

УДК 612.11+577.152

Д. В. ГРИГОРЬЕВА<sup>1</sup>, И. В. ГОРУДКО<sup>1</sup>, А. В. СОКОЛОВ<sup>2</sup>, Е. В. ШАМОВА<sup>1</sup>,  
В. Б. ВАСИЛЬЕВ<sup>3</sup>, О. М. ПАНАСЕНКО<sup>4</sup>, академик С. Н. ЧЕРЕНКЕВИЧ<sup>1</sup>

## РЕГУЛЯЦИЯ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ $Ca^{2+}$ -СИГНАЛИЗАЦИИ В НЕЙТРОФИЛАХ

<sup>1</sup>Белорусский государственный университет, Минск

<sup>2</sup>НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет

<sup>4</sup>НИИ физико-химической медицины ФМБА России, Москва

Поступило 21.04.2014

**Введение.** Нейтрофильные лейкоциты играют важную роль в защите организма от инфекций, вызванных бактериями, грибами, вирусами, а также от трансформированных или поврежденных клеток организма-хозяина. При избытке в очаге воспаления или крови факторов активации нейтрофилов запускается процесс неконтролируемого высвобождения в окружающую среду активных форм кислорода, в том числе токсических кислородных радикалов, а также содержащихся в гранулах гидролитических ферментов [1].

Миелопероксидаза (МПО) представляет собой гемсодержащий фермент азурофильных гранул нейтрофилов. Используя в качестве субстрата  $H_2O_2$ , продуцируемый *in vivo* при респираторном взрыве, высвобождаемая из активированных нейтрофилов МПО может проявлять как галогенирующую (окисление галогенидов до высокорекреационных гипогалоидных кислот), так и пероксидазную (одноэлектронное окисление ряда веществ) активность. Генерируемые МПО окислители (НОСl, НОВг, хлорамины, свободные радикалы и др.) являются высокорекреационными соединениями, которым и принадлежит основная антимикробная функция нейтрофилов [2]. Однако при секреторной дегрануляции или гибели нейтрофила может проявляться патологическое действие фермента. Так, было показано [3], что гипогалоидные кислоты могут изменять структурные свойства эритроцитов и инициировать гемолиз этих клеток. Кроме того, известно, что модифицированные в результате действия НОСl липиды [4], белки [5], липопотеины [6] способны выступать в качестве новых классов веществ, модулирующих функциональные свойства клеток миелоидного происхождения. В настоящее время накапливаются экспериментальные данные, указывающие на то, что МПО участвует в регуляции структурно-функциональных свойств клеток крови, не только проявляя свою ферментативную активность, но также непосредственно связываясь с клеточной поверхностью. Так, ранее нами было выявлено уменьшение устойчивости эритроцитов к кислотному и осмотическому гемолизу в присутствии МПО, обусловленное электростатическим взаимодействием фермента с плазматической мембраной клеток [7]. Установлено, что связывание МПО с тромбоцитами сопровождается деполимеризацией примембранного F-актина, увеличением концентрации внутриклеточного  $Ca^{2+}$  в результате его депо-зависимого входа в цитозоль тромбоцитов, а также снижением модуля упругости тромбоцитов [8]. Lau с соавт. [9] показали, что МПО может выступать в качестве аутокринного модулятора функциональной активности нейтрофилов. При связывании с интегрином CD11b/CD18 на внешней поверхности нейтрофилов и активации внутриклеточных сигнальных путей МПО стимулирует дегрануляцию и окислительный взрыв нейтрофилов.

Кальций является вторичным мессенджером, играющим ключевую роль во многих процессах трансдукции сигнала в клетке, которые регулируют разнообразные функции, такие как секреция, клеточное движение, пролиферация и клеточная смерть [10]. При активации клеток происходит увеличение концентрации кальция в цитозоле за счет высвобождения  $Ca^{2+}$  из внутри-

клеточных кальциевых депо и входа  $\text{Ca}^{2+}$  из внеклеточной среды через каналы плазматической мембраны [10]. Стимуляция нейтрофилов различными агонистами может сопровождаться увеличением концентрации свободного кальция в цитозоле и, в конечном итоге, приводить к изменению функциональной активности нейтрофилов. Изменяется ли кальциевый ответ нейтрофилов при их связывании с МПО в настоящее время неизвестно. В данной работе мы показали, что МПО индуцирует увеличение концентрации кальция в цитозоле нейтрофилов и исследовали механизмы полученного эффекта.

