

ОЦЕНКА ФУНКЦИИ АДГЕЗИИ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА К ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ

Соколов Д.И.¹, Старикова Э.А.², Селютин А.В.¹,
Сельков С.А.¹, Фрейдлин И.С.²

¹ ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта РАМН, Санкт-Петербург

² ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

Резюме. В статье описаны принципиально новые методы оценки способности субпопуляций мононуклеаров периферической крови человека к адгезии к человеческим эндотелиальным клеткам перевиваемой линии EA.Hy926, пригодные для использования в экспериментальных и клинико-иммунологических исследованиях, в том числе при лабораторной диагностике иммунодефицитных состояний, инфекций, патологии беременности и других видов патологии.

Ключевые слова: эндотелиоциты, проточная цитометрия, адгезия, мононуклеары.

Sokolov D.I., Starikova E.A., Seljutin A.V., Selkov S.A., Freidlin I.S.

EVALUATION OF ADHERENCE FUNCTION FOR VARIOUS SUBPOPULATIONS OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS TO ENDOTHELIAL CELLS

Abstract. In present article, essentially new methods are described for evaluation of adhesion of peripheral blood mononuclears to human endothelial cell line Ea.Hy926. These methods are suitable for both experimental purposes and research in clinical immunology, including laboratory diagnostics of immune deficiencies, infectious diseases, complicated pregnancy, and other kinds of clinical disorders. (*Med. Immunol.*, 2007, vol. 9, N 4-5, pp 473-478)

Введение

Адгезия лейкоцитов к поверхности эндотелия сосудов является важнейшим этапом, с которого начинается миграция клеток в субэндотелиальное пространство и выполнение ими защитных и регуляторных функций. Эндотелий сосудов играет активную роль в этом процессе. Эндотелиальные клетки способны быстро реагировать на внешние воздействия изменением адгезивных

и хемоаттрактантных свойств, что выражается в повышении уровня экспрессии адгезионных молекул и усилении секреции хемокинов [3]. Однако процесс адгезии лейкоцитов к эндотелию зависит не только от его свойств, но и от свойств самих лейкоцитов, в частности, от уровня экспрессии и степени аффинности интегринов на поверхности лейкоцитов. Хотя, интегрины конститутивно экспрессируются на моноцитах, они обладают низкой лиганд-связывающей активностью и не могут обеспечить стабильного связывания с соответствующими лигандами, необходимого для прочной адгезии. Хемокины, секретируемые эндотелием, регулируют все этапы активации и миграции лейкоцитов, в частности, индуцируют экспрессию адгезионных молекул и повышают аффинность интегринов [10].

Адрес для переписки:

Санкт-Петербург, Менделеевская линия, 3,
ГУ Научно-исследовательский институт
акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта,
лаборатория иммунологии.
Тел.: (812) 328-98-50. Факс: (812) 323-75-45.
E-mail: corbie@hotmail.ru

Лейкоциты периферической крови обладают разным адгезионным потенциалом, так как на разных популяциях лейкоцитов экспрессируются разные комбинации адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов [5]. В ходе различных патологических процессов комбинации этих молекул и их конформация изменяются. Повышение адгезионной функции той или иной популяции лейкоцитов может свидетельствовать об активации этих клеток и готовности к миграции из кровеносного русла. Нарушения функции адгезии лейкоцитов к эндотелию сосудов лежат в основе многих иммунодефицитных состояний. Недостаточность или чрезмерная активация адгезии и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов крови могут явиться факторами патогенеза различных заболеваний человека. До сих пор для оценки функции адгезии лейкоцитов крови преимущественно использовались косвенные лабораторные тесты, характеризующие экспрессию адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов на поверхности лейкоцитов. Оценка самой функции адгезии лейкоцитов крови проводилась с помощью тестов, далеких от условий целостного организма: адгезия лейкоцитов к стеклу и пластику, миграция лейкоцитов крови в стеклянных капиллярах или на пластике под слоем агарозы.

Целью настоящего исследования явилась разработка метода, позволяющего непосредственно оценивать функцию адгезии лейкоцитов крови к монослою эндотелиальных клеток и проводить сравнительное изучение особенностей адгезии отдельных субпопуляций моноклеаров периферической крови человека к монослою эндотелиальных клеток.

