

Изменение активности нейтрофилов крови человека при взаимодействии с компонентами жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда в условиях *in vitro*

Е.И.Коваленко¹, Д.И.Паршонок², Е.В.Вязов¹, А.А.Чиркин²

¹Белорусский государственный университет, Минск;

²Витебский государственный университет им. П.М.Машерова, Витебск, Беларусь

The change of human blood neutrophil activity during interaction with components of liquid contents of *Antheraea pernyi* G.-M. chrysalis *in vitro*

A.I. Kavalenka¹, D.I. Parshonok¹, Ya.V. Vyazov¹, A.A.Chirkin²

¹Belarusian State University

²Vitebsk State University

Аннотация

Изучено влияние нативного жидкого содержимого куколок дубового шелкопряда (НЖСК) на генерацию активных кислородных метаболитов (АКМ) и секрецию миелопероксидазы (МПО) нейтрофилами крови человека *in vitro*. Установлено, что НЖСК приводит к ингибированию процессов формирования АКМ нейтрофилами вследствие прямого ингибирования МПО-зависимых окислительных реакций и за счет снижения секреции МПО из нейтрофилов в среду. Действие НЖСК частично зависит от функционирования в нейтрофилах 5-липоксигеназных и фосфатидилинозитол-3-киназных внутриклеточных сигнальных путей и не является результатом некроза клеток.

Ключевые слова

Нейтрофилы, миелопероксидаза, активные кислородные метаболиты, куколки дубового шелкопряда

Нейтрофилы как представители фагоцитарного звена иммунитета играют важную роль в развитии воспаления при инфекциях, травмах, аллергических заболеваниях, ревматоидном артрите [1-3]. Обнаружено, что в ряде случаев поддержание хронического воспаления и повреждение тканей организма-хозяина связано с гиперактивацией нейтрофилов и другими нарушениями активности этих клеток [3-6]. Таким образом, представляет интерес поиск лекарствен-

Summary

The influence of liquid contents of *Antheraea pernyi* G.-M. chrysalis (LC) on reactive oxygen species (ROS) generation and myeloperoxidase (MPO) secretion in human blood neutrophils was studied *in vitro*. It was revealed that LC leads to inhibition of ROS formation processes in neutrophils as a result of direct inhibition of MPO-dependent oxidative reactions and the decrease of MPO secretion from neutrophils into medium. The action of LC depends on functioning of 5-lipoxygenase and phosphatidil inositol-3-kinase intracellular signal ways in neutrophils in particularly and is not result of necrosis of cells.

Key words

Neutrophils, myeloperoxidase, reactive oxygen species, Antheraea pernyi G.-M.) *chrysalis*

ных соединений, способных регулировать активность нейтрофилов. Среди лекарственных препаратов особое место занимают вещества биогенного происхождения. Ранее было показано, что экстракт куколок дубового шелкопряда обладает иммуномодулирующей активностью, влияет на продукцию гормонов надпочечников, приводит к изменению лейкоцитарной формулы крови, стимулирует фагоцитарную активность нейтрофилов и макрофагов, оказывает

воздействие на концентрацию в различных органах биогенных аминов и регуляторных аминокислот [7].

Целью данной работы было изучить влияние нативного жидкого содержимого куколок (НЖСК) дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.), нормированного по содержанию свободных аминокислот 15 г/л, на процессы генерации активных кислородных метаболитов (АКМ) и секреторную дегрануляцию нейтрофилов крови человека при активации клеток в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Реагенты: декстран-500, фиколл-400, 30 % раствор H_2O_2 , люминол, люцигенин, fMLP, Triton X-100 («Sigma», США); урографин («Schering AG», Германия); МК-886 («Calbiochem», США); гепарин, латекс («Белмедпрепараты», Беларусь); NaCl, KCl, $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, глюкоза, HOCl, наборы для определения лактатдегидрогеназы (ЛДГ) («Анализ-Х», Беларусь). Из фиколла-400 и урографина готовили раствор фиколл-урографина плотностью 1,077 г/см³. Сбалансированный буферный солевой раствор (СБСР) Эрла собственного приготовления включал 116,2 ммоль/л NaCl, 5,4 ммоль/л KCl, 0,9 ммоль/л $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$, 0,8 ммоль/л $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 26,2 ммоль/л $NaHCO_3$, 5,6 ммоль/л глюкозы.

