

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕГУЛЯТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ 2-ГЕКСАДЕЦЕНАЛЯ НА НЕЙТРОФИЛЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ

Н. В. Амаэгбери^{1*}, Г. Н. Семенкова¹, А. Г. Лисовская^{1,2},
С. С. Гусакова¹, В. А. Прокашева¹, О. И. Шадыро¹

УДК 577.334;577.35

¹ Белорусский государственный университет,

220030, Минск, просп. Независимости, 4, Беларусь; e-mail: n.amaegberi@gmail.com

² Университет Нотр-Дам, Нотр-Дам, Индиана, 46556 США

(Поступила 24 мая 2019)

С использованием метода хемилюминесценции определено влияние 2-гексадеценала на процессы образования активных форм кислорода и хлора (АФКХ) в стимулированных к фагоцитозу нейтрофилах. Установлено, что в низких концентрациях этот альдегид оказывает праймирующее действие на клетки, усиливая продукцию АФКХ, а в более высоких значительно подавляет этот процесс. Сопоставление результатов хемилюминесцентного и флуоресцентного анализа свойств клеток позволяет заключить, что 2-гексадеценаль является сигнальной молекулой и проявляет свойства регулятора функций нейтрофилов посредством модификации процессов внутриклеточной сигнализации, связанных с изменением продукции АФКХ, реорганизацией цитоскелета, повышением уровня несвязанных ионов кальция в цитоплазме, уменьшением митохондриального мембранного потенциала, и индуцирует апоптоз.

Ключевые слова: люминолопосредованная хемилюминесценция, активные формы кислорода и хлора, нейтрофилы, 2-гексадеценаль.

The effect of 2-hexadecenal on the formation of reactive oxygen and chlorine species (ROCS) in neutrophils stimulated to phagocytosis has been determined by chemiluminescent method. It has been established that at low concentrations this aldehyde demonstrates a priming effect on the cells, enhancing ROCS production, and at higher concentrations – significantly suppresses this process. Comparison the results of chemiluminescent and fluorescent analysis of the cell characteristics suggests that 2-hexadecenal is a signaling molecule, which exhibits the properties of the neutrophil function regulator by modifying the processes of intracellular signaling associated with changes in ROCS production, cytoskeleton reorganization, increase in unbound calcium ions levels in cytoplasm, reduction of mitochondrial membrane potential. It also induces apoptosis.

Keywords: luminol-amplified chemiluminescence, reactive oxygen and chlorine species, neutrophils, 2-hexadecenal.

Введение. Нейтрофилы формируют главную линию защиты организма от вторжения патогенов [1]. Эти клетки первыми мигрируют в очаг воспаления и обеспечивают быстрые защитные реакции в ответ на проникновение чужеродных агентов. Ключевую роль в этом процессе играют активные формы кислорода и хлора (АФКХ), уровень которых существенно возрастает при стимуляции нейтрофилов к фагоцитозу в результате так называемого “респираторного взрыва” [2]. Недостаток АФКХ приводит к распространению инфекции, однако в случае их гиперпродукции эти активные метаболиты вызывают повреждение тканей организма, что является причиной развития серьезных патологий, в том

STUDY ON REGULATORY EFFECT OF 2-HEXADECENAL ON NEUTROPHILS BY THE CHEMILUMINESCENT METHOD

N. V. Amaegberi^{1*}, G. N. Semenkov¹, A. G. Lisovskaya^{1,2}, S. S. Gusakova¹, V. A. Prokasheva¹,
O. I. Shadyro¹ (¹ Belarusian State University, 4 Nezavisimosti Prosp., Minsk, 220030, Belarus; e-mail: n.amaegberi@gmail.com; ² Notre Dame Radiation Laboratory, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana, 46556 USA)

числе рака [3, 4]. Поэтому производство АФКХ должно быть строго регламентировано, а оценка способности нейтрофилов к “респираторному взрыву” позволит судить как о микробицидном потенциале клеток, так и о степени риска повреждения здоровых тканей организма [5].

При стимуляции нейтрофилов к фагоцитозу и генерации АФКХ развивается сложный каскад процессов, включающий в себя взаимодействие рецепторов на поверхности клеток с сигнальными молекулами, сборку НАДФН-оксидазного комплекса и образование супероксидных анион-радикалов, которые затем трансформируются в пероксид водорода. В свою очередь H_2O_2 является субстратом миелопероксидазы (МПО), продуцирующей основной микробицидный агент — хлорноватистую кислоту и гипохлорит-ионы, посредством которых происходят разрушение бактериальной клетки и запуск биосинтеза множества физиологически активных соединений в клетке-фагоците [6—8]. Следует отметить, что помимо микробицидного действия АФКХ принимают участие в регуляции многочисленных сигнальных путей, с помощью которых реализуются функции клеток. В физиологических концентрациях H_2O_2 и $HOCl$ оказывают праймирующее действие на фагоциты, увеличивая выход АФКХ, усиливая секреторную дегрануляцию и агрегацию [9—11], а также индуцируют апоптоз посредством действия на стресс-активируемые МАПК [10, 12]. Таким образом, контроль за формированием “респираторного взрыва” в нейтрофилах важен как с целью получения информации о фагоцитарной активности клеток, так и для выяснения механизмов действия различных экзо- и эндогенных регуляторов функций фагоцитов.

