

## ПРИМЕНЕНИЕ ЦЕЛЕСТИНОВОГО СИНЕГО В И ГАЛЛОЦИАНИНА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ВЛИЯНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПРОДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА И ГАЛОГЕНОВ НЕЙТРОФИЛАМИ

В. Е. Реут<sup>1\*</sup>, Д. В. Григорьева<sup>1</sup>, И. В. Горудко<sup>1</sup>,  
А. В. Соколов<sup>2,3,4</sup>, О. М. Панасенко<sup>4,5</sup>

УДК 547.867.6+616.155.34

<sup>1</sup> Белорусский государственный университет,  
220030, Минск, Беларусь; e-mail: ReutVE@bsu.by

<sup>2</sup> ФГБНУ “Институт экспериментальной медицины”,  
197376, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: biochemsokolov@gmail.com

<sup>3</sup> Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034, Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup> Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА,  
119435, Москва, Россия; e-mail: o-panas@mail.ru

<sup>5</sup> Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова  
Минздрава России, 117997, Москва, Россия

(Поступила 21 апреля 2020)

Исследовано влияние лекарственных препаратов (дапсона, парацетамола и изониазида) на продукцию активных форм кислорода и галогенов нейтрофилами с применением стандартного флуоресцентного метода на основе скополетина, а также недавно разработанных флуоресцентных методов на основе оксазиновых красителей целестинового синего В и галлоцианина. Целестиновый синий В избирательно реагирует с хлорноватистой кислотой, галлоцианин — преимущественно с супероксидным анион-радикалом, что позволяет выявить регуляторное действие противовоспалительных препаратов на NADPH-оксидазу и миелопероксидазу нейтрофилов, ответственных за продукцию клетками активных форм кислорода и галогенов соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что красители галлоцианин и целестиновый синий В являются перспективными хемосенсорами для изучения воздействия лекарственных препаратов, используемых в противовоспалительной терапии, на респираторный взрыв нейтрофилов.

**Ключевые слова:** парацетамол, дапсон, изониазид, активация нейтрофилов, окислительный стресс, активные формы кислорода, активные формы галогенов.

We investigated the influence of drugs (dapsone, paracetamol and isoniazid) on the reactive oxygen and halogen species production by neutrophils. The standard fluorescent method based on scopoletin, as well as the recently developed fluorescent methods based on oxazine dyes, celestine blue B and gallocyanine, were used for this purpose. Celestine blue B selectively reacts with hypochlorous acid, and gallocyanine reacts mainly with the superoxide radical anion, which permits to reveal the regulatory effect of anti-inflammatory drugs on the neutrophil NADPH-oxidase and myeloperoxidase activity, responsible for the reactive oxygen and halogen species production, respectively. The obtained results indicate that gallocyanine and celestine blue B

---

## APPLICATION OF CELESTINE BLUE B AND GALLOCIANINE FOR STUDYING THE INFLUENCE OF DRUGS ON THE REACTIVE OXYGEN AND HALOGEN SPECIES PRODUCTION BY NEUTROPHILS

V. E. Reut<sup>1\*</sup>, D. V. Grigorieva<sup>1</sup>, I. V. Gorudko<sup>1</sup>, A. V. Sokolov<sup>2,3,4</sup>, O. M. Panasenko<sup>4,5</sup> (<sup>1</sup> Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus; e-mail: ReutVE@bsu.by; <sup>2</sup> Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376, Russia; e-mail: biochemsokolov@gmail.com; <sup>3</sup> St. Petersburg State University, St. Petersburg, 199034, Russia; <sup>4</sup> Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119435, Russia; e-mail: o-panas@mail.ru; <sup>5</sup> Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, 117997, Russia)

*dyes are promising chemosensors to study the effect of drugs used in anti-inflammatory therapy on the neutrophils respiratory burst.*

**Keywords:** *paracetamol, dapsone, isoniazid, neutrophil activation, oxidative stress, reactive oxygen species, reactive halogen species.*

**Введение.** Нейтрофилы (PMNs, полиморфноядерные лейкоциты) являются эффекторными клетками врожденного иммунитета и составляют до 70 % общего числа циркулирующих в крови лейкоцитов. PMNs служат первой линией защиты от вторжения патогенов: клетки быстро активируются при контакте с патоген-ассоциированными молекулярными паттернами, например липополисахаридами, формилсодержащими полипептидами бактерий и др. Реакция PMNs включает хемотаксис к очагу воспаления, фагоцитоз, образование активных форм кислорода (ROS) и галогенов (RHS), дегрануляцию, выброс внеклеточных ловушек (нетоз, NETosis) [1, 2]. Синтез ROS осуществляется NADPH-оксидазным комплексом, генерирующим супероксидный анион-радикал ( $\text{O}_2^-$ ), который спонтанно или с участием супероксиддисмутазы превращается в пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Гемсодержащий фермент азурофильных гранул PMNs — миелопероксидаза (MPO) — катализирует окисление хлорида пероксидом водорода до хлорноватистой кислоты (HOCl). Взаимодействие HOCl с биополимерами бактерий и низших грибов приводит к их гибели, т. е. является существенной частью антимикробной активности PMNs [3—5].