Выделение нейтрофилов из периферической крови здоровых доноров проводили по методу [8], модифицированному нами [9]. Консервированную с гепарином кровь перемешивали из расчета 5:1 с 7 % раствором декстрана-500 в 0,15 моль/л NaCl и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре для седиментации эритроцитов. В пробирки наливали по 3 мл фиколл-урографина, на который осторожно наслаивали по 9 мл плазмы с лейкоцитами, и центрифугировали в течение 25 мин при 1500 оборотов/мин для разделения лейкоцитов по плотности. После центрифугирования надосадочную жидкость и слой мононуклеаров удаляли, к осадку, содержащему фракцию гранулоцитов, добавляли 1 мл ледяной дистиллированной H_2O , перемешивали в течение 20 с для гипотонического лизиса оставшихся эритроцитов, после чего восстанавливали осмотичность раствора добавлением 1 мл 0,3 моль/л NaCl. Затем клетки дважды отмывали в 0,15 моль/л NaCl. Полученную фракцию клеток суспензировали в СБСР Эрла при pH 7,3. В полученной фракции клеток содержание нейтрофилов составляло не менее 96 %.

Повреждение нейтрофилов исследовали по высвобождению из клеток в инкубационную среду цитозольного фермента лактатдегидрогеназы (ЛДГ). Нейтрофилы ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) помещали в стеклянные пробирки, добавляли НЖСК и инкубировали в течение 60 мин при 37°C. Затем клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 оборотов/мин, надосадочную жидкость собирали. В образцах внеклеточной жидкости определяли активность ЛДГ с помощью наборов и спектрофотометра PV 1251C («СОЛАР», РБ) кинетическим методом [10]. Кинетический метод определения каталитической активности ЛДГ основан на ферментативной реакции взаимодействия пирувата и НАДН с образованием лактата и $НАД^+$. Уменьшение концентрации НАДН в образцах за 1 мин, детектируемое по изменению оптической плотности образцов на длине волны 340 нм (DD), пропорционально активности ЛДГ (А): $A = \Delta D \cdot 8600$ [мкмоль \cdot мин⁻¹ \cdot л⁻¹]. Полученные значения выражали в процентах от общей активности ЛДГ нейтрофилов (A_0), которую оценивали после обработки клеток 0,1 % раствором Triton X-100. Высвобождение ЛДГ в % ($A_{отн}$) определяли по формуле: $A_{отн} = A \cdot 100 \% / A_0$.

Генерация нейтрофилами АКМ. Суспензию нейтрофилов ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) помещали в стеклянную кювету, добавляли НЖСК, люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) или люцигенин ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и исследовали параметры усиленной люминолом (Люм-) или люцигенином (Люц-) хемилюминесценции (ХЛ), обусловленной генерацией нейтрофилами АКМ при активации клеток в процессе адгезии к стеклу [9]. Через 10 мин в образцы вносили fMLP ($7,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) затем спустя 5 мин добавляли латекс (50 мкл разбавленной 1:50 базовой суспензии латекса для определения ревматоидного фактора) и определяли параметры ХЛ, обусловленной образованием АКМ при действии fMLP и фагоцитозе клетками латекса. Кинетические зависимости интенсивности ХЛ активированных клеток регистрировали с помощью компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биохемилюминетр БХЛ-1 (Белгосуниверситет, РБ) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom («Новые аналитические системы», РБ). Интегральную интенсивность ХЛ клеток вычисляли как площадь под кинетической кривой, полученной за время измерения 10 мин при адгезии или за время 4 мин при действии латекса или fMLP. Ингибиторный эффект определяли в %.

Влияние НЖСК на реакции окисления, катализируемые миелопероксидазой нейтрофилов. Нейтрофилы ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) разрушали добавлением 0,1 % раствора Triton X-100. При этом миелопероксидаза (МПО) переходила в среду и становилась доступной для реакций, что позволяло исследовать влияние НЖСК на реакции, катализируемые МПО. В кювету хемилюминометра помещали суспензию разрушенных нейтрофилов, НЖСК, люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л), H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и оценивали скорость окисления люминола пероксидом водорода, катализируемое МПО хемилюминесцентным методом [11, 12]. Для этого регистрировали кинетические зависимости интенсивности ХЛ, а затем рассчитывали интегральную интенсивность ХЛ за 1,5 мин. Ингибиторный эффект определяли в %.

