

ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ И СКАВЕНДЖЕРОВ ГИПОГАЛОИДНЫХ КИСЛОТ НА АКТИВАЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЛИПОПРОТЕИНАМИ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ, МОДИФИЦИРОВАННЫМИ ГИПОХЛОРИТОМ

© 2016 г. О.М. Панасенко* **, Е.В. Михальчик*, И.В. Горудко***,
Д.В. Григорьева***, А.В. Соколов* **** ***, В.А. Костевич* ****,
В.Б. Васильев**** ***, С.Н. Черенкевич***

*НИИ физико-химической медицины ФМБА России, 119435, Москва, ул. Малая Пироговская, 1а;

E-mail: o-panas@mail.ru

**Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ,
117997, Москва, ул. Островитянова, 1;

E-mail: o-panas@mail.ru

***Белорусский государственный университет, 220050, Минск, пр. Независимости, 4, Беларусь;

E-mail: irinagorudko@rambler.ru

****Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины,
197376, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12;

E-mail: biochemsokolov@gmail.com

*****Санкт-Петербургский государственный университет,
199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9;

E-mail: vadim@biokemis.ru

Поступила в редакцию 11.11.15 г.

Показано, что липопротейны низкой плотности крови человека, модифицированные хлорноватистой кислотой, стимулируют нейтрофилы, активируя их хемилюминесценцию как в присутствии люминола, так и люцигенина. Исследовано влияние антиоксидантов и скавенджеров хлорноватистой кислоты (глутатиона, таурина, цистеина, метионина, церулоплазмينا и альбумина сыворотки человека) на хемилюминесценцию в присутствии люминола и люцигенина, а также на продукцию H_2O_2 нейтрофилами и на дегрануляцию азурофильных гранул. Показано, что все исследованные соединения по мере увеличения их концентрации снижали хемилюминесценцию нейтрофилов в присутствии люминола, как в ответ на стимуляцию модифицированными липопротейнами низкой плотности, так и на последующее добавление активатора форбол-12-миристан-13-ацетата. В то же время они либо в гораздо меньшей степени влияли, либо не оказывали влияния на хемилюминесценцию нейтрофилов в присутствии люцигенина в аналогичных условиях, а также на продукцию нейтрофилами H_2O_2 . Снижение хемилюминесценции нейтрофилов в большинстве случаев не связано с влиянием указанных соединений на дегрануляцию клеток, а, вероятно всего, обусловлено прямым взаимодействием с активными формами галогенов и кислорода, образующимися при активации нейтрофилов, и/или ингибированием миелопероксидазы. Таким образом, антиоксиданты и скавенджеры хлорноватистой кислоты, присутствующие в организме человека, способны влиять на процесс развития окислительного/галогенирующего стресса и замедлять его, препятствуя активации нейтрофилов.

Ключевые слова: галогенирующий стресс, окислительный стресс, липопротейны низкой плотности, активация нейтрофилов, активные формы галогенов, хемилюминесценция.

Сокращения: МПО – миелопероксидаза; АФГ – активные формы галогенов; ЧСА – альбумин сыворотки крови человека; ЛНП – липопротейны низкой плотности крови человека; АФК – активные формы кислорода; ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат; fMLP – N-формил-Met-Leu-Phe; PBS – фосфатно-солевой буферный раствор; ЛНП-НОС1 – липопротейны низкой плотности, модифицированные под действием НОС1; лм-ХЛ – хемилюминесценция, активированная люминолом; лц-ХЛ – хемилюминесценция, активированная люцигенином.

В организме человека присутствуют ферменты семейства гемсодержащих пероксидаз млекопитающих (донор: H_2O_2 -оксидоредуктазы, КФ 1.11.1.7), к которым принадлежит миелопероксидаза (МПО) [1]. МПО секретируется в результате активации и дегрануляции нейтрофилов в очаге воспаления во внеклеточное пространство и катализирует реакции образования активных форм галогенов (АФГ) – $HOCl$, $HOBr$ и др. – сильных окислителей и галогенирующих агентов [1,2]. С одной стороны, благодаря этой способности пероксидазы осуществляют бактерицидную функцию, защищая организм от патогенов, с другой – участвуют в целом ряде событий, вовлеченных в повреждение клеток и тканей организма-хозяина, что приводит к развитию окислительного/галогенирующего стресса [2,3]. Ряд биологически важных молекул, таких как альбумин сыворотки человека (ЧСА) [4], фосфатидилхолин [5], а также липопротеины низкой плотности (ЛНП) крови [6], модифицированные $HOCl$ или $HOBr$, могут усиливать дегрануляцию нейтрофилов, увеличивая экзоцитоз МПО и усугубляя развитие окислительного/галогенирующего стресса.

Окислительная модификация липопротеинов низкой плотности усугубляется тем, что МПО связывается с их поверхностью [7,8] и, продолжая катализировать образование активных форм галогенов, модифицирует ЛНП, что способствует их захвату субэндотелиальными клетками, накоплению в них холестерина и развитию ранних стадий атеросклероза [6]. Известно, что липопротеины низкой плотности, модифицированные под действием активных форм галогенов, активируют нейтрофилы, увеличивая продукцию клетками активных форм кислорода (АФК), стимулируя их адгезию к эндотелию и дегрануляцию азурофильных и специфических гранул [6,9]. Это приводит к увеличению экзоцитоза МПО и замыкает «порочный» круг образования модифицированных ЛНП [6].