В настоящее время для детектирования АФКХ широко используются методы с применением флуоресцентных зондов и хемилюминесцентных индикаторов [13, 14]. Наиболее простой и распространенный метод — детектирование H_2O_2 с помощью флуоресцентного зонда дихлордигидрофлуоресцеина [15]. Однако этот метод имеет ряд недостатков, поскольку не обладает специфичностью к пероксиду водорода, применим для измерения только внутриклеточной генерации H_2O_2 , имеет ряд ограничений и артефактов, связанных с особенностями внутриклеточного метаболизма [16—18]. Следует учитывать, что в нейтрофилах H_2O_2 является промежуточным активным метаболитом, так как используется МПО в качестве субстрата для образования $HOCl/OCl^-$ [7]. По нашему мнению и авторов [8, 11, 14], наиболее адекватным методом контроля за формированием “респираторного взрыва” в нейтрофилах является люминолопосредованная хемилюминесценция (ЛХЛ). Это обусловлено следующими причинами. Во-первых, люминол взаимодействует со всеми типами АФКХ, NO и пероксинитритом, однако наиболее эффективно он реагирует с $HOCl/OCl^-$, который является основным агентом для уничтожения микроорганизмов [8]. Во-вторых, люминол проникает в клетки, что позволяет регистрировать АФКХ как внутри, так и снаружи нейтрофила.

Цель настоящей работы — установить методом хемилюминесценции механизмы регуляторного действия 2-гексадеценаля (2-ГД) на способность стимулированных к фагоцитозу нейтрофилов генерировать АФКХ, а также сопоставить эти эффекты с результатами флуоресцентного анализа свойств клеток, которые связаны со способностью этого альдегида выполнять в фагоцитах сигнальную роль.

2-ГД образуется в организме из сфингозин-1-фосфата (С1Ф) в реакции, катализируемой С1Ф-лиазой [19]. Выявлен неферментативный путь образования этого ненасыщенного альдегида из ряда сфинголипидов в реакциях свободнорадикальной фрагментации, индуцируемых хлорноватистой кислотой в модельных системах и в клетках [20]. В [21] показано, что 2-ГД является биологически активным альдегидом, что выражается в изменении редокс-состояния клеток глиомы крысы С6, а также индуцировании апоптоза в эмбриональных клетках почки человека (НЕК293Т), фибробластах мыши (NIH3T3), HeLa и клетках глиомы крысы С6 [22, 23]. Поскольку 2-ГД может образовываться в организме под действием $HOCl$, а фагоциты генерируют хлорноватистую кислоту в больших количествах при оксидативном стрессе, предполагаем, что нейтрофилы могут быть мишенью для этого альдегида.

Материалы и методы измерений. Использованы декстран, гистопак-1077, питательная среда RPMI-1640, люминол, DPI (дифенилиодониум), АВАН (гидразид 4-аминобензойной кислоты), LY294002, SB202190, SP600125, G66976, аспирин, индометацин, МК-886, JC-1, пропидиум иодид (PI), бычий сывороточный альбумин (BSA), Triton X-100, *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma, США), Fura-2AM, Alexa Fluor 532 Phalloidin (Thermo Fisher Scientific, США), набор для определения апоптоза Annexin V-FITC (Trevigen, США), компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора (СБСР) Эрла (Анализ X, Беларусь). 2-ГД синтезирован на кафедре органической химии химического факультета БГУ (Минск, Беларусь). 2-ГД растворялся в смеси хлороформ:метанол в объемном соотношении 2:1. Дисперсия этого альде-

гида приготовлена, как описано в [24]. В качестве контрольного раствора использован ФБР, содержащий 0.18 % BSA и 150 ммоль/л NaCl.

Нейтрофилы выделены из крови здоровых людей в градиенте плотности гистопак-1077 по стандартной методике [25]. Примесь эритроцитов удалялась с помощью гипотонического лизиса, после чего восстанавливалась осмотичность раствора добавлением 0.15 моль/л NaCl. Суспензию клеток дважды отмывали в 0.15 моль/л NaCl. Полученную фракцию клеток суспензировали в СБСР Эрла при pH 7.2. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии ≥ 96 %. Выживаемость клеток оценена флуоресцентным методом с использованием PI на спектрофлуориметре CM 2203 (“Солар”, Беларусь). В суспензию нейтрофилов (1 млн/мл) вносили контрольный раствор или 2-ГД (0.35 и 35 мкмоль/л) и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. В пробу вносили 1 мкмоль/л PI. Образцы перемешивали в течение 5 мин и измеряли интенсивность флуоресценции ($\lambda_{\text{возб}} = 530$ нм, $\lambda_{\text{рег}} = 640$ нм). Затем клетки разрушали с помощью 10 %-ного раствора Triton X-100 и регистрировали интенсивность флуоресценции. Выживаемость клеток рассчитывали по методике [26].

