

ОСОБЕННОСТИ ДЕГРАНУЛЯЦИИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РАЗЛИЧНЫХ СТИМУЛЯТОРОВ

Алешина Г.М.¹, Янкелевич И.А.¹, Кокряков В.Н.¹

¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» Северо-Западного отделения Российской академии медицинских наук, Санкт-Петербург, Россия (197376, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12), e-mail: galina_aleshina@mail.ru

Проведено изучение действия иммуномодулирующего препарата «Глутоксим», липополисахарида и N-формил-метионил-лейцил-фенилаланина на дегрануляцию нейтрофильных гранулоцитов, как изолированных, так и в составе цельной крови. Установлено, что «Глутоксим» оказывает стимулирующее действие на секрецию белков и пептидов из гранул нейтрофильных гранулоцитов. «Глутоксим», так же как липополисахарид и N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин, проявляет большую дегранулирующую активность в условиях цельной крови, по сравнению с культурой изолированных нейтрофильных гранулоцитов. Показано, что более длительная инкубация цельной крови с «Глутоксимом» и липополисахаридом сопровождается снижением уровня нейтрофильных белков и пептидов в плазме, что позволяет предположить, что стимуляция «Глутоксимом» и липополисахаридом, в отличие от стимуляции N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином, может приводить к активации рецепторного аппарата клеток крови и связыванию секретлируемых соединений с клетками. Секреторное действие «Глутоксима» связано с работой фосфодиэстераз, так как блокируется добавлением ингибитора фосфодиэстераз – пентоксифиллина.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, дефенсины, лактоферрин, миелопероксидаза, «Глутоксим», липополисахарид.

SOME FEATURES OF NEUTROPHIL DEGRANULATION BY VARIOUS STIMULANTS

Aleshina G.M.¹, Yankelevich I.A.¹, Kokryakov V.N.¹

¹Institute of Experimental Medicine of the NorthWest Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Saint Petersburg, Russia (197376, Saint Petersburg, 12 akad. Pavlov Str.), e-mail: galina_aleshina@mail.ru

We studied an action of the immunomodulator Glutoxim, lipopolysaccharide and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine on the degranulation of neutrophils, both isolated and in the composition of whole blood. It was established that Glutoxim stimulates the secretion of peptides and proteins from the granules of neutrophils. Glutoxim as well as lipopolysaccharide and N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine demonstrate higher degranulation activity for neutrophils in whole blood, than for isolated neutrophils. It is shown that a longer incubation time of whole blood with Glutoxim and lipopolysaccharide is associated with decreased concentration of neutrophil peptides and proteins in the plasma, which may indicate that stimulation by Glutoxim and lipopolysaccharide, unlike stimulation by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, can lead to activating of the receptors of blood cells and binding of secreted compounds by the cells. Secretory activity Glutoxim depends on phosphodiesterases, since this activity can be blocked by the addition of the phosphodiesterases inhibitor - pentoxifylline.

Keywords: neutrophils, defensins, lactoferrin, myeloperoxidase, Glutoxim, lipopolysaccharide

Введение

Нейтрофильные гранулоциты - наиболее мобильная и многочисленная популяция лейкоцитов. В течение суток в костном мозге человека образуется до 10^{11} зрелых нейтрофилов, средний период полувыведения которых из циркуляции составляет 6-8 часов. До недавнего времени считалось, что основной функцией нейтрофилов является антимикробная защита, осуществляемая, прежде всего, за счет фагоцитоза, т.е. способности поглощать микроорганизмы и умерщвлять их с помощью микробоцидных веществ,

содержащихся в гранулах. В число этих соединений входят миелопероксидаза, лактоферрин, антимикробные катионные пептиды (дефенсины, кателицидины) и другие [2].