В то же время в организме имеются так называемые антигалогенирующие агенты. Одни из них выступают как скавенджеры за счет большой константы скорости взаимодействия с АФГ. Например, содержащиеся в организме человека метионин, цистеин, глутатион, таурин, аскорбат, урат, карнозин, гистамин, НАДН имеют константы скорости реакции с $HOCl/HOBr$ свыше $10^5 M^{-1}s^{-1}$ [10]. Другие ингибируют ферментативную активность пероксидаз. Например, белок острой фазы воспаления церулоплазмин, связываясь с МПО или пероксидазой эозинофилов, ингибирует их пероксидазную и галогенирующую активности [11–13]. Тиоцианат, конкурируя с галогенидами за соединение I МПО, препятствует образованию АФГ [14,15]. Триптофан, переводя МПО

из соединения I в соединение II, не участвующее в цикле галогенирования, также снижает вероятность образования $HOCl$ и $HOBr$ [16]. От того, насколько сбалансирована работа про- и антигалогенирующих систем организма, зависит вероятность возникновения окислительного/галогенирующего стресса, модификации ЛНП и развития атеросклероза. Ранее нами было показано, что ЧСА, модифицированный в условиях галогенирующего стресса, увеличивал респираторный взрыв нейтрофилов [17]. Целью данной работы было выяснить, как эндогенные соединения, обладающие антиоксидантными и антигалогенирующими свойствами (церулоплазмин, ЧСА, глутатион, таурин, цистеин, метионин), влияют на активацию нейтрофилов под действием липопротеинов низкой плотности, модифицированных в условиях, моделирующих окислительный/галогенирующий стресс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Соли, использованные для приготовления буферных растворов, а также среда Кребса–Рингера (продукт № K4002), $NaOCl$, 10-ацетил-3,7-дигидроксибензоказин (Ampliflu Red), гистопак, *o*-дианизидин, форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА), гидразид 4-аминобензойной кислоты, люминол, люцигенин, трисульфат неомидина, цистеин, восстановленный глутатион, цитрат натрия, скополетин, N-формил-Met-Leu-Phe (fMLP), фенил-агароза, сефакрил S-200 HR, ячейки VivaSpin20 (предел удерживания 1 МДа), супероксиддисмутаза, ЧСА, D-глюкоза, субстрат эластазы MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA, пероксидаза из корней хрена, NaN_3 были получены от фирмы Sigma-Aldrich (США); таурин и метионин – от фирмы Fluka (Швейцария); твин 20, UNO-Sphere Q и агарозный гель A-1,5m для хроматографии – от фирмы Bio-Rad (США); лимфопреп – от фирмы Nycomed (Норвегия).

Стабильный при хранении церулоплазмин с содержанием белка с молекулярным весом 132 кДа свыше 95% и критерием чистоты A_{610}/A_{280} не менее 0,050 выделяли с помощью ионообменной хроматографии цитратной плазмы на UNO-Sphere Q и аффинной хроматографии на неомидин-агарозе [18].

Миелопероксидазу с критерием чистоты A_{430}/A_{280} не менее 0,83 выделяли из экстракта лейкоцитов с помощью аффинной хроматографии на гепарин-агарозе, гидрофобной хроматографии на фенил-агарозе и гель-фильтрации на сефакриле S-200 HR [13].

Концентрацию коммерческого раствора гипохлорита натрия ($NaOCl$) определяли спектрофотометрически по поглощению гипохлорит-аниона (OCl^-) при 290 нм и рН 12, используя

молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{290} = 350 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [19]. Принимая во внимание, что $pK \text{HOCl}$ составляет 7,5 [19] и при физиологических значениях pH примерно половина кислоты находится в молекулярной форме, а остальная кислота – в диссоциированной форме, далее под HOCl мы будем понимать смесь HOCl/OCl^- , присутствующую в исследуемой среде.

Выделение нейтрофилов осуществляли из донорской крови, стабилизированной добавлением 1 объема 3,8%-го цитрата натрия на девять объемов крови, путем центрифугирования в течение 35 мин при 400 g в градиенте плотности лимфопрепа (Nycomed, Норвегия), как описано ранее [20], или с использованием двойного градиента плотности 1,119 и 1,078 г/мл (Гистопак, Sigma-Aldrich, США). Клетки отмывали от градиента в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS; 10 mM Na-фосфатный буфер, 140 mM NaCl, pH 7,4), содержащем 2,7 mM KCl, 5 mM D-глюкозы и использовали в эксперименте в течение 4–6 ч, выдерживая при температуре 4°C. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97–98%, доля жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим – не менее 96%.

Выделение и модификация ЛНП. Кровь доноров отбирали натощак в вакуумные пробирки с ЭДТА, отделяли плазму с помощью центрифугирования в течение 5 мин при 3000 g при температуре 4°C. Следы хиломикрон и тромбоцитов удаляли центрифугированием в течение 15 мин при 13000 g при температуре 4°C. На 1 мл плазмы добавляли 153 мг NaCl и 354 мг KBr и после растворения солей фильтровали через фильтры с размером пор 0,22 мкм. Один объем полученной плазмы помещали в центрифужные пробирки и сверху наслаивали два объема раствора с плотностью 1,063 г/мл (33 мг/мл NaCl, 59 мг/мл KBr) и два объема раствора с плотностью 1,019 г/мл (14,5 мг/мл NaCl, 13,6 мг/мл KBr). Пробирки помещали в бакетный ротор JS-24.38 и проводили ультрацентрифугирование в течение 18 ч при 110500 g при температуре от 4 до 8°C на центрифуге Avanti J-30I (Beckman Coulter, США). После центрифугирования с помощью шприца отбирали интерфазу с ЛНП, окрашенную в оранжевый цвет, и помещали ее в специальные ячейки VivaSpin20, удерживающие белки с молекулярным весом выше 1 МДа. При центрифугировании в течение 1 ч при 3000 g и температуре 4°C объем ЛНП уменьшался до 0,4 мл, его разбавляли PBS до 20 мл и повторяли процедуру концентрирования ЛНП и разбавления их PBS еще два раза. Полученные ЛНП были гомогенны по данным электрофореза в 0,8%-м агарозном геле [8] и содержали менее 1 мкМ KBr.

Условия возникновения окислительного/галогенирующего стресса моделировали путем воздействия на ЛНП NaOCl в мольном отношении 1:160. Для этого 3,2 mM NaOCl в PBS смешивали в равных объемах с раствором ЛНП, содержащим 10 мг/мл белка, и инкубировали пробы в течение 30 мин при 37°C при периодическом перемешивании. В контрольных экспериментах по отсутствию окисления *o*-дианизида избытком NaOCl было показано, что в выбранных нами условиях весь NaOCl вступал в реакцию с ЛНП.