Образование АФКХ оценивалось хемиллюминесцентным методом при температуре 37 °С и pH 7.4 с применением в качестве эмиттера свечения люминола на хемиллюминиметре БХЛ-1 (БГУ, Беларусь) с использованием системы получения и обработки информации Unichrom (Новые аналитические системы, Беларусь). Измерения проведены в среде СБСР Эрла. К суспензии нейтрофилов (1 млн/мл) добавляли контрольный раствор либо 2-ГД (0.35 и 35 мкмоль/л) и инкубировали с этими добавками в течение 30 мин. Для исследования влияния 2-ГД на процессы внутриклеточной сигнализации к клеткам добавляли 1 мкмоль/л DPI (ингибитор НАДФН-оксидазы), 0.1 мкмоль/л АВАН (ингибитор МПО), 100 мкмоль/л индометацина (ингибитор фосфолипазы А2 (ФЛА2)), 1 мкмоль/л аспирина (ингибитор циклооксигеназы 2 (ЦО)), 1 мкмоль/л МК-886 (ингибитор липоксигеназы (ЛО)), 0.1 мкмоль/л LY294002 (ингибитор фосфоинозитол-3-киназы (ФИЗК)), 0.1 мкмоль/л G6b976 (ингибитор протеинкиназы С (ПКС)), 0.1 мкмоль/л SP600125 (ингибитор JNK-МАП-киназы), 0.3 мкмоль/л SB202190 (ингибитор p38-МАП-киназы) и инкубировали в течение 30 мин. После этого суспензию клеток наслаивали на дно стеклянной кюветы диаметром 30 мм. Затем в анализируемую пробу вносили люминол ($2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л) и регистрировали кинетические зависимости интенсивности ЛХЛ клеток при адгезии к стеклу. После этого в кювету добавляли 0.1 мкмоль/л fMLP и регистрировали ЛХЛ в течение 10 мин. Интегральную интенсивность ЛХЛ (I) определяли как площадь под кинетической кривой, регистрируемой в течение 10 мин, суммарную интенсивность ЛХЛ ($\sum I_{\text{ХЛ}}$) — как отношение $\sum I / \sum I_0 \cdot 100$ %. При использовании ингибиторного анализа $\sum I_{\text{ХЛ}}$ определяли как $\sum I_i / \sum I_{i0} \cdot 100$ %, где $\sum I$ — интенсивность ЛХЛ в присутствии 2-ГД, $\sum I_0$ — интенсивность ЛХЛ в отсутствие 2-ГД, $\sum I_i$ — интенсивность ЛХЛ в присутствии ингибитора и 2-ГД, $\sum I_{i0}$ — интенсивность ЛХЛ в присутствии ингибитора в отсутствие 2-ГД.

Секреторная дегрануляция изучена по выходу лизоцима из клеток [27]. К суспензии клеток (2 млн/мл) добавляли контрольный раствор либо 2-ГД (0.35 и 35 мкмоль/л) и инкубировали в течение 20 мин при 37 °С. После этого образцы центрифугировали в течение 10 мин при 600g. Активность лизоцима в супернатанте определена по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрическим методом на спектрофлуориметре CM 2203 (“Солар”, Беларусь). Результаты представлены как процент от общей активности фермента, высвобождающегося из нейтрофилов после обработки 0.1 %-ным раствором Triton X-100.

Изменение мембранного митохондриального потенциала нейтрофилов ($\Delta\Psi_m$) оценено с помощью флуоресцентного зонда JC-1 [28]. Суспензию нейтрофилов (2 млн/мл) инкубировали с 1 мкмоль/л JC-1 в течение 15 мин, дважды промывали клетки фосфатным буфером и регистрировали флуоресценцию на спектрофлуориметре CM 2203 (“Солар”, Беларусь) в течение 2 мин. Затем к образцу добавляли контрольный раствор или 2-ГД (0.35 и 35 мкмоль/л) и регистрировали флуоресценцию в течение 20 мин. Отношение интенсивностей флуоресценции при 590 и 530 нм (I_{590}/I_{530}) пропорционально $\Delta\Psi_m$.

Концентрация ионов несвязанного цитозольного Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) определена с помощью флуоресцентного зонда Fura 2-AM ($\lambda_{\text{возб}} = 340$ и 380 нм, $\lambda_{\text{рег}} = 510$ нм) на спектрофлуориметре CM 2203 (“Солар”, Беларусь). Пробоподготовка и калибровка проведены по методике [29]. Затем клеточную суспензию помещали в кварцевую кювету и регистрировали флуоресценцию в течение 2 мин. После этого к образцу добавляли контрольный раствор или 2-ГД (0.35 и 35 мкмоль/л) и регистрировали флуоресценцию в течение 20 мин.

