Հայաստանի Գիտությունների Ազգային Ակադեմիա
Национальная Академия Наук Армении
National Academy of Sciences of Armenia

Հայաստանի Կենսաբանական Հանդես
Биологический Журнал Армении
Biological Journal of Armenia

•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ •Экспериментальные и теоретические статьи• •Experimental and theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 2 (64), 2012

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭТИОПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ЭКСПРЕССИЮ АДА2

Е.Г. САРКИСОВА, Н.А. АНДРЕАСЯН, А.А. АРУТЮНЯН, Р.Л. АЙРАПЕТЯН

Институт биохимии им. Г.Х. Бунятяна НАН РА
biochem@ipia.sci.am

Исследована активность аденозиндезаминазы 2 (АДА2) в плазме крови человека после коревой вакцинации. Изучена способность изолированных клеток периферической крови человека и лабораторных животных продуцировать фермент. Показано, что при иммунном ответе на коревую вакцинацию уровень АДА2 в плазме крови человека возрастает. Динамика активации АДА2 коррелирует с известной динамикой уровня иммуноглобулинов после вакцинации. Моноциты крови человека вырабатывают АДА2. При стимуляции клеток культурой Salmonella *typhimurium* возрастает активность фермента. Наличие лимфоцитов в инкубационной смеси с моноцитами значительно усиливает этот эффект. В присутствии NO (нитрозативном стрессе) в клетках наблюдается возрастание активности АДА2, что позволяет предположить, что активные формы кислорода, наряду с аденозином, могут быть факторами, регулирующими активность АДА2 при патологии.

Аденозиндезаминаза 2 – клетки крови – клетки Купфера – активация фермента – окислительный стресс – NO

Հետազոտվել է ադենոզինդեզամինազ 2-ի (ԱԴԱ2) ակտիվությունը մարդու արյան պլազմայում կարմրուկի պատվաստումից հետո: Հետազոտվել է մարդու ծայրամասային արյան և լաբորատոր կենդանիների մեկուսացված բջիջների ֆերմենտ արտադրելու ունակությունը: Ցույց է տրվել, որ կարմրուկի պատվաստման իմունային պատասխանի դեպքում արյան պլազմայի ԱԴԱ2 ակտիվությունը աճում է: Ակտիվացման տեղաշարժը համապատասխանում է պատվաստումից հետո իմունոգլոբուլինների հայտնի փոփոխությունների ընթացքին: Մարդու արյան մոնոցիտները արտազատում են ԱԴԱ2: Salmonella *typhimurium*-ի կուլտուրայով այդ բջիջների խթանումը բերում է ֆերմենտի ակտիվության աճին: Ինկուբացիոն խառնուրդում մոնոցիտների հետ լիմֆոցիտների առկայությունը զգալիորեն ուժեղացնում է այդ աճը: NO-ի ներկայությամբ (նիտրոզատիվ ստրես) բջիջներում դիտվում է ԱԴԱ2 ակտիվության աճ, որը թույլ է տալիս եզրակացնել, որ թթվածնի ակտիվ ձևերը ադենոզինի հետ մեկտեղ կարող են հանդիսանալ ԱԴԱ2-ի ակտիվությունը կարգավորող գործոններ պաթոլոգիայի ժամանակ:

Ադենոզինդեզամինազ 2 – արյան բջջիջներ – Կուպֆերի բջջիջներ – ֆերմենտի ակտիվացում – օքսիդատիվ սթրես – NO

In present article presented the level of adenosine deaminase 2 activity (ADA2) in human plasma after measles vaccination was investigated. ADA2 production in vitro by isolated blood cells of humans and laboratory animals at stimulation by Salmonella *typhimurium* and oxidative stress was studied. It had been shown, that ADA2 activity was in-

creased at immune response to measles vaccination. The dynamics of ADA2 activity was correlated with the known pattern of immunoglobulin production at measles vaccination. Human blood monocytes produced ADA2. At stimulation with Salmonella *typhimurium* the increase in enzyme activity in cells was observed. The co-incubation of monocytes with lymphocytes significantly strengthens the effect. In the presence of nitric oxide (nitrosative stress) observed increase of ADA2 activity allowed proposing, that ROS as well as adenosine could regulate enzyme activity at pathology.

