

ВЛИЯНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ПРЕИНКУБИРОВАННЫХ С ЦИТОКИНАМИ, НА ФЕНОТИП И ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК МОНОЦИТОПОДОБНОЙ ЛИНИИ THP-1

Старикова Э.А., Фрейдлин И.С., Соколов Д.И. *,
Сельков С.А. *, Сысоев К.А. **, Тотолян Арег А. **

ГУ НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;

* ГУ НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта, Санкт-Петербург;

** Государственный Медицинский Университет им. акад. Павлова, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. TNF α , IFN γ и IL-4 индуцируют разные варианты активации эндотелиальных клеток линии EA.hy 926. Наибольшие изменения свойств эндотелиальных клеток линии EA.hy 926 наблюдаются в случае их активации TNF α . Под влиянием этого цитокина происходит достоверное повышение секреции IL-8 и MCP-1, а также миграции и адгезии клеток линии THP-1 к монослою эндотелиальных клеток. Несмотря на это, совместное культивирование преинкубированных с этим цитокином эндотелиальных клеток с клетками линии не вызывает достоверных изменений поверхностного фенотипа последних.

IFN γ и IL-4 оказывают достоверное ингибирующее действие на адгезию моноцитов к эндотелию. При этом, преинкубация эндотелиальных клеток с IL-4 вызывала как усиление секреции IL-8 и MCP-1, так и усиление миграции клеток THP-1. Преинкубация эндотелиальных клеток с IFN γ , напротив, оказывала ингибирующее действие на оба параметра.

Совместное культивирование клеток THP-1 с интактными и предварительно инкубированными с IFN γ клетками линии EA.hy 926 приводило к незначительному достоверному повышению уровня экспрессии молекул HLA-DR. В случае предобработки монослоя эндотелиальных клеток IL-4 и последующего совместного культивирования их с клетками THP-1 на последних достоверно повышался уровень экспрессии CD68. Выявленные нами единичные изменения поверхностного фенотипа клеток линии THP-1 не коррелировали с изменениями других изученных параметров: экспрессией адгезионных молекул на эндотелии, хемоаттрактантными свойствами этих клеток и степенью адгезии моноцитов.

Ключевые слова: эндотелиальные клетки, цитокины, моноциты, адгезия, миграция, фенотип.

Starikova E.A., Freidlin I.S., Sokolov D. I., Selkov S.A., Sisoev K.A., Totolian A.A.

INFLUENCE OF ENDOTHELIAL CELLS PREINCUBATED WITH CYTOKINES ON THP-1 MONOCYTE-LIKE CELLS PHENOTYPE AND FUNCTIONS

Abstract. We demonstrated that TNF α , IFN γ and IL-4 induce different patterns of endothelial cells activation. The greatest alterations were observed in TNF α treated endothelial cells. Under the influence of this cytokine there was a statistically significant elevation of IL-8 and MCP-1 production by endothelial cells, of THP-1 adhesion and of migration toward endothelial cells monolayer. At the same time we had not observed any immunophenotype alteration of THP-1 cocultured with endothelial cells treated with TNF α .

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна,
197376, г. Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова,
д. 12, отдел иммунологии.
Тел.: (812)234-16-69, факс (812)234-94-89.

IFN γ и IL-4 induced statistically significant inhibition of THP-1 adhesion. IL-4 treated endothelial cells have elevated levels of IL-8 and MCP-1 production and stimulated THP-1 migrations. IFN γ showed inhibition of IL-8 and MCP-1 spontaneous production and THP-1 migration.

Incubation of THP-1 with untreated and IFN γ treated endothelial cells led to significant elevation of HLA-DR expression. Expression of CD68 was significantly higher in case of THP-1 cocultured with IL-4 treated endothelial cells. There was no any correlation between immunophenotype alteration THP-1 cells and others parameters alteration. (*Med. Immunol.*, 2005, vol.7, № 5-6, pp 495-502)

Введение

Моноциты циркулируют в крови, не пройдя окончательной дифференцировки. После миграции в ткани они дифференцируются в макрофаги или дендритные клетки и выполняют функции поглощения и презентации антигенов [11]. Вопрос о факторах, регулирующих дифференцировку и активацию моноцитов, продолжает дискутироваться в литературе. Возможно, в регуляции этих процессов участвуют эндотелиальные клетки и продуцируемые ими цитокины. Влияние эндотелия на мигрирующие моноциты может осуществляться, по меньшей мере, двумя путями: сигналами, которые генерируют пары взаимодействующих адгезионных молекул на поверхности моноцитов и эндотелия, и сигналами от взаимодействия секретируемых эндотелием хемокинов с хемокиновыми рецепторами на моноцитах. Дифференцировка и активация моноцитов сопровождаются изменениями поверхностного фенотипа клеток. Эндотелиальные клетки тоже подвергаются действию цитокинов, секретируемых в участке воспаления, в результате чего претерпевают активацию, как было показано нами ранее [1, 2].

