Intora M. 1997. Cytokine regulation endothelial cell function: from molecular level to bedside. *Immunol. Today*. 18 : 231—239.
- Marfaing-Koka A., Devergne O., Gorgone G., Portier A., Schall T., Galanaud P., Emilie D. 1995. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 154 : 1870—1878.
- Meager A. 1999. Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation. *Cytokine and Growth factor Rev.* 10 : 27—39.
- Passlick B., Fliieger D., Loms Ziegler-Heitbrock H. W. 1989. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*. 74 : 2527—2534.
- Strauss-Ayali D., Conrad S. M., Mosserl D. M. J. 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Leukoc. Biol.* 82 : 244—252.
- Thieblemont N., Weiss L., Sadeghi H. M., Estcourt C., Haeflner-Cavaillon N. 1995. CD14^{low}CD16^{high}: a cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur. J. Immunol.* 25 : 3418—3424.
- Von Andrian U. H., Mempel T. R. 2003. Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nature Rev.* 3 : 867—878.
- Weber C., Belge K.-U., von Hundelshausen P., Draude G., Steppich B., Mack M., Frankenberger M., Weber K. S. C., Ziegler-Heitbrock H. W. L. 2000. Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations. *J. Leukoc. Biol.* 67 : 699—704.
- Ziegler-Heitbrock H. W. L. 2007. The CD14⁺CD16⁺ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 81 : 584—592.

Поступила 22 VI 2009

CD14⁺⁺CD16⁻ AND CD14⁺CD16⁺ HUMAN MONOCYTES ADHESION TO ENDOTHELIAL CELLSE. A. Starickova,¹ A. M. Lebedeva, I. S. Freidlin

Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg;

¹ e-mail: Starickova@yandex.ru

Two subsets of monocytes were identified in humans and other mammals blood based on different levels of CD14 and CD16 expression. These subsets have different patterns of adhesion molecules and chemokine receptors, which suggest different modes of interaction with endothelium and tissue traffic. Here, we investigated the ability of CD14⁺CD16⁺ and CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes to adhesion to endothelial cells monolayer in presence and in the absence of pro- and anti-inflammatory cytokines. We demonstrated that CD14⁺CD16⁺ monocytes had higher level of adhesion to intact endothelial cells monolayer than CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes. Significant increase in adhesion of CD14⁺⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺ monocytes subpopulations was observed in the presence of both TNF α and TNF α combinations with other cytokines. IFN γ and IL-4 showed no independent effects on adhesion of monocytes. These results have demonstrated that both CD14⁺⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺ monocytes can be recruited to inflamed endothelium, but, in the absence of inflammation, CD14⁺CD16⁺ monocytes adhere to endothelial cells two times stronger than CD14⁺⁺CD16⁻ monocytes.

Key words: CD14⁺⁺CD16⁻ and CD14⁺CD16⁺ monocytes subpopulations, endothelial cells, adhesion, cytokines.