Материалы и методы

Работа выполнена с использованием эндотелиальных клеток человека перевиваемой линии EA.Hy926, любезно предоставленных Dr. Coe-Jean Edgell (Университет Северной Каролины, США). Культура получена путем гибридизации первичной эндотелиальной линии HUVEC с карциномой легкого A-549 в 1983 году. Линия EA.Hy926 воспроизводит основные морфологические, фенотипические и функциональные характеристики, присущие эндотелию [4]. Для культивирования использовали среду DMEM/F12 с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (ICN, США), 50 мкг/мл сульфата гентамицина, 2 мМ L-глутамина, НАТ (ICN, США). Клетки линии EA.Hy926 являются монослойной культурой, требующей пересева 1 раз в 3–4 дня. Дезинтеграцию монослоя для пересева вызывали 5-минутной экспозицией в растворе Версена. Накануне опыта производили пересев клеток линии EA.Hy926, часть полученной клеточной суспензии тщательно ресуспендировали

в культуральной среде и помещали в лунки плоскодонного 24-луночного планшета (Sarstedt, Австрия) в концентрации $1,5 \times 10^5$ клеток на лунку в 500 мкл культуральной среды и культивировали во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C для получения однородного монослоя.

Изучали функцию адгезии к эндотелию моноклеаров на примере периферической крови здоровых беременных женщин ($n = 10$). Моноклеары выделяли при помощи стандартного метода с использованием центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографин. Затем проводили окраску клеток при помощи витального флуоресцентного красителя CFSE (carboxyfluorescein succinimidyl ester) (ICN, США). Для этого клетки отмывали холодным физиологическим раствором, довели концентрацию клеток до 1×10^6 в 1 мл и добавляли CFSE до конечной концентрации 5 мкМ. Затем инкубировали клетки при 37°C в течение 10 минут и трижды отмывали холодным физиологическим раствором.

В лунки, содержащие однородный монослой эндотелиальных клеток линии EA.Hy926, вносили предварительно окрашенные витальным флуоресцентным красителем CFSE моноклеары периферической крови в концентрации 10^6 клеток на лунку в 500 мкл культуральной среды и культивировали во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C в течение 30 минут. После инкубации трижды отмывали теплым физиологическим раствором от неадгезированных клеток. Адгезированные клетки вместе с монослоем эндотелиальных клеток переводили в суспензию с помощью 5-минутной экспозиции в растворе Версена. Полученную смесь клеток подвергали цитофлуориметрическому анализу при помощи прибора FACScan (BD, США) на основе определения трех параметров: малого углового светорассеяния (FSC), бокового светорассеяния (SSC) и значения флуоресценции при длине волны 519 нм CFSE (FL-1). Настройку прибора проводили таким образом, чтобы четко выделить области, занимаемые эндотелиальными клетками и моноклеарами периферической крови в зависимости от показателей прямого и бокового светорассеяния. Проводили гейтирование исследуемых клеток в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат) (рис. 1а). Затем данную область анализировали на наличие флуоресценции FL1, что позволяло различать окрашенные витальным флуоресцентным красителем CFSE моноклеары периферической крови от неокрашенных клеток линии EA.Hy926 (рис. 1б и 1в). Степень адгезии определяли по соотношению моноклеаров периферической крови и клеток линии EA.Hy926.

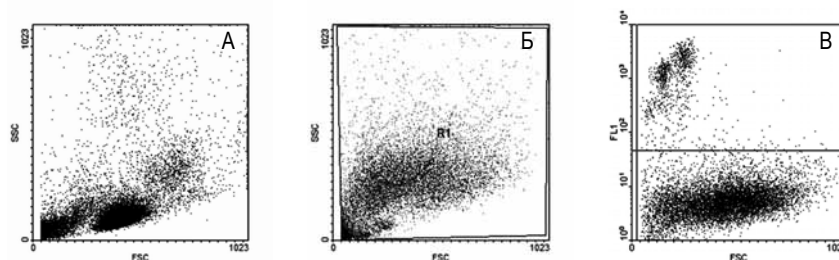


Рисунок 1.

А. График в координатах FSC-SSC с изображением мононуклеаров периферической крови.

