

# МЕДИЦИНСКАЯ БИОТЕХНОЛОГИЯ

## АКТУАЛЬНЫЕ ПРОБЛЕМЫ МЕДИЦИНСКОЙ ГЕНЕТИКИ

УДК 612-083:371

### РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИЙ НЕЙТРОФИЛОВ 2-ГЕКСАДЕЦЕНАЛЕМ

Н.В. Амаэгбери<sup>1</sup>, Г.Н. Семенкова<sup>1</sup>, А.Г. Лисовская<sup>2</sup>,  
Е.А. Мельникова<sup>1</sup>, О.И. Шадыро<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, n.amaegberi@gmail.com

<sup>2</sup>Университет Нотр-Дам, Нотр-Дам, Индиана, США

2-Гексадеценаль – ненасыщенный альдегид, образующийся в организме из сфингозин-1-фосфата (С1Ф) при действии фермента С1Ф-лиазы [1]. Этот альдегид проявляет биологическую активность в отношении клеток эмбриональной почки человека НЕК293Т, цервикальной карциномы HeLa, фибробластов мыши NIH3T3 и глиомы крысы С6 [2, 3], вызывая реорганизацию цитоскелета и индуцируя апоптоз.

Ранее нами и другими авторами был установлен неферментативный путь образования 2-ГД в результате свободнорадикальной деструкции ряда сфинголипидов в условиях оксидативного стресса, обусловленного действием  $\gamma$ -, УФ-излучения, а также хлорноватистой кислоты [4, 5]. НОС1 образуется в галогенирующем цикле миелопероксидазы (МПО), локализованной преимущественно в нейтрофилах [6]. Эти клетки мигрируют в очаги воспаления, которые формируются при травмах, инсульте, инфекционных, нейродегенеративных, онкологических и других заболеваниях, осуществляя киллинг чужеродного материала посредством генерации активных форм кислорода и хлора (АФКХ), в том числе НОС1 [7]. Нами показано, что действие НОС1, продуцируемой в галогенирующем цикле миелопероксидазы, на эритроциты человека, клетки глиомы крысы С6 и НЕК293 индуцирует свободнорадикальную деструкцию сфинголипидов с образованием 2-ГД [8, 9]. Следовательно, нейтрофилы, являясь источником хлорноватистой кислоты, могут быть мишенью для 2-ГД в условиях оксидативного стресса.

Цель работы: изучить влияние 2-ГД на функциональные свойства нейтрофилов крови здоровых людей.

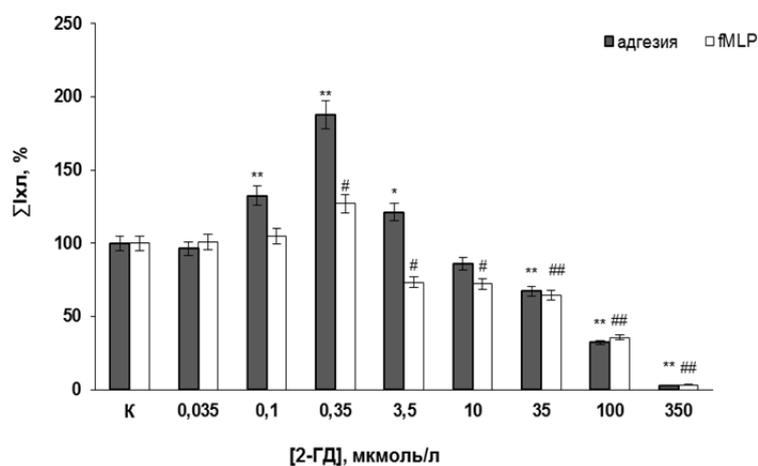
**Материалы.** В работе использовали декстран, гистопак-1077, питательную среду RPMI-1640, иодида пропидиум (PI), бычий сывороточный альбумин (БСА), люминол, fMLP, Triton X-100, JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтил-бензамидозолокарбоцианин йодид), FCCP (карбонилцианид р-трифторометоксифенилгидразон), EGTA (этиленгликоль-бис( $\beta$ -аминоэтиловый эфир)-*N,N,N',N'*-тетрауксусной кислоты), *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 Эрла (БСРЭ) («Анализ Х, Беларусь»). 2-ГД был синтезирован на кафедре органической химии химического факультета БГУ.