Целью настоящего исследования было изучение влияния эндотелиальных клеток перевиваемой линии EA.hy 926, предварительно инкубированных с цитокинами, на адгезию, миграцию и поверхностный фенотип моноцитоподобных клеток перевиваемой линии THP-1. Параллельно мы проводили оценку секреции хемокинов IL-8 и MCP-1 эндотелиальными клетками.

Материалы и методы

В работе использовали рекомбинантные препараты человеческих цитокинов TNF α - «Рефнолин» (специфическая активность препарата 1ЕД - 0,06 нг), в концентрации 50 ЕД/мл, IFN γ - «Гаммаферон» (НПО «Фермент», «Sanitas», Литва), в концентрации 500 ЕД/мл, IL-4, (специфическая активность препарата 1ЕД - 0,2 нг, «Becton Dickinson», США), в концентрации 50 ЕД/мл.

EA.hy 926 - линия эндотелиальных клеток человека была любезно предоставлена Dr. Cora-Jean C. Edgell (Университет Северной Калифорнии, США). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 («Sigma», США), с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («ICN», США), 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина (АО «Самсон», СПб), 2 мМоль глутамина («ICN», США) и НАТ («ICN», США), при 37°C во влажной атмосфере с

5% CO $_2$. Пересев культуры производили каждые 3-4 дня. Для дезинтеграции монослоя клетки инкубировали в растворе Версена в течение 5-10 минут («Биолот», СПб). Клетки линии THP-1 культивировали в среде RPMI-1640 («Биолот», СПб) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки («ICN», США), 50 мкг/мл сульфата гентамицина (АО «Самсон», СПб), 2 мМ L-глутамина («ICN», США). Пересев производили 1 раз в 2-3 дня добавлением равного количества полной культуральной среды. Для культивирования использовали пластиковые флаконы объемом 50 мл («Sarstedt», Австрия).

Клетки линии EA.hy 926 помещали в лунки 24-луночного плоскодонного планшета («Sarstedt», Германия) в концентрации 50000 клеток на лунку в 500 мкл культуральной среды и инкубировали до образования конфлюэнтного монослоя во влажной атмосфере с 5% CO $_2$, при 37°C. Далее клетки инкубировали в присутствии исследуемых цитокинов, через 24 часа производили отмывку и продолжали инкубацию еще 24 часа. Все эксперименты проводили в присутствии 10 мкг/мл полимиксина В («Sigma», США). После окончания инкубации образцы культуральных жидкостей замораживали (-20°C) для последующего определения концентрации IL-8 и MCP-1. Концентрацию IL-8 и MCP-1 определяли используя стандартные коммерческие наборы BioPlex Cytokine Assay (Bio-Rad Laboratories, USA). Для оценки влияния эндотелиальных клеток на фенотип клеток THP-1 дальнейшую инкубацию эндотелиальных клеток проводили в присутствии клеток THP-1 (150000 клеток в лунке) во влажной атмосфере с 5% CO $_2$, при 37°C. Через 30 минут фракцию клеток THP-1 собирали с эндотелиального монослоя 5-ти минутной инкубацией в холодном растворе Версена («Биолот», СПб). Клетки осаждали центрифугированием и проводили оценку экспрессии CD45, HLA-DR, CD32, CD49, CD11b, CD68, CD15 (функции и лиганды этих поверхностных маркеров представлены в табл.3). В анализируемой клеточной суспензии примесь эндотелиальных клеток составляла не более 5%, т. к. 95% клеток экспрессировали лейкоцитарные маркеры CD45 и CD15. Клеточную суспензию однократно отмывали от культуральной среды забуференным физиологическим раствором (ЗФР), содержащим 0,1% NaN $_3$ («Helicon», Москва). Моноклональные антитела (мАт) против CD45, HLA-DR, CD32, CD11b (Научно-производственный центр «МедБиоСпектр», Москва) вносили по 8 мкл, а мАт против CD49 и CD68

Табл. 1. ИЗМЕНЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ МОЛЕКУЛ НА КЛЕТКАХ ЛИНИИ THP-1 ПРИ СОВМЕСТНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ С ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ EA.hy 926, ПРЕИНКУБИРОВАННЫМИ С ЦИТОКИНАМИ