Секреторная дегрануляция азурофильных гранул нейтрофилов. Суспензии нейтрофилов ($1 \cdot 10^6$ клеток/мл) помещали в стеклянные пробирки, добавляли НЖСК, fMLP ($7,5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) (там, где это указано) и инкубировали в течение 60 мин при $37^\circ C$. Нейтрофилы при адгезии на стекло и действии fMLP активируются и секретируют МПО во внеклеточную среду [9]. По окончании инкубирования надосадочную жидкость собирали и центрифугировали в течение 7 мин при 400 g для осаждения неадгезировавших клеток. В полученных образцах внеклеточной жидкости определяли уровень активности МПО, секретированной клетками, по интенсивности ХЛ, индуцированной добавлением люминола ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л). Полученные значения выражали в % от общего уровня активности МПО в нейтрофилах.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистики Стьюдента. На рисунках представлены средние значения (M) и доверительные интервалы (при $p = 0,95$).

Результаты и обсуждение

Нейтрофилы формируют АКМ в процессе воспаления при активации под действием хемотаксических агентов (бактериальных пептидов, интерлейкина-8, лейкотриенов), при действии адгезионных молекул – лектинов, интегринов, иммуноглобулинов, при адгезии на эндотелий, фибронектин, а также непосредственно в ходе фагоцитоза микроорганизмов и частиц [1, 2, 6, 9, 13]. Нами выбраны модели, где в качестве активирующих воздействий использованы синтетический хемотаксический пептид fMLP, частицы латекса, индуцирующие фагоцитарную ак-

тивность нейтрофилов, и стеклянная подложка в качестве адгезионного субстрата.

На рис. 1 показаны кинетические зависимости интенсивности Люм-ХЛ нейтрофилов при адгезии клеток на поверхность стекла (1, 1'), при внесении fMLP (2, 2') и латекса (3, 3'). Возникающее свечение является следствием взаимодействия люминола с АКМ (O_2^- , H_2O_2 , OH , 1O_2 , $OSCl$, $ONOO^-$), генерируемыми активированными нейтрофилами. Зависимости 1-3 были получены в отсутствие НЖСК, а кривые 1'-3' при добавлении в клеточную суспензию 2 мкл, разбавленного в 20 раз НЖСК, на 1 мл суспензии. Как видно из рис. 1, при добавлении НЖСК дубового шелкопряда происходит снижение выхода АКМ как в случае активации клеток в ходе адгезии, так и при воздействии fMLP и латекса.

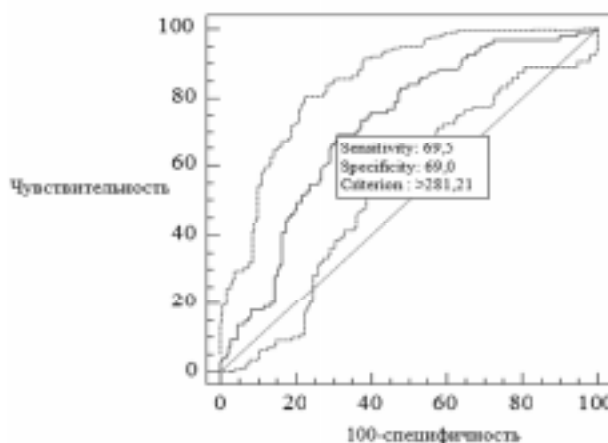


Рис. 1. Кинетические зависимости Люм-ХЛ нейтрофилов при адгезии клеток на поверхность стекла (1, 1'), при внесении fMLP (2, 2') и латекса (3, 3'). 1, 2, 3 – в отсутствие НЖСК, 1', 2', 3' – при добавлении 2 мкл разбавленного в 20 раз НЖСК (1,5 мкг свободных аминокислот).

На рис. 2 приведены данные, характеризующие величину ингибиторного эффекта НЖСК в зависимости от количества вносимого препарата. Обнаружено, что ингибирующий эффект НЖСК в отношении генерации клетками АКМ, вызванной действием латекса и fMLP (рис. 2, кривые 2, 3), значительно выше, чем в отношении активации клеток в ходе адгезии на стекло (рис. 2, кривая 1). Выход АКМ, генерируемых при адгезии, снижается на 50 % при количестве

НЖСК в среде, соответствующем разбавлению в 500 раз, а при воздействии на нейтрофилы fMLP и латекса снижение выхода АКМ на 50 % наблюдается при разбавлении НЖСК более, чем в 10^4 раз.

