

<https://doi.org/10.29296/25877305-2019-11-03>

Молекулярные механизмы регуляции функциональной активности клеток крови: совершенствование таргетной противовоспалительной терапии

Э. Баринов¹, доктор медицинских наук, профессор,
Х. Григорян², кандидат медицинских наук,
Т. Фабер¹, **В. Сохина**¹, **А. Перенесенко**¹

¹Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького, Украина

²Донецкое областное клиническое территориальное медицинское объединение, Украина

E-mail: barinov.ef@gmail.com

Частота осложнений, связанных с развитием острого воспаления и рецидивированием хронических заболеваний, диктует необходимость совершенствования традиционных методов профилактики и лечения. Перспективным направлением разработки таргетной терапии является управление механизмами активации и рекрутирования лейкоцитов из циркулирующей крови в очаг воспаления, что позволило бы приблизиться к возможности контролируемого развития воспалительной реакции. В обзоре приводятся многочисленные доказательства модуляции функциональной активности лейкоцитов и их трансэндотелиальной миграции при стимуляции α - и β -адренорецепторов. Обсуждается практическая значимость экспрессии пуриnergических P_2 -рецепторов лейкоцитов. Представлены возможные механизмы активации моноцитов и макрофагов при стимуляции $P2X$ -рецепторов ($P2X_2$, $P2X_4$, $P2X_5$ и $P2X_7$), что позволяет прогнозировать их противовоспалительный потенциал, а в перспективе – контролировать развитие воспаления. Анализируются регуляторные возможности основных подтипов $P2Y$ -рецепторов ($P2Y_1$, $P2Y_2$, $P2Y_4$, $P2Y_6$, $P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$ и $P2Y_{14}$), которые участвуют в регуляции фагоцитоза, секреции цитокинов, адгезии и миграции лейкоцитов. Рассматривается роль тромбоцитов, экспрессирующих пуриновые рецепторы ($P2Y_1$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{14}$ и $P2X_1$), в рекрутировании и хемотаксисе лейкоцитов при воспалении; обоснована перспективность селективного воздействия на адрен- и пуриnergические рецепторы клеток крови как на терапевтическую мишень при системной воспалительной реакции.

Ключевые слова: терапия, воспаление, лейкоциты, тромбоциты, α - и β -адренорецепторы, пуриновые P_2 -рецепторы.

Для цитирования: Баринов Э., Григорян Х., Фабер Т. и др. Молекулярные механизмы регуляции функциональной активности клеток крови: совершенствование таргетной противовоспалительной терапии // Врач. – 2019; 30 (11): 15–22. <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-11-03>

Актуальная проблема клинической медицины – уточнение механизмов активации и рекрутирования лейкоцитов из циркулирующей крови в очаг вос-

паления, что позволило бы приблизиться к возможности ограничения развития воспалительной реакции на самых ранних этапах.

УЧАСТИЕ α -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ В МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Адренергические рецепторы экспрессируются на поверхности лейкоцитов, но их роль в регуляции воспаления все еще недостаточно изучена. В обстоятельном обзоре A. Scanzano, M. Cosentino [1] обобщены знания об адренергической модуляции иммунного ответа. В частности, констатируется, что на поверхности лейкоцитов имеются адренорецепторы, которые связываются с норадреналином и адреналином; катехоламины ингибируют миграцию нейтрофилов человека, стимулируют экспрессию молекул CD11b/CD18 и окислительный метаболизм; однако взаимодействие α - и β -адренорецепторов в этих процессах остается неизученным; экспрессия β_2 -адренорецепторов моноцитов ограничивает воспаление.

Существуют многочисленные доказательства критической роли адренергических механизмов в регуляции воспаления.

Во-первых, симпатическая нервная система регулирует выработку провоспалительных миелоидных клеток из гемопоэтических клеток-предшественников [2]. Количество миелоидных клеток у пациентов с сахарным диабетом сильно коррелирует с концентрацией норадреналина в плазме, что свидетельствует о роли активации вегетативных симпатических нейронов в продукции миелоидных клеток. Предшественники гранулоцитарных лейкоцитов экспрессировали β_2 -адренергический рецептор. Данное исследование показывает, что катехоламины способствуют пролиферации клеток-предшественников миелоидного ряда.

Во-вторых, имеются данные [3], согласно которым провоспалительные медиаторы могут влиять на экспрессию адренергических рецепторов лейкоцитов; в свою очередь, лейкоциты способны самостоятельно синтезировать катехоламины при развитии воспаления. Повышенная экспрессия тирозингидроксилазы и дофамин-бета-гидроксилазы – 2 ферментов, ограничивающих скорость синтеза катехоламинов, обнаружена в мононуклеарных клетках, инфильтрирующих слизистую оболочку ободочной кишки при моделировании острого воспаления, что свидетельствует о синтезе катехоламинов в процессе развития острой воспалительной реакции [4]. Антагонист α_2 -адренорецепторов (rx821002) подавлял выработку провоспалительных цитокинов мононуклеарами. Приведенные данные отражают критическую роль катехоламинов в стимуляции α_2 -адренорецепторов при развитии острого воспаления и позволяют предположить, что использование антагонистов этих рецепторов представляет собой новый подход к лечению колита.

В-третьих, J. da Silva Rossato и соавт. [5] приводят доказательства того, что стимуляция α - и β -адренорецепторов сопровождается увеличением фагоцитарной способности макрофагов, экспрессией индуцибельной синтазы оксида азота (iNOS₂) и повышением продукции NO; в основе данных процессов, вероятно, лежит активация ядерного фактора каппа В (NF- κ B). R. Sud и соавт. [6] предлагают рассматривать α_2 -адренорецепторы макрофагов как триггер воспалительной реакции, поскольку их лиганды индуцируют продукцию фактора некроза опухоли- α (ФНО α).