Состояние цитоскелета нейтрофилов при действии 2-ГД оценивалось с помощью Alexa Fluor 532 Phalloidin [9]. Клетки подвергались адгезии на поверхности стекла 20 мин в отсутствие и в присут-

ствии 2-ГД в концентрациях 0.35 и 35 мкмоль/л. Образцы анализировали с помощью конфокального сканирующего микроскопа Nano Finder High End (Tokyo Instruments, Япония—Lotis ТП, Беларусь). Интегральная интенсивность флуоресценции Alexa Fluor 532 в клетках соответствует концентрации F-актина в нейтрофилах.

Апоптоз нейтрофилов оценивался с помощью набора Annexin V-FITC по методике [30]. Нейтрофилы в среде RPMI инкубировали с контрольным раствором или 2-ГД (0.35 и 35 мкмоль/л) в течение 4 ч. Затем клетки окрашивали Annexin V-FITC и PI в течение 10 мин. Измерения проводили с помощью проточного цитофлуориметра BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США).

Для статистической обработки результатов использован однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Различия между контрольной и экспериментальными группами проанализированы с помощью теста Даннета. Результаты представлены как среднее значение трех и более независимых экспериментов \pm стандартное отклонение. Результаты считаются достоверными при $P < 0.05$.

Результаты и их обсуждение. Для определения влияния 2-ГД на формирование “респираторного взрыва” нейтрофилы стимулировали к фагоцитозу адгезией к поверхности стекла и действием хемотаксического пептида N-формилметиониллейцилфенилаланина (fMLP). На рис. 1 представлены кинетические зависимости ЛХЛ клеток, не обработанных и обработанных 2-ГД в концентрации 0.35 мкмоль/л. Видно, что предварительное инкубирование клеток с 2-ГД приводит к увеличению интенсивности ЛХЛ как при адгезии, так и при добавлении fMLP. На рис. 2 показано влияние 2-ГД на суммарную интенсивность ЛХЛ стимулированных к фагоцитозу клеток. Поскольку интегральная интенсивность ЛХЛ отражает суммарный выход АФКХ [31], эффекты, вызываемые 2-ГД в нейтрофилах, зависят от его концентрации: 0.35 мкмоль/л этого альдегида вызывают повышение, 35 мкмоль/л — снижение выхода АФКХ в нейтрофилах в процессе формирования отклика клеток на оба типа стимуляции.

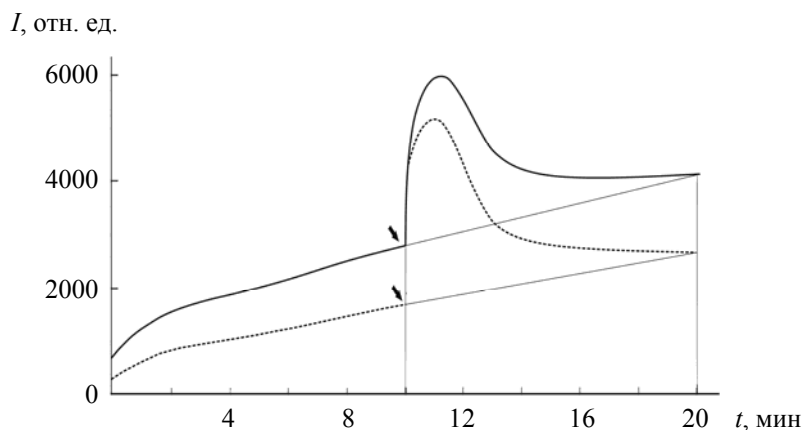


Рис. 1. Кинетические зависимости интенсивности ЛХЛ нейтрофилов, стимулированных адгезией и fMLP в отсутствие (пунктир) и в присутствии 0.35 мкмоль/л 2-ГД (сплошная линия); [люминол] = $2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, [fMLP] = $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л, измерения в СБСР Эрла (pH 7.2) при 37 °С; стрелками указан момент добавления fMLP

Полагаем, что влияние 2-ГД на способность нейтрофилов генерировать АФКХ связано с праймирующим действием этого альдегида. Снижение продукции АФКХ клетками может быть обусловлено цитотоксическими эффектами 2-ГД. Для проверки этого предположения изучена жизнеспособность нейтрофилов, обработанных 2-ГД в концентрациях 0.35—100 мкмоль/л. Инкубирование нейтрофилов с исследуемым альдегидом в течение 1 ч не приводит к изменению количества живых клеток по сравнению с контролем (графические данные не приводятся). Из этого следует, что вызываемые 2-ГД эффекты не обусловлены его цитотоксичностью в отношении нейтрофилов.