**Методы.** Нейтрофилы выделяли из крови здоровых людей по стандартной методике [10]. Жизнеспособность клеток определяли флуоресцентным методом с использованием иодида пропидиума (PI,  $\lambda_{\text{возб}} = 530$  нм,  $\lambda_{\text{рег}} = 640$  нм) на спектрофлуориметре (СМ 2203 «Солар», Беларусь) [11]. Генерацию АФКХ изучали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛюмХЛ) [12], на хемилюминометре БХЛ-1 (Минск, Беларусь). Продукцию АФКХ стимулировали добавлением 0,1 мкмоль/л хемотаксического пептида fMLP. Изменение митохондриального потенциала клеток ( $\Delta\Psi_m$ ) оценивали с помощью флуоресцентного зонда JC-1 ( $\lambda_{\text{ex}}=490$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=530$  нм, 590 нм) [13]. Отношение интенсивностей флуоресценции при 590 и 530 нм ( $I_{590}/I_{530}$ ) пропорционально  $\Delta\Psi_m$ . Концентрацию ионов несвязанного цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) определяли с помощью флуоресцентного зонда Fura 2-AM ( $\lambda_{\text{ex}}=340, 380$  нм,  $\lambda_{\text{em}}=510$  нм) на спектрофлуориметре (СМ 2203 «Солар», Беларусь). Пробоподготовку и калибровку проводили согласно методике [14]. Концентрацию ионов несвязанного цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  в клетках С6 и нейтрофилах рассчитывали по уравне-

нию Гринкевица. Состояние цитоскелета клеток при действии 2-ГД оценивали с помощью Alexa Fluor 532 Phalloidin [15]. Апоптоз клеток оценивали с помощью набора Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, согласно методике [16].

**Результаты и обсуждение.** С целью определения цитотоксичности 2-ГД нами изучено влияние этого альдегида на жизнеспособность нейтрофилов. Методом флуоресценции с использованием PI показано, что инкубирование клеток с 2-ГД в диапазоне концентраций 0,35-35 мкмоль/л в течение 30 мин не приводит к изменению их жизнеспособности. При увеличении концентрации исследуемого альдегида (100 и 350 мкмоль/л) через 30 мин наблюдается незначительное снижение жизнеспособности нейтрофилов до  $(92,9 \pm 2,7) \%$  и  $(89,4 \pm 2,2) \%$  соответственно.

На рисунке 1 показано влияние 2-ГД в широком диапазоне концентраций на суммарную интенсивность ЛюмХЛ стимулированных нейтрофилов. Видно, что инкубирование клеток в течение 30 мин с 2-ГД в диапазоне концентраций 0,1-3,5 мкмоль/л приводит к росту продукции АФКХ клетками при адгезии. Повышение концентрации 2-ГД до 10 и 35 мкмоль/л вызывает снижение генерации АФКХ на 14,9 % и 33,8 % соответственно. 2-ГД в концентрации 0,035 и 0,1 мкмоль/л не оказывает влияния на кислородактивирующую способность клеток при стимуляции fMLP. Инкубирование нейтрофилов с 2-ГД в концентрации 0,35 мкмоль/л приводит к увеличению интенсивности ЛюмХЛ на 27,2 %, а повышение концентрации исследуемого альдегида (3,5–35 мкмоль/л) вызывает снижение продукции АФКХ клетками на  $(27,2-36,7) \%$  соответственно.