Хемилюминесценцию нейтрофилов регистрировали на люминометре LKB Wallac Lumino-meter 1251 (Финляндия) в режиме непрерывного измерения при постоянном перемешивании и температуре 37°C. В пробу объемом 1 мл, содержащую среду Кребса–Рингера (pH 7,4), люцинол или люцигенин (0,2 mM), вносили нейтрофилы (конечная концентрация $0,4 \cdot 10^6$ кл/мл), измеряли уровень спонтанной хемилюминесценции, после чего добавляли нативные ЛНП или ЛНП, предварительно модифицированные HOCl (ЛНП- HOCl), до конечной концентрации 0,25 мг белка в мл и измеряли величину сигнала хемилюминесценции (хемилюминесценция ответ на ЛНП). Затем через ~3 мин клетки стимулировали раствором ФМА (0,16 мкМ) и продолжали регистрировать хемилюминесценцию в ответ на активатор. Интенсивность хемилюминесценции оценивали по высоте пика и выражали в милливольтгах. Растворы исследуемых соединений в PBS вносили непосредственно перед добавлением ЛНП.

Продукцию H_2O_2 нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре LSF1211A («СОЛАР», Минск, Беларусь) с использованием скополетина в качестве субстрата пероксидазной реакции, как описано ранее [20]. Суспензию нейтрофилов (10^6 кл/мл в PBS с 0,9 mM CaCl_2 и 0,5 mM MgCl_2 , pH 7,35), содержащую 1 мкМ скополетина, 20 мкг/мл пероксидазы из корней хрена и 1 mM NaN_3 , термостатировали при 37°C при непрерывном перемешивании в течение 3 мин в кювете в присутствии либо в отсутствие исследуемых соединений: метионина, цистеина, таурина, церулоплазмина, ЧСА. Затем добавляли ЛНП или ЛНП- HOCl (конечная концентрация 0,1 или 0,4 мг/мл по белку) и регистрировали кинетику окисления скополетина по уменьшению интенсивности флуоресценции при 460 нм (возбуждение при 350 нм). Скорость продукции H_2O_2 клетками определяли как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой убыли интенсивности флуоресценции скополетина в результате его окисления H_2O_2 . Этот линейный участок содержал не менее десяти экспериментальных то-

чек. Для расчета использовали статистическую программу Origin 7.0.

Получение супернатантов после дегрануляции нейтрофилов. К суспензии изолированных нейтрофилов (10^6 кл/мл) в среде Кребса/Рингера (рН 7,4) добавляли аликвоту антиоксиданта (метионин, цистеин, таурин, глутатион, церулоплазмин, ЧСА) или PBS и ЛНП (либо ЛНП-НОС1), конечная концентрация составляла 0,25 мг/мл по белку. В часть образцов вносили раствор ФМА (конечная концентрация 100 нг/мл). Пробы инкубировали 15 мин при 37°C при периодическом перемешивании, затем осаждали клетки центрифугированием (15 мин, 400 g) и отбирали супернатант, который немедленно замораживали и хранили при -40°C.

Активность миелопероксидазы в супернатантах оценивали по флуоресценции резорфина, который образовывался при окислении 10-ацетил-3,7-дигидроксибензофеноксамина бромирующей МПО, которая связывалась при инкубации образцов в планшетах с адсорбированными на поверхности лунок аффинными антителами против МПО, полученными от крыс [21]. Антитела (5 мкг/мл), растворенные в 40 мМ Na_2CO_3 , 80 мМ NaHCO_3 , рН 9,4, адсорбировали в 96-луночных полистирольных планшетах в течение ночи при 4°C. После трех отмывок PBS, содержащим 0,05% твин 20, в лунки помещали очищенную МПО в концентрациях 0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20; 40 нг/мл и супернатанты, разведенные от 10 до 80 раз PBS, содержащим 0,05% твин 20. После 60 мин инкубации в термошейкере при 37°C и 270 об/мин лунки планшета отмывали три раза PBS, содержащим 0,05% твин 20. В лунки помещали раствор, содержащий 1 мкМ 10-ацетил-3,7-дигидроксибензофеноксамина, 10 мкМ H_2O_2 , 20 мМ NaBr , 200 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 24 мМ натрий-цитратного буфера, рН 6,0. Через 30 мин инкубации в термошейкере при 37°C и 270 об/мин измеряли флуоресценцию резорфина при 580–620 нм (возбуждение при 535–555 нм) с помощью планшетного монохроматорного флуориметр-люминометр-спектрофлуориметра CLARI-Ostar (BMG LABTECH, Германия). Калибровочный график зависимости интенсивности флуоресценции I от концентрации МПО ([МПО]) обрабатывали в программе MS Excel 2002 как биномиальную функцию $I = a[\text{МПО}]^2 + b[\text{МПО}] + c$ (коэффициент детерминированности R^2 , нормированный от 0 до 1, составлял не менее 0,98). Вычисляли активность МПО в супернатантах нейтрофилов с учетом разведения образца и выражали ее как нг/мл очищенной МПО.

Активность эластазы в суспензии нейтрофилов оценивали флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре

LSF1211A («СОЛАР», Минск, Беларусь) с использованием специфического субстрата – MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA. 1 мл суспензии нейтрофилов ($2 \cdot 10^6$ кл/мл в PBS с 1 мМ CaCl_2 , 0,5 мМ MgCl_2), содержащей 20 мкМ MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA, инкубировали 3 мин при 37°C, после чего добавляли стимулятор (1 мкМ fMLP). Кинетику расщепления эластазой специфического субстрата и высвобождения флуорофора – аминометилкумарина – регистрировали по увеличению интенсивности флуоресценции при 460 нм (возбуждение при 380 нм). Активность эластазы определяли как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой, отражающей увеличение интенсивности флуоресценции в результате образования флуоресцирующего продукта [22].

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены как средние значения \pm стандартные отклонения. Достоверность различий средних величин рассчитывали с использованием t -критерия Стьюдента, принимая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активация нейтрофилов нативными ЛНП и ЛНП-НОС1. Активацию изолированных из донорской крови нейтрофилов регистрировали двумя способами: 1) методом люминол- или люцигенин-зависимой хемилюминесценции (лм-ХЛ и лц-ХЛ соответственно); 2) по продукции H_2O_2 – флуоресцентным методом с использованием скополетина в качестве субстрата пероксидазной реакции. На рис. 1а,б приведены типичные кривые соответственно лм-ХЛ и лц-ХЛ нейтрофилов в ответ на добавление ЛНП или ЛНП-НОС1 и последующее добавление ФМА. На рис. 2 представлены типичные кривые окисления скополетина нейтрофилами после добавления ЛНП и ЛНП-НОС1, отражающие скорость продукции клетками H_2O_2 . Результаты опытов по активации нейтрофилов без ФМА суммированы в табл. 1.