**Материалы и методы исследования.** В работе использовали следующие реактивы: HEPES, ЭДТА, N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), N-этилмалеимид (NEM), генестеин, вортманнин, NaBr, NaOCl (Sigma-Aldrich, США); фура-2АМ (Molecular probes, США); гистопак (Nycomed, Норвегия); декстран Т70 (Roth, Германия). Очищенные моноклональные антитела (mAb) к CD18 –  $\beta$ -субъединице  $\beta_2$ -интегрина (анти-CD18 mAb) и CD 11b –  $\alpha$ -субъединице  $\beta_2$ -интегрина (анти-CD11b mAb) были приобретены у фирмы Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния. Остальные реактивы – Реахим, Россия; Белмедпрепараты, Беларусь.

Донорскую кровь, стабилизированную 3,8 %-ным раствором цитрата натрия в соотношении 9 : 1, получали из Республиканского научно-практического центра гематологии и трансфузиологии. Нейтрофилы выделяли согласно методу, описанному в работе [11] с использованием декстрана Т70 и гистопака. Отмытые нейтрофилы ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4) с глюкозой (11 мМ) и хранили при 4 °С в течение нескольких часов. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97–98 %, число жизнеспособных клеток (по тесту с трипановым синим) – не менее 96 %.

Препарат МПО с показателем чистоты  $A_{430}/A_{280}$  (RZ) ~ 0,85 выделяли из замороженных лейкоцитов здоровых доноров с помощью аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе, гидрофобной хроматографии на фенил-сефарозе и гель-фильтрации на сефакриле S-200 HR [12].

Концентрацию внутриклеточных свободных ионов кальция  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах определяли с применением флуоресцентного зонда фура-2АМ. К 1 мл отмытых нейтрофилов добавляли 2 мкл 0,5 мМ фура-2АМ и инкубировали в течение 40 мин при 37 °С и постоянном перемешивании. Нагруженные клетки отмывали от инкубационной среды дважды HEPES-буфером (20 мМ HEPES, 120 мМ NaCl, 11 мМ D-глюкоза, 5 мМ KCl, 1 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4) при 1500 об/мин в течение 5 мин. Отмытые нейтрофилы сохраняли в качестве исходной суспензии в концентрации  $10^7$  кл/мл. Для измерения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в кювету спектрофлуориметра вносили 0,9 мл HEPES-буфера, содержащего 4 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 2 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 100 мкл исходной суспензии клеток. Измерение флуоресценции проводили на длине волны 510 нм (возбуждение – 340 и 380 нм) при 37 °С в кинетическом режиме с использованием спектрофлуориметра LSF 1211А (СОЛАР, Минск, Беларусь). Концентрацию цитоплазматического кальция рассчитывали по классическому методу [13].

Результаты исследований представлены как среднее значение  $\pm$  среднее квадратичное отклонение. Достоверность различий средних величин рассчитывали с использованием *t*-критерия Стьюдента, принимая различия достоверными на уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Как показано на рис. 1, *а* (кривая 1), добавление МПО к суспензии нейтрофилов, находящихся в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащей среде, приводило к увеличению  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в цитозоле, которое может происходить как за счет высвобождения  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, так и за счет входа внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  через каналы плазматической мембраны. Из данных, представленных на рис. 1, *б*, видно, что МПО, добавленная к суспензии нейтрофилов в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащей среде, инициировала дозозависимое увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , причем максимальный эффект наблюдался при добавлении 75–150 нМ. В каждой серии экспериментов величину эффекта, оказываемого МПО на нейтрофилы, сравнивали с ответом клеток на стандартный активатор – fMLP. Так, увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в ответ на 1 мкМ fMLP составляло  $900 \pm 35$  нМ, в то время как увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в ответ на 100 нМ МПО было  $200 \pm 21$  нМ по сравнению с базальным уровнем  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в клетке ( $25 \pm 9$  нМ). Также было показано, что МПО, модифицированная НОС1/НОВг в мольном соотношении 1 : 100, сохраняла свою способность вызывать  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ в нейтрофилах. Так, увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах при действии хлорированной и бромированной МПО (100 нМ) составляло  $193 \pm 21$  и  $200 \pm 20$  нМ соответственно. В присутствии 50 мкМ гидразида