Формирование “респираторного взрыва” в нейтрофилах обусловлено модификацией многочисленных процессов внутриклеточной сигнализации [32, 33]. Основные источники АФКХ в нейтрофилах — НАДФН-оксидаза и МПО [19, 34]. С помощью специфических ингибиторов изучен вклад этих ферментов в ЛХЛ стимулированных fMLP клеток в отсутствие и в присутствии 2-ГД в концентрации 0.35 мкмоль/л, вызывающей увеличение выхода АФКХ. Результаты представлены на рис. 3 и

в табл. 1. Видно, что ингибитор НАДФН-оксидазы (DPI) полностью подавляет вызываемое 2-ГД увеличение суммарного выхода ЛХЛ. В присутствии ингибитора МПО (АВАН) интенсивность ЛХЛ в присутствии 2-ГД снижается на 30 % по сравнению с контролем (с АВАН и без 2-ГД). Из этих данных следует, что влияние 2-ГД на выход АФКХ связано со значительным увеличением вклада НАДФН-оксидазы и МПО в этот процесс.

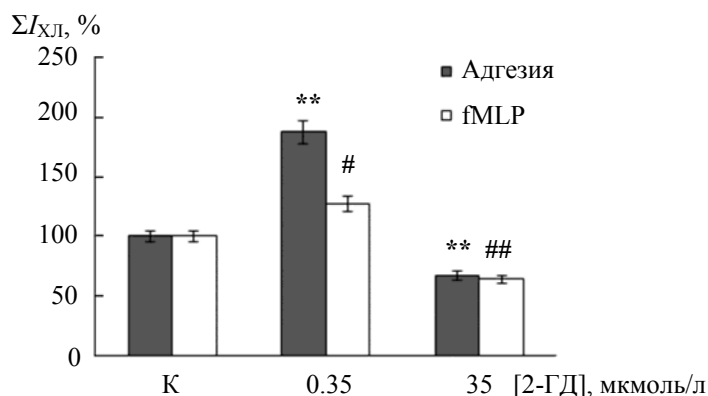


Рис. 2. Влияние 2-ГД на ЛХЛ нейтрофилов, стимулированных адгезией и хемотаксическим пептидом fMLP: К — контроль (клетки, не обработанные 2-ГД); время инкубирования клеток с 2-ГД 30 мин; $\Sigma I_{\text{ЛЛ}}$ — суммарная интенсивность ЛХЛ, измеренная в течение 10 мин при адгезии либо после добавления fMLP; [люминол] = $2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, [fMLP] = $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 5$); ** $P < 0.01$ по сравнению с контролем для адгезии; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ по сравнению с контролем для fMLP

Еще одним источником активных метаболитов в нейтрофилах является арахидоновая кислота (АК), которая высвобождается из фосфолипидов под действием ФЛА2 [35]. АК подвергается аутоокислению с образованием супероксидных анион-радикалов и/или активирует сборку НАДФН-оксидазного комплекса. Кроме того, АК подвергается метаболизму по оксигеназному либо липоксигеназному пути, что также оказывает влияние на выход АФКХ [35, 36]. Из табл. 1 и рис. 3 видно, что ингибирование ФЛА2 и ЦО приводит к увеличению продукции АФКХ в присутствии 2-ГД в 3.39 и 2.87 раза по сравнению с контролем (для образцов, не содержащих ингибиторы, $\Sigma I / \Sigma I_0 = 1.27$). В то же время ингибирование ЛО приводит к отмене повышающего эффекта исследуемого альдегида и значительно подавляет ЛХЛ ($\Sigma I_i / \Sigma I_{i0} = 0.76$). Полученные данные свидетельствуют о том, что 2-ГД в концентрации 0.35 мкмоль/л вызывает перераспределение вкладов ФЛА2 и ферментов метаболизма АК в повышающее влияние этого альдегида на продукцию АФКХ нейтрофилами.

ФИЗК также является важным компонентом сигнальных путей, вовлеченных в продукцию АФКХ нейтрофилами [37]. Индуцируя образование фосфоинозитол-3-фосфата, этот фермент принимает участие в мобилизации несвязанных ионов кальция в цитоплазме и активации ряда МАП-киназ, таких как ПКС, JNK и p38 [37, 38]. ПКС стимулирует сборку НАДФН-оксидазного комплекса [39]. JNK- и p38-МАПК являются проапоптотическими белками [40]. Как показано на рис. 3 и в табл. 1, ингибирование ФИЗК и p38-МАПК не оказывает влияния на повышение выхода ЛХЛ, обусловленного действием на клетки 2-ГД, ингибирование ПКС немного увеличивало, а ингибирование JNK полностью отменяло вызываемый 2-ГД эффект.

Известно, что активация p38-МАПК приводит к усилению секреторной дегрануляции, что реализуется в высвобождении МПО из клеток и увеличении продукции НОС1/ОСГ во внеклеточное пространство [41]. Отсутствие вклада p38-МАПК в “респираторный взрыв” хорошо согласуется с данными, полученными при спектрофотометрическом изучении влияния 2-ГД на выход лизоцима из нейтрофилов (табл. 2). Видно, что секреция лизоцима во внеклеточную среду не изменяется после инкубирования клеток с этим альдегидом в течение 20 мин. Это свидетельствует об отсутствии влияния 2-ГД на секреторную дегрануляцию нейтрофилов. Из полученных данных следует, что в индуцированное 2-ГД повышение продукции АФКХ в нейтрофилах вовлечены такие компоненты путей

трансдукции активационного сигнала, как НАДФН-оксидаза, МПО, ФЛА2 и ферменты метаболизма АК, а также JNK МАПК.