Б. График в координатах FSC-SSC с изображением области R1, где находятся эндотелиальные клетки EA.Hy926 и мононуклеары периферической крови.

В. График в координатах FSC-FL1 с изображением областей: вверху – окрашенные мононуклеары периферической крови, внизу – неокрашенные эндотелиальные клетки.

Результаты

Нами установлено, что в среднем на 1000 эндотелиальных клеток адгезируют 45 мононуклеаров периферической крови здоровых беременных женщин. Данный вариант метода не позволяет отличить облако лимфоцитов от облака моноцитов. Поэтому возможна только оценка суммарной функции адгезии мононуклеаров периферической крови к эндотелиальным клеткам.

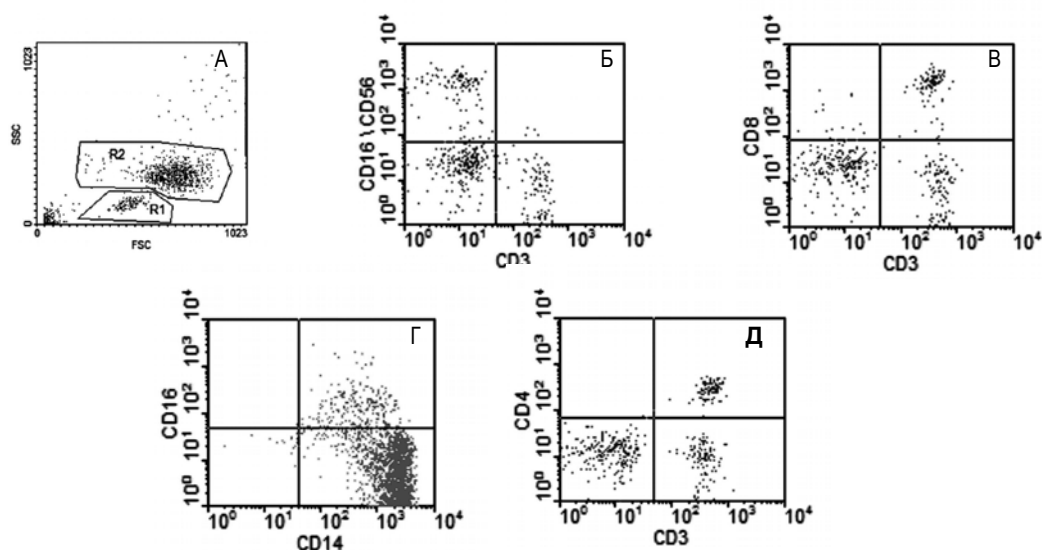
Для количественной и качественной оценки адгезировавших к эндотелию субпопуляций мононуклеаров периферической крови метод был усовершенствован с использованием проточной цитометрии и моноклональных антител. Предварительно каждый образец крови обрабатывали моноклональными антителами (BD, США), при одновременном использовании следующих комбинаций антител: антиCD3(FITC) и антиCD16/56(PE); антиCD3(PerCP), антиCD4(FITC) и антиCD8(PE); антиCD14(FITC) и антиCD16(PE) и проводили цитофлуориметрический анализ при помощи прибора FACScan (BD, США). Аналогичную оценку субпопуляционного состава проводили в отношении мононуклеаров периферической крови, адгезированных к монослою эндотелиальных клеток. Для этого после инкубации с монослоем эндотелиальных клеток и отмывания физиологическим раствором от неадгезированных мононуклеаров адгезированные мононуклеары обрабатывали тем же набором моноклональных антител. Настройку проточного цитофлуориметра проводили таким образом, чтобы четко выделить области, занимаемые лимфоцитами ($CD3^+$) и мононуклеарными фагоцитами ($CD14^+$) в зависимости от показателей прямого и бокового светорассеяния. Проводили гейтирование исследуемых клеток в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат). При этом эндотелиальные клетки не попадали в пределы гейти-

рованных областей. Затем анализировали на наличие флуоресценции клетки, попавшие в гейты R1 (лимфоциты) и R2 (моноциты) (рис. 2). Результаты анализа приведены в таблице 1.