Adenosine deaminase 2 – blood cells – Kupffer cells – enzyme activation – oxidative stress – NO

Внеклеточный аденозин – важная регуляторная молекула, концентрация которой низкая в норме, может быстро возрасти при повреждении тканей, воспалении или гипоксии. В поврежденных тканях и при воспалительных процессах аденозин, являясь продуктом распада ATP, наряду с ним стимулирует пуринергические рецепторы. Выброс ATP и аденозина, их сигнальная деятельность и последующее истощение в среде – суть стадии острого воспалительного ответа, развивающегося воспаления и его подавления [5]. Регуляция воспалительного ответа аденозином и ATP в целом сложна, особенно в адаптивном иммунитете млекопитающих, в связи с чем возникает много вопросов о роли ATP и аденозина. Важным этапом этой регуляции является дезаминирование аденозина аденозиндезаминазой (АДА), ферментом, который превращает аденозин и дезоксиаденозин в инозин и дезоксиинозин соответственно. Известны два типа ферментов с АДА активностью: АДА1 и ADGF/АДА2 (или АДА-подобные белки), факторы роста с аденозиндезаминазной активностью, которые впервые были охарактеризованы у *Drosophila* [22]. Основная функция АДА1 заключается в выведении токсичных производных аденозина и дезоксиаденозина и защите клеток от апоптоза [3]. Наследственный дефицит АДА1 у человека приводит к тяжелому комбинированному иммунодефициту (ТКИД) [11]. В отличие от хорошо изученной АДА1, АДА2 исследована в меньшей степени из-за низкого содержания фермента в организме. В норме АДА2 определяется лишь в плазме крови человека, каталитическая способность ее ниже, чем у АДА1 (K_m в 100 раз больше) и оптимум pH находится в слабокислой области при pH 6,0, тогда как для АДА1 – при pH 7,4 [19]. Активность АДА2 в плазме значительно возрастает при заболеваниях, при которых активируются моноциты/макрофаги (гепатит С, острая лейкемия, ВИЧ/СПИД, инфекционный мононуклеоз и т. д.), в плевральной жидкости при туберкулезном плеврите, в спинномозговой – при туберкулезном менингите и т.д. Активность АДА2 предложена в качестве диагностического теста [1, 11, 14, 17, 18].

Последние достижения в расшифровке гена АДА2 [19] позволили получить фермент в рекомбинантной форме и исследовать его физиологическую роль. Показано, что АДА2 необходима для дифференцирования моноцитов и стимуляции пролиферации макрофагов и дендритных клеток. Возможно, для выполнения этой функции не требуется собственно АДА-активность, а важны, скорее всего, свойства АДА2 как фактора роста [20]. Причины и механизмы возрастания активности АДА2 при патологии еще предстоит исследовать.

При воспалении клетки продуцируют активные формы кислорода (АФК), неконтролируемый выброс которых приводит к окислительному стрессу. Многие клеточные белки – факторы транскрипции, рецепторы и ферменты – чувствительны к этим условиям. К их числу принадлежит и 5'-нуклеотидаза, которая активируется под воздействием супероксид-иона [8], что приводит к увеличению концентрации аденозина. Аденозин в свою очередь активирует глутатионпероксидазу 1 – центральный фермент антиоксидантной защиты организма [23]. Увеличение концентрации адено-

зина, таким образом, может быть важным адаптивным механизмом при окислительном стрессе. В этой связи роль АДА2, как регулятора уровня аденозина в условиях, при которых требуются его высокие концентрации, приобретает важное значение. А так как уровень АДА2 возрастает при некоторых инфекциях, то интересно было исследовать воздействие окислительного стресса на ее активность.

В настоящей работе мы наблюдали за активностью АДА2 в плазме крови человека после вакцинации против кори. Была исследована также способность изолированных клеток крови человека и лабораторных крыс и мышей продуцировать фермент *in vitro*, а также при стимулировании клеток культурой Salmonella *typhimurium* и в условиях окислительного стресса.

