

ПРАЙМИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА НА АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ

Григорьева Д.В.¹, Терехова М.С.¹, Шамова Е.В.¹, Ефремов Н.А.², Малюшкова Е.В.¹, Семак И.В.¹, Черенкевич С.Н.¹, Соколов А.В.³, Панасенко О.М.⁴, Горудко И.В.¹

¹ Белорусский государственный университет

пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, Республика Беларусь; e-mail: dargr@tut.by

² ГУ «РНПЦ онкологии и медицинской радиологии им. Н.Н. Александрова»

агродорог Лесной, Минский район, 223040, Республика Беларусь; e-mail: hakumen737@gmail.com

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

ул. Академика Павлова, 12, г. Санкт-Петербург, 197376, РФ; e-mail: biochemsokolov@gmail.com

⁴ ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России

ул. Малая Пироговская, 1а, г. Москва, 119435, РФ; e-mail: o-panas@mail.ru

Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. Установлено, что рекомбинантный лактоферрин человека (рЛф), выделенный из молока трансгенных коз, связывается с нейтрофилами периферической крови человека. Данное связывание ведет к увеличению внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция за счет мобилизации Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула и входа внеклеточных Ca^{2+} через депоуправляемые кальциевые каналы и кальциевые каналы Т-типа, фосфорилированию внутриклеточных белков по тирозину, а также к реорганизации актинового цитоскелета. Показано, что рЛф праймирует fMLP-индуцированный респираторный взрыв нейтрофилов. Полученные данные свидетельствуют о том, что рЛф является перспективным белком с иммуномодулирующим действием, направленным на повышение функциональной активности нейтрофилов при патологиях, ассоциированных со сниженной киллерной способностью этих клеток.

Ключевые слова: рекомбинантный лактоферрин человека, нейтрофилы, респираторный взрыв, ионы кальция, тирозинкиназы, актиновый цитоскелет.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в современной науке значительно повысился интерес к изучению роли железосвязывающего белка лактоферрина (Лф), обладающего уникальным набором биологических функций различного характера. Изначально Лф рассматривался исключительно как белок, проявляющий бактериостатическое действие за счет связывания ионов железа и других металлов, что лишает бактериальные клетки важных микроэлементов, необходимых для их роста [1]. Однако в дальнейшем были выявлены бактерицидное, антиканцерогенное, противовоспалительное, иммуномодулирующее и другие свойства Лф [2]. Лф экспрессируется эпителиальными клетками внутренних желез млекопитающих с последующей секрецией белка на слизистую или в другие жидкости, а также синтезируется и накапливается во вторичных гранулах нейтрофилов. Как известно, наиболее многочисленную популяцию лейкоцитов периферической крови у взрослого человека составляют как раз нейтрофильные гранулоциты. Нейтрофилы являются клеточным компонентом врожденного иммунитета [3]. При дегрануляции или лизисе клеток Лф высвобождается во внеклеточное пространство. В связи с этим Лф относят к белкам острой фазы воспаления, увеличение его концентрации в крови либо других жидкостях служит в качестве маркера течения воспалительной реакции в организме. Концентрация Лф в плазме зависит от количества нейтрофилов. Поскольку 10^6 нейтрофилов содержат 15 мкг Лф, а в очагах воспаления концентрация данных клеток варьируется от 25×10^6 кл/мл до 5×10^7 кл/мл, то локальная концентрация Лф может достигать 750 мкг/мл. При активации дегрануляции нейтрофилов высвобождающийся из гранул Лф может связываться с клетками, находящимися в ближайшем микроокружении нейтрофилов в очаге воспаления, а именно с макрофагами, лимфоцитами, тучными клетками и базофилами [4]. Однако помимо этого, Лф также может связываться с поверхностью самих нейтрофилов и регулировать их структурно-функциональное состояние. К настоящему времени установлено, что Лф усиливает адгезию нейтрофилов к эндотелию [5], а также задерживает апоптоз нейтрофилов [6]. Однако как влияет Лф на проявление других функциональных активностей нейтрофилов, а именно продукцию активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ), секрецию антимикробных гранулярных белков, способность образовывать нейтрофильные внеклеточные ловушки и другие – неизвестно. Поэтому целью данной работы явилось исследование влияния Лф на респираторный взрыв нейтрофилов, а также выяснение механизмов, оказываемых Лф эффектов.