Из приведенных данных видно, что наибольшей способностью к адгезии обладают моноциты, так как процент лимфоцитов с фенотипом $CD3^+$ был достоверно ниже, а суммарный процент клеток с фенотипом $CD14^+$ был достоверно выше среди адгезировавших клеток по сравнению с процентом этих клеток среди лейкоцитов цельной крови. Относительное содержание $CD16^+/CD56^+$ клеток и $CD14^+/CD16^-$ моноцитов выше среди адгезировавших клеток. Относительное содержание $CD3^+/CD4^+$ было достоверно ниже, тогда как количество $CD3^+/CD8^+$ не отличалось. Относительное содержание $CD14^+/CD16^+$ моноцитов среди адгезировавших клеток и среди лейкоцитов цельной крови не различалось.

При анализе полученных данных мы дополнительно определяли соотношения субпопуляций мононуклеаров периферической крови среди лейкоцитов цельной крови и среди адгезировавших к эндотелию клеток (табл. 2).

В нашем эксперименте отношение общего количества лимфоцитов к общему количеству моноцитов в периферической крови среди лейкоцитов цельной крови было выше, чем среди адгезировавших клеток, что указывает на повышенную адгезионную активность моноцитов в сравнении с лимфоцитами. Отношение количества $CD4^+$ лимфоцитов к общему количеству $CD3^+$ лимфоцитов среди лейкоцитов цельной крови также было выше, чем среди адгезировавших клеток. При этом отношение $CD8^+$ лимфоцитов к общему количеству $CD3^+$ лимфоцитов среди лейкоцитов цельной крови было ниже, чем среди адгезировавших клеток. Так как относительное содержание $CD3^+/CD4^+$ досто-

**Рисунок 2.**

- А.** Двумерная гистограмма в координатах FSC-SSC мононуклеаров периферической крови. Гейт R1 содержит лимфоциты. Гейт R2 содержит моноциты. Эндотелиальные клетки отличаются большими размерами и располагаются в правом верхнем углу графика.
- Б.** Двумерная гистограмма лимфоцитов в координатах FL1(CD3)-FL2(CD16/CD56).
- В.** Двумерная гистограмма лимфоцитов в координатах FL3(CD3)-FL1(CD4).
- Г.** Двумерная гистограмма лимфоцитов в координатах FL3(CD3)-FL2(CD8).
- Д.** Двумерная гистограмма моноцитов в координатах FL1(CD14)-FL2(CD16).

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ ЖЕНЩИН ДО И ПОСЛЕ АДГЕЗИИ К ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ ЛИНИИ EA.Hy926

Субпопуляции мононуклеаров (по данным цитофлуориметрического анализа)	Процент клеток с указанным фенотипом у здоровых беременных женщин (n = 10) среди лейкоцитов цельной крови	Процент клеток с указанным фенотипом у здоровых беременных женщин (n = 10) среди адгезировавших клеток
Относительное содержание лимфоцитов от общего количества событий (гейт R1)	18,42±0,77	4,71±0,73*
Относительное содержание моноцитов от общего количества событий (гейт R2)	3,97±0,64	24,76±3,43*
Доля лимфоцитов с фенотипом CD3 ⁺ от общего количества лимфоцитов	74,27±1,38	52,95±5,00*
Доля CD16 ⁺ /CD56 ⁺ клеток от общего количества лимфоцитов	11,35±1,12	15,23±2,29*
Доля CD3 ⁺ /CD4 ⁺ клеток от общего количества лимфоцитов	47,83±2,1	27,85±5,06*
Доля CD3 ⁺ /CD8 ⁺ клеток от общего количества лимфоцитов	24,65±2,73	26,38±5,38
Доля CD14 ⁺ клеток от общего количества моноцитов	83,28±3,10	96,66±0,99
Доля CD14 ⁺ /CD16 ⁻ клеток от общего количества моноцитов	79,53±3,19	92,88±0,68**
Доля CD14 ⁺ /CD16 ⁺ клеток от общего количества моноцитов	3,75±0,59	3,78±0,55

Примечания: * – p < 0,01; ** – p < 0,05.