Адренергическая система клеток крови обеспечивает регуляцию адгезии при рекрутировании лейкоцитов из сосудистого русла. Так, адреналин значительно усиливал экспрессию P-селектина и гликопротеина IIb/IIIa на тромбоцитах [7]. Агонист не влиял на экспрессию молекул CD11b и L-селектина нестимулированных нейтрофилов, но отменял эти эффекты при стимуляции лейкоцитов N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином (fMLP). β -Адренергическая блокада усиливала взаимодействие тромбоцитов и нейтрофилов. Это показывает, что опосредованное α -адренорецепторами увеличение экспрессии молекул адгезии на тромбоцитах может вносить существенный вклад в активацию лейкоцитов путем формирования тромбоцитарно-лейкоцитарных агрегатов.

Что касается лейкоцитов, то их адгезия к эндотелию и последующая миграция зависят от активации интегринов, связанной с передачей сигналов «inside-outside». Интегринзависимая адгезия контролируется конформационным состоянием молекулы, т.е. изменением сродства к лиганду, которое регулируется 7 трансмембранными белками, связывающими рецепторы гуанинового нуклеотида (GPCR). При этом $\alpha_4\beta_1$ -интегрин (CD49d / CD29, Very Late Antigen-4 – VLA-4) экспрессируется на лейкоцитах и гемопоэтических стволовых клетках. Установлено, что аффинность VLA-4 может быстро повышаться вследствие передачи сигналов с α_2 -адренорецепторов через Gai-белок; рецепторы, связанные с Gas, могут модулировать аффинное состояние VLA-4 через цАМФ-зависимый путь [8]. В частности, циклический аденозинмонофосфат (цАМФ), действуя через протеинкиназу A, ингибирует вызванную хемоаттрактантом интегрин-зависимую адгезию лейкоцитов, а также предотвращает обмен гуаниновых нуклеотидов с RhoA, небольшим ГТФ-связывающим белком подсемейства Rho, который активируется хемоаттрактантами [9]. Эти данные позволяют предположить, что индуцированное цАМФ ингибирование активации Rho может быть причиной антиадгезивного действия цАМФ и может способствовать противовоспалительной активности лекарств, повышающих уровень цАМФ.

Осталось невыясненным, могут ли адренорецепторы модулировать трансэндотелиальную миграцию

лейкоцитов при реализации воспаления. В этом контексте представляются важными результаты исследования [10]. У мышей на разных моделях воспаления при введении агонистов α_2 -адренорецепторов (ксилазина или UK14304) наблюдалось значительное снижение миграции нейтрофилов; α_2 -адренергический антагонист (rx821002) отменял этот эффект. Эксперименты с эндотелиальными клетками (монослой HUVEC) показали, что UK14304 предотвращал активацию ICAM-1 и уменьшал макромолекулярный транспорт через монослой клеток. В посткапиллярных венулах предварительная обработка эндотелиальных клеток α_2 -агонистами снижала трансэндотелиальную миграцию нейтрофилов. Интересно, что α_2 -агонисты предотвращали опосредованное ФНО α снижение экспрессии адгезивных молекул (VE-кадгерина, β -катенина и плакоглобина) и опосредованное ICAM-1 фосфорилирование VE-кадгерина. Эти данные свидетельствуют о том, что α_2 -адренорецепторы запускают сигналы на эндотелиальных клетках, которые защищают целостность межклеточных контактов во время воспалительного ответа.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ β -АДРЕНОРЕЦЕПТОРОВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ РЕАЛИЗАЦИИ ВОСПАЛЕНИЯ

β -Адренорецепторы рассматриваются в качестве многообещающей таргетной мишени противовоспалительной терапии. Известно, что симпатическая нервная система регулирует функцию иммунной системы через β -адренорецепторы, однако их роль в регуляции реакции лейкоцитов при остром воспалении недостаточно известна. L. Grisanti и соавт. [11] выяснили, что у мышей с отсутствием β_2 -адренорецепторов отмечены высокая смертность после моделирования инфаркта миокарда вследствие нарушения миграции лейкоцитов и усиление их депонирования в селезенке. Исследованиями *in vitro* установлено, что экспрессия молекулы VCAM (vascular cell adhesion molecule-1) в макрофагах человека и мышей зависела от активности β_2 -адренорецептора. Таким образом, экспрессированный в лейкоцитах β_2 -адренорецептор играет важную роль в регуляции развития острой воспалительной реакции. Функциональная активность β_2 -адренорецепторов мононуклеарных клеток снижается у пациентов с хроническими воспалительными заболеваниями [12]. Связывание катехоламинов с β -адренергическими рецепторами на лейкоцитах человека ингибирует клеточные ответы, стимулируемые хемоаттрактантами лигандами [13]. В связи с этим количественная оценка плотности β -адренорецепторов [14] может быть клинически перспективной с точки зрения оценки тяжести заболевания и выявления пациентов, у которых терапия β -адреноблокаторами способна давать наибольший эффект. β_2 -Адренергические рецепторы кодируются в хромосоме 5q32-34, относятся к группе G-белок-ассоциированных рецепторов

с 7 трансмембранными доменами; при связывании агониста с рецептором активируется аденилатциклаза [12].

Лейкоциты человека часто используются в качестве модельной системы для изучения состояния β -адренорецепторов. Экспрессия β -адренорецепторов была значительно выше в гранулоцитах, чем в мононуклеарных клетках [14]. В интактных мононуклеарных лейкоцитах или мембранных препаратах обнаружено порядка 1000–3000 β_2 -адренергических рецепторов с константой сродства антагониста (K_d) в диапазоне 25 пМ [15]. Введение в организм агониста β -адренорецепторов приводит к увеличению числа мононуклеаров, экспрессирующих адренорецепторы, а инфузия адреналина вызывает избирательное повышение количества циркулирующих лимфоцитов CD56⁺ или CD57⁺, которые богаты β -адренорецепторами. Результаты исследований показывают, что вызванные адреналином изменения β -адренорецепторов и перераспределение форм лейкоцитов могут быть связаны между собой. Вероятно, β -адренергические рецепторы способны вызывать селективную мобилизацию клеток при реализации воспалительной реакции.