Видно, что нативные ЛНП без добавления ФМА не вызывали статистически значимого увеличения как лм-ХЛ, так и лц-ХЛ по сравнению с контролем. В их присутствии также достоверно не увеличивалась скорость окисления скополетина, а значит, и скорость генерации H_2O_2 нейтрофилами. ЛНП-НОС1, напротив, активировали нейтрофилы, увеличивая хоть и незначительно, но достоверно как лм-ХЛ (в ~3,6 раза), так и лц-ХЛ (в ~2 раза), а также скорость продукции H_2O_2 нейтрофилами (в ~1,5 раза) по сравнению с нативными ЛНП.

В табл. 2 суммированы результаты по влиянию ЛНП и ЛНП-НОС1 на лм-ХЛ или лц-ХЛ

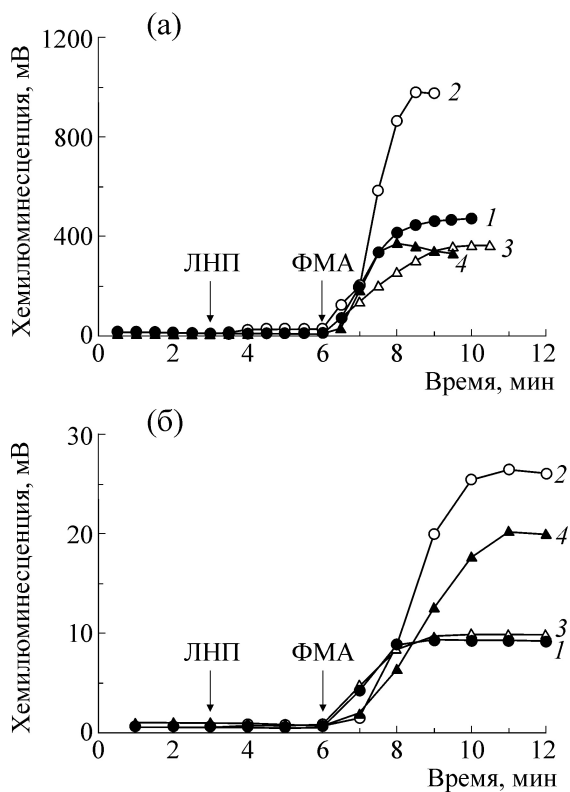


Рис. 1. Типичные кинетические кривые лм-ХЛ (а) и лц-ХЛ (б) нейтрофилов в ответ на добавление нативных ЛНП (1) или ЛНП-НОС1 (2) и последующее добавление ФМА; 3 – контроль, когда вместо ЛНП/ЛНП-НОС1 добавляли PBS (10 мМ фосфата, 140 мМ NaCl, pH 7,4). 4 – вариант 2 в присутствии 4 мМ цистеина или 3,8 мкМ церулоплазмينا на рис (а) и (б) соответственно. Момент добавлений ЛНП и ФМА указан стрелками. Измерения проводили при 37°C в бикарбонатном растворе Кребса–Рингера (pH 7,4), содержащем 1,3 мМ CaCl₂, люминол или люцегинин (0,2 мМ). В пробу вносили нейтрофилы (4·10⁵ кл/мл), ЛНП (250 мкг/мл), ФМА (0,16 мкМ).

нейтрофилов в ответ на последующее добавление ФМА. Видно, что нативные ЛНП не увеличивали хемилюминесцентный ответ клеток на активатор, тогда как ЛНП-НОС1 вызывали достоверно более выраженный ответ на ФМА

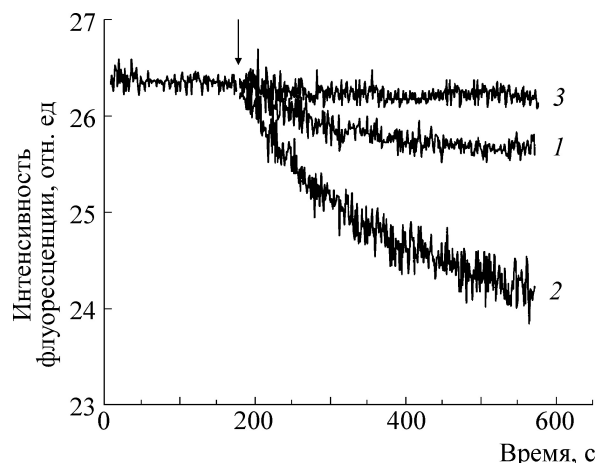


Рис. 2. Типичные кинетические кривые окисления скополетина в суспензии нейтрофилов, активированных нативными ЛНП (1) или ЛНП-НОС1 (2); 3 – влияние ЧСА (7,5 мкМ) на окисление скополетина в суспензии нейтрофилов, активированных ЛНП-НОС1. Интенсивность флуоресценции скополетина измеряли при 460 нм, длина волны возбуждения – 350 нм. Стрелкой указан момент добавления ЛНП/ЛНП-НОС1.

(в ~3,2 и ~6,2 раза для лм-ХЛ и лц-ХЛ соответственно), что может свидетельствовать о праймирующем эффекте ЛНП-НОС1 в отношении окислительного взрыва нейтрофилов.

Известно, что лм-ХЛ нейтрофилов обусловлена окислением люминола НОС1 [23,24], которая образуется при функционировании цикла галогенирования МПО, а лц-ХЛ – окислением люцегинина супероксидным анион-радикалом ($\cdot\text{O}_2^-$), образование которого катализирует НАДФН-оксидаза [23,25]. Это значит, что лм-ХЛ может быть мерой хлорирующей активности МПО [12], а лц-ХЛ – мерой активности НАДФН-оксидазы [26]. Действительно, как видно из рис. 3 и табл. 3, ингибитор МПО, гидразид 4-аминобензойной кислоты, эффективно снижал интенсивность лм-ХЛ нейтрофилов в ответ на ФМА как в отсутствие, так и в присутствии нативных ЛНП или ЛНП-НОС1. В то же время он не снижал интенсивность лц-ХЛ.