Способность вырабатывать ROS, RHS и их производные, а также вазоактивные липидные медиаторы позволяет PMNs участвовать в воспалительной реакции и модулировать иммунный ответ [4, 6, 7]. Однако мощное действие окислителей на патогены не избирательно. Так, накопление ROS и RHS в очаге воспаления приводит к переокисленному окислению липидов (повреждению клеточных мембран и липопротеинов), окислительному повреждению белков, мутациям в ДНК, активации апоптоза и т. д. [6]. Перечисленные процессы приводят или по крайней мере способствуют развитию хронического воспаления, новообразований и ряда патологий, ассоциированных с активацией PMNs [8, 9]. Также подавление функций PMNs признается важным фактором успешности трансплантации органов. При этом для предотвращения нежелательных последствий активации PMNs может быть использовано несколько стратегий: ингибирование NADPH-оксидазного комплекса или внутриклеточных сигнальных путей, ведущих к его сборке и/или дегрануляции; перехват ROS и RHS [10]; угнетение галогенирующей активности MPO, т. е. продукции HOCl [11]. Применение неспецифических антиоксидантов не защищает от локальной генерации ROS. Скорость взаимодействия между оксидантами и молекулами-мишенями часто превышает скорость их взаимодействия с антиоксидантами [8]. Оксидоредуктазы PMNs, в том числе NADPH-оксидаза и MPO, продуцирующие ROS и RHS, считаются основными фармакологическими мишенями. Это делает поиск и применение препаратов, модулирующих ответы ROS/RHS-генерирующих ферментных систем, более перспективным направлением противовоспалительной терапии.

Существенная методическая проблема регистрации ROS и RHS — их высокая реакционная способность и малое время жизни в средах, содержащих биополимеры. Хемосенсоры должны, с одной стороны, избирательно реагировать с определенным видом окислителя, а с другой — быть толерантными к действию оксидоредуктаз. Так, многие вещества, реагирующие с HOCl, например тетраметилбензидин, тионитробензойная кислота, аскорбиновая кислота, являются субстратами пероксидазного цикла MPO. Не менее важны экономическая доступность приобретения хемосенсора и его стабильность при хранении. В работах [12—14] в качестве чувствительных хемосенсоров типа “turn-on” использованы оксазиновые красители: галлоцианин (GC) для регистрации продукции  $\text{O}_2^-$  и целестиновый синий В (CB) для регистрации HOCl и хлораминов. Данные красители обладают фотостабильностью на протяжении всего эксперимента, и их стоимость минимум на два порядка ниже стоимости аналогов, используемых в научной практике.

Отправная точка для апробации новых методических подходов — использование препаратов, широко применяемых для лечения различных заболеваний. Проведен анализ литературы с целью выбора медикаментов, применяемых во врачебной практике, достаточно хорошо изученных и входящих в список важнейших лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения [15].

Дапсон — противолепрозный лекарственный препарат, используется для лечения туберкулеза [16], герпетического дерматита, астмы, ревматоидного артрита и др. [17, 18], т. е. при заболеваниях, характеризующихся инфильтрацией PMNs. Показано, что дапсон препятствует сборке NADPH-оксидазы через G-белок-зависимый путь [19]. В работах [17, 20, 21] описан метаболизм дапсона очищенной MPO.

Парацетамол (АРАР) — широко используемое анальгетическое и жаропонижающее средство, выполняет роль ингибитора циклооксигеназы 1, 2 и 3 [22, 23]. АРАР является эффективным перехватчиком  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{HOCl}$ , что способствует защите PMNs от апоптоза [22]. Имеются сведения о том, что АРАР ингибирует МРО [24]. Однако передозировка АРАР сопровождается повреждением печени, что может быть связано в том числе с увеличением продукции ROS и RNS нейтрофилами [25—27].

Изониазид (ИНН) — наиболее часто используемый противотуберкулезный пролекарственный препарат, который ингибирует биосинтез миколоевой кислоты в клеточной стенке *Mycobacterium tuberculosis* [28, 29]. Считается, что ИНН также участвует в регуляции продукции ROS/RNS нейтрофилами. Так, ИНН конкурирует с  $\text{Cl}^-$  за окисление в активном центре МРО, что приводит к выходу фермента из цикла галогенирования и ингибированию продукции  $\text{HOCl}$  [28, 30].

Цель настоящей работы — исследование применимости красителей галлоцианина и целестинового синего В для изучения действия дапсона, АРАР и ИНН на продукцию  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  и  $\text{HOCl}$  нейтрофилами человека.

**Материалы и методы исследования. Реактивы.** Цитрат натрия, форбол 12-миристенат 13-ацетат (РМА), N-формил-метил-лейцил-фенилаланин (fMLP), D-глюкоза, СВ, GC, скополетин (SP), гистопак-1077, пероксидаза корней хрена,  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{NaOCl}$ , дапсон, АРАР, ИНН фирмы Sigma-Aldrich (США); декстран Т70 фирмы Roth (Германия). Остальные реактивы получены от заводов “Реахим” (Россия) и “Белмедпрепараты” (Беларусь).

**Выделение PMNs.** Венозную кровь здоровых доноров стабилизировали 109 мМ раствором цитрата натрия (9:1, v/v). 20 мл крови смешивали с 6 %-ным раствором декстрана Т70 (5:1, v/v) и осаждали эритроциты путем седиментации в течение 40—50 мин при комнатной температуре. Слой обогащенной лейкоцитами плазмы собирали в пробирки и центрифугировали в течение 7 мин при 400g, затем путем гипотонического лизиса удаляли примесь эритроцитов. Для этого к осадку клеток добавляли 3 мл охлажденного 0.2 %-ного  $\text{NaCl}$  и 3 мл 1.6 %-ного  $\text{NaCl}$ , содержащего 20 мг/мл D-глюкозы для восстановления изотоничности раствора. Затем снова центрифугировали в течение 7 мин при 400g. При необходимости гипотонический лизис проводили повторно. К клеткам добавляли 6 мл фосфатно-солевого буферного раствора (PBS; 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ  $\text{NaCl}$  и 2.7 мМ  $\text{KCl}$ , pH 7.35), наслаивали на 4 мл гистопак-1077 и центрифугировали в течение 10 мин при 400g при комнатной температуре. Осадок PMNs отмывали PBS, содержащим 2 мг/мл D-глюкозы, и хранили при 4 °С < 6 ч. Содержание PMNs в клеточной суспензии 97—98 %, число жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим  $\geq 96$  %.