Агонисты β_2 -адренорецепторов могут ингибировать воспалительные и иммуноэффекторные функции клеток; возможно, они влияют на защитные механизмы организма. В связи с этим необходимо ответить на вопрос: *может ли агонист β_2 -адренорецепторов модифицировать рекрутирование нейтрофилов крови человека и их антимикробную активность?* Ранние исследования M. Silvestri и соавт. [16] показали, что агонисты β_2 -адренорецепторов способны частично снижать рекрутирование нейтрофилов, не влияя на процессы, связанные с фагоцитарной активностью в отношении бактерий. Сходной точки зрения придерживаются M. Wahle и соавт. [17], поскольку инкубация нейтрофилов с адреналином не сопровождалась изменением секреции интерлейкина (ИЛ)-8, а экспрессия молекул адгезии (CD15 и CD44) спонтанно снижалась.

Последующие исследования во многом изменили эти представления:

- Доказана критическая роль β -аррестин2/AP-1-зависимой передачи сигналов β -адренорецепторов в регуляции экспрессии хемокина CCR2 и рекрутировании лейкоцитов в острой фазе воспаления [11]. Стимуляция β -адренорецептора увеличивала экспрессию молекул CCR2 и миграционную чувствительность лейкоцитов к хемокину CCL2. Оказалось, что передача сигналов с β -адренорецепторов на β -аррестин-2 была необходима для регуляции экспрессии CCR2. Кроме того, показано, что белок-AP-1 (activator protein-1) играет важную роль в обеспечении экспрессии CCR2 в ответ на стимуляцию β -адренорецептора в моноцитах человека и мышей.

- В нейтрофилах активация β_2 -адренорецептора ингибирует воспалительную реакцию. Оказалось, что агонисты β_2 -адренорецептора эффективны в подавлении индуцированной продукции супероксидного аниона O_2^- [18]. Отсутствуют доказательства участия протеинкиназы A в подавлении индуцированной fMLP продукции O_2^- нейтрофилами после стимуляции β_2 -адренорецептора. Это позволяет предположить, что β_2 -адренорецепторы ингибируют продукцию O_2^- независимым от цАМФ способом, что укладывается в концепцию конформаций лиганд-специфических рецепторов (функциональной селективности или смещенной передачи сигналов). Недавно установлено, что функции нейтрофилов в основном модулируются β_2 -адренорецепторами [19].
- Исследования М. Hinchado и соавт. [20] показали, что α - и β -адренорецепторы необходимы для стимуляции всех стадий фагоцитарного процесса, запускаемого внеклеточным белком теплового шока 72 кДа (eHsp72). Кроме того, eHsp72 увеличивал внутриклеточные уровни цАМФ, т.е. он является «внутриклеточным сигналом опасности» во время вызванной стрессом активации нейтрофилов, опосредованной белками теплового шока.

ЭКСПРЕССИЯ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ P2X-РЕЦЕПТОРОВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ

Внеклеточные нуклеотиды признаны важными медиаторами активации лейкоцитов, инициирующими множественные ответы через P2X-ионотропные рецепторы и метаботропные G-белок-связанные P2Y-рецепторы [21]. Рецепторы P2X экспрессируются во многих тканях, где они участвуют в ряде функций, включая синаптическую передачу, сокращение мышц, агрегацию тромбоцитов, воспаление, активацию макрофагов, дифференцировку и пролиферацию, невропатическую боль. При этом P2X₄-рецептор является одним из наиболее чувствительных пуринергических рецепторов, который активируется при наномолярных концентрациях аденозинтрифосфата (АТФ), т.е. является примерно в 1000 раз более хемосенситивным, чем P2X₇-рецептор.

Моноциты и макрофаги экспрессируют разнообразные р₂-рецепторы на клеточной поверхности для 5'-АТФ, который способен повысить уровень цитоплазматического Ca²⁺ [22]. Подтверждена экспрессия рецепторов P2X₁, P2X₄, P2X₅ и P2X₇ на моноцитах и макрофагах человека. АТФ вызывал дозозависимое увеличение концентрации Ca²⁺; введение ингибитора Ca²⁺-АТФазы сопровождалось ослаблением эффекта АТФ. Этим подтверждается, что активация рецептора P2X₄ моноцитов-макрофагов сопровождается ионотропным кальциевым ответом. Недавно было показано, что в дополнение к экспрессии на плазматической мембране

P2X₄-рецепторы локализуются также внутриклеточно в лизосомах, где они защищены от протеолиза гликозированием [23]. Долгое время оставалось невыясненным, как активируются и регулируются лизосомальные P2X₄-рецепторы. Оказалось, что они активируются внутрилизосомным АТФ только в полностью диссоциированной тетраанионной форме, когда pH увеличивается до 7,4 [21]. Таким образом, после слияния поздних эндосом и лизосом P2X₄-рецептор может функционировать как Ca²⁺-канал.

В настоящее время АТФ рассматривается как паттерн-молекула, связанная с повреждением клетки (damage-associated molecule pattern – DAMP) [24]. Обнаружение лейкоцитами экзогенного освобожденного АТФ инициирует воспаление и заживление раны. Лейкоциты могут самостоятельно секретировать АТФ и тем самым регулировать гомеостаз и координировать ответы на внешние провоспалительные сигналы. Хотя был достигнут некоторый прогресс в выяснении механизмов высвобождения АТФ из некоторых типов клеток млекопитающих, для лейкоцитов высвобождающие каналы и механизмы передачи сигнала остаются малоизученными. Выяснение конкретных механизмов выведения АТФ из лейкоцитов позволит прогнозировать их противовоспалительный потенциал. Данное утверждение связано с тем, что АТФ высвобождается вместе с β -никотинамидадениндинуклеотидом, который может контролировать высвобождение ИЛ1 β [25].