Таблица 1. Интенсивность лм-ХЛ или лц-ХЛ нейтрофилов и скорость окисления скополетина нейтрофилами в ответ на добавление ЛНП или ЛНП-НОС1

Добавляемый объект	лм-ХЛ, мВ	лц-ХЛ, мВ	Скорость окисления скополетина, пмоль/с/10 ⁶ клеток	
	ЛНП, 250 мкг/мл	ЛНП, 250 мкг/мл	ЛНП, 100 мкг/мл	ЛНП, 400 мкг/мл
Контроль	5,0 ± 1,9	0,60 ± 0,10	0,15 ± 0,03	0,21 ± 0,03
ЛНП	3,8 ± 1,3	0,55 ± 0,05	0,15 ± 0,05	0,25 ± 0,01
ЛНП-НОС1	13,6 ± 5,0*	1,10 ± 0,40*	0,23 ± 0,03*	0,38 ± 0,04*

Примечание. **p* < 0,05 по сравнению с ЛНП и контролем.

Таблица 2. Влияние нативных и модифицированных ЛНП на интенсивность лм-ХЛ и лц-ХЛ нейтрофилов в ответ на последующее добавление ФМА

Добавляемый объект	лм-ХЛ, мВ	лц-ХЛ, мВ
Контроль	340 ± 186	9,6 ± 0,4
ЛНП	342 ± 111	9,4 ± 1,7
ЛНП-НОС1	1086 ± 590*	58,1 ± 35,3*

Примечание. * $p < 0,05$ по сравнению с ЛНП и контролем.

Влияние антиоксидантов и скавенджеров НОС1 на активацию нейтрофилов. На рис. 1а,б (кривые 4) в качестве примеров приведены результаты влияния цистеина и церулоплазмينا на лм-ХЛ и лц-ХЛ нейтрофилов соответственно, в ответ на добавление ЛНП-НОС1 и последующее добавление ФМА. На рис. 2 (кривая 3) представлен пример влияния ЧСА на кинетику окисления скополетина нейтрофилами после добавления ЛНП-НОС1, отражающую скорость продукции клетками H_2O_2 . Следует отметить, что сам ЧСА практически не влиял на скорость продукции клетками H_2O_2 (данные не приведены). Результаты влияния всех использованных антиоксидантов и скавенджеров НОС1 на указанные параметры суммированы в табл. 4 и 5. Видно, что все соединения по мере увеличения их концентрации снижали лм-ХЛ нейтрофилов, как в ответ на ЛНП-НОС1 (табл. 4), так и на последующее добавление ФМА (табл. 5). В то же время они либо в гораздо меньшей степени влияли, либо не оказывали влияния на лц-ХЛ нейтрофилов в аналогичных условиях, а также на продукцию нейтрофилами пероксида водорода. Так, например, цистеин в концентрации 3,3 мМ снижал лм-ХЛ в ответ на ЛНП-НОС1 на 60%, не влияя при этом на продукцию H_2O_2 клетками, а также не снижая лц-ХЛ нейтрофилов (табл. 4). В ответ на последовавшее за ЛНП-НОС1 добавление ФМА цистеин также снижал лм-ХЛ на 85%, не влияя при этом на лц-ХЛ клеток (табл. 5).

Поскольку лм-ХЛ нейтрофилов обусловлена главным образом функционированием цикла галогенирования МПО и продукцией НОС1 [23,25], становится понятно, почему соединения, активно взаимодействующие с НОС1, а также ингибирующие МПО, эффективно снижают лм-ХЛ нейтрофилов. В то же время известно, что метионин, цистеин, глутатион, таурин обладают антиоксидантными свойствами, взаимодействуя с АФК, в том числе с $\bullet O_2^-$ [27]. Вероятно, именно поэтому они в некоторой степени снижают лц-ХЛ нейтрофилов, которая обусловлена главным образом функционированием НАДФН-оксидазы этих клеток [26]. Следует заметить, что бел-

Таблица 3. Влияние гидразида 4-аминобензойной кислоты (100 мкМ) на интенсивность лм-ХЛ и лц-ХЛ нейтрофилов в присутствии нативных ЛНП или ЛНП-НОС1 в ответ на последующее добавление ФМА (в % от контроля)

Добавляемый объект	лм-ХЛ, %	лц-ХЛ, %
Контроль (без ингибитора)	100	100
ЛНП + ингибитор	37,8 ± 1,9*	120 ± 25
ЛНП-НОС1 + ингибитор	20,6 ± 2,0*	126 ± 23

Примечание. * $p < 0,01$ по сравнению с контролем.

ковые антиоксиданты (церулоплазмин и ЧСА) проявляли ингибирующий эффект в концентрациях 2,3–7,5 мкМ (табл. 4 и 5). Церулоплазмин, как известно, является природным ингибитором ферментативной и регулятором бактерицидной активности МПО [28]. Этот белок острой фазы воспаления связывается с МПО, образуя комплекс и ингибируя при этом как пероксидазную, так и галогенирующую активность фермента [11,12]. Вместе с тем церулоплазмин обладает супероксиддисмутазной активностью. Как было показано ранее, церулоплазмин снижает продукцию $\bullet O_2^-$ нейтрофилами, активированными опсонизированным зимозаном [29]. В наших экспериментах церулоплазмин активно подавлял лм-ХЛ нейтрофилов как в ответ на ЛНП-НОС1, так и на последующее добавление ФМА, одновременно снижая продукцию клетками H_2O_2 и лц-ХЛ. Что касается ЧСА, то этот белок, вероятнее всего, обладает свойствами неспецифического скавенджера как АФГ, так и АФК, следствием чего является снижение

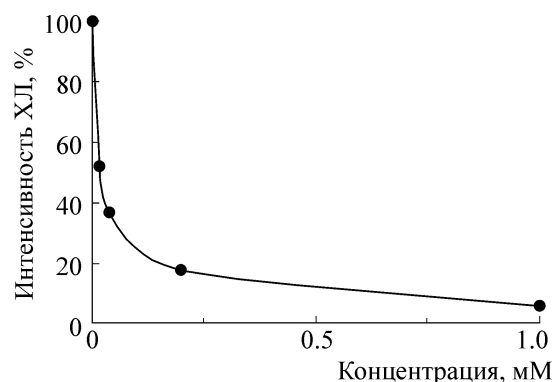
**Рис. 3.** Зависимость интенсивности хемилюминесценции нейтрофилов в присутствии люминола в ответ на добавление ФМА от концентрации ингибитора МПО, гидразида 4-аминобензойной кислоты. За 100% принята интенсивность хемилюминесценции в отсутствие ингибитора. Среда измерения: бикарбонатный раствор Кребса–Рингера (рН 7,4), содержащий 1,3 мМ $CaCl_2$, люминол (0,2 мМ), нейтрофилы ($4 \cdot 10^5$ кл/мл) и 0,156 мкМ ФМА. Температура измерения 37°C.