Материал и методика. В работе использовали плазму крови добровольцев – сотрудников лаборатории, а также белых лабораторных крыс и мышей. Аденозин, ингибитор АДА1 эритро-9-(2-гидрокси-3-нонил)-аденингидрохлорид (EHNA), HBSS, HEPES, коллагеназа IV – фирмы "Sigma-Aldrich" Ltd. (США), Ficoll – фирмы "Serva", коммерческий препарат sodium diatrizoate – "Bracco Diagnostics" (США). Остальные реактивы высокой степени очистки.

Мононуклеары периферической крови (PBMC) получали по Boyum [6]: венозную кровь с антикоагулянтом (в соотношении 9:1 с 3,8%-ным цитратом натрия) разбавляли в 2-4 раза физраствором с 20 мМ К-фосфатного буфера (PBS) и 2 мл разбавленной крови наносили на двухслойный градиент Ficoll-diatrizoate (2 мл плотностью 1.078 наслаивали на 2 мл плотностью 1.119 в 10-миллилитровой пробирке) и центрифугировали в течение 30 мин при 3500 об/мин. Верхний слой, содержавший PBMC, собирали, после трехкратного промывания PBS клетки смешивали с HBSS с 20 мМ HEPES, pH 7.35. Подсчитывали число клеток и определяли активность АДА клеточной суспензии. Для получения первичных моноцитов осадок клеток в буфере с 0.1 мМ $CaCl_2$ высевали на культуральные платы и инкубировали в течение 1-1,5 ч при 37°C. Прикрепившиеся клетки – моноциты и не прикрепившиеся – лимфоциты трижды промывали буфером и использовали далее в экспериментах. Подсчет клеток производили в камере Горяева, использованы только препараты с 80-90%-ной чистотой. Процедура очистки приводила к примерно 90%-ной чистоте лимфоцитов и моноцитов, и число жизнеспособных клеток составляло ≈ 90%, определенных с помощью трипанового синего.

Кровь крыс получали пункцией из сердца шприцем с гепарином, затем клетки разделяли по Boyum [6], как описано выше, в градиенте плотностей 1,087 и 1,129 Ficoll-diatrizoate для PBMC и PMN соответственно. Процедура в основном повторяет процедуру для получения клеток крови человека, описанную выше.

Печень лабораторных животных подвергали перфузии поэтапной обработкой раствором коллагеназы IV, по методике Seglen [16], промывали PBS и суспендировали в HBSS с 20 мМ HEPES, pH 7,35. После центрифугирования при 50 g в течение 10 мин надосадочный раствор, содержавший клетки, наносили на смесь Ficoll-diatrizoate плотностью 1,1 и центрифугировали при 3500 об/мин в течение 30 мин. Верхний слой содержал чистые клетки Купфера, которые после трехкратного промывания тем же буфером использовали в экспериментах.

Перитонит у лабораторных животных вызывали инъекцией содержимым слепой кишки крыс или мышей, 0,5 г/кг внутрибрюшинно, как описано в [9]. По истечении 20 ч животных подвергали анестезии и клетки собирали трехкратным промыванием брюшной полости PBS. Клетки трижды промывали PBS и использовали в экспериментах.

Активность АДА (АДАtotal, АДА1 и АДА2) в плазме крови и в клеточных суспензиях определяли так же, как описано в [4]. Активность АДА2 измеряли в присутствии 0,04 мМ EHNA, специфического ингибитора АДА1, который демаскирует активность АДА2. Активность АДА1 получена вычитанием АДА2 из АДАtotal. Значения активности АДА в плазме выражены в единицах активности на литр, U/l; в гомогенатах и клеточных суспензиях - в единицах активности на мг белка и на число клеток соответственно. За единицу активности АДА было принято количество фермента, образующего 1 нмоль аммиака за 1 мин/ч в указанных условиях эксперимента. Белок определяли по методу Bradford [7], используя в качестве стандарта БСА.