РОЛЬ ПУРИНЕРГИЧЕСКИХ P2Y-РЕЦЕПТОРОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВОСПАЛЕНИЯ

Рецепторы P2Y представляют собой молекулы, связанные с G-белком (GPCR), которые активируются адениновыми и уридиновыми нуклеотидами и нуклеотидными сахарами. Существует 8 подтипов P2Y-рецепторов (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ и P2Y₁₄), которые активируют каскады внутриклеточных сигналов для регуляции различных клеточных процессов, включая пролиферацию, дифференцировку, фагоцитоз, секрецию, ноцицепцию, адгезию и миграцию клеток [26]. Эти сигнальные каскады работают главным образом благодаря последовательной активации или дезактивации гетеротримерных и мономерных G-белков, фосфолипаз, аденилат- и гуанилилциклаз, протеинкиназ и фосфодиэстераз. Кроме того, существует множество ионных каналов, молекул клеточной адгезии и рецепторных тирозинкиназ, которые модулируются P2Y-рецепторами и обеспечивают трансформацию сигнала во внутриклеточный ответ. Рецепторы P2Y преимущественно активируются мононуклеотидами, которые высвобождаются из нервных окончаний или тканей в ответ на физический стресс, а также при повреждении клеток, хотя недавние исследования подтвердили наличие лиганд-независимой функции P2Y-рецепторов через

рецептор-рецепторные взаимодействия (олигомеризацию) [27].

Рецепторы P2Y играют важную роль в АТФ-индуцированной агрегации тромбоцитов [28]. Появляется все больше данных о важной функции P2Y-рецепторов в дифференцировке и созревании иммунных клеток, миграции и апоптозе клеток [29]. Проточная цитометрия позволила установить, что мононуклеарные и полиморфноядерные клетки экспрессируют рецепторы P2Y-1, 2, 4, 6, 11, 14. Вероятно, в лейкоцитах низкие концентрации АТФ индуцируют высвобождение нуклеотидов посредством активации рецепторов P2Y-2, 4, 6, 11, а в более высоких концентрациях – через рецепторы P2X [30]. Таким образом, АТФ-индуцированное высвобождение нуклеотидов представляет собой потенциальный механизм, ведущий к усилению пуринергической сигнализации. Представляет интерес пуриновый рецептор P2Y₁₄, который экспрессируется на высоком уровне в нейтрофилах человека [31]. УДФ-глюкоза вызывала значительное ингибирование (около 30%) стимулированного накопления цАМФ, что свидетельствует о связи рецептора с активностью аденилатциклазы [32].

В моноцитах активация P2Y связана с повышением уровня внутриклеточного Ca²⁺ [33]. Макрофаги являются основным источником хемокина макрофагов-2 (MIP-2) и хемокина – производного кератиноцитов, которые играют основную роль в миграции нейтрофилов в зону воспаления. Хотя внеклеточный АТФ из тканей, вовлеченных в воспаление, индуцирует несколько иммунных ответов в макрофагах, неясно, влияют ли АТФ-стимулированные макрофаги на миграцию нейтрофилов. R. Amison и соавт. [34] исследовали роль АТФ-индуцированной продукции MIP-2 макрофагами. В эксперименте *in vitro* было подтверждено, что АТФ индуцирует продукцию MIP-2 в макрофагах благодаря взаимодействию с рецепторами P2X₇ и P2Y₂. Индуцированная АТФ продукция MIP-2 ингибировалась обработкой антиоксидантом N-ацетил-1-цистеином, а также при блокаде ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase) или p38MAPK (mitogen-activated protein kinase). Это позволяет предположить, что АТФ активирует сигнальные пути макрофагов, связанные с продукцией активных форм кислорода и MIP-2, который регулирует миграцию нейтрофилов.

Как известно, хемокины и АТФ являются ключевыми медиаторами в зоне воспаления, которые могут попадать в системное кровообращение при нарушении гистогематического барьера. Основная функция хемокинов – мобилизация лейкоцитов, тогда как АТФ запускает воспаление. Оказалось, что ССЛ-хемокины ингибируют АТФ-индуцированное высвобождение ИЛ1β из моноцитов посредством сигнальной системы, включающей активацию ССР-1 и iFLA2, а также высвобождение небольших медиаторов и конформацию

α₇- и α₉-субъединиц никотинового рецептора ацетилхолина [35]. Вероятно, всякий раз, когда хемокины и АТФ попадают в циркуляцию одновременно, системное высвобождение ИЛ1β ограничивается.

Рекрутирование воспалительных клеток к участкам повреждения тканей и (или) инфекции контролируется множеством сигнальных процессов, влияющих на межклеточные взаимодействия между эндотелиальными клетками сосудов в посткапиллярных венах и циркулирующими лейкоцитами. В последние годы обсуждается участие P2Y-пуринергических рецепторов в активации эндотелиальных клеток при воспалении. Однако механизмы регуляции высвобождения АТФ из эндотелия остаются неясными. E. Liverani и соавт. [36] представили данные, что АТФ-пропускающий канал паннексин-1 (pannexin-1) открывается посредством ФНОα. Этот процесс включает в себя активацию рецепторов ФНО 1-го типа, стимуляцию киназ семейства Src (SFK) и SFK-зависимое фосфорилирование паннексина-1. Таким образом, во время острого системного воспаления эндотелиальные клетки секретируют АТФ и могут таким образом стимулировать адгезию и миграцию лейкоцитов через венозную стенку.