**Производство  $\text{H}_2\text{O}_2$  нейтрофилами** оценивали флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре CM 2203 (“Солар”, Минск, Беларусь) с использованием SP — “turn-off” хемосенсора, субстрата пероксидазы хрена [31]. К 1 мл суспензии PMNs ( $10^6$  кл/мл в PBS; 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ; 1 мкМ SP, 20 мг/л пероксидазы хрена, 1 мМ  $\text{NaN}_3$ ; 37 °С) добавляли исследуемые вещества, инкубировали 2—3 мин и добавляли активатор. Для стандартизации условий эксперимента предварительно готовили “коктейль” (SPT) реакционной смеси смешиванием водных растворов 0.2 мМ SP, 2 г/л пероксидазы хрена и 0.1 М  $\text{NaN}_3$  в соотношении 1:2:2 (v/v/v). Кинетику окисления SP регистрировали по уменьшению интенсивности флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 350$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 460$  нм). Скорость продукции  $\text{H}_2\text{O}_2$  клетками ( $\nu$ ) определяли как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой убыли интенсивности флуоресценции SP в результате его окисления  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

**Производство  $\text{O}_2^-$  нейтрофилами** оценивали с использованием флуоресцентного хемосенсора типа “turn-on” — GC [32]. К 1 мл суспензии PMNs ( $10^6$  кл/мл в PBS; 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ ) добавляли 5 мкМ GC, исследуемое вещество, инкубировали 2—3 мин и добавляли активатор. Кинетику превращения GC регистрировали по увеличению интенсивности флуоресценции продукта реакции ( $\lambda_{\text{возб}} = 360$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 490$  нм) на спектрофлуориметре CM 2203 (“Солар”, Минск, Беларусь) при 37 °С и постоянном перемешивании. Для характеристики продукции  $\text{O}_2^-$  использовали скорость превращения GC ( $\nu$ ), которую определяли как тангенс угла наклона начального линейного участка кривой изменения интенсивности флуоресценции, и амплитуду реакции ( $h_7$ ) — изменение интенсивности флуоресценции по сравнению с фоновым уровнем через 7 мин после начала реакции.

**Производство  $\text{HOCl}$  и ее производных** оценивали с использованием флуоресцентного хемосенсора типа “turn-on” — СВ [21]. К 1 мл суспензии PMNs ( $10^6$  кл/мл в PBS; 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 20 мМ таурина) добавляли 20 мкМ СВ, исследуемое вещество, инкубировали 2—3 мин и добавляли активатор. Кинетику образования гликоля СВ регистрировали по увеличению интенсивности флуоресценции ( $\lambda_{\text{возб}} = 460$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 590$  нм) на спектрофлуориметре CM 2203 (“Солар”, Минск, Бела-

реть) при 37 °С и постоянном перемешивании. Для характеристики продукции  $\text{HOCl}$  и образования хлорированных производных использовали скорость превращения СВ ( $v$ ), которую определяли как тангенс угла наклона начального линейного участка кривой изменения интенсивности флуоресценции, и амплитуду реакции ( $h_{15}$ ) — изменение интенсивности флуоресценции по сравнению с фоновым уровнем через 15 мин после начала реакции.

Для активации PMNs использовали хемотаксический пептид fMLP (0.5 мкМ) — стимулятор сборки NADPH-оксидазного комплекса PMNs через  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый сигнальный путь, ассоциированный с G-белками [33], и форболовый эфир PMA (50 нМ), который активирует протеинкиназу C, что вызывает не только сборку NADPH-оксидазы, но и дегрануляцию азурофильных гранул PMNs, содержащих MPO [34, 35]. Следует отметить, что в случае скополетинового теста при активации нейтрофилов PMA речь идет о другом сигнальном пути активации клеток из-за присутствия в системе  $\text{NaN}_3$ , ингибирующего MPO [36].

При исследовании дапсона важна его гидрофобность, поэтому в качестве растворителя применяли ацетон. Для устранения влияния растворителя на результаты исследований в качестве контроля использовали кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции хемосенсоров в присутствии эквивалентной добавки ацетона. Статистическая и графическая обработка данных выполнена с использованием пакета программ OriginPro 2016. Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. Наблюдаемые эффекты считали достоверными при статистической значимости  $p < 0.05$ , рассчитанной по парному критерию Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Влияние лекарственных препаратов на параметры флуоресценции хемосенсоров. Поскольку исследуемые препараты помимо предполагаемого воздействия на функциональную активность PMNs могут непосредственно взаимодействовать с красителями и компонентами тестовых систем, используемых при измерении, на первом этапе исследовано влияние лекарственных препаратов на параметры флуоресценции хемосенсоров в отсутствие клеток.

Исследования спектров поглощения, а также возбуждения и испускания флуоресценции лекарственных препаратов и их аддуктов, образованных при взаимодействии с окислителями, показывают, что в условиях эксперимента они не влияют на флуоресцентные свойства красителей (данные не приведены). Исследовано влияние препаратов на работу SP и СВ тестовых систем (SPT и СВТ). На рис. 1 представлены типичные кинетики изменения интенсивности флуоресценции SP и СВ при действии окислителей и влияние лекарственных препаратов на этот процесс в указанных тестовых системах. Из рис. 1, а видно, что при добавлении APAP к SPT сохраняется ~40 % флуоресценции скополетина, что может быть обусловлено реакцией между  $\text{H}_2\text{O}_2$  и препаратом [22]. Добавление APAP