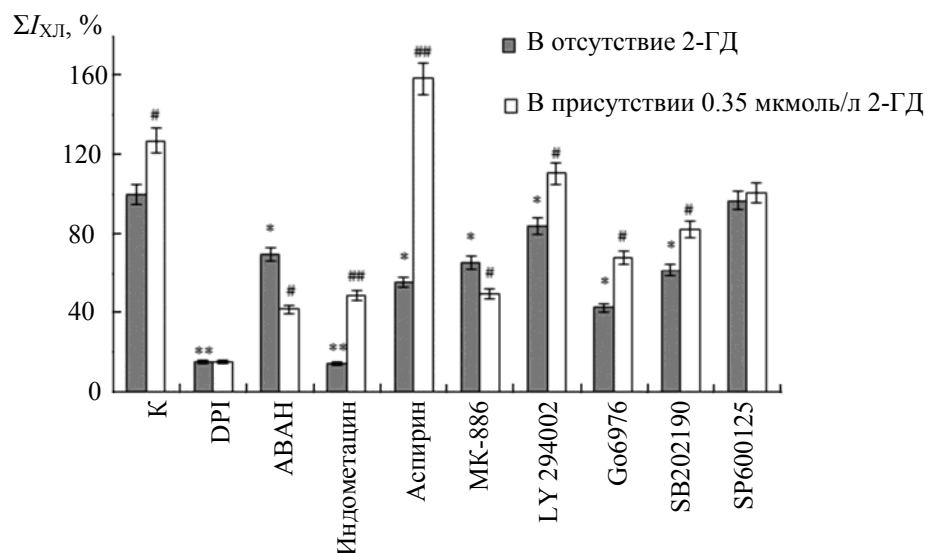


Рис. 3. Влияние 2-ГД (0.35 мкмоль/л) на генерацию АФКХ нейтрофилами, стимулированными хемотаксическим пептидом fMLP в присутствии ингибиторов компонентов сигнальных путей: DPI — ингибитор НАДФН-оксидазы, АВАН — ингибитор МПО, индометацин — ингибитор ФЛА2, аспирин — ингибитор ЦО2, МК-886 — ингибитор ЛО, LY294002 — ингибитор ФИЗК, Gö6976 — ингибитор ПКС, SB202190 — ингибитор p38-МАПК, SP600125 — ингибитор JNK-МАПК. К — контроль (клетки, не обработанные ингибиторами); время инкубирования клеток с 2-ГД и ингибиторами 30 мин; $\Sigma I_{ХЛ}$ — суммарная интенсивность ЛХЛ, измеренная в течение 10 мин после добавления fMLP; [люминол] = $2.5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, [fMLP] = $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л; результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($n = 5$); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ по сравнению с контролем, не содержащим 2-ГД, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ по сравнению с соответствующим ингибитором, не содержащим 2-ГД

Т а б л и ц а 1. Влияние ингибиторов компонентов сигнальных путей на интенсивность ЛХЛ, обусловленную действием 2-гексадеценаля на стимулированные fMLP нейтрофилы

Фермент	Ингибитор	ΣI_{i0} , %	ΣI_i , %	$\Sigma I_i / \Sigma I_{i0}$
НАДФН-оксидаза	DPI	14.86 \pm 0.68	15.12 \pm 0.56	1.02
МПО	АВАН	69.81 \pm 2.3	41.97 \pm 3.14	0.60
ФЛА2	Индометацин	14.29 \pm 0.49	48.43 \pm 1.95	3.39
ЦО2	Аспирин	55.27 \pm 2.23	158.6 \pm 6.3	2.87
ЛО	МК-886	65.55 \pm 1.72	49.8 \pm 2.12	0.76
ФИЗК	LY294002	84.29 \pm 2.78	110.5 \pm 4.76	1.31
ПКС	Gö6976	42.65 \pm 1.51	68.08 \pm 2.47	1.59
p38-МАПК	SB202190	61.69 \pm 2.83	82.14 \pm 3.22	1.33
JNK-МАПК	SP600125	96.81 \pm 3.02	100.82 \pm 3.94	1.04

П р и м е ч а н и е: ΣI_{i0} — интенсивность ЛХЛ в присутствии ингибитора в отсутствие 2-ГД, ΣI_i — интенсивность ЛХЛ в присутствии ингибитора и 2-ГД; [2-ГД] = 0.35 мкмоль/л; контроль (в отсутствие ингибиторов): $\Sigma I_i / \Sigma I_{i0} = 1.27$, где ΣI_{i0} — интенсивность ЛХЛ в отсутствие 2-ГД, ΣI_i — интенсивность ЛХЛ в присутствии 2-ГД; [fMLP] = $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л.