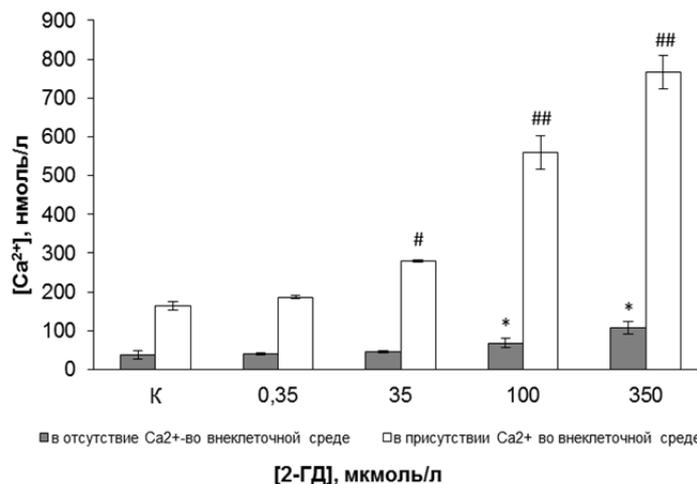


**Рисунок 1. – Влияние 2-гексадеценаля на ЛюмХЛ нейтрофилов, стимулированных адгезией (серые столбики) и хемотаксическим пептидом fMLP (светлые столбики)**

Формирование “респираторного взрыва” в нейтрофилах обусловлено модификацией многочисленных процессов внутриклеточной сигнализации [17]. С целью выявления механизмов влияния 2-ГД на продукцию АФКХ клетками, нами изучено действие на этот процесс специфических ингибиторов ряда ферментов, участвующих в процессах трансдукции активационного сигнала в нейтрофилах при их стимуляции fMLP. С помощью специфических ингибиторов компонентов сигнальных путей установлено, что в повышение продукции АФКХ нейтрофилами при действии 0,35 мкмоль/л 2-ГД вносят вклад НАДФН-оксидаза, МПО, липоксигеназа (ЛО) и JNK-МАПК.

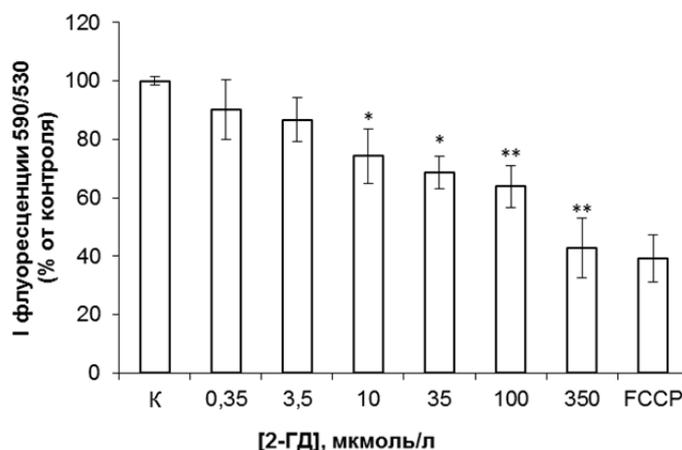
Генерация АФКХ в нейтрофилах сопряжена с повышением концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле клеток. Увеличение уровня ионов кальция в цитоплазме нейтрофилов необходимо для их активации, продукции АФКХ, регуляции процессов гибели и клиренса этих клеток [18]. Увеличение концентрации несвязанных ионов кальция в этих клетках может наблюдаться также при запуске апоптоза. Нами изучено влияние 2-ГД в различных концентрациях на уровень цитозольного кальция в нейтрофилах в зависимости от его наличия во внеклеточной среде. Результаты представлены на рисунке 2. Видно, что при добавлении 2-ГД к клеткам наблюдается повышение уровня  $[Ca^{2+}]_i$  как в отсутствие, так и в присутствии ионов кальция во внеклеточной среде. Однако, если в отсутствие кальция вне клеток заметное повышение  $[Ca^{2+}]_i$  в цитозоле по сравнению с контролем (в 1,8 раза) обнаруживается при концентрации 2-ГД 100 мкмоль/л, тогда как в присутствии внеклеточного кальция такой же прирост внутриклеточных ионов  $Ca^{2+}$  зарегистрирован для 35 мкмоль/л этого альдегида. При концентрации 2-ГД 100 и 350 мкмоль/л уровень цитозольного кальция повышается в 3,4 и 4,7 раза соответственно. Следует отметить, что при обработке клеток 0,35

мкмоль/л 2-ГД как в присутствии, так и в отсутствие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  во внеклеточной среде, концентрация этих ионов в цитозоле не изменяется.