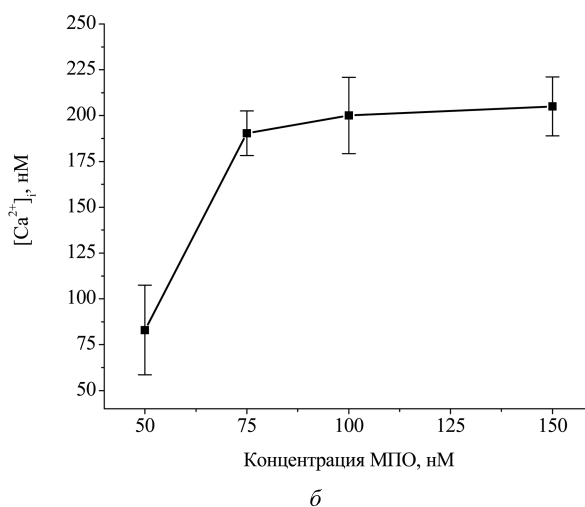
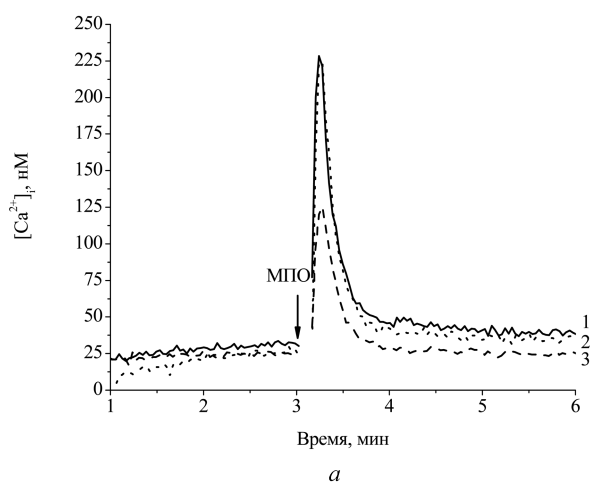


Рис. 1. Влияние МПО на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ нейтрофилов: *a* – типичные кинетические кривые МПО-индуцированного изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащей среде в отсутствие (кривая 1) и в присутствии (кривая 2) 50 мкМ гидразида 4-аминобензойной кислоты; кривая 3 – изменение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах в бескальциевой среде, содержащей 1 мМ ЭДТА, в ответ на МПО. Стрелкой указан момент добавления 100 нМ МПО; *б* – зависимость изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащей среде от концентрации МПО

4-аминобензойной кислоты (ингибитора ферментативной активности МПО) кальциевый ответ нейтрофилов на МПО сохранялся (рис. 1, *a*, кривая 2). Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в цитозоле нейтрофилов в присутствии МПО не связано с ее каталитической активностью, а обусловлено непосредственным взаимодействием фермента с компонентами плазматической мембраны.