Известны три основных типа гранул нейтрофилов – азурофильные, специфические и желатиновые, которые различаются по времени формирования при миелопоэзе и по составу своего содержимого [2]. Маркерными белками для специфических гранул являются лактоферрин, кателицидины, В₁₂-связывающий белок, для азурофильных – миелопероксидаза, дефенсины, катепсины, эластаза. Общим белком для всех типов гранул является лизоцим. Кроме разницы в содержимом, гранулы различаются по степени и последовательности их участия в экзоцитозе (дегрануляции) в ответ на различные стимулы. Установлено, что в первую очередь выделяют свое содержимое во внеклеточную среду желатиновые гранулы, затем – специфические и в последнюю очередь – азурофильные [10].

Необходимо отметить, что секреция содержимого гранул происходит не только во время фагоцитоза в местах воспаления. В плазме крови в норме всегда присутствуют гранулярные белки и пептиды, количество которых может меняться как при физиологических состояниях, так и при некоторых заболеваниях. С точки зрения клиницистов, эти белки и пептиды прежде всего – маркеры функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, которые рассматриваются в качестве ведущих клеточных факторов врожденного иммунитета, а также как универсальные звенья гомеостаза, реагирующие на многочисленные сигналы о нарушении постоянства внутренней среды [1]. В то же время накапливается все больше данных о том, что белки и пептиды нейтрофилов обладают не только микробоцидными свойствами, но и влияют на регуляцию других функций организма, имеющих отношение к воспалению, врожденному и адаптивному иммунитету и стрессу [9].

Например, установлено, что лактоферрин может связывать в циркуляции компоненты бактериальных клеток (ЛПС) или их рецепторов и тем самым предотвращать развитие воспаления и связанное с ним повреждение тканей, подавлять высвобождение провоспалительных цитокинов и активных форм кислорода [5]. Показано, что лактоферрин транспортируется в ядро, где он может связываться с ДНК и активировать экспрессию отдельных групп генов [6].

Миелопероксидаза непосредственно вовлечена в метаболизм активных форм кислорода, высокий уровень содержания этого фермента в тканях может способствовать образованию хлораминов, которые, являясь своеобразными сигнальными молекулами (аларминами), способны влиять на генерацию макрофагами медиаторов воспаления [7].

Антимикробные пептиды (дефенсины, кателицидины) влияют на клетки врожденного иммунитета (нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки) и эпителиальные клетки,

определяя отдельные стороны взаимодействия врожденной и адаптивной иммунной систем. Для млекопитающих была показана роль АМП в реализации таких клеточных функций, как хемотаксис, апоптоз, генная транскрипция и продукция цитокинов [8].

В связи с этим можно предположить, что иммуномодулирующие свойства некоторых препаратов, в частности «Глутоксима», могут быть связаны с их способностью вызывать дегрануляцию нейтрофильных гранулоцитов, приводящей к высвобождению эндогенных иммунорегуляторов.

Целью нашей работы явилось изучение действия «Глутоксима» на дегрануляцию нейтрофильных гранулоцитов, как изолированных, так и в составе цельной крови в сравнении с другими известными стимуляторами дегрануляции – липополисахаридом и N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином.

Методы

Реактивы

Глутоксим ®-PCO, Серия 03102011 - производитель и поставщик ЗАО «ФАРМА ВАРМ». Липополисахарид E.coli 055:B5 (ЛПС), N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), пентоксифиллин (PX), Histopaque 1119 и Percoll получены от компании Sigma.

Питательная среда RPMI-1640 с L-глутамином – производство компании «БиолоГ».

Сыворотка крови плодов коровы – производство компании «БиолоГ».

Забуференный физиологический раствор (ЗФР) – Na-фосфатный буфер 0,01 М, pH=7,5, содержащий 0,137 М NaCl и 0,0027 М KCl.

Объект исследования

В работе использовали венозную кровь, полученную от практически здоровых добровольцев. Забор осуществляли стерильным шприцем, затем помещали в стерильную пластиковую пробирку, содержащую 5%-ный раствор натриевой соли ЭДТА (pH 7,3) в качестве антикоагулянта из расчета 0,4 мл раствора ЭДТА на 12 мл крови.