Т а б л и ц а 2. Влияние 2-гексадеценаля на функциональную активность нейтрофилов

Концентрация 2-ГД, мкмоль/л	0	0.35	35
Секреторная дегрануляция (выход лизоцима из клеток), %	21±2.1	20.36±2.3	20.26±1.9
[Ca ²⁺] _i , нМ	164.4±8	186.27±7.8	279.33±10.5*
Изменение митохондриального потенциала (ΔΨ _м), %	100	93.09±1.7	68.60±0.9**
Количество апоптотических клеток, %	41.6±2.2	43.6±2.7	79.6±3.4*
Изменение цитоскелета (уровень F-актина), %	1.66±0.15	3.34±0.43*	3.94±0.25*

П р и м е ч а н и е: [Ca²⁺]_i — концентрация несвязанных ионов кальция в цитоплазме; результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (*n* = 3); **P* < 0.05, ***P* < 0.01 по сравнению с контролем, не содержащим 2-ГД.

Как отмечалось ранее, увеличение концентрации 2-ГД с 0.35 до 35 мкмоль/л вызывает снижение выхода АФКХ в нейтрофилах по сравнению с контролем, причем этот эффект не связан с цитотоксическим действием исследуемого альдегида (рис. 2). Полагаем, что ослабление функциональной активности нейтрофилов после обработки 35 мкмоль/л 2-ГД обусловлено индуцированием апоптоза.

Известно, что индуцирование апоптоза сопровождается модификацией цитоскелета, увеличением концентрации несвязанных ионов кальция в цитоплазме, уменьшением мембранного митохондриального потенциала [42, 43]. Исследовано влияние 2-ГД на эти свойства клеток с использованием специфических флуоресцентных зондов (табл. 2). В отличие от более низкой концентрации 35 мкмоль/л 2-ГД вызывает значительное увеличение [Ca²⁺]_i и снижение митохондриального потенциала (ΔΨ_м), тогда как увеличение F-актина наблюдается и после обработки нейтрофилов 0.35 мкмоль/л 2-ГД. Увеличение уровня F-актина в клетках свидетельствует о реорганизации цитоскелета [44]. В [45] показано, что модификация цитоскелета сопряжена с изменением процессов внутриклеточной сигнализации, связанных как с активацией, так и с ингибированием метаболизма. Методом проточной цитометрии показано, что этот альдегид в концентрации 0.35 мкмоль/л не влияет, а в концентрации 35 мкмоль/л повышает количество апоптотических клеток в образце в ~2 раза (табл. 2).

Заключение. С использованием метода люминолопосредованной хемилюминесценции показано регуляторное влияние 2-гексадеценаля на генерацию активных форм кислорода и хлора в нейтрофилах, определен вклад в формирование “респираторного взрыва” НАДФН-оксидазы, миелопероксидазы, JNK-МАПК, ФЛА2 и ферментов метаболизма арахидоновой кислоты, что свидетельствует о модификации процессов внутриклеточной сигнализации. С помощью флуоресцентных методов установлено, что 2-гексадеценаль вызывает модификацию цитоскелета, повышение содержания внутриклеточных несвязанных ионов кальция, снижение митохондриального потенциала и индуцирует апоптоз. Из полученных результатов следует, что 2-гексадеценаль при действии на нейтрофилы может выполнять роль сигнальной молекулы.

- [1] C. Nathan. *Nat. Rev. Immunol.*, **6** (2006) 173—182
 [2] T. N. Mayadas, X. Cullere, C. A. Lowell. *Annu. Rev. Pathol.*, **9** (2014) 181—218
 [3] B. Amulic, C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler, A. Zychlinsky. *Annu. Rev. Immunol.*, **30** (2012) 459—489
 [4] R. Grecian, M. K. B. Whyte, S. R. Walmsley. *Br. Med. Bul.*, **128** (2018) 5—14
 [5] A. C. Carr, C. L. Hawkins, S. R. Thomas, R. Stocker, B. Frei. *Free Radic. Biol. Med.*, **30**, N 5 (2001) 526—536
 [6] J. M. Robinson. *Histochem. Cell Biol.*, **130** (2008) 281—297
 [7] J. Arnhold, J. Flemmig. *Arch. Biochem. Biophys.*, **500**, N 1 (2010) 92—106
 [8] Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина. *Успехи биол. химии*, **49** (2009) 341—388