Для оценки роли входа внеклеточного  $\text{Ca}^{2+}$  через плазматическую мембрану при МПО-индуцированном увеличении  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах эксперименты были проведены в бескальциевой среде, содержащей 1 мМ ЭДТА. На рис. 1, *a* (кривая 3) видно, что при добавлении МПО к суспензии нейтрофилов, находящихся в бескальциевой среде,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  снижалась на  $59 \pm 4\%$  ( $n = 6$ ,  $p < 0,05$ ) по сравнению с ответом нейтрофилов на МПО в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащей среде. Эти данные свидетельствуют о том, что увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах при добавлении МПО, действительно, обусловлено не только выходом  $\text{Ca}^{2+}$  из внутриклеточных депо, но и входом ионов кальция из внеклеточного пространства через каналы плазматической мембраны.

Для того чтобы исследовать участие различных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов плазматической мембраны в регуляции МПО-индуцированного входа ионов кальция в нейтрофилы, использовали  $\text{NiCl}_2$  – неорганический блокатор  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов Т-типа и верапамил – блокатор потенциал-зависимых  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа. Было установлено, что в присутствии  $\text{NiCl}_2$  (1 мМ) МПО-индуцированное увеличение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  уменьшалось на  $77 \pm 6\%$  ( $n = 5$ ,  $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем. Также

как и в случае с  $\text{NiCl}_2$ , после преинкубации клеток с верапамилом (10 мкМ) эффект, оказываемый МПО на нейтрофилы, снижался на  $36 \pm 2 \%$  ( $n = 4$ ,  $p < 0,05$ ) от контроля. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что МПО-индуцированный вход ионов кальция из внеклеточной среды происходит с участием кальциевых каналов Т-типа и верапамил-чувствительных  $\text{Ca}^{2+}$ -каналов L-типа плазматической мембраны.

Известно, что МПО-индуцированная активация внутриклеточной сигнализации в нейтрофилах осуществляется через  $\beta_2$ -интегрины (CD11b/CD18), связывание которых с лигандами происходит с участием ионов двухвалентных металлов [9]. Снижение МПО-индуцированного роста  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах, находящихся в бескальциевой среде, содержащей ЭДТА (хелатор двухвалентных катионов, необходимых, в том числе, для связывания интегринов с лигандами), может быть как в результате уменьшения связывания МПО со своим рецептором CD11b/CD18, так и ингибирования входа кальция извне. Для того чтобы оценить участие CD11b/CD18 в МПО-индуцированном  $\text{Ca}^{2+}$ -ответе нейтрофилов, исследовали влияние моноклональных антител – mAb к CD11b ( $\alpha$ -субъединице) и CD18 ( $\beta$ -субъединице)  $\beta_2$ -интегрина – на  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ нейтрофилов при добавлении МПО. Установлено, что присутствие mAb к CD18 субъединице  $\beta_2$ -интегрина не влияет (рис. 2, а) на МПО-индуцированный  $\text{Ca}^{2+}$ -ответ нейтрофилов. Однако в присутствии моноклональных антител к CD11b субъединице  $\beta_2$ -интегрина было выявлено снижение прироста  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в ответ на МПО на  $51 \pm 8 \%$  ( $n = 7$ ,  $p < 0,05$ ). Эти данные свидетельствуют об участии  $\alpha$ -субъединицы  $\beta_2$ -интегрина в увеличении  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах при добавлении МПО.