Стимулирование изолированных нейтрофильных гранулоцитов

Для выделения нейтрофильных гранулоцитов из цельной крови использовали два последовательных разделения с помощью центрифугирования в различных градиентах плотности – Histopaque и Percoll [3].

На первом этапе на 6 мл раствора Histopaque 1119 наслаивали 6 мл крови, центрифугировали 30 минут при 800 g, отбирали нижнюю розоватую фазу, содержащую гранулоциты, промывали забуференным физраствором (ЗФР), ресуспендировали в ЗФР и наносили на градиент Percoll – 85, 80, 75, 70 и 65%. Центрифугировали 30 минут при 800 g и отбирали фазу, содержащую гранулоциты.

Клетки промывали в ЗФР, ресуспендировали в среде RPMI, содержащей 5%-ную эмбриональную сыворотку, подсчитывали количество клеток в камере Горяева.

Выделенные нейтрофильные гранулоциты, ресуспендированные в среде RPMI, содержащей 5%-ную эмбриональную сыворотку, вносили в лунки 96 луночных планшетов (1 млн на лунку) и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение часа при температуре 37 °С, чтобы дать нейтрофилам прикрепиться к пластику. Через час среду удаляли, в лунки с прикрепившимися клетками добавляли по 0,2 мл свежей среды и по 0,01 мл стимуляторов в ЗФР, по три лунки на каждый вариант стимулятора. Планшеты инкубировали при 37 °С в течение 15 или 30 минут, затем отбирали культуральную жидкость, замораживали и до анализа хранили при -20 °С.

В качестве стимуляторов использовали: 1) глутоксим – конечные концентрации 100 мкг/мл, 10 мкг/мл и 1 мкг/мл; 2) ЛПС – конечная концентрация 1 мкг/мл; 3) fMLP – конечная концентрация 0,5 мкг/мл; 4) контроль – ЗФР.

Стимулирование клеток цельной крови

Кровь с антикоагулянтом разливали в стерильные эппендорфы и добавляли стимуляторы в объеме 1/100 объема крови. Пробирки инкубировали при 37 °С в течение 15 или 30 минут, затем центрифугировали при 400 g в течение 3 минут, отбирали плазму, замораживали ее и до анализа хранили при -20 °С.

В качестве стимуляторов использовали: 1) глутоксим – конечные концентрации 100 мкг/мл, 10 мкг/мл и 1 мкг/мл; 2) ЛПС – конечная концентрация 1 мкг/мл; 3) fMLP – конечная концентрация 0,5 мкг/мл; 4) пентоксифиллин (РХ) – конечная концентрация 0,56 мг/мл; 5) контроль – ЗФР.

Количественное определение белков и пептидов нейтрофилов

Количественное определение белков и пептидов нейтрофилов в плазме и культуральной жидкости проводили с использованием наборов фирмы Nuncult biotech (Нидерланды) для иммуноферментного определения миелопероксидазы (МПО) (кат. номер НК324), лактоферрина (кат. номер НК329) и альфа-дефенсинов 1-3 (кат. номер НК317).

Процедуру определения концентраций осуществляли в соответствии с инструкцией производителя.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica 10.0. Достоверность различий между группами оценивали по U-критерию Манна–Уитни, за достоверный принимали 95%-ный уровень значимости ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

В ходе экспериментов установлено, что «Глутоксим», так же как и fMLP, слабо влияет на секрецию содержимого специфических гранул изолированных нейтрофильных гранулоцитов. Секреция лактоферрина наблюдается только после 30-минутной инкубации с ЛПС и «Глутоксимом» в высокой концентрации (100 мкг/мл). Секреция содержимого азурофильных гранул под действием «Глутоксима» осуществляется с большей интенсивностью, чем специфических и в широком спектре концентраций стимулятора. Установлено, что имеет место достоверное повышение содержания дефенсинов и МПО в культуральной жидкости изолированных нейтрофилов после 30-минутной инкубации с «Глутоксимом» по сравнению с контролем. Причем инкубация с ЛПС не влияла на секрецию дефенсинов (табл. 1). Инкубация в течение 15 минут не приводила к изменению концентрации нейтрофильных белков и пептидов в культуральной жидкости.