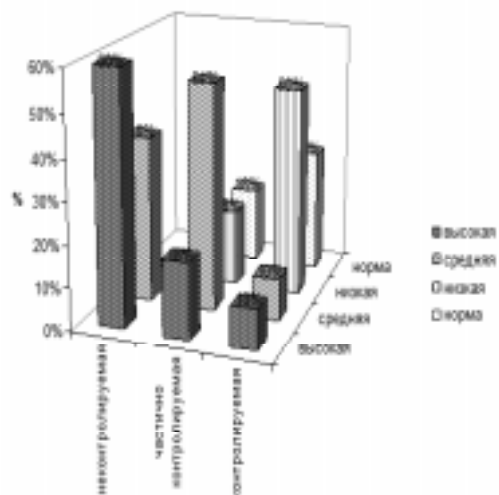


Рис. 2. Ингибирующий эффект НЖСК дубового шелкопряда на Люм-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии (1), действии fMLP (2) и латекса (3) в зависимости от степени разбавления НЖСК. Указана конечная степень разбавления препарата при его внесении в суспензию клеток.

В нейтрофилах за генерацию АКМ ответственны, в первую очередь, такие ферменты, как НАДФН-оксидаза и миелопероксидаза (МПО, КФ 1.11.1.7) [6, 13]. Активация мембраноассоциированных НАДФН-оксидазных комплексов обуславливает образование в нейтрофилах O_2^- и H_2O_2 , которые формируются и атакуют субстраты у наружной поверхности клеток и внутри фагосом [6, 13]. Хорошо изученным хемилюминесцентным индикатором формирования O_2^- и H_2O_2 является люцигенин [9, 13]. С целью уточнения мишеней действия НЖСК, было изучено его влияние на Люц-ХЛ нейтрофилов. Установлено, что НЖСК дубового шелкопряда не оказывает значительного влияния на интенсивность Люц-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии, действии латекса и fMLP. Разница между Люм-ХЛ и Люц-ХЛ характеризует участие в генерации АКМ миелопероксидазы, поскольку люцигенин, в отличие от люминола,

не окисляется МПО, не взаимодействует с O_2^- и другими продуктами МПО. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об ингибирующем влиянии НЖСК на МПО-зависимую генерацию АКМ нейтрофилами.

На рис. 3 представлена зависимость, характеризующая влияние НЖСК на окисление люминола пероксидом водорода в присутствии МПО разрушенных нейтрофилов. Как и в случае цельных жизнеспособных нейтрофилов, при действии на фермент МПО разрушенных клеток препарат НЖСК также ингибировал способность МПО катализировать окисление люминола. Ингибирование на 50 % наблюдается при добавлении НЖСК в количестве, соответствующем разбавлению более, чем в 10^4 раз. Следовательно, компоненты НЖСК могут напрямую влиять на МПО-зависимые реакции.

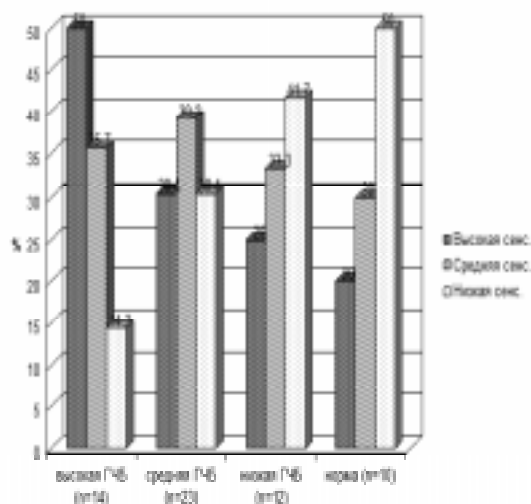


Рис. 3. Зависимость ингибирующего действия НЖСК на Люм-ХЛ в системе «люминол + H_2O_2 + МПО разрушенных нейтрофилов» от степени разбавления НЖСК. Указана конечная степень разбавления препарата при его внесении в суспензию.