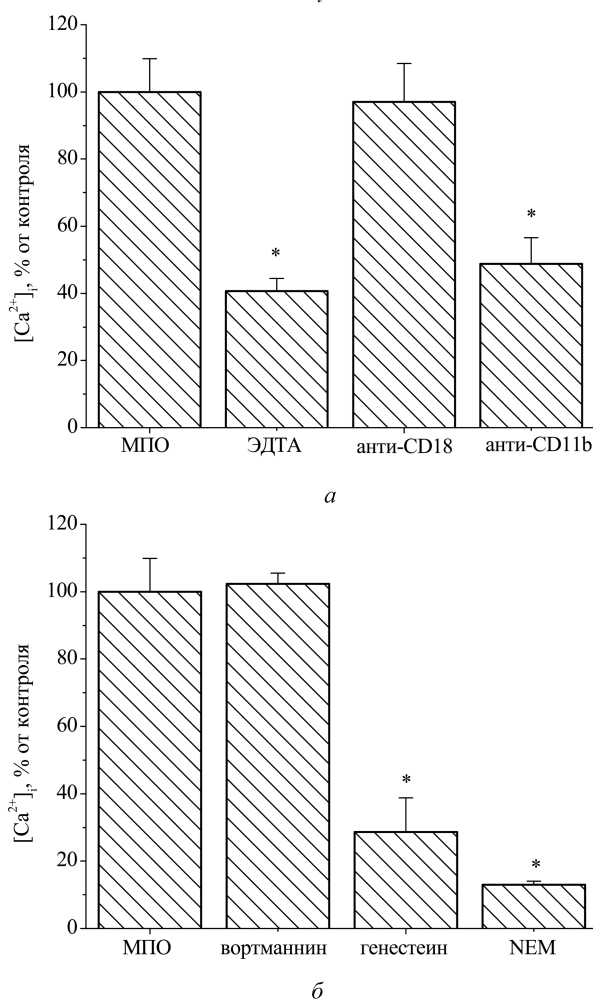


Рис. 2. Влияние моноклональных антител и ингибиторов сигнальных путей на МПО-индуцированное изменение  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах: зависимость изменения  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  в нейтрофилах в  $\text{Ca}^{2+}$ -содержащей среде при добавлении 100 нМ МПО в отсутствие и в присутствии моноклональных антител (10 мкг/мл) к субъединицам  $\beta_2$ -интегрина нейтрофилов, ЭДТА (1 мМ) (а), а также ингибиторов внутриклеточных сигнальных систем: генестеина (10 мкМ), вортманнина (100 нМ) и NEM (10 мкМ) (б)

Для оценки участия вклада различных сигнальных белков и ферментов в регуляцию кальциевой сигнализации в присутствии МПО использовали следующие ингибиторы: вортманнин (ингибитор фосфотидилинозитол-3-киназ), генестеин (ингибитор тирозинкиназ), NEM (известный сульфгидрильный реагент, основными мишенями которого в нейтрофилах являются цитозольный белок NSF (N-ethylmaleimide-sensitive factor), белок Rac1 и др.). Как видно из данных, представленных на рис. 2, б, инкубация нейтрофилов с вортманнином (100 нМ) не оказывала влияния на увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в клетках в присутствии МПО, в то время как предварительная обработка нейтрофилов генестеином (10 мкМ) снижала  $Ca^{2+}$ -ответ нейтрофилов при добавлении МПО на  $71 \pm 10\%$  ( $n = 6, p < 0,05$ ). Также нами было установлено, что проникающий через плазматическую мембрану сульфгидрильный реагент NEM (10 мкМ) значительно (на  $87 \pm 1\%$ ,  $n = 4, p < 0,05$ ) ингибировал МПО-индуцированное увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в нейтрофилах. Таким образом, полученные данные свидетельствуют об участии тирозинкиназ, а также белков и ферментов, содержащих SH-группы, в  $Ca^{2+}$ -ответе нейтрофилов после связывания МПО с интегринными.

Известно, что связывание агонистов различной природы с интегринными нейтрофилов может приводить к генерации внутриклеточных сигналов, которые активируют клеточные ответы [14]. Интегрины не содержат каталитических доменов и используют цитозольные нерецепторные тирозинкиназы, например, Src и Syk семейств для последующей трансдукции сигнала [14]. В свою очередь, активация тирозинкиназ может активировать фосфолипазу  $C\gamma$ , которая гидролизует фосфоинозитиды с образованием диацилглицерола и инозитол-3-фосфата. Последний, в свою очередь, инициирует высвобождение  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо [1]. Так как в данной работе было выявлено, что после преинкубации нейтрофилов с генестеином (10 мкМ) в бескальциевой среде, инициированный МПО,  $Ca^{2+}$ -ответ уменьшался на  $27 \pm 2\%$  ( $n = 3, p < 0,05$ ), можно предположить участие тирозинкиназ в МПО-индуцированном увеличении  $[Ca^{2+}]_i$  за счет выхода  $Ca^{2+}$  из внутриклеточных депо клеток. Имеются также данные [15], свидетельствующие об участии тирозинкиназ в увеличении  $[Ca^{2+}]_i$ , которое обусловлено открытием потенциал-зависимых кальциевых каналов, однако механизмы данного эффекта до конца не выяснены.