Рецептор эндотелия P2Y₁ индуцирует активацию эндотелиальных клеток, сопровождающуюся адгезией лейкоцитов [37]. Этот факт подтверждается данными исследования [38], авторы которого показали, что агонист P2Y₁-рецепторов (2MeSATP) увеличивал адгезию лейкоцитов к эндотелиальным клеткам и продукцию ФНОα *in vitro*. Представленные данные подтверждают возможность модуляции эндотелия посредством пуринергического рецептора P2Y₁. В связи с этим P2Y₁-рецептор может использоваться в качестве потенциальной мишени для контроля хронического воспаления.

Эндотелиальные клетки сосудов экспрессируют также рецепторы P2Y₆ [39]. Продемонстрирована селективная индукция рецептора P2Y₆ (более чем в 4 раза за 24 ч), а также зависящая от времени и дозы индукция P2Y₆ *in vitro* и *in vivo* при стимуляции этих клеток во время воспаления. При использовании антагониста (MRS 2578) пуриновых P2Y₆-рецепторов эндотелиальных клеток человека *in vitro* обнаружено снижение активности NF-κB и экспрессии провоспалительных генов. Эти исследования демонстрируют важный вклад сигналов с P2Y₆-рецепторов эндотелиальных клеток в усиление воспаления, а также обосновывают перспективность воздействия на эти рецепторы как на терапевтическую мишень при системной воспалительной реакции.

РОЛЬ ПУРИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ ТРОМБОЦИТОВ В РЕКРУТИРОВАНИИ ЛЕЙКОЦИТОВ ИЗ СОСУДИСТОГО РУСЛА

Тромбоциты модулируют как гемостаз, так и иммунные ответы при взаимодействии с лейкоцитами по-

средством секреции биологически активных веществ и установления межклеточных контактов. В контексте развития воспалительной реакции важно знать механизмы активации тромбоцитов; в частности, остается невыясненным, отличается ли вовлечение пуринов в стимуляцию тромбоцитов при развитии воспаления от таковой в процессе тромбогенеза. Впервые авторы работы [40] выяснили, что при индукции воспалительной реакции стимуляция $P2Y_1$ -рецептора тромбоцитов приводила к повышению активности Rho-ассоциированной киназы (RhoA) и, следовательно, стимуляция $P2Y_1$ -рецептора необходима для инициации хемотаксиса лейкоцитов *in vitro*. Таким образом, передача сигналов с RhoA-киназы после активации $P2Y_1$ -рецепторов определяет дихотомию активации тромбоцитов во время воспаления и тромбогенеза.

Представляет интерес, какие из пуриновых рецепторов тромбоцитов ($P2Y_1$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{14}$ и $P2X_1$) ответственны за рекрутирование лейкоцитов и хемотаксис, что в перспективе позволит разработать таргетное лечение воспаления на ранних стадиях. Установлено, что рекрутирование нейтрофилов, индуцированное липополисахаридами, ингибируется у мышей, которым вводили антагонисты $P2Y_1$ - или $P2Y_{14}$ -рецепторов [41]. Время кровотечения значительно увеличивалось у мышей, которым вводили антагонисты $P2Y_{11}$ -, $P2Y_{12}$ - или $P2X_1$ -рецепторов; при этом агрегация тромбоцитов в ответ на аденозиндифосфат (АДФ) значительно снижалась. Эти гемостатические реакции остались неизменными в случае применения антагониста $P2Y_{14}$ -рецептора. анализ хемотаксиса *in vitro* выявил прямой антагонизм $P2Y_1$ -рецепторов тромбоцитов в отношении подвижности нейтрофилов при действии хемокинов, продуцируемых макрофагами (MDC, CCL22). Стимуляция тромбоцитов селективными агонистами $P2Y_{14}$ (УДФ-глюкоза, MRS2690) усиливала хемотаксис нейтрофилов. Это подтверждает роль активации $P2Y_{11}$ - и $P2Y_{14}$ -рецепторов тромбоцитов в развитии воспалительной реакции.

Н. Satonaka и соавт. [42] исследовали участие другого пуринового рецептора – $P2Y_{12}$ – в миграции нейтрофилов при воспалении легких. Полученные данные свидетельствуют о том, что у мышей, предварительно получавших антагонист $P2Y_{12}$ -рецептора (клопидогрел), отмечались уменьшение количества циркулирующих лейкоцитов, снижение функциональной активности тромбоцитов и их взаимодействия с лейкоцитами, следствием чего было ограничение повреждения тканей в зоне воспаления. Аналогичные результаты наблюдались у мышей, лишенных $P2Y_{12}$ -рецепторов: активация тромбоцитов и количество агрегатов тромбоцитов с лейкоцитами было низким. Указанные эффекты не наблюдались у мышей, лишенных $P2Y_1$ -рецепторов; это позволяет заключить, что именно рецептор $P2Y_{12}$ ответственен за описанные эффекты.

Сигнальные каскады, участвующие в различных $P2Y_1$ -зависимых активациях тромбоцитов при воспалении, не выяснены. Установлено, что ингибирование фосфолипазы С (U73122) подавляло агрегацию тромбоцитов, индуцированную АДФ и агонистом $P2Y_1$ (MRS2365) [43]. Напротив, индуцированный тромбоцитами хемотаксис нейтрофилов человека значительно ослаблялся ингибиторами Rac1 или RhoA, причем агонист $P2Y_1$ -рецептора оказывал меньшее действие, чем АДФ, на индуцированную агрегацию тромбоцитов, но вызывал сходную эффективность стимуляции хемотаксиса нейтрофилов, что может объясняться различиями в молекулярном взаимодействии 2 указанных агонистов. Таким образом, активация рецептора тромбоцитов $P2Y_1$ во время воспаления осуществляется через альтернативные пути с участием Rho-ГТФазы в отличие от канонической передачи сигналов через фосфолипазу С. Это может быть объяснено селективными молекулярными взаимодействиями разных лигандов в ортостерическом сайте рецептора $P2Y_1$.