Поверхностные маркеры клеток	Культивирование THP-1 с клетками EA.hy926, преинкубированными с цитокинами				Культивирование клеток THP-1 без клеток EA.hy926 (M±m)
	TNFα (M±m)	IFNγ (M±m)	IL-4 (M±m)	Без цитокинов (M±m)	
CD45	52±6,6	50±8,5	49±7,9	50±7,7	45±5,2
CD15	62±12,8	70±19,4	70±17,9	57±9,1	60±17,3
HLA-DR	25±2,4	26±1,4**	25±2,3	27±0,9**	23±1,8
CD32	18±1,7	19±1,7	17±2,9	20±4,5	17±0,8
CD49d	33±7,5	31±3,7	33±6,3	30±4,5	29±3,8
CD11b	15±1,8	15±2,2	16±2,1	16±3,5	15±1,9
CD68	10±0,9	11±1,9	11±0,3***	9±1,7	9±0,3

Представлены средние значения по результатам четырех независимых экспериментов. Результаты выражены в единицах интенсивности флюоресценции, за вычетом интенсивности флюоресценции контроля вторых антител или изотопического контроля.

*** Различия статистически достоверны по сравнению с экспрессией на клетках линии THP-1, инкубированных в отсутствие клеток EA.hy 926 (p<0.001).

** Различия статистически достоверны по сравнению с экспрессией на клетках линии THP-1, инкубированных в отсутствие клеток EA.hy 926 (p<0.01).

Табл. 2. РАЗЛИЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ПРЕИНКУБАЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК EA.hy 926 С ЦИТОКИНАМИ

Изучаемые параметры	TNFα	IFNγ	IL-4
Экспрессия ICAM-1 на клетках EA.hy 926.	+	+	-
Экспрессия VCAM-1 на клетках EA.hy 926.	+	+	-
Повышение секреции IL-8 клетками EA.hy 926.	+	-	+
Усиление адгезии THP-1 к клеткам EA.hy 926	+	-	-
Усиление хемотаксиса THP-1 к клеткам EA.hy 926	+	-	+
Изменения поверхностного фенотипа THP-1 при совместном культивировании с клетками EA.hy 926	-	+	+

Примечание: + стимулирующий достоверный эффект; – нет стимулирующего достоверного эффекта.

Табл. 3. ФУНКЦИИ ИССЛЕДУЕМЫХ ПОВЕРХНОСТНЫХ МОЛЕКУЛ И ИХ ЛИГАНДЫ

Поверхностные маркеры	Другое название	Лиганды на эндотелии	Функции
CD45	LCA (leukocyte common antigen)		Тирозинфосфатаза, передача сигнала внутрь клетки
CD15	Sialyl -Le ^x	CD62E, CD62P	Адгезионная молекула
HLA-DR	Молекула главного комплекса гистосовместимости II класса		Презентация антигена
CD32	FcγRII		Рецептор для Fc порции Ig G
CD49d	α ₄ -субъединица β ₁ -интегринов, VLA-4	VCAM-1	Адгезионная молекула
CD11b	α _m -субъединица β ₂ -интегринов	ICAM-1	Адгезионная молекула, CR3
CD68	Макросиалин		Лизосомальный маркер

(Becton Dickinson, США) - по 6 мкл на 300000 клеток в 50 мкл 3ФР с 0,1% NaN_3 («Helicon», Москва) и инкубировали в присутствии мАт 20 минут при 25°C в темноте. После двукратной отмывки 3ФР, содержащим 0,1% NaN_3 («Helicon», Москва), вносили поликлональные Ат к иммуноглобулинам мыши, меченные ФИТЦ (НПЦ «МедБиоСпектр», Москва, или «Becton Dickinson, США») вносили по 8 и 6 мкл, соответственно, и проводили инкубацию 20 минут при 25°C в темноте. После трехкратной отмывки, проводили учет результатов с помощью проточного цитофлюориметра FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson, США».