В качестве источников кислородных радикалов были использованы растворы нитрита и нитропруссида натрия. Клеточные суспензии предварительно инкубировали с 1мМ азида натрия в течение 10 мин при 37ºC для подавления активности каталазы. Далее клетки инкубировали с

различными концентрациями нитрита (0-75 мМ) и нитропруссида натрия (0-40 мМ) в HBSS с 20 мМ HEPES, pH 7,0, в течение 15 мин при 37ºС и из каждой пробы отбирали аликвоты для определения в них активности АДА. Контролем служили клетки, инкубированные в буфере без добавок.

Результаты анализировали с использованием матрицы Non-linear Fit программы Grafit, version 5.0.3 for Windows (Erithacus Software, USA) [12].

Статистический анализ проводили с использованием программы InStat, version 3 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA), специфические различия оценивали в Student's two-tailed t-test. Данные приведены как средние ± стандартная ошибка.

Результаты и обсуждение. Как уже отмечалось выше, при некоторых заболеваниях уровень АДА повышается в жидкостях организма (плевральной, спинномозговой, синовиальной и т.д.) в основном за счет возрастания активности АДА2. Активность последней определяется лишь в плазме крови человека, и было интересно проследить за ней при иммунном ответе после вакцинации. Воспользовавшись тем, что молодым сотрудникам лаборатории в поликлинике была сделана прививка от кори, мы проследили за уровнем активности АДА2 в плазме, каждые 3-4 дня определяя у них АДА-активность.

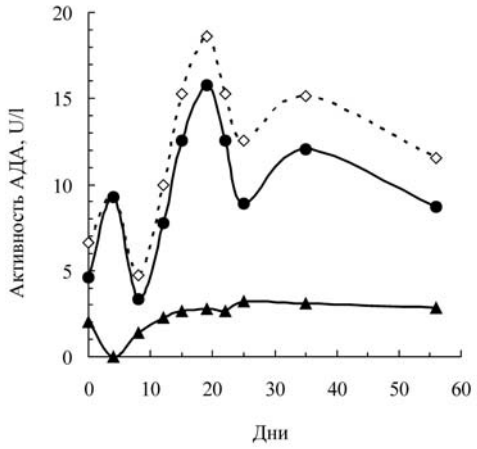

Рис. 1. Активность АДА в плазме крови после коревой вакцинации.
Зависимость активности АДА от времени иммунного ответа:
(--◊- -) – $АДА_{total}$; (-▲-) – ADA1; (-●-) – ADA2.
Активность АДА, определенная до прививки, была принята за контроль.

На рис. 1 приведены кривые активности АДА в плазме за два месяца наблюдений. На графике четко прослеживается динамика возрастания АДА2, которая достигает максимума на 15-20 день и составляет примерно 16 U/l, затем постепенно возвращается к норме. Если сравнить полученную динамику активности АДА2 с описанной динамикой развития иммунного ответа [15], то первый пик соответствует 5-10 дням, когда растет уровень IgM, а нарастание второго наблюдается примерно с десятого дня, то есть вместе с ростом уровня IgG. Интересно, что АДА1, упав до нуля сразу после прививки, быстро восстанавливается и держится на постоянном уровне, равном примерно 3,0 U/l.

Значения активности АДА1 в только что полученных PBMC и PMN очень низки, а АДА2 практически не выявлена ни в одном из исследованных типов клеток. Однако через несколько часов инкубации в HBSS с HEPES, pH 7,0 при 37°C моноциты обнаруживают низкую активность АДА2 (данные не приведены). Далее с

целью стимулирования клетки инкубировали (в течение 8-и ч) в присутствии Salmonella *typhimurium,* затем определяли активность АДА2 в моноцитах, лимфоцитах, нейтрофилах и в смешанных суспензиях моноцитов с лимфоцитами или с нейтрофилами, а также лимфоцитов с нейтрофилами. В присутствии бактерий моноциты продуцировали выраженную активность АДА 2. В смешанной суспензии моноцитов с лимфоцитами наблюдалось значительное увеличение активности АДА2 по сравнению с суспензией только моноцитов за одно и то же время инкубации (рис. 2). Взаимодействие клеток, таким образом, является необходимым условием для проявления активности АДА2.