Таблица 4. Влияние антиоксидантов и сквенджеров НОС1 на интенсивность лм-ХЛ, лц-ХЛ нейтрофилов и скорость окисления скополетина нейтрофилами в ответ на добавление ЛНП-НОС1 в % от контроля

Добавляемый объект	лм-ХЛ, %	лц-ХЛ, %	Скорость окисления скополетина, пмоль/с/10 ⁶ клеток	
	ЛНП-НОС1, 250 мкг/мл	ЛНП-НОС1, 250 мкг/мл	ЛНП-НОС1, 100 мкг/мл	ЛНП-НОС1, 400 мкг/мл
Контроль (без добавок)	100	100	100	100
Метионин, мМ				
0,1	97	96	—*	63
2,7	76	91	—	—
5,0	56	—	—	—
Цистеин, мМ				
0,1	86	114	—	109
2,1	74	—	—	—
3,3	40	118	—	—
Таурин, мМ				
1,0	86	118	58	68
3,2	63	77	—	—
Глутатион восст., мМ				
0,3	48	—	—	—
1,3	42	108	—	—
Церулоплазмин, мкМ				
2,3	51	81	59	59
3,8	53	90	—	—
ЧСА, мкМ				
3	—	90	—	—
6	—	123	—	—
7,5	54	100	71	37
Супероксиддисмутаза, Ед/мл				
150	45	62	—	—

Примечание. * «—» Означает, что при указанных концентрациях веществ измерения не проводились.

лм-ХЛ нейтрофилов и выброса ими H_2O_2 (табл. 4 и 5). Увеличение лц-ХЛ нейтрофилов в присутствии ЧСА в ответ на добавление ФМА (табл. 5) можно объяснить, если предположить, что ЧСА эффективно взаимодействует с НОС1 и тем самым конкурирует с $\bullet O_2^-$ в реакции с НОС1 [30]. Более того, образующийся при взаимодействии ЧСА с НОС1 хлорированный альбумин активирует НАДФН-оксидазу [17]. Повышение в обоих случаях локальной концентрации $\bullet O_2^-$ увеличивает хемилюминесцентный ответ клеток в присутствии люцигенина. В табл. 4 и 5 приведены также значения снижения лм-ХЛ и лц-ХЛ нейтрофилов в присутствии супероксиддисмутаза. Этот фермент специфически катализирует диспропорционирование $\bullet O_2^-$. Видно, что супероксиддисмутаза существенно снижает лц-ХЛ нейтрофилов в присутствии ЛНП-НОС1, особенно в ответ на добавление ФМА (табл. 5). Некоторое снижение лм-ХЛ в присутствии супероксиддисмутаза можно объяснить неспецифическим взаимодействием с АФГ, а также тем, что супероксиддисмутаза,

катализируя превращение $\bullet O_2^-$ в H_2O_2 , увеличивает локальную концентрацию последнего, а это может быть причиной ингибирования МПО [31].

Влияние антиоксидантов и сквенджеров НОС1 на дегрануляцию нейтрофилов. Если принять во внимание, что лм-ХЛ нейтрофилов обусловлена окислением люминола АФГ, образующимся при функционировании МПО [23,24], то обнаруженное нами влияние антиоксидантов и сквенджеров НОС1 на лм-ХЛ может быть связано: 1) с ингибированием активности МПО, 2) с взаимодействием с активными формами галогенов; 3) с нарушением в их присутствии секреции МПО при дегрануляции нейтрофилов. Для выяснения этого вопроса после инкубации нейтрофилов с ЛНП/ЛНП-НОС1 в присутствии антиоксидантов и сквенджеров НОС1 и последующего добавления к ним в некоторых случаях ФМА отделяли супернатант от клеток и исследовали в нем активность МПО с помощью модифицированного метода иммуноферментного анализа. Результаты эксперимента представ-

лены в табл. 6. Видно, что ЛНП-НОС1 без добавления ФМА вызывали дегрануляцию нейтрофилов и экзоцитоз МПО. Последующее добавление ФМА практически не влияло на этот процесс. Из всех исследованных соединений лишь глутатион несколько снижал экзоцитоз МПО. Возможно, этим частично обусловлено снижение лм-ХЛ нейтрофилов в его присутствии (табл. 4 и 5). Обращает на себя внимание тот факт, что присутствие церулоплазмينا и ЧСА сильно увеличивало секрецию МПО нейтрофилами в ответ на ЛНП-НОС1. Известно, что церулоплазмин за счет ферроксидазной активности способен праймировать нейтрофилы, активируя НАДФН-оксидазу [32]. По-видимому, церулоплазмин-индуцированный прайминг сопровождается дегрануляцией нейтрофилов. Ранее нами было показано, что ЧСА, модифицированный в присутствии АФГ, усиливал дегрануляцию азурофильных гранул нейтрофилов, в которых содержится МПО [4]. Можно предположить, что в присутствии активированных нейтрофилов ЧСА претерпевал некоторую модификацию под действием АФГ и/или АФК, усиливая экзоцитоз МПО. Обращает на себя внимание сильное снижение активности МПО в присутствии цистеина в супернатантах после дегрануляции нейтрофилов в ответ на добавление ЛНП-НОС1 и ФМА (табл. 6). В контрольных экспериментах было показано, что цистеин существенно уменьшал численное выражение активности очищенной МПО, несмотря на специфические условия, препятствующие влиянию белковых ингибиторов на определение активности МПО в использованном нами методе иммуноферментного анализа (данные не приведены). Для того чтобы выяснить, влиял ли цистеин на дегрануляцию нейтрофилов, мы исследовали в его присутствии экзоцитоз другого маркера азурофильных гранул – эластазы. К клеткам добавляли субстрат, который в присутствии эластазы гидролизировался с образованием флуорофора. Результаты эксперимента представлены на рис. 4. Видно, что в присутствии цитохалазина В в ответ на добавление активатора (fMLP) значительно увеличивалась флуоресценция, свидетельствуя об экзоцитозе эластазы. Однако цистеин (3,3 мМ) не оказывал заметного влияния на развитие флуоресценции, а значит, и на дегрануляцию азурофильных гранул нейтрофилов. Таким образом, можно предположить, что эффективное снижение в присутствии цистеина интенсивности лм-ХЛ и лц-ХЛ нейтрофилов в ответ на ЛНП-НОС1 и ФМА не связано со снижением их дегрануляции, а, вероятнее всего, обусловлено взаимодействием активных форм галогенов и кислорода с этим антиоксидантом.