Оценку интенсивности миграции клеток линии ТНР-1 проводили с использованием метода, основанного на окраске внутриклеточного белка специфическим витальным флюоресцентным красителем carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE). Для окраски клетки ТНР-1 однократно отмывали от культуральной среды 3ФР и доводили клеточность до 1 млн. клеток в мл. Клетки инкубировали в 3ФР с CFSE («Sigma», США) в конечной концентрации 0,5 мкг/мл, 10 минут на водяной бане при 37°C. После чего, клетки 3 раза отмывали от красителя холодным 3ФР. Монослой эндотелиальных клеток инкубировали в присутствии исследуемых цитокинов, через 24 часа производили отмывку и продолжали инкубацию еще 24 часа во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C. По окончании инкубации в каждую лунку помещали трансвеллы («Becton Dickinson», США) с диаметром пор 8 мкм и в верхнюю камеру вносили, предварительно окрашенные CFSE, клетки ТНР-1, по 100000 в 100 мкл культуральной среды. После 2,5 часовой инкубации во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C все содержимое нижней камеры собирали для анализа. Интенсивность миграции оценивали с использованием проточного цитофлюориметра по количеству окрашенных CFSE клеток линии ТНР-1, приходящихся на соответствующее количество клеток линии EA.hy926. Цитофлюоресцентный анализ проводили на основе определения трех параметров: малого углового светорассеяния (FSC), бокового светорассеяния (SSC) и показателя зеленой флюоресценции CFSE (FL-1). Настройку амплифайера проводили таким образом, чтобы в окне Dot Plot FSC-SSC четко выделялось облако эндотелиальных клеток и клеток линии ТНР-1. Проводили гейтинг исследуемых клеток в координатах FSC (ось абсцисс) и SSC (ось ординат). Затем данную группу анализировали на наличие флюоресценции в координатах FL1 зеленое свечение (CFSE) в окне Dot Plot. В результате в окне Dot Plot происходит разделение окрашенных витальным флюоресцентным красителем CFSE клеток линии ТНР-1 от неокрашенных клеток линии EA.hy926.

Для оценки адгезии клетки линии EA.hy 926 помещали в лунки 96-луночного плоскодонного план-

шета («Greiner», Германия) в концентрации 25000 клеток на лунку в 200 мкл культуральной среды и инкубировали до образования конфлюэнтного монослоя во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C. Далее клетки инкубировали в присутствии исследуемых цитокинов, через 24 часа производили отмывку и вносили предварительно окрашенные CFSE клетки ТНР-1 по 100000 клеток в 100 мкл полной культуральной среды, инкубировали 30 минут во влажной атмосфере с 5% CO_2 при 37°C. Не адгезировавшие клетки удаляли троекратной отмывкой полной культуральной средой. Дезинтеграцию монослоя вызывали 10-минутной экспозицией в 0,25% растворе Версена («Биолот», СПб), тщательно ресуспендировали и содержимое лунок в объеме 200 мкл переносили в микропробирки для анализа, после чего проводили учет интенсивности флюоресценции с использованием проточной цитофлюориметрии. Степень адгезии оценивали по количеству клеток линии ТНР-1, приходящихся на клетки линии EA.hy926.

Статистическую обработку полученных данных проводили с вычислением критерия Стьюдента, используя компьютерную программу STATISTICA 5.0.

Результаты

Исследование адгезии клеток линии ТНР-1 показало, что около 12% внесенных в лунку моноцитов адгезируют к монослою не активированных клеток EA.hy 926. Преинкубация клеток EA.hy 926 с цитокином $\text{TNF}\alpha$ приводила к троекратному усилению адгезии, а преинкубация клеток EA.hy 926 с $\text{IFN}\gamma$ и IL-4 оказывала достоверное ингибирующее действие на последующую адгезию клеток линии ТНР-1 (рис.1).

Клетки линии ТНР-1 достаточно активно спонтанно мигрировали в направлении монослоя интактных эндотелиальных клеток EA.hy926. После преинкубации эндотелиальных клеток с $\text{TNF}\alpha$ и IL-4 отмечено достоверное повышение интенсивности миграции клеток ТНР-1, при этом, эффект $\text{TNF}\alpha$ был достоверно выше эффекта IL-4 ($p < 0,05$). $\text{IFN}\gamma$ не оказывал достоверного влияния на исследуемый показатель (рис.2).

Параллельными исследованиями было показано, что эндотелиальные клетки EA.hy 926 спонтанно секретируют хемокины IL-8 (рис.3) и MCP-1 (рис.4), причем уровень спонтанной секреции IL-8 в 5 раз выше, чем уровень спонтанной секреции MCP-1. Уровни секреции обоих хемокинов эндотелиальными клетками линии EA.hy 926 одинаково изменялись после преинкубации с цитокинами: $\text{IFN}\gamma$ достоверно ингибировал, а $\text{TNF}\alpha$ и IL-4 достоверно повышали спонтанную продукцию этих хемокинов. Стимулирующее действие $\text{TNF}\alpha$ было до-