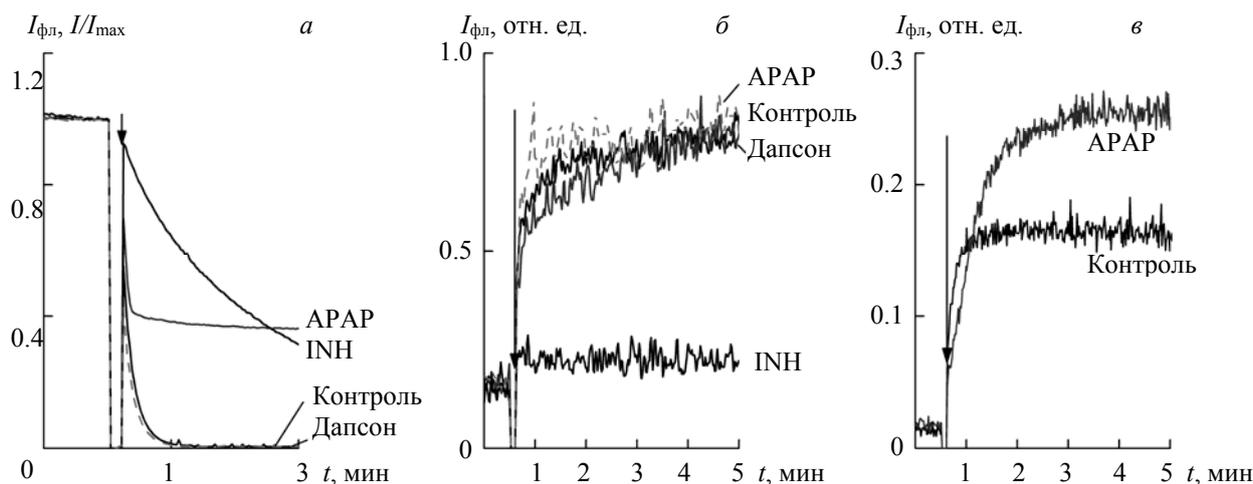


Рис. 1. Влияние APAP (100 мкМ), изониазида (500 мкМ), дапсона (1 мМ) на изменение интенсивности флуоресценции хемосенсоров в тестовых системах при введении 10 мкМ  $\text{H}_2\text{O}_2$  в системе SPT (а), 20 (б) и 40 мкМ (в)  $\text{HOCl}$  в системе СВТ; SPT: PBS с 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 1 мкМ SP, 20 мг/л пероксидазы хрена, 1 мМ  $\text{NaN}_3$ ; СВТ: PBS с 1 мМ  $\text{CaCl}_2$ , 0.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 20 мкМ СВ, 20 мМ таурина;  $T = 37$  °С; стрелкой указан момент добавления окислителей (с дополнениями и изменениями из [37])

в СВТ не приводит к изменениям в кинетике превращения красителя 20 мкМ НОСІ (рис. 1, б), однако при увеличении концентрации окислителя до 40 мкМ (рис. 1, в) увеличивается интенсивность флуоресценции реакционной смеси. Известно [38, 39], что АРАР реагирует с НОСІ с образованием как хлорированных (хлор- и дихлор-4-ацетамидофенол), так и не хлорированных (1,4-бензохинон, N-ацетил-*p*-бензохинонимин) продуктов, т. е. является перехватчиком НОСІ. Отсутствие падения интенсивности флуоресценции СВТ в таких условиях объясняется особенностью используемой тестовой системы. СВ окисляется как НОСІ, так и галогенированными производными, в том числе хлораминами [14], а СВТ содержит таурин, который также конкурирует с АРАР за взаимодействие с НОСІ. Увеличение локальной концентрации НОСІ приводит к накоплению галогенированных продуктов как таурина, так и АРАР, которые, вероятно, и окисляют СВ. Из рис. 1, а также видно, что присутствие ІNH в системе SPT приводит к уменьшению скорости окисления SP. Используемая система содержит пероксидазу хрена. Являясь ее субстратом [40], ІNH конкурирует с SP за фермент, что приводит к снижению скорости окисления SP. Помимо ингибирующего действия на пероксидазу возможна прямая реакция ІNH с НОСІ с образованием изоникотиновой кислоты [41], что объясняет падение интенсивности флуоресценции СВ в присутствии препарата (рис. 1, б). Дапсон не оказывал влияния ни на одну из используемых тестовых систем (рис. 1, а, б).

*Влияние парацетамола на продукцию ROS и RHS нейтрофилами в системах GCT, SPT и СВТ.* Исследовано влияние парацетамола (% от контроля) на генерацию  $\text{O}_2^-$  (GCT),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (SPT) и НОСІ (СВТ) при активации нейтрофилов fMLP или PMA. Результаты экспериментов приведены на рис. 2. Видно, что АРАР в концентрации 0.1—1 мкМ не влияет на параметры флуоресценции GC при активации PMNs как PMA, так и fMLP (рис. 2, а, б). Увеличение концентрации АРАР приводит к увеличению интенсивности флуоресценции GC при активации нейтрофилов fMLP (до 10—100 мкМ АРАР) и PMA (до 100 мкМ АРАР), что может быть связано с усилением генерации  $\text{O}_2^-$ , вероятно,