Ранее было показано, что галогенированные белки [4], фосфолипиды [5] и ЛНП [6], которые

Таблица 5. Влияние антиоксидантов и скавенджеров НОС1 на интенсивность лм-ХЛ и лц-ХЛ нейтрофилов в присутствии ЛНП-НОС1 в ответ на добавление ФМА (в % от контроля)

Добавляемый объект	лм-ХЛ, %	лц-ХЛ, %
Контроль (без добавок)	100	100
Метионин, мМ		
0,1	100	100
2,7	72	103
5,0	58	—*
Цистеин, мМ		
0,1	81	114
2,1	49	110
3,3	15	100
Таурин, мМ		
1,0	95	100
2,4	88	—
3,2	56	49
Глутатион восст., мМ		
0,13	31	—
0,3	25	74
1,3	28	43
Церулоплазмин, мкМ		
2,3	81	100
2,7	70	—
3,8	63	81
ЧСА, мкМ		
1,5	58	—
3	59	217
6	64	160
7,5	—	216
Супероксиддисмутаза, Ед/мл		
150	33	5

Примечание. * «—» Означает, что при указанных концентрациях веществ измерения не проводились.

могут образовываться в очагах воспаления по МПО-зависимому пути, активируют нейтрофилы, стимулируя в них продукцию АФК/АФГ и дегрануляцию с высвобождением МПО во внеклеточное пространство, что усугубляет модификацию биологически важных молекул и дальнейшее развитие окислительного/галогенирующего стресса. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что антиоксиданты и скавенджеры АФГ, присутствующие в организме человека, способны влиять на процесс развития окислительного/галогенирующего стресса и замедлять его путем взаимодействия с АФГ/АФК, препятствуя активации и дегрануляции нейтрофилов, вызванной модифицированными в очаге воспаления ЛНП. Повышение активности антигалогенирующей системы организма, включающей скавенджеры АФГ, регуляторы дегрануляции азурофильных гранул нейтрофилов, ингибиторы активности МПО и других перок-

Таблица 6. Влияние антиоксидантов и сквенджеров НОС1 на активность МПО в супернатантах, полученных после дегрануляции нейтрофилов в ответ на ЛНП-НОС1 в присутствии или отсутствие ФМА

Состав	Без ФМА		+ ФМА	
	МПО, нг/мл	МПО, %	МПО, нг/мл	МПО, %
Среда Кребса–Рингера	0	0	–	–
Среда Кребса–Рингера + ЛНП-НОС1	0	0	–	–
Нейтрофилы	22,5 ± 3,2	29	80,0 ± 7,6	91
Нейтрофилы + ЛНП	38,3 ± 6,6	50	82,5 ± 1,9	94
Нейтрофилы + ЛНП-НОС1	76,8 ± 1,0	100*	88,2 ± 1,6	100*
Нейтрофилы + ЛНП-НОС1 + метионин (2,7 мМ)	105,4 ± 24,5	137	89,6 ± 0,3	102
Нейтрофилы + ЛНП-НОС1 + цистеин (3,3 мМ)	2,4 ± 2,1	3	2,3 ± 2,0	3
Нейтрофилы + ЛНП-НОС1 + таурин (3,2 мМ)	87,5 ± 3,2	114	76,8 ± 1,8	87
Нейтрофилы + ЛНП-НОС1 + глутатион (1,3 мМ)	57,3 ± 7,5	75	56,6 ± 5,4	64
Нейтрофилы + ЛНП-НОС1 + церулоплазмин (2,3 мкМ)	190,6 ± 14,1	248	122,3 ± 5,7	139
Нейтрофилы + ЛНП-НОС1 + ЧСА (3 мкМ)	179,9 ± 33,6	234	86,4 ± 0,8	98

Примечание. * За 100% принято содержание МПО в супернатантах после инкубации нейтрофилов в присутствии ЛНП-НОС1 без добавления и после последующего добавления ФМА.

сидаз, необходимо рассматривать как важное звено регуляции воспалительной реакции организма и противовоспалительной терапии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты 14-04-00807, 14-04-90007 и 15-04-03620) и Белорусского фонда фундаментальных исследований (грант В14R-035).