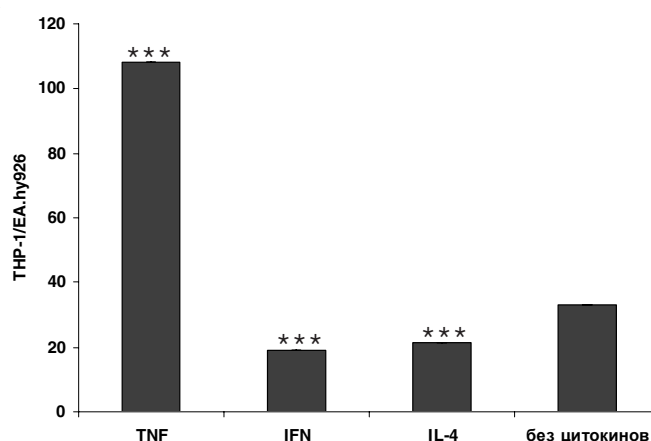


Рис. 1. Адгезия клеток линии THP-1 к эндотелиальным клеткам EA.hy 926, предварительно инкубированными с цитокинами. Результаты отражают количество клеток линии THP-1, приходящихся на 100 клеток EA.hy 926.

*** Различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

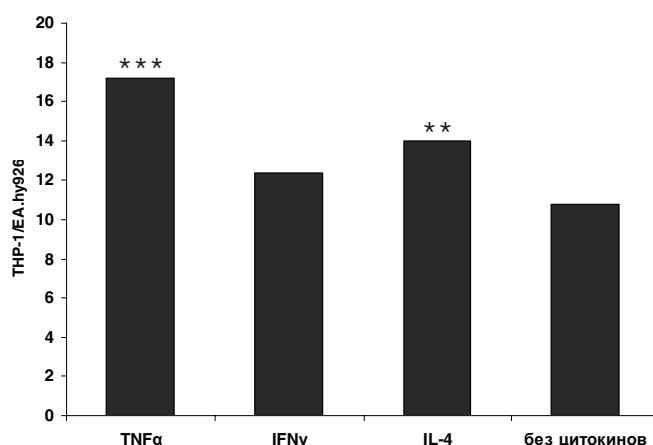


Рис. 2. Миграция клеток линии THP-1 к эндотелиальным клеткам EA.hy 926, предварительно инкубированными с цитокинами. Результаты отражают количество мигрировавших клеток THP-1, приходящихся на 100 клеток EA.hy 926.

** Различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,01$).

*** Различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,001$).

стительно выше, чем стимулирующее действие IL-4, как в отношении продукции MCP-1, так и в отношении продукции IL-8.

Оценку экспрессии поверхностных молекул на клетках линии THP-1 проводили после 30 минутной инкубации с интактными или предварительно инкубированными в присутствии цитокинов эндотелиальными клетками EA.hy 926. Ранее было показано, что 30 мин. достаточно, чтобы произошла адгезия клеток THP-1 к эндотелиальным клеткам. Совместное культивирование культур клеток не приводило к существенным изменениям количества клеток, экспрессирующих исследуемые маркеры. При незначительном повышении уровня экспрессии всех поверхностных молекул в кокультуре, достоверным по сравнению со спонтанной экспрессией было только повышение уровня экспрессии HLA-DR (табл.1). Уровень экспрессии исследуемых мар-

керов на клетках THP-1 столь же незначительно повышался при их совместном культивировании с эндотелиальными клетками, преинкубированными с цитокинами, в этом случае достоверным было повышение уровня экспрессии CD68 в случае предобработки эндотелия IL-4 и повышение уровня экспрессии HLA-DR в случае предобработки эндотелия IFNγ (табл.1).

Обсуждение

Моноциты мигрируют из сосудов в ткани даже в отсутствие воспаления. В основе этого явления лежит конститутивная секреция эндотелиальными клетками ряда хемокинов (MCP-1[17], SDF-1[15], Fractalkine [11]). Наши эксперименты показали, что эндотелиальные клетки линии EA.hy 926 спонтанно секретируют хемоаттрактанты для моноцитов -

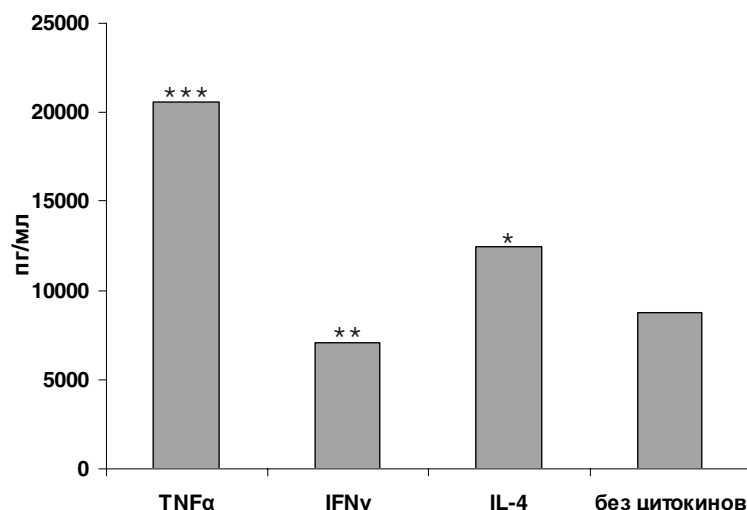


Рис.3. Секреция IL-8 эндотелиальными клетками EA.hy 926, предварительно инкубированными с цитокинами.

*** Различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.001$).

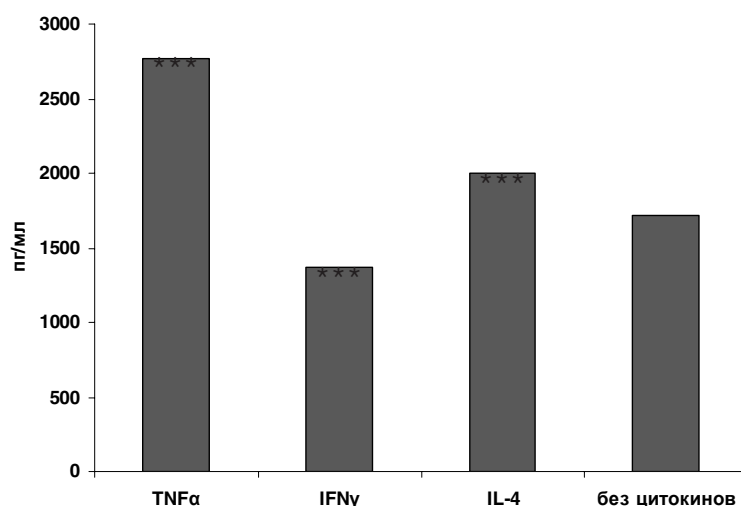


Рис.4. Секреция MCP-1 эндотелиальными клетками EA.hy 926, предварительно инкубированными с цитокинами.

* Различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.05$).

** Различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.01$).

*** Различия статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0.001$).

IL-8 и MCP-1 (рис.3 и рис.4). Не исключено, что спонтанная секреция хемокинов эндотелиальными клетками *in vitro* происходит в результате их неспецифической активации.

Известно, что эндотелиальные клетки секретируют широкий спектр хемокинов, подавляющее большинство которых являются хемоаттрактантами для моноцитов. TNFα, IFNγ и IL-4 индуцируют секрецию эндотелиальными клетками разных комбинаций хемокинов. Под влиянием TNFα эндотелий сосудов секретирует MIPs, MCPs, RANTES, фракталкин, IL-8 [15]. IFNγ и IL-4 являются антагонистами в отношении секреции эндотелием ряда хемокинов. IFNγ индуцирует секрецию RANTES [9, 16] и фракталкина [8], а IL-4 ингибирует секрецию

этих хемокинов [16, 8], но стимулирует секрецию эндотелием эотаксина-3 [7] и MCP-1 [14, 6, 18]. Показано, что IFNγ индуцирует секрецию MCP-1 эндотелиальными клетками микрососудов [15].

В нашей культуральной системе только TNFα и IL-4 стимулировали секрецию такого спектра хемокинов, который усиливал миграцию клеток THP-1. Эксперименты выявили статистически достоверную положительную корреляцию между интенсивностью продукции IL-8 и MCP-1 эндотелиальными клетками, преинкубированными с цитокинами, и миграцией моноцитов по направлению к монослою эндотелиальных клеток, преинкубированных с теми же цитокинами ($r=0,94$, при $p < 0,01$ для IL-8 и $r=0,92$, при $p < 0,01$ для MCP-1). Преин-

кубация эндотелиальных клеток с $\text{TNF}\alpha$ и IL-4 вызывала как усиление секреции хемокинов, так и усиление миграции клеток ТНР-1. Преинкубация эндотелиальных клеток с $\text{IFN}\gamma$, напротив, оказывала ингибирующее действие на оба параметра. Очевидно, хемокины IL-8 и MCP-1 играют основную роль в привлечении клеток ТНР-1. Возможно также, что интенсивность секреции эндотелиальными клетками IL-8 и MCP-1 под влиянием $\text{TNF}\alpha$ и IL-4 коррелирует с интенсивностью секреции других хемокинов под влиянием тех же цитокинов. Обращает на себя внимание выявленный нами факт стимулирующего действия IL-4 на секрецию IL-8. Это не согласуется с имеющимися в литературе данными о том, что IL-4 также как $\text{IFN}\gamma$ является ингибитором секреции IL-8 [3, 5, 15]. Регистрируемые в наших опытах эффекты могли быть вызваны не только $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ и IL-4, но и продуктами, секретруемыми эндотелиальными клетками под влиянием этих цитокинов. Другими словами, индуцирующий эффект IL-4 на секрецию IL-8 мог быть опосредованным, т. к. он проявлялся только после удаления цитокина из среды (рис.3).