**Заключение.** Таким образом, МПО, секретируемая нейтрофилами в очагах воспаления, инициирует увеличение концентрации свободных ионов внутриклеточного кальция в нейтрофилах, обусловленное как выходом ионов кальция из внутриклеточных депо, так и входом внеклеточного  $Ca^{2+}$  через каналы плазматической мембраны. МПО-индуцированное увеличение  $[Ca^{2+}]_i$  в нейтрофилах не связано с проявлением каталитической активности фермента, а обусловлено связыванием МПО с  $\alpha$ -субъединицей  $\beta_2$ -интегрин нейтрофилов и активацией тирозинкиназ и SH-содержащих реагентов. Таким образом, кальций, являющийся основным вторичным мессенджером во внутриклеточной передаче сигналов к молекулам-мишеням, играет ключевую роль в регуляции МПО-зависимой дегрануляции и генерации активных форм кислорода нейтрофилами.

## Литература

1. Галкин А. А., Демидова В. С. // Успехи современной биологии. 2007. Т. 127, № 1. С. 58–72.
2. Klebanoff S. J. // J. of leukocyte biology. 2005. Vol. 7. P. 598–625.
3. Zavadnik I. B. et al. // Bioelectrochemistry. 2002. Vol. 58. P. 127–135.
4. Горудко И. В. и др. // Биол. мембраны. 2010. Т. 27, № 4. С. 314–324.
5. Köröczki G. F. et al. // J. Immunol. 2001. Vol. 167. P. 451–460.
6. Maeba R. et al. // FEBS Lett. 1995. Vol. 377, N 3. P. 309–312.
7. Григорьева Д. В. и др. // Докл. НАН Беларуси. 2012. Т. 56, № 6. С. 47–50.
8. Gorudko I. V. et al. // Biology Open. 2013. Vol. 2. P. 916–923.
9. Lau D. et al. // PNAS. Vol. 102, N 2. P. 431–436.
10. Harfi I., Corazza F., D'Hondt S., Sariban E. // J. Immunol. 2005. Vol. 175. P. 4091–4102.
11. Timoshenko A. V. et al. // Methods Mol. Med. 1998. Vol. 9. P. 441–451.
12. Горудко И. В. и др. // Биоорг. химия. 2009. Т. 35, № 5. С. 629–639.
13. Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R. Y. // J. Biol. Chem. 1985. Vol. 260, N 6. P. 3440–3450.
14. Berton G., Lowell C. A. // Cell. Signal. 1999. Vol. 11, N 9. P. 621–635.
15. Wijetunge S., Lynn J. S., Hughes A. D. // British J. of Pharmacology. 2000. Vol. 129. P. 1347–1354.

*D. V. GRIGORIEVA, I. V. GORUDKO, A. V. SOKOLOV, E. V. SHAMOVA, V. B. VASILIEV,  
O. M. PANASENKO, S. N. CHERENKEVICH*

dargr@tut.by

## **REGULATION OF $Ca^{2+}$ -SIGNALING IN NEUTROPHILS BY MYELOPEROXIDASE**

### **Summary**

It is shown that myeloperoxidase (MPO) initiates an increase in the concentration of intracellular free calcium ions in neutrophils caused both by the release of calcium ions from intracellular stores, and extracellular  $Ca^{2+}$  entry across the plasma membrane channels. It is found that MPO modified by hypohalous acids retains its ability to induce  $Ca^{2+}$ -signaling in neutrophils. It is established that MPO-induced entry of  $Ca^{2+}$  into cytosol of neutrophils is not associated with its catalytic activity, but caused by direct binding of MPO to  $\alpha$ -subunit of  $\beta_2$ -integrin of neutrophils and tyrosine kinase activation.