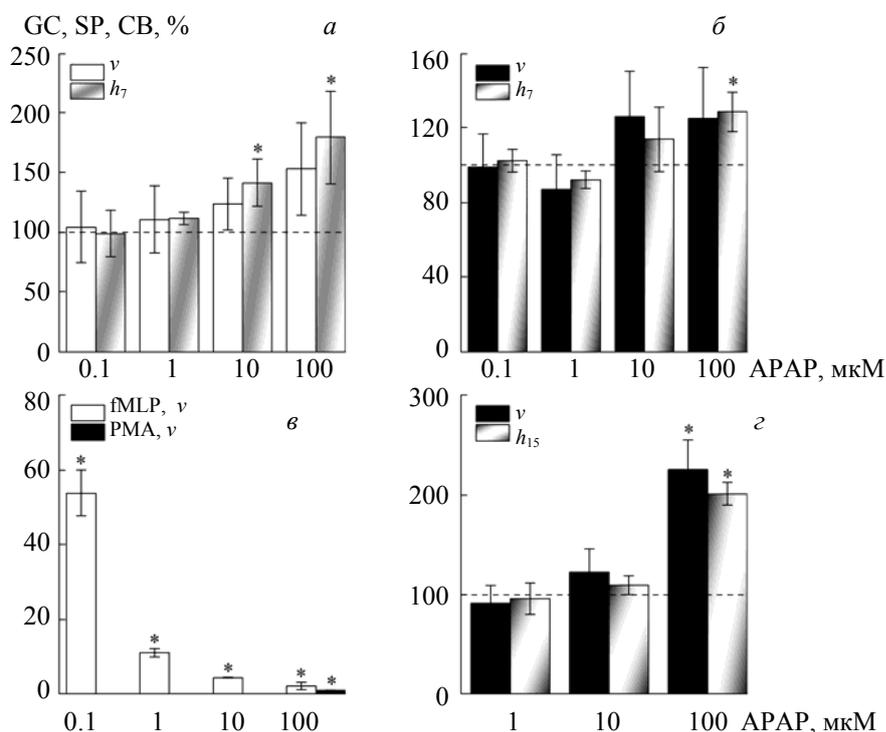


Рис. 2. Влияние АРАР на параметры флуоресценции GC, SP и СВ (*v* и *h* в % от контроля) при активации нейтрофилов 0.5 мкМ fMLP (а) и 50 нМ PMA (б) в системе GCT, 0.5 мкМ fMLP или 50 нМ PMA в системе SPT (в), 50 нМ PMA в системе СВТ (г); GCT: PBS с 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мкМ GC; SPT: PBS с 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ SP, 20 мг/л пероксидазы хрена, 1 мМ NaN<sub>3</sub>; СВТ: PBS с 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мкМ СВ, 20 мМ таурина; T = 37 °C

ввиду стимуляции активности NADPH-оксидазного комплекса. В то же время АРАР уменьшает скорость продукции  $H_2O_2$  (в  $\sim 2$  раза при активации fMLP) уже при концентрации 0.1 мкМ и полностью предотвращает флуоресценцию SP в концентрации 100 мкМ (рис. 2, в), вероятно, благодаря взаимодействию с  $H_2O_2$  [22]. При этом зарегистрировано значительное увеличение параметров флуоресценции СВ (в  $\sim 2$  раза) в присутствии 100 мкМ АРАР (рис. 2, г). Отметим, что 100 мкМ является пиковой концентрацией препарата в плазме крови при однократном пероральном приеме 1 г АРАР, что не выходит за рамки максимальной терапевтической дозы [24]. Исходя из полученных данных с учетом предварительной проверки влияния АРАР на характер взаимодействия хемосенсоров с оксидантами в модельных системах, можно сделать вывод, что 100 мкМ АРАР стимулирует продукцию  $\cdot O_2^-$  нейтрофилами; даже в малых концентрациях АРАР — эффективный перехватчик  $H_2O_2$ ; при образовании HOCl активированными PMNs АРАР в терапевтических концентрациях образует высокорекреационные галогенированные продукты, способные превращать СВ в флуорофор.

*Влияние дапсона на продукцию ROS и RHS нейтрофилами в системах GCT, SPT и CBT.* На рис. 3 суммированы результаты экспериментов по влиянию дапсона (% от контроля относительно эквивалентной добавки ацетона) на генерацию  $\cdot O_2^-$  (GCT),  $H_2O_2$  (SPT) и HOCl (CBT) при активации нейтрофилов fMLP или PMA. Видно, что 500 и 1000 мкМ дапсона ингибируют fMLP-, но не PMA-индуцированное изменение параметров флуоресценции в GCT-системе (рис. 3, а, б). Аналогично в SPT-системе, начиная со 100 мкМ, дапсон ингибирует окисление SP при активации нейтрофилов fMLP, но не PMA (рис. 3, в) и не влияет на продукцию HOCl нейтрофилами при их активации PMA (рис. 3, г). Изменения параметров флуоресценции в GCT и SPT хорошо регистрируются при концентрации дапсона 500 мкМ, что превышает порог токсического действия препарата.