- [9] T. Kuznetsova, T. Kulahava, I. Zholnerevich, N. Amaegberi, G. Semenkov, O. Shadyro, J. Arnold. *Mol. Immunol.*, **87** (2017) 317—324
- [10] G. Semenkov, I. Zholnerevich, T. Kulahava, Z. Kvacheva. *Free Rad. Biol. Med.*, **120**, Suppl. 1 (2018) S100
- [11] A. A. Krjukov, G. N. Semenkov, S. N. Cherenkevich, V. Gerein. *BioFactors*, **26** (2006) 283—292
- [12] B. Halliwell, M. V. Clement, L. H. Longa. *FEBS Lett.*, **486** (2000) 10—13
- [13] M. M. Tarpey, D. A. Wink, M. B. Grisham. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **286** (2004) 431—444
- [14] F. Caldefie-Che'zet, S. Walrand, C. Moinard, A. Tridon, J. Chassagne, M.-P. Vasson. *Clin. Chim. Acta*, **319** (2002) 9—17
- [15] C. P. LeBel, H. Ischiropoulos, S. C. Bondy. *Chem. Res. Toxicol.*, **5** (1992) 227—231
- [16] M. Karlsson, T. Kurz, U. T. Brunk, S. E. Nilsson, C. I. Frennesson. *Biochem. J.*, **428** (2010) 183—190
- [17] S. L. Hempel, G. R. Buettner, Y. Q. O'Malley, D. A. Wessels, D. M. Flaherty. *Free Radic. Biol. Med.*, **27** (1999) 146—159
- [18] B. Kalyanaramana, V. Darley-Usmar, K. J. A. Davies, P. A. Dennery, H. J. Formanc, M. B. Grisham, G. E. Mann, K. Moore, L. J. Roberts II, H. Ischiropoulos. *Free Radic. Biol. Med.*, **52**, N 1 (2012) 1—6
- [19] N. Bartke, Y. A. Hannun. *J. Lipid Res.*, **50** (2009) 591—596
- [20] O. Shadyro, A. Lisovskaya, G. Semenkov, I. Edimecheva, N. Amaegberi. *Lipid Insight.*, **8** (2015) 1—9
- [21] Н. В. Амаэбери, Г. Н. Семенкова, А. Г. Лисовская, З. Б. Квачева, О. И. Шадыро. *Биофизика*, **64**, № 3 (2019) 544—551
- [22] N. V. Amaegberi, G. N. Semenkov, Z. B. Kvacheva, A. G. Lisovskaya, S. V. Pinchuk, O. I. Shadyro. *Cell Biochem. Funct.* (2019) 1—9
- [23] A. Kumar, H. S. Byun, R. Bittman, J. Saba. *Cell Signal.*, **23** (2011) 1144—1152
- [24] Z. Liu, Y. Gong, H. S. Byun, R. Bittman. *New J. Chem.*, **34** (2010) 470—475
- [25] A. Böyum. *Scand. J. Immunol.*, **5** (1976) 9—15
- [26] F. Kato, M. Tanaka, K. Nakamura. *Toxicol. in Vitro*, **13** (1999) 923—929
- [27] D. Shugar. *Biochim. Biophys. Acta*, **8** (1952) 302—309
- [28] F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo. *Bio. Protoc.*, **9**, N 1 (2019) 1—13
- [29] R. A. Hirst, C. Harrison, K. Hirota, D. G. Lambert. *Methods in Molecular Biology, Calcium Signaling Protocols: 2nd ed.*, Totowa, Humana Press Inc. (1997) 37—45
- [30] A. Ishaque, M. Al-Rubeai. In: *Methods in Biotechnology, Animal Cell Biotechnology, Methods and Protocols, 2nd ed.*, Totowa, Humana Press Inc. (2007) 285—299
- [31] A. I. Kavalenka, G. N. Semenkov, S. N. Cherenkevich. *Cell Tissue Biol.*, **1**, N 6 (2007) 551—559
- [32] J. Zhang, X. Wang, V. Vikash, Q. Ye, D. Wu, Y. Liu, W. Dong. *Oxid. Med. Cell. Longev.* (2016); ID 4350965, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4350965>
- [33] A. Mo'csai, B. Walzog, C. A. Lowell. *Cardiovasc. Res.*, **107** (2015) 373—385
- [34] B. M. Babior, J. D. Lambeth, W. Nauseef. *Arch. Biochem. Biophys.*, **397** (2002) 342—344
- [35] B. Samuelsson. *Z. Rheumatol.*, **50**, Suppl. 1 (1991) 3—6
- [36] V. S. Hanna, E. A. A. Hafez. *J. Adv. Res.*, **11** (2018) 23—32
- [37] K. Futosi, S. Fodor, A. Mócsai. *Int. Immunopharmacol.*, **17** (2013) 638—650
- [38] M. Reyes-Reyes, N. Mora, A. Zentella, C. Rosales. *J. Cell Sci.*, **114** (2001) 1579—1589
- [39] A. Bertram, K. Ley. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, **59**, N 2 (2011) 79—87
- [40] G. Huang, L. Z. Shi, H. Chi. *Cytokine*, **48**, N 3 (2009) 161—169
- [41] D. Kim, C. L. Haynes. *Analyst*, **138**, N 22 (2013) 1—17
- [42] S. Elmore. *Toxicol. Pathol.*, **35** (2007) 495—516
- [43] P. Pinton, C. Giorgi, R. Siviero, E. Zecchini, R. Rizzuto. *Oncogen.*, **27**, N 50 (2008) 6407—6418
- [44] E. A. Papakonstanti, C. Stournaras. *FEBS Lett.*, **582** (2008) 2120—2127
- [45] G. Forgacs, S. H. Yook, P. A. Janmey, H. Jeong, C. G. Burd. *J. Cell Sci.*, **117** (2004) 2769—2775