АНТИАГРЕГАНТНАЯ ТЕРАПИЯ И МОДУЛЯЦИЯ ВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ РЕАКЦИИ

Антиагрегантные препараты в последние годы стали рассматриваться как возможные многообещающие средства для профилактики воспаления. Данный подход базируется на концепции, согласно которой $P2Y_{12}$ -рецепторы гладкомышечных клеток (ГМК) стенки сосудов участвуют в сигнализации, контролирующей продукцию моноцитарного хемоаттрактантного белка-1 (MCP-1), обеспечивающего адгезию моноцитов к эндотелию. Т. Cardoso и соавт. [44] показали, что АДФ индуцировал значительный синтез мРНК хемоаттрактанта в культивируемых ГМК стенках артерий; эффект снижался при блокаде $P2Y_{12}$ -рецептора (антагонист R-138727) и ингибировании JNK (с-Jun NH2-терминальной киназы). Консенсусные сайты ядерного фактора NF-κB в промоторной области MCP-1 были вовлечены в эту активацию. «Ловушки» активных форм кислорода также снижали активацию MCP-1 и JNK, индуцированную АДФ. Эти данные свидетельствуют о том, что АДФ через $P2Y_{12}$ -рецептор гладких миоцитов индуцирует воспалительные изменения, связанные с продукцией MCP-1 и последующей адгезией моноцитов к эндотелию.

В связи с этим представляется логичным интерес к перорально назначаемым антиагрегантам класса тиенопиридина, которые после метаболизма в печени могут ингибировать функцию тромбоцитов путем необратимого блокирования $P2Y_{12}$ -рецептора. Вероятно, тиенопиридины влияют на воспалительные процессы, но их воздействие на лейкоциты не получило должного отражения в литературе, несмотря на важную роль этих клеток в воспалении. Представляет интерес публикация [45], подтверждающая, что

смесь метаболитов прасугрела, полученная *in vitro* с использованием микросом печени крысы, значительно ингибировала активацию нейтрофилов. В частности, метаболиты прасугрела ингибировали миграцию нейтрофилов, поверхностную экспрессию молекул CD16 и образование тромбоцитарно-нейтрофильных агрегатов. Предварительная обработка метаболитом прасугрела значительно снижала индуцируемое фосфорилирование киназы, регулируемой внеклеточным сигналом (ERK), а также мобилизацию ионов Ca^{2+} . Чтобы определить мишень прасугрела в нейтрофилах, роль обоих рецепторов — P2Y₁₂ и P2Y₁₃ — была изучена с использованием специфических обратимых антагонистов, соответственно AR-C6931MX и MRS2211. Ни один из антагонистов не оказывал прямого влияния на функциональные ответы, вызванные агонистами нейтрофилов. Вероятно, метаболиты прасугрела могут непосредственно воздействовать на нейтрофилы и ингибировать их активацию, подтверждая возможное объяснение противовоспалительных эффектов. Однако эти метаболиты не действуют на нейтрофилы через рецептор P2Y₁₂ или P2Y₁₃.

Приведенные данные позволяют выделить несколько перспективных направлений разработки таргетного лечения пациентов с острыми и хроническими воспалительными заболеваниями, направленного на модуляцию функциональной активности клеток крови. В этом контексте представляют интерес подтипы α - и β -адренорецепторов, а также пуриновые P2X-рецепторы (P2X₁, P2X₄, P2X₅ и P2X₇) и рецепторы P2Y (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ и P2Y₁₄), которые участвуют в регуляции фагоцитоза, секреции цитокинов, адгезии и миграции лейкоцитов.