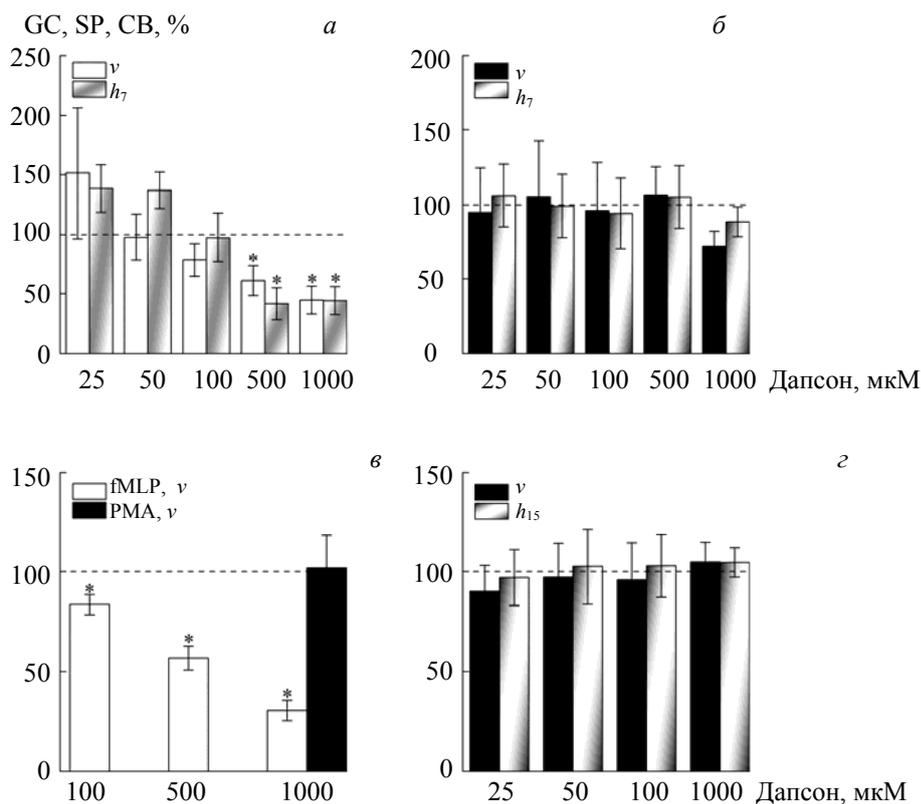


Рис. 3. Влияние дапсона на параметры флуоресценции GC, SP и СВ ( $v$  и  $h$  в % от контроля) при активации нейтрофилов 0.5 мкМ fMLP (а) и 50 нМ PMA (б) в системе GCT, 0.5 мкМ fMLP или 50 нМ PMA в системе SPT (в), 50 нМ PMA в системе CBT (г); GCT: PBS с 1 мМ  $CaCl_2$ , 0.5 мМ  $MgCl_2$ , 5 мкМ GC; SPT: PBS с 1 мМ  $CaCl_2$ , 0.5 мМ  $MgCl_2$ , 1 мкМ SP, 20 мг/л пероксидазы хрена, 1 мМ  $NaN_3$ ; CBT: PBS с 1 мМ  $CaCl_2$ , 0.5 мМ  $MgCl_2$ , 20 мкМ СВ, 20 мМ таурина;  $T = 37^\circ C$

Учитывая, что дапсон не влияет на окисление хемосенсоров в тестовых системах в отсутствие активированных PMNs, можно заключить, что дапсон ингибирует  $\text{Ca}^{2+}$ -зависимый сигнальный путь активации PMNs, ассоциированный с рецепторами G-белков, и это приводит к уменьшению продукции  $\text{O}_2^-$  и  $\text{H}_2\text{O}_2$  [42, 43]; в клеточной среде дапсон не является ни перехватчиком HOCl, ни ингибитором ее продукции.

*Влияние изониазида на продукцию ROS и RNS нейтрофилами в системах GCT, SPT и CBT.* На рис. 4 представлены результаты экспериментов по влиянию INH (% от контроля) на генерацию  $\text{O}_2^-$  (GCT),  $\text{H}_2\text{O}_2$  (SPT) и HOCl (CBT) при активации нейтрофилов fMLP или PMA. Видно, что INH (100–1000 мкМ) не влияет на параметры флуоресценции в GCT-системе (рис. 4, а, б), что может свидетельствовать об отсутствии его влияния на продукцию  $\text{O}_2^-$  нейтрофилами. В SPT-системе INH (500 мкМ) достоверно уменьшает скорость окисления SP под действием  $\text{H}_2\text{O}_2$  (в ~2 раза) при активации PMNs как fMLP, так и PMA (рис. 4, в), что хорошо согласуется с результатами предварительных экспериментов (рис. 1, а), а также с данными [40], свидетельствующими о возможной конкуренции INH с SP за активный центр пероксидазы хрена. В CBT-системе INH в диапазоне концентраций 100–1000 мкМ достоверно уменьшает параметры флуоресценции CB (рис. 4, г), что может быть обусловлено снижением продукции HOCl нейтрофилами. Учитывая влияние INH на HOCl в модельной системе (рис. 1, б), можно предположить, что в клеточной среде действие INH обусловлено не конкуренцией с Cl<sup>-</sup> за окисление в активном центре MPO [30], а прямым взаимодействием с HOCl с образованием, вероятно, негалогенированных продуктов, например изоникотиновой кислоты [41].

Отсутствие влияния препарата на продукцию  $\text{O}_2^-$  противоречит некоторым сообщениям о его антиоксидантном действии [44], но в то же время подтверждает другие экспериментальные данные об отсутствии влияния на функциональную активность PMNs [45], в том числе NADPH-оксидазный комплекс [46, 47].