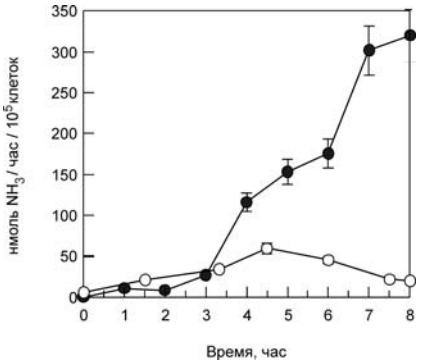

Рис. 2. Зависимость активности АДА2 в изолированных клетках крови, стимулированных *S. typhimurium* (моноцитах (-○-) и моноцитах/лимфоцитах (-●-)) от времени инкубации. Приведенные графики получены вычитанием из кривых для смешанных суспензий, кривых, полученных отдельно для лимфоцитов и отдельно для *S. typhimurium*. Здесь и на рис.3 каждая точка представляет собой среднее трех независимых экспериментов. Все значения активности АДА2 значительно отличались от контроля (p <0.005).

Суспензию моноцитов с лимфоцитами (PBMC) после выделения и промывки инкубировали в течение 5 ч в HBSS с HEPES, pH 7,0, при 37°C, при этом в среде накапливался фермент. Затем клетки подвергали воздействию перекиси водорода и нитрита натрия, которые использовали в качестве продуцентов АФК.

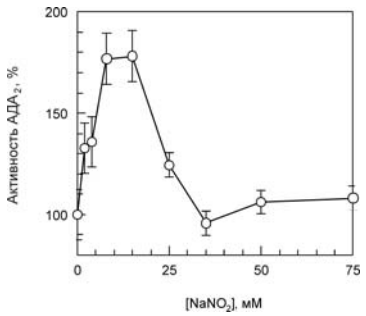

Рис. 3. Зависимость активности АДА2 в суспензии PMBC от концентрации $NaNO_2$. Контрольные (100%) значения активности представляют собой результат инкубации клеток только в буфере.

В присутствии нитрита натрия наблюдали активацию АДА2 на ~80% от исходной активности, с максимумом при 10-15 мМ $NaNO_2$ (рис.3). Аналогичные зависимости от НПН были получены также для очищенного фермента из плазмы крови человека [2].

В клетках крови и тканей лабораторных животных АДА2 не была обнаружена, в них выявлена лишь АДА1. Чтобы стимулировать иммунный ответ у крыс и мышей, им вводили эритроциты человека; в других опытах у животных вызывали сепсис инъекцией содержимым слепой кишки или заражали их культурой S. *typhimurium*. Хотя у зараженных животных в плазме крови мы не наблюдали индукции АДА2, в клетках перитонеального смыва (ПС), состоявшего преимущественно из макрофагов, отмечали некоторую АДА2 активность. Эти клетки были подвергнуты далее воздействию АФК. На рис. 4а представлена зависимость активности АДА2 в макрофагах ПС от концентрации НПН. Кривые зависимости активности АДА2 имеют форму колокола с максимумом при концентрации реагентов около 15 мМ.

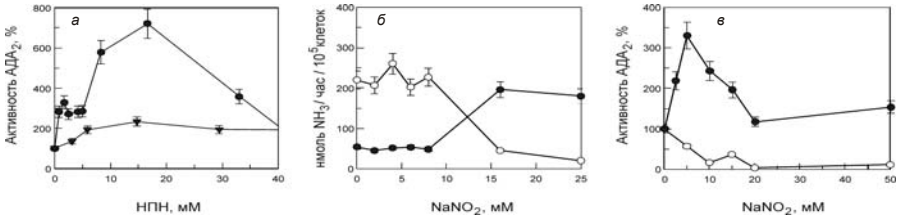

Рис 4. Зависимость активности АДА2 в клетках от концентрации АФК. *а* - макрофаги перитонеального смыва мыши, зараженной S.*typhimurium* (-●-) и крысы с экспериментальным сепсисом (-▲-); *б* - зависимость активности изоферментов АДА от концентрации $NaNO_2$ в макрофагах ПС крыс при экспериментальном сепсисе: АДА1 (-○-) и АДА2 (-●-); *в* - зависимость активности АДА2 от концентрации $NaNO_2$ в клетках Купфера мышей, контрольных (-○-) и иммунизированных эритроцитами (-●-)