**Рисунок 2. – Влияние 2-ГД на концентрацию несвязанных ионов кальция в цитоплазме нейтрофилов**

Увеличение концентрации цитозольного  $\text{Ca}^{2+}$  и одновременное уменьшение продукции АФКХ может быть связано с подавлением редокс-активности митохондрий, что в свою очередь может свидетельствовать о развитии апоптотического процесса [19]. На рисунке 3 показано влияние 2-ГД на величину митохондриального мембранного потенциала нейтрофилов.



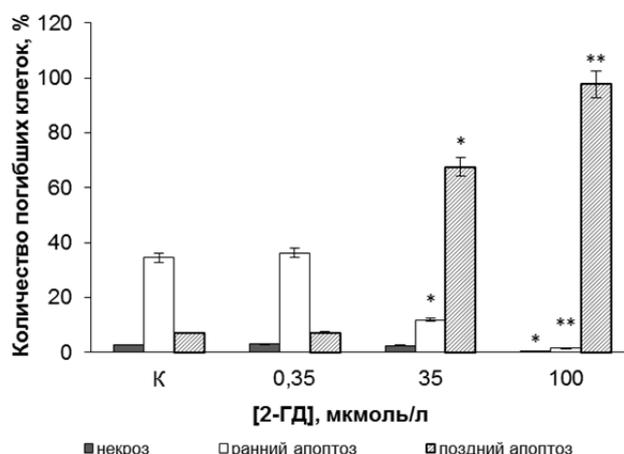
**Рисунок 3. – Влияние 2-гексадеценаля на величину митохондриального мембранного потенциала в нейтрофилах**

Видно, что добавление 2-ГД (3,5–350 мкмоль/л) к суспензии клеток вызывает снижение мембранного потенциала митохондрий на (25,7–57,3) %. При этом, действие 2-ГД в концентрации 350 мкмоль/л, сопоставимо с действием известного разобщителя FCCP, что, по-видимому, связано с цитотоксичностью этого альдегида в высоких концентрациях.

Изменение функциональной активности нейтрофилов сопровождается модификацией цитоскелета. Мы оценили влияние 2-ГД на состояние актинового цитоскелета при адгезии клеток к поверхности стекла. Установлено, что 2-ГД в концентрациях 35 и 0,35 мкмоль/л вызывает реорганизацию цитоскелета нейтрофилов, что выражается в изменении морфологических характеристик и перераспределении F-актина.

На рисунке 4 показано влияние 2-ГД на апоптоз нейтрофилов. Видно, что инкубирование клеток с 0,35 мкмоль/л 2-ГД в течение 4 ч не влияет на апоптотические процессы в этих клетках. В то же время, обработка клеток 35 мкмоль/л 2-ГД приводит к снижению количества живых клеток, а также клеток в стадии раннего апоптоза до 17,8 % и 11,9 % соответственно. В этом случае основная часть популяции нейтрофилов 67,7 % находится в стадии позднего апоптоза. С увеличением концентрации исследуемого альдегида до 100 мкмоль/л практически все клетки 97,7 % окрашива-

ются как Annexin V, так и PI, что свидетельствует о переходе клеток в стадию позднего апоптоза. Мы полагаем, что отсутствие клеток в стадии некроза, после инкубирования со 100 мкмоль/л 2-ГД связано, с потерей некоторого количества клеток в процессе пробоподготовки. Таким образом, 2-ГД в концентрациях 35 и 100 мкмоль/л усиливает стимулированный адгезией апоптоз нейтрофилов.



**Рисунок 4. – Количество погибших нейтрофилов при действии 2-гексадеценаля**

**Заключение.** Таким образом, 2-ГД дозозависимо регулирует функции нейтрофилов. В низких концентрациях этот альдегид оказывает праймирующее действие на клетки, что выражается в увеличении выхода АФКХ за счет повышения вкладов НАДФН-оксидазы, МПО, ЛО и JNK-МАПК. При более высоких концентрациях 2-ГД индуцирует апоптоз, что коррелирует со значительным увеличением несвязанных ионов кальция в цитоплазме, уменьшением продукции АФКХ и снижением митохондриального мембранного потенциала. Оба эти процесса сопряжены с реорганизацией цитоскелета.