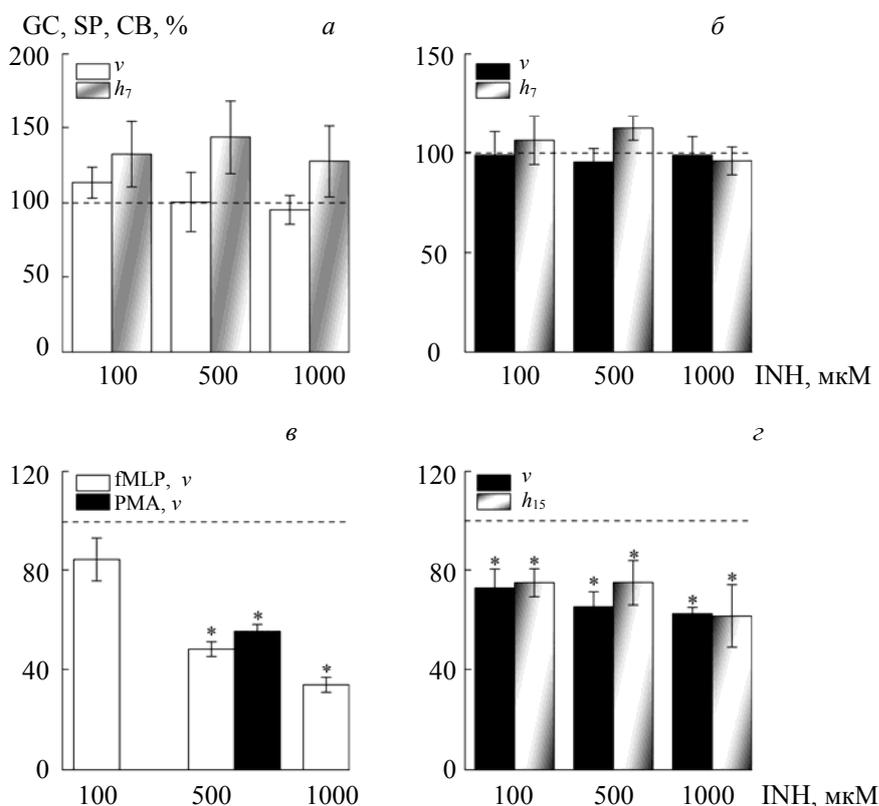


Рис. 4. Влияние INH на параметры флуоресценции GC, SP и CB (v и h в % от контроля) при активации нейтрофилов 0.5 мкМ fMLP (а) и 50 нМ PMA (б) в системе GCT, 0.5 мкМ fMLP и 50 нМ PMA в системе SPT (в), 50 нМ PMA в системе CBT (г); GCT: PBS с 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мкМ GC; SPT: PBS с 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ SP, 20 мг/л пероксидазы хрена, 1 мМ NaN<sub>3</sub>; CBT: PBS с 1 мМ CaCl<sub>2</sub>, 0.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мкМ CB, 20 мМ таурина; T = 37 °C

Таким образом, INH не влияет на активность NADPH-оксидазы PMNs; INH, конкурируя с субстратом за пероксидазу из корней хрена, может снижать пероксидазную активность этого фермента; INH, перехватывая HOCl, может препятствовать окислительному/галогенирующему воздействию HOCl на другие молекулы и клетки. Изменения параметров флуоресценции в SPT-системе хорошо регистрируются при концентрации INH 500 мкМ, что превышает порог токсического действия препарата. Однако в концентрации 100 мкМ INH способен перехватывать HOCl, что следует учитывать при его использовании в клинической практике.

**Заключение.** Использование галлоцианина и целестинового синего В позволяет определить, является ли действие лекарственного препарата направленным на изменения в работе NADPH-оксидантного комплекса, галогенирующей активности миелопероксидазы и/или проявлением антиоксидантных свойств. Применение теста на основе скополетина может быть ограничено в случае, если исследуемое вещество является субстратом присутствующей в системе пероксидазы хрена. В целом полученные результаты согласуются с литературными данными, что позволяет рекомендовать красители галлоцианин и целестиновый синий В для тестирования препаратов, проявляющих антиоксидательную активность, обладающих способностью подавлять внутриклеточные сигнальные пути, ведущие к сборке и активации NADPH-оксидазы лейкоцитов, ингибировать активность гемсодержащих пероксидаз млекопитающих, т. е. лекарств, применяемых при лечении заболеваний, сопровождающихся воспалительными процессами. Исследования с использованием галлоцианина и целестинового синего В способствуют расширению понимания механизмов действия существующих лекарственных средств, а также апробации новых для применения в противовоспалительной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке грантов Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований № Б19PM-024 и № Б20P-215, грантов Российского фонда фундаментальных исследований № 19-54-04004 и № 20-515-00006, гранта Всемирной федерации ученых на 2020—2021 гг.

- [1] N. V. Vorobjeva, B. V. Pinegin. *Biochem. Mosc.*, **79**, N 12 (2014) 1286—1296
- [2] P. H. Liefeld, C. M. Wessels, L. P. Leenen, L. Koenderman, J. Pillay. *Crit. Care*, **20**, N 1 (2016) 73—81
- [3] M. Colitti, B. Stefanon, G. Gabai, M. Gelain, F. Bonsembiante. *Antioxidants*, **8**, N 1 (2019) 28—46
- [4] A. Manda-Handzlik, U. Demkow. In: *Pulmonary Infection*, Ed. M. Pokorski, Springer, Cham (2015) 51—60
- [5] C. Nathan, A. Cunningham-Bussel. *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, N 5 (2013) 349—361
- [6] F. Vatanever, W. C. de Melo, P. Avci, D. Vecchio, M. Sadasivam, A. Gupta, R. Chandran, M. Karimi, N. A. Parizotto, R. Yin, G. P. Tegos, M. R. Hamblin. *FEMS Microbiol. Rev.*, **37**, N 6 (2013) 955—989
- [7] G. Dent, K. F. Rabe, H. Magnussen. *Br. J. Pharmacol.*, **122**, N 4 (1997) 758—764
- [8] K. Brieger, S. Schiavone, Jr. Miller, K. Krause. *Swiss Med. Wkly.*, **142** (2012) 13659—13664
- [9] A. Phaniendra, D. B. Jestadi, L. Periyasamy. *Indian J. Clin. Biochem.*, **30**, N 1 (2015) 11—26
- [10] N. D. Vaziri, B. Rodriguez-Iturbe. *Nat. Clin. Pract. Nephrol.*, **2**, N 10 (2006) 582—593
- [11] E. Malle, P. G. Furtmüller, W. Sattler, C. Obinger. *Br. J. Pharmacol.*, **152**, N 6 (2007) 838—854
- [12] С. О. Козлов, И. В. Кудрявцев, Н. А. Грудина, А. В. Костевич, О. М. Панасенко, А. В. Соколов, В. Б. Васильев. *Acta Biomed. Sci.*, **1**, N 2-3 (2016) 86—91
- [13] В. Е. Луценко, Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, О. М. Панасенко, А. В. Соколов, С. Н. Черенкевич. *Докл. НАН Беларуси*, **63**, № 6 (2019) 730—735
- [14] В. Е. Луценко, Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, С. Н. Черенкевич, Н. П. Горбунов, В. А. Костевич, О. М. Панасенко, А. В. Соколов. *Мед. акад. журн.*, **19**, № 2 (2019) 63—71
- [15] World Health Organization N WHO/MVP/EMP/IAU/2019.06 (2019) 1—60
- [16] G. Wozel, C. Blasum. *Arch. Dermatol. Res.*, **306**, N 2 (2014) 103—124
- [17] J. A. Uetrecht, N. A. Zahid, N. H. Shear, W. D. Biggar. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, N 1 (1988) 274—279
- [18] M. D. Coleman. *Br. J. Dermatol.*, **129**, N 5 (1993) 507—513
- [19] S. M. Debol, M. J. Herron, R. D. Nelson. *J. Leukoc. Biol.*, **62**, N 6 (1997) 827—836
- [20] P. M. Bozeman, D. B. Learn, E. L. Thomas. *Biochem. Pharmacol.*, **44**, N 3 (1992) 553—563