ТАБЛИЦА 2. СОПОСТАВЛЕНИЕ СООТНОШЕНИЙ СУБПОПУЛЯЦИЙ МОНОНУКЛЕАРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ДО И ПОСЛЕ АДГЕЗИИ К ЧЕЛОВЕЧЕСКИМ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМ КЛЕТКАМ ЛИНИИ EA.Hy926

Варианты соотношений	Соотношения субпопуляций мононуклеаров периферической крови	
	среди лейкоцитов цельной крови	среди адгезировавших клеток
общего количества лимфоцитов к общему количеству моноцитов	4,640	0,220
количества CD4 ⁺ лимфоцитов к общему количеству CD3 ⁺ лимфоцитов	0,640	0,520
количества CD8 ⁺ лимфоцитов к общему количеству CD3 ⁺ лимфоцитов	0,330	0,500
количества CD14 ⁺ /CD16 ⁺ моноцитов к общему количеству CD14 ⁺ моноцитов	0,032	0,039
количества CD14 ⁺ /CD16 ⁻ моноцитов к общему количеству CD14 ⁺ моноцитов	0,820	0,960

верно снижалось среди адгезировавших клеток по сравнению с их содержанием среди лейкоцитов цельной крови, а количество CD3⁺/CD8⁺ не изменялось, можно сделать вывод о том, что CD4⁺ лимфоциты обладали низкой адгезионной активностью, тогда как CD8⁺ лимфоциты изначально обладали высокой адгезионной активностью и полностью адгезировали к эндотелиальным клеткам. Поэтому снижение содержания лимфоцитов с фенотипом CD3⁺ среди адгезировавших клеток по сравнению с их содержанием среди лейкоцитов цельной крови вызвано уменьшением количества CD4⁺ лимфоцитов вследствие их низкой адгезионной активности. Отношение CD14⁺/CD16⁺ моноцитов к общему количеству CD14⁺ моноцитов среди лейкоцитов цельной крови составило и среди адгезировавших к эндотелию клеток было одинаковым. При этом отношение CD14⁺/CD16⁻ моноцитов к общему количеству CD14⁺ моноцитов среди лейкоцитов цельной крови было ниже, чем среди адгезировавших к эндотелию. Принимая во внимание то, что относительное количество клеток с фенотипом CD14⁺ и доля CD14⁺/CD16⁻ моноцитов было выше среди адгезировавших клеток, а относительное содержание CD14⁺/CD16⁺ моноцитов было одинаковым среди адгезировавших клеток и в цельной крови, можно сделать вывод о том, что CD14⁺/CD16⁺ моноциты изначально обладают высокой адгезионной способностью. Увеличение доли клеток с фенотипом CD14⁺ среди адгезированных клеток обеспечивалось высокой адгезионной способностью CD14⁺/CD16⁻ моноцитов.

Обсуждение

Приобретенные иммунодефициты с дефектами адгезионной и миграционной активности

лейкоцитов чаще всего развиваются как следствия хронических бактериальных или вирусных инфекций. При различных иммунопатологических процессах (аутоиммунные заболевания, атеросклероз) усиленная продукция цитокинов и хемокинов ведет к повышению экспрессии адгезионных молекул на лейкоцитах и к существенному усилению процессов адгезии и трансэндотелиальной миграции лейкоцитов из кровяного русла в очаги воспаления.

При таких патологиях беременности, как гестоз и плацентарная недостаточность, в первую очередь страдают эндотелиальные клетки плаценты и организма матери. Изучение в этой работе адгезионных свойств субпопуляций мононуклеаров крови здоровых беременных женщин объясняется насущной необходимостью последующей объективной оценки функции адгезии мононуклеаров крови к эндотелию при патологии беременности. Для поддержания иммунологического баланса, обеспечивающего вынашивание беременности, необходимо постоянное обновление мононуклеаров плаценты за счет мононуклеаров крови [7, 8, 9, 11]. Главным условием этого процесса являются адекватные адгезионные свойства отдельных субпопуляций мононуклеаров крови. Поэтому проведение оценки адгезионных свойств параллельно с определением субпопуляционного состава мононуклеаров периферической крови позволит выявлять иммунологические дефекты у больных гестозом и обоснованно подходить к выбору терапии с учетом того, что различные лекарственные препараты (стероидные гормоны, антибиотики) способны угнетать процессы адгезии и трансэндотелиальной миграции [1, 2, 6].