*Работа выполнена при поддержке Всемирной организации учёных (World Federation of Scientists).*

#### Список использованных источников

- Gault, C.R. An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown / C.R. Gault, L.M. Obeid, Y.A. Hannun // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2010. – Vol. 688. – P. 1–23.
- Kumar, A. The sphingolipid degradation product *trans*-2-hexadecenal induces cytoskeletal reorganization and apoptosis in a JNK dependent manner / A. Kumar [et. al] // *Cell Signal.* – 2011. – Vol. 23. – P. 1144–1152.
- Amaegberi, N.V. 2-Hexadecenal inhibits growth of C6 glioma cells /N.V. Amaegberi, G.N. Semenkova, Z.B. Kvacheva, A.G. Lisovskaya, S.V. Pinchuk, O.I. Shadyro // *Cell. Biochem. Funct.* – 2019. – Vol. 37. – P. 281-289.
- Lisovskaya, A.G. A new mechanism for photo- and radiation-induced decomposition of sphingolipids / A.G. Lisovskaya, O.I. Shadyro, I.P. Edimecheva // *Lipids.* – 2011. – Vol. 46. – P. 271–276.
- Brahmbhatt, V.V. Novel carbonyl and nitrile products from reactive chlorinating species attack of lysosphingolipid / V.V. Brahmbhatt [et. Al] // *Chem. Phys. Lipids.* – 2007. – Vol. 145. – P. 72–84.
- Aratani, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function /Y. Aratani // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2018. – Vol. 640. – P. 47–52.
- Kolaczowska, E. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation / E. Kolaczowska, P. Kubes // *Nat. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 13. – P. 159–175.
- Shadyro, O. Free-radical destruction of sphingolipids resulting in 2-hexadecenal formation / O. Shadyro, A. Lisovskaya, G. Semenkova, I. Edimecheva, N. Amaegberi // *Lipid insights.* – 2015. – Vol. 8. – P. 1–9.
- A. Lisovskaya, K. Pratsenka, A. Kulinkina, G.N. Semenkova, O. Shadyro, Sphingolipid destruction in HOCl-treated red blood cells, *FEBS J.* – 2015. – Vol. 282. – P. 235.
- Böyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Böyum // *Scand. J. Immunol.* – 1976. – Vol. 5. – P. 9–15.

11. Kato, F. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents / F. Kato, M. Tanaka, K. Nakamura // *Toxicol. In Vitro.* – 1999. – Vol. 13. – P. 923–929.
12. Liu, L. A simple chemiluminescence assay for the determination of reactive oxygen species produced by human neutrophils / L. Liu [et al.] // *J. Immunol. Meth.* – 1996. – Vol. 192, № 1–2. – P. 173–178.
13. Sivandzade, F. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe / F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo // *Bio Protoc.* – 2019. – Vol. 9 (1).
14. Measurement of  $[Ca^{2+}]_i$  in whole cell suspensions using Fura-2 // *Methods in molecular biology. Calcium signaling protocols* / A. Patel [et al.] ; ed. D.G. Lambert. – Totowa, 2013. – P. 37–45.
15. Cui, X. F-actin cytoskeleton reorganization is associated with hepatic stellate cell activation / X. Cui [et al.] // *Mol. Med. Rep.* – 2014. – Vol. 9. – P. 1641–1647.
16. Measurement of apoptosis in cell culture // *Methods in biotechnology, animal cell biotechnology: methods and protocols*, 2nd ed. / A. Ishaque, M. Al-Rubeai ; ed. R. Pörtner. – Totowa, 2007. – P. 285–299.
17. Zhang, J. ROS and ROS-mediated cellular signaling / J. Zhang [et al.] // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2016.
18. Ribeiro, D. Calcium pathways in human neutrophils – the extended effects of thapsigargin and ML-9 / D. Ribeiro [et al.] // *Cells.* – 2018. – Vol. 7 (11).
19. McCracken, J.M. Regulation of human neutrophil apoptosis and lifespan in health and disease / J.M. McCracken, L-A.H. Allen // *J. Cell Death.* – 2014. – Vol. 7. – P. 15–23.