Таблица 1. Содержание лактоферрина, МПО и дефенсинов в инкубационной жидкости культуры нейтрофилов после 30-минутной инкубации со стимуляторами.

	Лактоферрин (нг/мл)	МПО (нг/мл)	Дефенсины (мкг/мл)
Глутоксим, 100 мкг/мл	41,4±11,7*	307±93*	22,2±17,1*
Глутоксим, 10 мкг/мл	33,2±16,0	284±55*	15,7±8,3*
Глутоксим, 1 мкг/мл	32,7±14,8	759±547*	11,7±4,3*
ЛПС, 1 мкг/мл	31,7±5,8*	871±551*	4,42±1,07
fMLP, 0,5 мкг/мл	25,9±5,6	403±278	6,47±2,94
контроль	21,1±4,4	193±34	4,63±2,12

* - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Исследование секреции содержимого гранул нейтрофильных гранулоцитов в цельной крови (ex vivo) показало другую динамику дегрануляции. Секреция лактоферрина происходит под действием всех исследованных стимуляторов. Причем при стимуляции «Глутоксимом» и ЛПС концентрация белка в плазме после 15-минутной инкубации была выше, чем после 30-минутной. Для fMLP такой зависимости не наблюдалось (табл. 2).

«Глутоксим» вызывает секрецию дефенсинов из нейтрофилов в цельной крови при всех испытываемых концентрациях, причем концентрация пептидов в плазме после 15-минутной инкубации с «Глутоксимом» в концентрации 10 мкг/мл и 1 мкг/мл выше, чем после 30-минутной. Такая же динамика наблюдается и для действия ЛПС, но не fMLP (табл. 2), для которого в данных условиях не выявлена секреторная активность.

Секреция миелопероксидазы, как и лактоферрина, осуществляется под действием всех испытуемых стимуляторов, причем при стимуляции «Глутоксимом» и ЛПС концентрация белка в плазме после 15-минутной инкубации была выше, чем после 30-минутной (табл. 2).

Из литературы известно, что ЛПС-индуцированная стимуляция нейтрофилов может быть ингибирована пентоксифиллином – ингибитором фосфодиэстеразы [4].

Мы исследовали действие этого ингибитора на глутоксим-стимулированную секрецию нейтрофильных пептидов и белков и установили, что добавление пентоксифиллина полностью блокирует секрецию исследуемых белков и пептидов (табл. 2).

Таблица 2. Содержание лактоферрина, МПО и дефенсинов в плазме крови после инкубации (15 или 30 минут) со стимуляторами

	Лактоферрин (нг/мл)		МПО (нг/мл)		Дефенсины (нг/мл)	
	15 минут	30 минут	15 минут	30 минут	15 минут	30 минут
Глутоксим, 100 мкг/мл	494±40*	383±13*#	112±8*	124±7*	280±11*	389±76*
Глутоксим, 10 мкг/мл	747±64*	186±17#	136±4*	57,3±6,4#	266±9*	113±15#
Глутоксим, 1 мкг/мл	601±128*	355±108#	175±5*	64,3±2,5#	399±57*	82,0±30,0#
ЛПС	1014±27*	628±19*#	253±15*	48,3±3,2#	1129±25*	67,8±9,5#
fMLP	333±69*	417±14*	75,3±1,5*	77,3±3,1*	111±7*	75,5±14,9
Глутоксим (100мкг/мл) + РХ	177±31	221±17	38,0±1,0	34,7±1,5	74,1±6,4	75,0±18,7
РХ	200±9	212±26	54,3±6,0	53,0±2,0	133±18*	89,0±11,0#
контроль	163±22	174±32	42,3±1,2	54,3±3,2	58,8±4,7	96,6±11,8

* - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим контролем (15 или 30 минут инкубации)

- $p < 0,05$ по сравнению с соответствующей группой (стимулятором) при 15-минутной инкубации

Работа поддержана ЗАО «ФАРМА ВАМ» (договор № 02/08-ДП), грантами РФФИ № 12-04-01498 и № 12-04-01573

Заключение

Таким образом, установлено, что иммуномодулирующий препарат «Глутоксим» оказывает стимулирующее действие на секрецию белков и пептидов из гранул нейтрофильных гранулоцитов. «Глутоксим», так же как ЛПС и N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин, проявляет большую дегранулирующую активность в условиях цельной крови, по сравнению с культурой изолированных нейтрофильных гранулоцитов. Показано, что более длительная инкубация цельной крови с «Глутоксимом» и ЛПС сопровождается

снижением уровня нейтрофильных белков и пептидов в плазме, что позволяет предположить, что стимуляция «Глутоксимом» и ЛПС, в отличие от стимуляции N-формил-метионил-лейцил-фенилаланином, может приводить к активации рецепторного аппарата клеток крови и связыванию секретируемых соединений с клетками. Секреторное действие «Глутоксима» связано с работой фосфодиэстераз, так как блокируется добавлением ингибитора фосфодиэстераз – пентоксифиллина.

Список литературы

1. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз / И.И. Долгушин, О.В. Бухарин. - Екатеринбург : Изд. УрО РАН, 2001. - 280 с.
2. Borregaard N., Cowland J.B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte // *Blood*. - 1997. - Vol. 89, No 10. - P. 3503-3521.
3. Brinkmann V., Laube B., Abu Abed U., Goosmann C., Zychlinsky A. Neutrophil Extracellular Traps: How to Generate and Visualize Them. // *J. Vis. Exp.* - 2010. - Vol. 36. - e1724. doi:10.3791/1724.
4. Coimbra R., Loomis W., Melbostad H., Tobar M., Porcides R.D., Hoyt D.B. LPS-stimulated PMN activation and proinflammatory mediator synthesis is downregulated by phosphodiesterase inhibition: role of pentoxifylline // *J Trauma*. - 2004. - Vol. 57. - P. 1157-1163.
5. Legrand D., Ellass E., Carpentier M., Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2005. – Vol. 62. – P. 2549–2559.
6. Legrand D., Vigié K., Said E.A., Ellass E., Masson M, Slomianny M.C., Carpentier M., Briand J.P., Mazurier J., Hovanesian A.G. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells // *Eur. J. Biochem.* – 2004. – Vol. 271. M- P. 303–317.
7. Marcinkiewicz J., Grabowska A., Bereta J., Stelmaszynska T. Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. // *J. Leucocyte Biol.* - 1995. - V. 58. - P. 667-674.
8. Salzet M. Antimicrobial peptides are signaling molecules // *Trends Immunol.* - 2002. – Vol. 23. – P. 283-284.
9. Selsted M.E., Ouellette A.J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response // *Nat Immunol.* – 2005. – Vol. 6. – P. 551-557.
10. Sengeløv H., Follin P., Kjeldsen L., Løllike K., Dahlgren C., Borregaard N. Mobilization of granules and secretory vesicles during in vivo exudation of human neutrophils // *J. Immunol.* - 1995. - Vol. 154. - P. 4157-4163.

Рецензенты:

Киселева Е.П., д.м.н., в.н.с. отдела иммунологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург.

Ермоленко Е.И., д.м.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и генетики микробов отдела молекулярной микробиологии, ФГБУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины» СЗО РАМН, г. Санкт-Петербург.