Адгезия лейкоцитов к эндотелию — сложный процесс, в основе которого лежит взаимодей-

ствие разных молекул на эндотелии с их лигандами на лейкоцитах. При проведении клинико-лабораторных исследований выявление дефектов каждой отдельной молекулы, участвующей в адгезии, не представляется возможным. Предложенный вариант функционального теста позволяет проводить комплексную оценку процесса, выявлять нарушение функции: снижение или усиление адгезии, сдвиги соотношений субпопуляций адгезирующих лейкоцитов.

Разработанные нами методы могут быть использованы для фундаментальных и для клинико-лабораторных исследований. С их помощью можно изучать механизмы, лежащие в основе процесса адгезии, влияния на процесс адгезии лейкоцитов к эндотелиальным клеткам различных хемоаттрактантных молекул, цитокинов, ростовых факторов и лекарственных препаратов, выявлять дефекты функциональной активности отдельных субпопуляций лейкоцитов периферической крови и изучать роль подобных нарушений при различных патологических процессах.

Работа поддержана грантами: РФФИ № 06-04-48110а, а также грантами Президента РФ № НШ-5268.2006.7 и МК-1355.2007.7.

Список литературы

1. Alvarez A., Hermenegildo C., Issekutz A.C., Esplugues J.V., Sanz M.J. Estrogens inhibit angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via rapid endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase activation // *Circ. Res.* — 2002. — Vol. 91, N 12. — P. 1142-1150.
2. Cantaluppi V., Biancone L., Romanazzi G.M., Figliolini F., Beltramo S., Ninniri M.S., Galimi F., Romagnoli R., Franchello A., Salizzoni M., Perin P.C., Ricordi C., Segoloni G.P., Camussi G. Antiangiogenic and immunomodulatory effects of rapamycin on islet endothelium: relevance for islet transplantation // *Am. J. Transplant.* — 2006. — Vol. 6, N 11. — P. 2601-2611.
3. Cook-Mills J., Deem T. Active participation of endothelial cells in inflammation // *J. Leukoc. Biol.* — Vol. 77. — P. 487-495.
4. Edgell C.J., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1983. — Vol. 80, N 12. — P. 3734-3737.
5. Fabbri M., Bianchi E., Fumagalli L., Pardi R. Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules // *Inflammation research.* — 1999. — Vol. 48. — P. 239-246.
6. Geraldès P., Gagnon S., Hadjadj S., Merhi Y., Sirois M.G., Cloutier I., Tanguay J.F. Estradiol blocks the induction of CD40 and CD40L expression on endothelial cells and prevents neutrophil adhesion: an ER α -mediated pathway // *Cardiovasc. Res.* — 2006. — Vol. 71, N 3. — P. 566-573.
7. Goldman-Wohl D.S., Ariel I., Greenfield C., Lavy Y., Yagel S. Tie-2 and angiopoietin-2 expression at the fetal-maternal interface: a receptor ligand model for vascular remodelling // *Mol. Hum. Reprod.* — 2000. — Vol. 6. — P. 81-87.
8. Hara N., Fujii T., Yamashita T., Kozuma S., Okai T., Taketani Y. Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) on extravillous trophoblasts in preeclampsia: Immunohistological demonstration with anti-HLA-G specific antibody «87G» and anti-cytokeratin antibody «CAM5.2» // *Am. J. Reprod. Immunol.* — 1996. — Vol. 36. — P. 349-358.
9. Reister F., Frank H.-G., Kingdom J.C.P., Heyl W., Kaufmann P., Rath W., Huppertz B. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women // *Lab. Invest.* — 2001. — Vol. 81. — P. 1143-1152.
10. Sanz-Rodriguez, F., Hidalgo A., Teixido J. Chemokine stromal cell-derived factor-1 α modulates VLA-4 integrin-mediated multiple myeloma cell adhesion to CS-1/fibronectin and VCAM-1 // *Blood.* — 2001. — Vol. 97. — P. 351.
11. Zhou Y., Damsky C.H., Fisher S.J. Preeclampsia is associated with failure of human cytotrophoblasts to mimic a vascular adhesion phenotype. One course of defective end vascular invasion in this syndrome // *J. Clin. Invest.* — 1997. — Vol. 99. — P. 2152-2164.

поступила в редакцию 15.05.2007

принята к печати 30.05.2007