На рис. 4б приведены зависимости активности АДА1 и АДА2 от нитрита натрия в макрофагах ПС крыс при экспериментальном перитоните. С увеличением концентрации нитрита натрия активность АДА1 падает, а активность АДА2 возрастает. С ростом концентрации $NaNO_2$ происходит как бы переключение активности с АДА1 на ADA2. Кривые активности являются зеркальными отражениями друг друга. Это укладывается в предположение Gakis et al. [10] о гомеостазе, формируемом в организме двумя изоферментами.

У мышей, иммунизированных эритроцитами человека, ни в плазме крови, ни в тканях активность АДА2 не была обнаружена (данные не приведены). Однако при окислительном стрессе, при сравнении активности АДА2 клеток Купфера этих мышей с контрольными, наблюдалась активация АДА2 под воздействием $NaNO_2$, в контрольных же клетках этого эффекта не было, рис. 4 в. Таким образом, активация фермента под воздействием АФК позволила выявить индукцию АДА2 в клетках печени в ответ на введение мышам эритроцитов человека.

Несмотря на то что у грызунов не был обнаружен ген, соответствующий ADGF и ответственный за активность АДА2 [13], была, тем не менее, показана способность макрофагов крыс продуцировать активность АДА, которая не подавляется ингибитором АДА1 EHNA [9]. Мы также наблюдали активность АДА2 в макрофагах перитониального смыва крыс и мышей и клетках Купфера печени мышей при

воспалении. Значения активности АДА2 при этом очень низкие, но в присутствии АФК они заметно возрастают. Из использованных в качестве продуцентов АФК перекиси водорода, пероксинитрита, (Fe^{2+}-ascorbate), (Fe^{2+}-H_2O_2), нитрита и нитропруссида натрия только в присутствии последних двух наблюдалась активация фермента (рис. 4). Активность АДА2 возрастает под воздействием АФК, в отличие от большинства ферментов, которые обычно подвергаются ингибированию в условиях окислительного стресса. Ранее мы наблюдали это на препаратах очищенного фермента [2], здесь же приводятся данные, полученные на разделенных клетках крови человека, вырабатывающих АДА2, а также на макрофагах крыс и мышей при воспалении. На основании полученных результатов можно предположить, что активные формы кислорода, наряду с аденозином, могут быть факторами, регулирующими активность АДА2 при патологии.