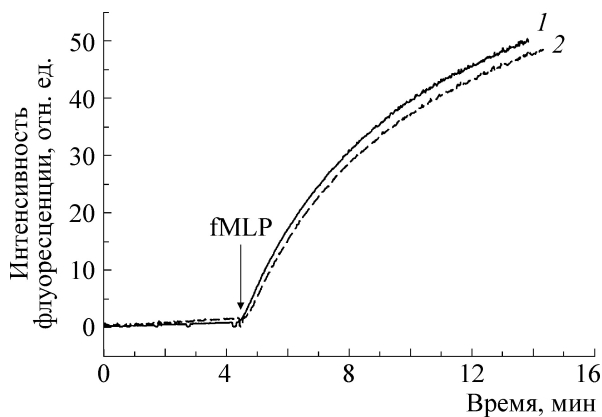


Рис. 4. 1 – Влияние цистеина на fMLP-индуцированный экзоцитоз эластазы из нейтрофилов в присутствии цитохалазина В; 2 – контрольная кривая без цистеина. Среда измерения: 10 мМ Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 5 мМ D-глюкозы, pH 7,3. Концентрации: нейтрофилов – 2·10⁶ кл/мл, fMLP – 1 мкМ, субстрата эластазы (MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA) – 20 мкМ, цистеина – 3,3 мМ, CaCl₂ – 1 мМ, MgCl₂ – 0,5 мМ. Кинетику расщепления эластазой специфического субстрата и высвобождения флуорофора – аминотетракумарина – регистрировали по увеличению интенсивности флуоресценции при 460 нм (возбуждение при 380 нм).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. J. Davies, C. L. Hawkins, D. I. Pattison, et al., *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 1199 (2008).
2. О. М. Панасенко, И. В. Горудко и А. В. Соколов, *Успехи биол. химии* **53**, 195 (2013).
3. О. М. Панасенко и В. И. Сергиенко, *Вестн. РАМН*, № 1, 27 (2010).
4. I. V. Gorudko, D. V. Grigorieva, E. V. Shamova, et al., *Free Radic. Biol. Med.* **68**, 326 (2014).
5. И. В. Горудко, Т. В. Вахрушева, А. В. Мухортова и др., *Биол. мембраны* **27**, 314 (2010).
6. A. V. Sokolov, V. A. Kostevich, O. L. Runova, et al., *Chem. Phys. Lipids* **180**, 72 (2014).
7. A. V. Sokolov, K. V. Ageeva, O. S. Cherkalina, et al., *Chem. Phys. Lipids* **163**, 347 (2010).
8. A. V. Sokolov, A. V. Chekanov, V. A. Kostevich, et al., *Chem. Phys. Lipids* **164**, 49 (2011).
9. S. Kopprasch, W. Leonhardt, J. Pietzsch, et al., *Atherosclerosis* **136**, 315 (1998).
10. D. I. Pattison and M. J. Davies, *Curr. Med. Chem.* **13**, 3271 (2006).
11. A. V. Sokolov, K. V. Ageeva, M. O. Pulina, et al., *Free Radic. Res.* **42**, 989 (2008).
12. О. М. Панасенко, А. В. Чеканов, И. И. Власова и др., *Биофизика* **53**, 573 (2008).
13. A. V. Sokolov, V. A. Kostevich, E. T. Zakharova, et al., *Free Radic. Res.* **49**, 800 (2015).
14. Y. Xu, S. Szép and Z. Lu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 20515 (2009).
15. J. D. Chandler and B.J. Day, *Free Radic. Res.* **49**, 695 (2015).
16. S. Galijasevic, I. Abdulhamid and H. M. Abu-Soud, *Free Radic. Biol. Med.* **44**, 1570 (2008).

17. Е. В. Михальчик, Н. В. Смолина, Т. С. Астамирова и др., *Биофизика* **58** (4), 681 (2013).
18. А. В. Соколов, В. А. Костевич, Д. Н. Романико и др., *Биохимия* **77**, 775 (2012).
19. J. C. Morris, *J. Phys. Chem.* **70**, 3798 (1966).
20. A. V. Timoshenko, K. Kayser and H. J. Gabius, *Methods Mol. Med.* **9**, 441 (1998).
21. И. В. Горудко, О. С. Черкалина, А. В. Соколов и др., *Биоорг. химия* **35**, 629 (2009).
22. B. Coles, A. Bloodsworth, S. R. Clark et al., *Circ. Res.* **91**, 375 (2002).
23. Ю. А. Владимиров и Е. В. Проскурнина, *Успехи биол. химии* **49**, 341 (2009).
24. E. P. Brestel, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **126**, 482 (1985).
25. Y. Li, H. Zhu, P. Kuppusamy, et al., *J. Biol. Chem.* **273**, 2015 (1998).
26. I. B. Afanas'ev, E. A. Ostrakhovitch, E. V. Mikhal'chik, et al., *Luminescence* **16**, 305 (2001).
27. Е. В. Дорожко и Е. И. Короткова, *Хим.-фармацевт. журн.* **44** (10), 53 (2010).
28. A. V. Sokolov, E. T. Zakahrova, V. A. Kostevich, et al., *Biometals* **27**, 815 (2014).
29. А. В. Соколов, Е. А. Голенкина, В. А. Костевич и др., *Биохимия* **75**, 1687 (2010).
30. L. P. Candeias, M. R. Stratford and P. Wardman, *Free Radic. Res.* **20**, 241 (1994).
31. J. M. Zgliczynsky, T. Stelmazynska, J. Domanski et al., *Biochim. Biophys. Acta* **235**, 419 (1971).
32. T. Iwata, A. Kantarci, M. Yagi, et al., *J. Periodontol.* **80**, 1300 (2009).

Effects of Antioxidants and Hypohalous Acid Scavengers on Neutrophil Activation by Hypochlorous Acid-Modified Low-Density Lipoproteins

O.M. Panasenko* **, E.V. Mikhalchik*, I.V. Gorudko*,
D.V. Grigorieva***, A.V. Sokolov* **** ***, V.A. Kostevich* ****,
V.B. Vasilyev**** ***, and S.N. Cherenkevich*****

**Research Institute of Physico-Chemical Medicine, Federal Medico-Biological Agency of Russia,
ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia*

***Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Public Health and Social Development of the
Russian Federation, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia*

****Belarusian State University, pr. Nezavisimosti 4, Minsk, 220050 Belarus*

*****Research Institute of Experimental Medicine, ul. Akademika Pavlova 12, St. Petersburg, 197376 Russia*

******St. Petersburg State University, Universitetskaya nab. 7/9, St. Petersburg, 199034 Russia*

Hypochlorous acid-modified human blood low-density lipoproteins were shown to stimulate neutrophils and enhance neutrophil chemiluminescence in the presence of luminol or lucigenin. Effects of antioxidants and HOCl scavengers (glutathione, taurine, cysteine, methionine, ceruloplasmin, and human serum albumin) on chemiluminescence in the presence of luminol and lucigenin as well as on H₂O₂ production by neutrophils and degranulation of azurophilic granules were studied. It was shown that all the investigated compounds by increasing their concentrations caused a decline in neutrophil chemiluminescence in the presence of luminol in response to stimulation with hypochlorous acid-modified low-density lipoproteins and subsequent addition of the activator, phorbol-12-myristate-13-acetate. At the same time, under the same conditions these compounds had much less effect or even none at all on neutrophil chemiluminescence in the presence of lucigenin and also on H₂O₂ production by neutrophils. The decline in neutrophil chemiluminescence in most cases is not related to the effect of these compounds on neutrophil degranulation, but most probably is due to direct interaction with reactive halogen and oxygen species formed during neutrophil activation and/or due to inhibition of myeloperoxidase. Hence, antioxidants and HOCl scavengers present in the human body are capable of influencing developmental process of oxidative/halogenative stress and can slow it down thus preventing neutrophil activation.

Key words: halogenative stress, oxidative stress, low-density lipoproteins, neutrophil activation, reactive halogen species, chemiluminescence