МПО в покоящихся нейтрофилах локализована в азурофильных лизосомальных гранулах и вовлекается в процессы генерации АКМ только после высвобождения из гранул при активации клеток [9, 13]. МПО, секретированная из нейтрофилов во внеклеточное пространство, может приводить к окислительной модификации белков, липидов и прочих веществ на удалении от клетки, что обуславливает важность процесса

секреторной дегрануляции. На рис. 4 показано влияние НЖСК на секрецию МПО из нейтрофилов при активации клеток в ходе адгезии на стекло и при действии fMLP. Клетки были проинкубированы в течение 1 ч при 37 °С в отсутствие или присутствии НЖСК, а затем проведена оценка высвобождения МПО во внеклеточную среду в процентах по отношению к полному содержанию МПО в нейтрофилах. Как видно из рис. 4, НЖСК тормозит секрецию МПО во внеклеточную среду и при активации клеток в процессе адгезии, и при действии fMLP. По-видимому, влияние НЖСК на процессы активации кислорода в нейтрофилах не ограничиваются прямым взаимодействием НЖСК с МПО и ее продуктами, но и включают супрессивное действие на процессы активации нейтрофилов.

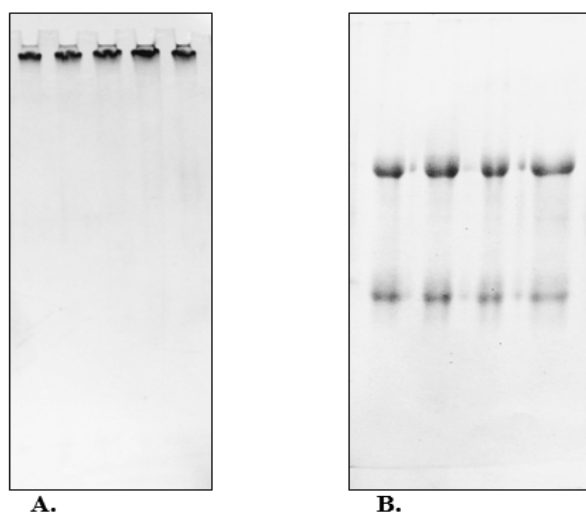


Рис. 4. Влияние НЖСК на секрецию МПО из нейтрофилов при активации клеток в процессе адгезии (1) и при действии fMLP (2).

Поскольку выход ферментов из клеток и инактивация клеток могут происходить в результате клеточной гибели, в работе изучено повреждение нейтрофилов при действии НЖСК по высвобождению ЛДГ. ЛДГ является цитозольным ферментом и может оказываться во внеклеточной среде только вследствие нарушения барьерной функции плазматической мембраны клетки. Проведенные исследования показали, что НЖСК в использованных концентрациях не приводит к усилению высвобождения

из нейтрофилов ЛДГ и, следовательно, не вызывает разрушения нейтрофилов по механизму некроза.

Важные внутриклеточные ферменты, регулирующие процессы сборки НАДФН-оксидазных комплексов, дегрануляции нейтрофилов, а также гибели нейтрофилов по механизму апоптоза являются фосфатидил-инозитол-3-киназа (ФИ-3-К) и 5-липоксигеназа (5-ЛО) [6, 9, 14, 15]. Нами изучена зависимость действия НЖСК на генерацию нейтрофилами АКМ от ингибиторов 5-ЛО и ФИ-3-К. На рис. 5 показаны данные, отражающие ингибирующее действие НЖСК на Люм-ХЛ нейтрофилов в отсутствие и присутствии в среде МК-886 (блокатор активации 5-ЛО) и LY294002 (ингибитор ФИ-3-К) в случае активации клеток при адгезии и действии fMLP. Как видно из рис. 5, ингибирующий эффект НЖСК на генерацию АКМ при действии fMLP слабо зависит от МК-886 и LY294002. В тоже время ингибирующее действие НЖСК на образование АКМ при активации нейтрофилов в процессе адгезии значительно снижается при блокировании 5-ЛО и ФИ-3-К. Такой результат подтверждает, что действие НЖСК не ограничивается лишь влиянием на активность МПО и включает изменение процессов внутриклеточной сигнализации.