В настоящей работе показано, что при иммунном ответе на коревую вакцинацию уровень АДА2 в плазме крови человека возрастает. Динамика активации АДА2 коррелирует с известной динамикой уровня иммуноглобулинов после вакцинации. Моноциты крови человека вырабатывают АДА2. Наличие лимфоцитов в инкубационной смеси с моноцитами значительно усиливает этот эффект. В присутствии NO, то есть при нитрозативном стрессе, в клетках наблюдается возрастание активности АДА2.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Марданян С.С.,Саркисова Е.Г., Андреасян Н.А., Бадалян Л.Т., Ханоян А.С., Сагоян И.Л., Маркарян Н.Р.* Активность аденозиндезаминазы в плевральной жидкости при туберкулезном плеврите. Проблемы туберкулеза, *2*, 37-39, 2002.
2. *Саркисова Е.Г., Андреасян Н.А., Айрапетян Р.Л., Арутюнян А.А.* Окись азота – фактор активации аденозиндезаминазы 2 *in vitro*. Биохимия, *77*, 1, 116-122, 2012.
3. *Aldrich M.B., Blackburn M.R., Kellems R.E.* The importance of adenosine deaminase for lymphocyte development and function. Biochem. Biophys.Res. Commun., *272*, 311–315, 2000.
4. *Andreasyan N.A., Hayrapetyan H.L., Sargisova Y.G., Mardanyan S.S., Badalyan L.T., Khanoyan A.S. Activity of adenosine deaminase and its isoforms in pleural fluid at tuberculous pleuritis. Medical Science Monitor, 8(10), CR 708, 2002.*
5. *Bours M.J., Swennen E.L., Di Virgilio F., Cronstein B.N., Dagnelie P.C.* Adenosine 5'- triphosphate and adenosine as endogenous signaling molecules in immunity and inflammation. Pharmacol Ther., *112,* 2, 358–404, 2006.
6. *Boyum A. Scan.* J.Clin. Lab. Invest. 21, Suppl. *97*, 77, 1968.
7. *Bradford M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein utilizing the principle of protein binding. Anal. Biochem., *72*, 259-268, 1976.
8. *Chen Y-F., Li P-L. and Zou A-P.* Oxidative stress enhances the production and actions of adenosine in the kidney. Am. J Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol., *281*, R1808-R1816, 2001.
9. *Conlon B.A. and Law W.R.* Macrophages are source of extracellular adenosine deaminase-2 during inflammatory responses. Clin. Exp. Immunol., *138*, 14-20, 2004.
10. *Gakis C., Cappio-Borlino A. and Pulina G.* Enzymes (Isoenzyme System) as homeostatic mechanisms. The isoenzyme (ADA2) of adenosine deaminase of human monocytes-macrophages as a regulator of the 2'deoxyadenosine. Biochem. Mol. Biol. Intern., *46*, 3, 487-494, 1998.
11. *Hershfield M.S.* New insights into adenosine-receptor-mediated immunosuppression and the role of adenosine in causing the immunodeficiency associated with adenosine deaminase deficiency. Eur. J. Immunol., *35*, 25–30, 2005.
12. *Leatherbarrow R.J.* GraFit Version 5, Erithacus Software Ltd., Horley, U.K., 2001.
13. *Maier S. A., Galellis J. R., McDermid H. E.* Phylogenetic analysis reveals a novel protein family closely related to adenosine deaminase. J. Mol. Evol., *61*, 776-794, 2005.

14. *Niedzwicki J.G., Mayer K.H., Abushanab E., Abernethy D.R.* Plasma adenosine deaminase 2 is a marker for human immunodeficiency virus-1seroconversion. Am. J. Hematol., *37*, 3, 152-155, 1991.
15. *Helefand R.F., Kebede S., Gary H.E. Jr., Beyene H., Bellini W.J.* Timing of development of measles-specific immunoglobulin M and G after primary measles vaccination. Clin. Diag. Lab. Immun., *6*, 2, 178–180, 1999.
16. *Seglen P.O.* Hepatocytes suspension and cultures as tools in experimental carcinogenesis. J. Toxicol. Environ. Health, *5*, 551-560, 1979.
17. *Thompson L.F. and Seegmiller J.E.* Adenosine deaminase deficiency and severe combined immunodeficiency disease. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., *51*, 167-210, 1980.
18. *Valdéz L.,Pose A., San José E., Martinez Vázquez J. M.* Tuberculous pleural effusions. Eur. J. Intern. Med., *14*, 77-88, 2003.
19. *Zavialov A.V., Engstrom A.* Human ADA2 belongs to a new family of growth factors with adenosine deaminase activity. Biochem. J., *391*, 51-57, 2005.
20. *Zavialov A., Gracia E., Glaichenhaus N., Franco R., Zavialov A.V., Lauvau, G.* Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. J. Leukocyte Biol., *88*, 279-290, 2010.
21. *Zemlin A.E., Burgess L.J., Carstens M.E.* The diagnostic utility of adenosine deaminase isoenzymes in tuberculous pleural effusions. Int. J Tuberc. Lung Dis., *13*, 2, 214-220, 2009.
22. *Zurovec M., Dolezal T., Gazi M., Pavlova E., Bryant P.J.* Adenosine deaminase - related growth factors stimulate cell proliferation in Drosophila by depleting extracellular adenosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *99* , 7, 4403-4408, 2002.
23. *Zhang Y., Handy D., Loscalzo J.* Adenosine-dependent induction of glutation peroxidase 1 in human primary endothelial cells and protection against oxidative stress. Circ. Res., *96*, 831-837, 2005.

Поступила 21.11.2011