Ранее нами было показано, что клетки линии EA.hy 926 имеют низкий спонтанный уровень экспрессии молекул ICAM-1 и VCAM-1. Под влиянием $\text{TNF}\alpha$ и $\text{IFN}\gamma$ происходило достоверное повышение уровней экспрессии адгезионных молекул. IL-4 самостоятельного действия не оказывал, но снижал уровень экспрессии адгезионных молекул, индуцированный $\text{TNF}\alpha$ [1, 2]. Наши эксперименты позволяют предполагать, что выраженность адгезии макрофагоподобных клеток линии ТНР-1 к эндотелиальным клеткам EA.hy 926 зависит от нескольких условий. Во-первых, необходим высокий уровень экспрессии адгезионных молекул ICAM-1 и VCAM-1 на эндотелии. Во-вторых, требуется наличие высоко аффинных лигандов для этих молекул на клетках ТНР-1 – β_2 -интегринов. Известно, что хемокины действуют на всех этапах трансэндотелиальной миграции лейкоцитов. Связывание хемокинов с их рецепторами на лейкоцитах опосредованно усиливает адгезию, т. к. приводит к изменению конформации молекул интегринов, повышению их аффинности и кластеризации [13, 11]. Фракталкин, секретруемый эндотелиальными клетками, одновременно является и хемоаттрактантом и адгезионной молекулой [10, 12]. Повышение степени адгезии клеток линии ТНР-1 к эндотелиальным клеткам в наших экспериментах происходило только в том случае, если и уровень экспрессии адгезионных молекул на эндотелиальных клетках и уровень секреции хемокинов эндотелиальными клетками были выше спонтанного уровня, как это было в случае преинкубации эндотелиальных клеток с $\text{TNF}\alpha$ (табл.2).

$\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$ и IL-4 индуцируют разные варианты активации эндотелиальных клеток (табл.2), которые могут реализовываться в ходе разных патологических процессов. В целом, наибольшие изменения свойств эндотелиальных клеток линии EA.hy 926 наблюдаются в случае их активации $\text{TNF}\alpha$. Несмотря на это, совместное культивирование преинкубированных с этим цитокином эндотелиальных клеток с клетками линии ТНР-1 не вызывает достоверных изменений поверхностного фенотипа последних.

$\text{IFN}\gamma$ и IL-4 оказывают достоверное ингибирующее действие на адгезию моноцитов к эндотелию. При этом $\text{IFN}\gamma$ повышает экспрессию адгезионных молекул на эндотелии, а IL-4 стимулирует секрецию хемокинов эндотелиальными клетками. Совместное культивирование клеток ТНР-1 с интактными и предварительно инкубированными с $\text{IFN}\gamma$ клетками линии EA.hy 926 приводит к незначительному достоверному повышению уровня экспрессии молекул HLA-DR. Это может свидетельствовать о повышении антигенпрезентирующих свойств моноцитов и является свидетельством их активации [2]. В случае предобработки монослоя эндотелиальных клеток IL-4 и последующего совместного культивирования их с клетками ТНР-1 на последних достоверно повышается экспрессия CD68. Повышение уровня экспрессии CD68 сопровождает процесс дифференцировки моноцитов в макрофаги [2].

Нельзя исключать, что описанные изменения фенотипа зависят от остаточных следовых количеств цитокинов, с которыми преинкубировались эндотелиальные клетки. Можно предположить также, что на этапе прочной адгезии происходит перераспределение (кластеризация) данных адгезионных молекул на поверхности моноцитов без изменения уровня их экспрессии. Выявленные нами единичные изменения поверхностного фенотипа клеток линии ТНР-1 не коррелировали с изменениями других изученных параметров: экспрессией адгезионных молекул на эндотелии, хемоаттрактантными свойствами этих клеток и степенью адгезии моноцитов. Исходя из этих данных, можно предположить, что сигналы, передаваемые внутрь клеток от адгезионных молекул не приводят к изменению поверхностного фенотипа моноцитов, по крайней мере, в течение 30 минут кокультивирования. То же самое можно сказать о продуктах, которые секретруются эндотелиальными клетками линии EA.hy 926, преинкубированными с цитокинами при их совместном культивировании с клетками ТНР-1.

Нами разработана адекватная экспериментальная модель для изучения взаимодействия эндотелиальных клеток и моноцитов с использованием перевиваемых клеточных линий. Взаимное влияние моноцитов с эндотелиальными клетками нуждается в дальнейшем тщательном изучении.