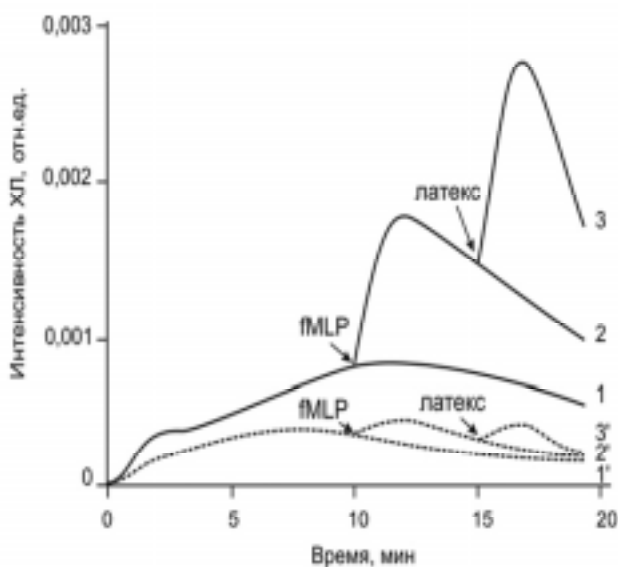


Рис. 5. Ингибирующий эффект НЖСК в отношении Люм-ХЛ нейтрофилов при активации клеток в отсутствие и присутствии МК-886 ($2 \cdot 10^{-6}$ моль/л) и LY294002 ($1,7 \cdot 10^{-7}$ моль/л).

Заключение

Полученные в работе данные позволили сделать следующие выводы. НЖСК дубового шелкопряда приводит к ингибированию процессов генерации нейтрофилами АКМ путем непосредственного ингибирования МПО-зависимых окислительных реакций и за счет снижения секреции из нейтрофилов МПО во внеклеточную среду. Ингибирую-

щий эффект в отношении образования нейтрофилами АКМ при действии латекса и fMLP многократно превышает величину воздействия НЖСК на активацию нейтрофилами кислорода при адгезии. Действие НЖСК на нейтрофилы частично зависит от функционирования 5-ЛО и ФИ-3-К внутриклеточных сигнальных путей и не является результатом некроза клеток.

Литература

1. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6 (3): 173–82.
2. Aratani Y. Role of myeloperoxidase in the host defense against fungal infection. *Nippon. Ishinkin. Gakkai Zasshi.* 2006; 47 (3): 195–99.
3. Holgate S.T., Holloway J., Wilson S., et al. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2006; 117 (3): 496–506.
4. Cave A.C., Brewer A.C., Narayanapanicker A., et al. NADPH oxidases in cardiovascular health and disease. *Antioxid. Redox. Signal.* 2006; 8 (5–6): 691–728.
5. Semenkova G.N., Kavalenka A.I., Krukau A.A., et al. Ability of phagocytes to generate reactive oxygen species in children with pollinosis. *Physica Medica.* 2004; 20 (1): 132–34.
6. Babior V.M. Phagocytosis and oxidative stress. *Am. J. Med.* 2000; 109: 33–44.
7. Чиркин А.А., Коваленко Е.И., Шейбак В.М. и др. Антиоксидантная активность куколок дубового шелкопряда (*Antheraea pernyi* G.-M.). Ученые записки УО «Витебский государственный университет имени П.М.Машерова», Естественные науки. Биология. 2007; 6: 248–66.
8. Бейум А. Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика. М.: Медицина. 1980. 9–36.
9. Kavalenka A.I., Semenkova G.N., Cherenkevich S.N. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro. *Cell and Tissue Biology.* 2007; 1(6): 551–59.
10. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. Воронеж: Издательство ВГУ. 2000. 296 с.
11. Dahlgren C., Follin P., Lundqvist H., Sjolín C. Quantitative slot-blot chemiluminescence assay for determination of myeloperoxidase from human granulocytes. *Anal. Biochem.* 1993; 214 (1): 284–88.
12. Haqqani A.S., Sandhu J.K., Birnboim H.C. A myeloperoxidase-specific assay based upon bromide-dependent chemiluminescence of luminol. *Anal. Biochem.* 1999; 273 (1): 126–32.
13. Arnhold J. Review: properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow).* 2004; 69 (1): 4–9.
14. Uddin M., Seumois G., Lau L.C. et al. Enhancement of neutrophil function by the bronchial epithelium stimulated by epidermal growth factor. *Eur. Respir. J.* 2008; 31: 714–24.
15. Guidot D.M., Repine M.J., Westcott J.Y., Repine J.E. Intrinsic 5-lipoxygenase activity is required for neutrophil responsiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1994; 91(17): 8156–59.

Адрес для корреспонденции:

Беларусь, 220030, Минск, пр.

Независимости, 4

*Белорусский государственный университет,
Физический факультет, кафедра биофизики;*

Коваленко Елена Иосифовна.

e-mail: Kavalenka@bsu.by

т. 209-50-81

Поступила 25.01.09 г.