* * *

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/Reference

- Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: a review // *Front Pharmacol.* – 2015; 6: 171. DOI: 10.3389/fphar.2015.00171.
- Vasamsetti S., Florentin J., Coppin E. et al. Sympathetic Neuronal Activation Triggers Myeloid Progenitor Proliferation and Differentiation // *Immunity.* – 2018; 49 (1): 93–106.e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2018.05.004.
- Kalkoff M., Chan-Dominy A., Sleigh J. et al. Alpha1-adrenergic receptor mRNA and inflammatory mediator expression in circulating leucocytes after cardiac surgery // *Anaesth Intensive Care.* – 2008; 36 (4): 535–43. DOI: 10.1177/0310057X0803600406.
- Bai A., Lu N., Guo Y. et al. Modulation of inflammatory response via alpha2-adrenoceptor blockade in acute murine colitis // *Clin Exp Immunol.* – 2009; 156 (2): 353–62. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03894.x.
- da Silva Rossato J., Krause M., Fernandes A. et al. Role of alpha- and beta-adrenoreceptors in rat monocyte/macrophage function at rest and acute exercise // *J. Physiol. Biochem.* – 2014; 70 (2): 363–74. DOI: 10.1007/s13105-013-0310-3.
- Sud R., Spengler R., Nader N. et al. Antinociception occurs with a reversal in alpha 2-adrenoceptor regulation of TNF production by peripheral monocytes/macrophages from pro- to anti-inflammatory // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008; 588 (2–3): 217–31. DOI: 10.1016/j.ejphar.2008.04.043.
- Horn N., Anastase D., Hecker K. et al. Epinephrine enhances platelet-neutrophil adhesion in whole blood *in vitro* // *Anesth. Analg.* – 2005; 100 (2): 520–6. DOI: 10.1213/01.ANE.0000141527.60441.B7.
- Chigaev A., Waller A., Amit O. et al. Galphas-coupled receptor signaling actively down-regulates alpha4beta1-integrin affinity: a possible mechanism for cell de-adhesion // *BMC Immunol.* – 2008; 9: 26. DOI: 10.1186/1471-2172-9-26.
- Laudanna C., Campbell J., Butcher E. Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants // *J. Biol. Chem.* – 1997; 272 (39): 24141–4.
- Herrera-Garcia A., Dominguez-Luis M., Arce-Franco M. et al. Prevention of neutrophil extravasation by β 2-adrenoceptor-mediated endothelial stabilization // *J. Immunol.* – 2014; 193 (6): 3023–35. DOI: 10.4049/jimmunol.1400255.
- Grisanti L., Gumpert A., Traynham C. et al. Leukocyte-expressed β 2-adrenergic receptors are essential for survival after acute myocardial injury // *Circulation.* – 2016; 134 (2): 153–67. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022304.
- Roca R., Esteban P., Zapater P. β 2 adrenergic receptor functionality and genotype in two different models of chronic inflammatory disease: Liver cirrhosis and osteoarthritis // *Mol. Med. Rep.* – 2018; 17 (6): 7987–95. DOI: 10.3892/mmr.2018.8820.
- Mueller H., Motulsky H., Sklar L. The potency and kinetics of the β -adrenergic receptors on human neutrophils // *Mol. Pharmacol.* – 1988; 34 (3): 347–53.
- Saygin D., Wanner N., Rose J. et al. Relative quantification of beta-adrenergic receptor in peripheral blood cells using flow cytometry // *Cytometry A.* – 2018; 93 (5): 563–70. DOI: 10.1002/cyto.a.23358.
- Landmann R. Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations // *Eur. J. Clin. Invest.* – 1992; 22 (1): 30–6.
- Silvestri M., Oddera S., Lantero S. et al. beta 2-agonist-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is not associated with modification of LFA-1 and Mac-1 expression or with impairment of polymorphonuclear leukocyte antibacterial activity // *Respir. Med.* – 1999; 93 (6): 416–23.
- Wahle M., Greulich T., Baerwald C. et al. Influence of catecholamines on cytokine production and expression of adhesion molecules of human neutrophils *in vitro* // *Immunobiology.* – 2005; 210 (1): 43–52. DOI: 10.1016/j.imbio.2005.02.004
- Brunskole H., Reinartz M., Käbble S. Dissociations in the effects of β 2-adrenergic receptor agonists on cAMP formation and superoxide production in human neutrophils: support for the concept of functional selectivity // *PLoS One.* – 2013; 8 (5): e64556. DOI: 10.1371/journal.pone.0064556.
- Marino F., Scanzano A., Pulze L. β 2-Adrenoceptors inhibit neutrophil extracellular traps in human polymorphonuclear leukocytes // *J. Leukoc. Biol.* – 2018; 104 (3): 603–14. DOI: 10.1002/JLB.3A1017-398RR.
- Hinchado M., Giraldo E., Ortega E. Adrenoreceptors are involved in the stimulation of neutrophils by exercise-induced circulating concentrations of Hsp72: cAMP as a potential «intracellular danger signal» // *J. Cell Physiol.* – 2012; 227 (2): 604–8. DOI: 10.1002/jcp.22759.
- Suurväli J., Boudinot P., Kanellopoulos J. et al. P2X4: A fast and sensitive purinergic receptor // *Biomed. J.* – 2017; 40 (5): 245–56. DOI: 10.1016/j.bj.2017.06.010.
- Layhadi J., Fountain S. P2X4 receptor-dependent Ca²⁺ influx in model human monocytes and macrophages // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017; 18 (11): E2261. DOI: 10.3390/ijms18112261.
- Huang P., Zou Y., Zhong X. et al. P2X4 forms functional ATP-activated cation channels on lysosomal membranes regulated by luminal pH // *J. Biol. Chem.* – 2014; 289 (25): 17658–67. DOI: 10.1074/jbc.M114.552158.
- Campwala H., Fountain S. Constitutive and agonist stimulated ATP secretion in leukocytes // *Commun. Integr. Biol.* – 2013; 6 (3): e23631. DOI: 10.4161/cib.23631.
- Hiller S., Heldmann S., Richter K. et al. β -Nicotinamide adenine dinucleotide (β -nad) inhibits atp-dependent il-1 β release from human monocytic cells // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018; 19 (4): E1126. DOI: 10.3390/ijms19041126.
- Erb L., Weisman G. Coupling of P2Y receptors to G proteins and other signaling pathways // *Wiley Interdiscip. Rev. Membr. Transp. Signal.* – 2012; 1 (6): 789–803. DOI: 10.1002/wmts.62.
- von Kugelgen I., Hoffmann K. Pharmacology and structure of P2Y receptors // *Neuropharmacology.* – 2016; 104: 50–61. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.030.
- Le Duc D., Schulz A., Lede V. et al. P2Y Receptors in Immune Response and Inflammation // *Adv. Immunol.* – 2017; 136: 85–121. DOI: 10.1016/bs.ai.2017.05.006.
- De Ita M., Vargas M., Carbajal V. et al. ATP releases ATP or other nucleotides from human peripheral blood leukocytes through purinergic P2 receptors // *Life Sci.* – 2016; 145: 85–92. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.12.013.