- [21] A. V. Sokolov, V. A. Kostevich, S. O. Kozlov, I. S. Donskyi, I. I. Vlasova, A. O. Rudenko, E. T. Zakharova, V. B. Vasilyev, O. M. Panasenko. *Free Radic. Res.*, **49**, N 6 (2015) 777—789
- [22] M. Freitas, V. M. Costa, D. Ribeiro, D. Couto, G. Porto, F. Carvalho, E. Fernandes. *Toxicol. Lett.*, **219**, N 2 (2013) 170—177
- [23] H. S. Smith. *Pain Phys.*, **12**, N 1 (2009) 269—280
- [24] M. Koelsch, R. Mallak, G. G. Graham, T. Kajer, M. K. Milligan, L. Q. Nguyen, D. W. Newsham, J. S. Keh, A. J. Kettle, K. F. Scott, J. B. Ziegler, D. I. Pattison, S. Fu, C. L. Hawkins, M. D. Rees, M. J. Davies. *Biochem. Pharmacol.*, **79**, N 8 (2010) 1156—1164
- [25] H. Jaeschke. *Hepatology*, **43**, N 6 (2006) 1191—1194
- [26] H. Jaeschke, M. R. McGill, A. Ramachandran. *Drug Metab. Rev.*, **44**, N 1 (2012) 88—106
- [27] H. Jaeschke. *Toxicol. Lett.*, **144**, N 3 (2003) 279—288
- [28] P. Wang, K. Pradhan, X. Zhong, X. Ma. *Acta Pharm. Sin. B*, **6**, N 5 (2016) 384—392
- [29] S. R. Khan, A. G. Morgan, K. Michail, N. Srivastava, R. M. Whittal, N. Aljuhani, A. G. Siraki. *Biochem. Pharmacol.*, **106** (2016) 46—55
- [30] L. V. Forbes, P. G. Furtmüller, I. Khalilova, R. Turner, C. Obinger, A. J. Kettle. *Biochem. Pharmacol.*, **84** (2012) 949—960
- [31] I. V. Gorudko, A. V. Mukhortava, B. Caraher, M. Ren, S. N. Cherenkevich, G. M. Kelly, A. V. Timoshenko. *Arch. Biochem. Biophys.*, **516**, N 2 (2011) 173—181
- [32] В. Е. Луценко, Д. В. Григорьева, С. Н. Черенкевич, О. М. Панасенко, А. В. Соколов, И. В. Горудко. Актуальные вопр. биол. физики и химии, **3**, № 3 (2018) 612—618
- [33] G. T. Nguyen, E. R. Green, J. Mecsas. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **7** (2017) 373—396
- [34] F. R. Sheppard, M. R. Kelher, E. E. Moore, N. J. McLaughlin, A. Banerjee, C. C. Silliman. *J. Leukoc. Biol.*, **78**, N 5 (2005) 1025—1042
- [35] J. Nagaji. *Kurume Med. J.*, **46**, N 3—4 (1999) 157—162
- [36] H. Rosen, S. J. Klebanoff. *J. Exp. Med.*, **149**, N 1 (1979) 27—39
- [37] В. Е. Луценко, Д. В. Григорьева, И. В. Горудко, Е. В. Шамова, А. В. Соколов, С. Н. Черенкевич, О. М. Панасенко. Сб. ст. междунар. конф. "Рецепторы и внутриклеточная сигнализация", 20—24 мая 2019 г., Пущино, **2** (2019) 823—827
- [38] P. J. O'Brien, S. Khan, S. D. Jatoe. In: *Biological Reactive Intermediates IV*, Eds. C. M. Witmer, R. R. Snyder, D. J. Jollow, G. F. Kalf, J. J. Kocsis, I. G. Sipes, Plenum Press, New York (1991) 51—64
- [39] M. Bedner, W. A. MacCrehan. *Environ. Sci. Technol.*, **40**, N 2 (2006) 516—522
- [40] A. Hillar, P. C. Loewen. *Arch. Biochem. Biophys.*, **323**, N 2 (1995) 438—446
- [41] V. Bogdandi, G. Lente, I. Fabian. *RSC Adv.*, **5**, N 83 (2015) 67500—67508
- [42] S. M. Debol, M. J. Herron, R. D. Nelson. *J. Leukoc. Biol.*, **62**, N 6 (1997) 827—836
- [43] T. Suda, Y. Suzuki, T. Matsui, T. Inoue, O. Niide, T. Yoshimaru, H. Suzuki, C. Ra, T. Ochiai. *Br. J. Dermatol.*, **152**, N 5 (2005) 887—895
- [44] D. W. Choi, B. Leininger-Muller, Y. C. Kim, P. Leroy, G. Siest, M. Wellman. *Free Radic. Res.*, **36**, N 8 (2002) 893—903
- [45] B. Okuyan, F. V. Izzettin, M. Sancar, Ö. Ertaş, A. Çevikbaş, Ü. S. Gürer. *Int. Immunopharmacol.*, **5**, N 7-8 (2005) 1337—1342
- [46] B. M. Zeis. *Chemotherapy*, **34**, N 1 (1988) 56—60
- [47] L. G. Kielland, R. A. Vage, G. E. Eide, S. Sørnes, A. Naess. *Chemotherapy*, **57**, N 4 (2011) 339—344