Список литературы

1. Старикова Э.А., Амчиславский Е.И., Соколов Д.И., Фрейдлин И.С., Полосухина Е.Р., Барышников А.Ю. Изменения поверхностного фенотипа эндотелиальных клеток под влиянием провоспалительных и противовоспалительных цитокинов // Медицинская иммунология. - 2003. - Т.5, №1-2. - С.39-48.
2. Старикова Э.А., Фрейдлин И.С., Соколов Д.И., Сельков С.А. Изменения свойств эндотелиальных клеток линии EA.hy.926 под влиянием TNF α , IFN γ и IL-4 // Иммунология. - 2005. - №2. - С.83-87.
3. Фрейдлин И.С., Шейкин Ю.А. Эндотелиальные клетки в качестве мишеней и продуцентов цитокинов // Медицинская иммунология. - 2001. - т.3, №4. - с.499-514.
4. Ярилин А.А. Основы иммунологии. - М.: Медицина, 1999. - 608 с.
5. Borgmann S., Bayer A., Knig W., Ambrosch A., and Kraus J. Contrasting effects of long-term treatment with IFN γ in endothelial cells: increase in IL-6 secretion versus decrease in IL-8 secretion, NF- κ B, and AP-1 activation // Endothelium. - 2002. - Vol.9, №3. - P. 173-178. 6.
6. Colotta F., Sironi M., Borre A., Luini W., Maddalena F., Mantovani A. Interleukin 4 amplifies monocyte chemotactic protein and interleukin 6 production by endothelial cells // Cytokine. - 1992. - V.4. - №1. - P. 24-28.
7. Cuvelier S., Pate K. Shear-dependent eosinophil transmigration on interleukin 4-stimulated endothelial cells: a role for endothelium-associated eotaxin-3 // J. Exp. Med. - 2001. - V.194, №12. - P.1699-1709.
8. Fraticelli P., Sironi M., Bianchi G., D'Ambrosio D., Albanesi C., Stoppacciaro A., Chieppa M., Allavena P., Ruco L., Girolomoni G., Sinigaglia F., Vecchi A. and Mantovani A. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses // Clin Invest. - 2001. - Vol.107, №9. - P.1173-1181.
9. Goebeler M., Yoshimura T., Toksoy A., Ritter U., Brouck E., Gillitzer R. The chemokine repertoire of human dermal microvascular endothelial cells and its regulation by inflammatory cytokines // Journal of Investigative Dermatology. - 1997. - Vol. 108. - P.445-451.
10. Goda S., Imai T., Yoshie O., Yoneda O., Inoue H., Nagano Y., Okazaki T., Imai H., Bloom E. T., Domae N., and Umehara H. CX3C-Chemokine, fractalkine-enhanced adhesion of THP-1 cells to endothelial cells through integrin-dependent and -independent mechanisms // J. Immunol. - 2000. - Vol.164. - P.4313-4320.
11. Imhof B. A. and Aurrand-Lions M. Adhesion mechanisms regulating the migration of monocytes // Nature reviews. - 2004. - Vol.4, №6. - P.432-444.
12. Kerfoot S. M., Lord S. E., Bell R. B., Gill V., Robbins S. M. and Kubes P. Human fractalkine mediates leukocyte adhesion but not capture under physiological shear conditions; a mechanism for selective monocytes recruitment // Eur. J. Immunol. - 2003, №33. - P.729-739.
13. Lalor P. F., Shields P., Grant A. J., Adams D. H. Recruitment of lymphocytes to the human liver // Immunology and cell biology. - 2002, №80. - p.52
14. Mantovani A., Garlanda C., Introna M. Regulation of endothelial function by pro- and anti-inflammatory cytokines // Transplantation proceeding. - 1998. - №30. - P.4239-4243.
15. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs // Immunology today. - 1999. - Vol.20, №6. - P.254-257.
16. Marfaing-Koka A., Devergne O., Gorgone G., Portier A., Schall T.J., Galanaud P. and Emilie D. Immunologists Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN- γ plus TNF- α and inhibition by IL-4 and IL-13 // J. Immunol. - 1995. - Vol. 154. - P.1870-1878.
17. Randolph G. J. // In: Lotze M., Thompson A. (ed.) Dendritic cells. Biology and clinical application. Sec. Ed., Acad.Press, San Diego. - 2001. - P.275.
18. Rollins B., Pober J. Interleukin-4 induces the synthesis and secretion of MCP-1/JE by human endothelial cells // J. Pathol. - 1991. - Vol. 138. - P.1315-1319.

поступила в редакцию 24.05.2005

принята к печати 30.06.2005