30. Oliveira S., Oliveira N., Meyer-Fernandes J. et al. Increased expression of NTPDases 2 and 3 in mesenteric endothelial cells during schistosomiasis favors leukocyte adhesion through P2Y1 receptors // *Vascul. Pharmacol.* – 2016; 82: 66–72. DOI: 10.1016/j.vph.2016.02.005.
31. Riegel A., Faigle M., Zug S. et al. Selective induction of endothelial P2Y6 nucleotide receptor promotes vascular inflammation // *Blood.* – 2011; 117 (8): 2548–55. DOI: 10.1182/blood-2010-10-313957.
32. Nishimura A., Sunggip C., Oda S. Purinergic P2Y receptors: Molecular diversity and implications for treatment of cardiovascular diseases // *Pharmacol. Ther.* – 2017; 180: 113–28. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2017.06.010.
33. Amison R., Momi S., Morris A. et al. RhoA signaling through platelet P2Y receptor controls leukocyte recruitment in allergic mice // *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2015; 135 (2): 528–38. DOI: 10.1016/j.jaci.2014.09.032.
34. Amison R., Arnold S., O'Shaughnessy B. et al. Lipopolysaccharide (LPS) induced pulmonary neutrophil recruitment and platelet activation is mediated via the P2Y1 and P2Y14 receptors in mice // *Pulm. Pharmacol. Ther.* – 2017; 45: 62–8. DOI: 10.1016/j.pupt.2017.05.005.
35. Amison R., Jamshidi S., Rahman K. et al. Diverse signaling of the platelet P2Y1 receptor leads to a dichotomy in platelet function // *Eur. J. Pharmacol.* – 2018; 827: 58–70. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.03.014.
36. Liverani E., Rico M., Tsygankov A. et al. P2Y12 receptor modulates sepsis-induced inflammation // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* – 2016; 36 (5): 961–71. DOI: 10.1161/ATVBAHA.116.307401.
37. Harden T., Sesma J., Fricks I. et al. Signalling and pharmacological properties of the P2Y receptor // *Acta Physiol. (Oxf).* – 2010; 199 (2): 149–60. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2010.02116.x.
38. Scrivens M., Dickenson J. Functional expression of the P2Y14 receptor in human neutrophils // *Eur. J. Pharmacol.* – 2006; 543 (1–3): 166–73. DOI: 10.1016/j.ejphar.2006.05.037.
39. Sivaramakrishnan V., Bidula S., Campwala H. et al. Constitutive lysosome exocytosis releases ATP and engages P2Y receptors in human monocytes // *J. Cell Sci.* – 2012; 125 (Pt 19): 4567–75. DOI: 10.1242/jcs.107318.
40. Kawamura H., Kawamura T., Kanda Y. et al. Extracellular ATP-stimulated macrophages produce macrophage inflammatory protein-2 which is important for neutrophil migration // *Immunology.* – 2012; 136 (4): 448–58. DOI: 10.1016/S1470-2045(18)30837-4.
41. Amati A., Zakrzewicz A., Siebers R. et al. Chemokines (CCL3, CCL4, and CCL5) inhibit ATP-induced release of IL-1 β by monocytic cells // *Mediators Inflamm.* – 2017; 2017: 1434872. DOI: 10.1155/2017/1434872.
42. Satonaka H., Nagata D., Takahashi M. et al. Involvement of P2Y12 receptor in vascular smooth muscle inflammatory changes via MCP-1 upregulation and monocyte adhesion // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* – 2015; 308 (8): H853–61. DOI: 10.1152/ajpheart.00862.2013.
43. Lohman A., Leskov I., Butcher J. et al. Pannexin 1 channels regulate leukocyte emigration through the venous endothelium during acute inflammation // *Nat. Commun.* – 2015; 6: 7965. DOI: 10.1038/ncomms8965.
44. Cardoso T., Pompeu T., Silva C. The P2Y1 receptor-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is inhibited by melatonin // *Purinergic. Signal.* – 2017; 13 (3): 331–8. DOI: 10.1007/s11302-017-9565-4.
45. Liverani E., Rico M., Garcia A. et al. Prasugrel metabolites inhibit neutrophil functions // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2013; 344 (1): 231–43. DOI: 10.1124/jpet.112.195883.

MOLECULAR MECHANISMS FOR REGULATION OF THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF BLOOD CELLS: IMPROVEMENT OF TARGETED ANTI-INFLAMMATORY THERAPY

Professor **V. Barinov**¹, MD; **Kh. Grigoryan**², Candidate of Medical Sciences; **T. Faber**¹; **V. Sokhina**¹; **A. Perenesenko**¹

¹M.Gorky Donetsk National Medical University, Ukraine

²Donetsk Regional Clinical Territorial Medical Association, Ukraine

The frequency of complications associated with the development of acute inflammation and recurrent chronic diseases necessitates the improvement of conventional methods for prevention and treatment. The promising area in the development of targeted therapy is the management of the mechanisms for leukocyte activation and recruitment from circulating blood into the focus of inflammation, which would bring us closer to the possibility of controlled development of the inflammatory response. The review provides much evidence for modulation of the functional activity of leukocytes and their transendothelial migration during stimulation of α - and β -adrenergic receptors. It discusses the practical significance of the leukocyte expression of purinergic P2 receptors. The review also presents the possible mechanisms for activation of monocytes and macrophages during stimulation of P2X receptors (P2X₁, P2X₄, P2X₅, and P2X₇), which makes it possible to predict their anti-inflammatory potential, as well as to control the development of inflammation in future. It analyzes the regulatory capabilities of the main subtypes of P2Y receptors (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, and P2Y₁₄), which are involved in the regulation of phagocytosis, the secretion of cytokines, and the adhesion and migration of leukocytes. The authors consider the role of platelets that express purine receptors (P2Y₁, P2Y₁₂, P2Y₁₄, and P2X₁) in the recruitment and chemotaxis of leukocytes in inflammation and provide evidence that there are prospects for the selective action on blood cell adrenergic and purinergic receptors as a therapeutic target in a systemic inflammatory response.

Key words: therapy, inflammation, leukocytes, platelets, α - and β -adrenergic receptors, purine P₂ receptors.

For citation: Barinov V., Grigoryan Kh., Faber T. et al. Molecular mechanisms for regulation of the functional activity of blood cells: improvement of targeted anti-inflammatory therapy // *Vrach.* – 2019; 30 (11): 15–22. <https://doi.org/10.29296/25877305-2019-11-03>