В исследовании использовали рекомбинантный Лф (рЛф) человека, выделенный из молока трансгенных коз-продуцентов. В работе [7] было показано, что рЛф по физическим, биохимическим и биологическим характеристикам аналогичен природному Лф человека из женского молока, что делает его перспективным соединением для использования в пищевой, фармацевтической и сельскохозяйственной промышленности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Нейтрофилы выделяли из донорской крови, стабилизированной 109 мМ раствором цитрата натрия, полученной из Республиканского научно-практического центра гематологии и медицинских биотехнологий (г. Минск, Республика Беларусь). Кровь смешивали с 6 %-ным раствором декстрана Т70 (5:1, v/v) в 0,9 %-ном NaCl и осаждали клеточную массу в течение 30-40 мин при 23 °С с использованием пластиковых шприцов. Слой плазмы, обогащенной лейкоцитами, собирали в пластиковые пробирки и центрифугировали в течение 7 мин при 400 g, после чего примесь эритроцитов удаляли осмотическим лизисом, добавляя к осадку клеток сначала 3 мл 0,2 %-ного NaCl, а затем столько же 1,6 %-ного NaCl, содержащего 20 мг/мл D-глюкозы. Полученную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 400 g. Осадок клеток ресуспензировали в 6 мл фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 10 мМ Na₂HPO₄/KH₂PO₄, 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl (pH 7,35), насливали на 3 мл лимфопрепа и центрифугировали в течение 10 мин при 400 g. Полученный осадок нейтрофилов отмывали в ФСБ в течение 7 мин при 400 g. Отмытые нейтрофилы ресуспензировали в ФСБ с глюкозой (2 мг/мл) и хранили при 4 °С в течение 6-8 часов. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97-98 %, число жизнеспособных клеток по тесту с пропидиум иодидом – не менее 96 %.

Связывание рЛф с нейтрофилами оценивали методом проточной цитофлуориметрии. 100 мкл цельной крови инкубировали с рЛф (250 мкг/мл), меченным флуоресцеин изотиоцианатом (FITC), в течение 10 мин при 23 °С, затем клеточную суспензию прокрашивали меченым антителом CD45-PC5 к общелейкоцитарному антигену (трансмембранному гликопротеину), представленному на поверхности всех лейкоцитов человека, в течение 15 мин при 23 °С. Эритроциты лизировали 1 мл Versalyse Lysing Solution в течение 10 мин при 23 °С, после чего полученная суспензия клеток была проанализирована на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter). Анализ уровня экспрессии CD45 в сочетании с боковым светорассеянием (SSC/CD45) позволил разделить лейкоциты по гранулярности и выявить фракцию нейтрофилов.

Производство H₂O₂ нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом на компьютеризированном спектрофлуориметре CM 2203 («СОЛАР», Минск, Беларусь) с использованием скополетина. Скополетин является флуоресцентным субстратом пероксидазы хрена, при окислении которого в присутствии H₂O₂ образуется нефлуоресцирующий продукт. К 1 мл суспензии нейтрофилов (10⁶ кл/мл в ФСБ с 1 мМ CaCl₂, 0,5 мМ MgCl₂, 37 °С), содержащей 1 мкМ скополетина, 20 мкг/мл пероксидазы хрена и 1 мМ NaN₃ добавляли рЛф (250 мкг/мл), а затем, при отсутствии влияния последнего, fMLP (1 мкМ). Кинетику окисления скополетина регистрировали по уменьшению интенсивности флуоресценции на длине волны 460 нм (возбуждение на длине волны 350 нм). Скорость продукции H₂O₂ клетками определяли как тангенс угла наклона линейного участка кинетической кривой, отражающей убыль интенсивности флуоресценции скополетина в результате его окисления H₂O₂.

Дегрануляцию специфических гранул нейтрофилов оценивали по выходу из клеток лизоцима – фермента, содержащегося в азурофильных и специфических гранулах нейтрофилов. К суспензии нейтрофилов в ФСБ, содержащем 1 мМ CaCl₂ и 0,5 мМ MgCl₂, добавляли рЛф (25-500 мкг/мл) и инкубировали образцы в течение 20 мин при 37 °С. Конечная концентрация клеток в пробах составляла 3×10⁶ кл/мл. Реакцию дегрануляции останавливали путем помещения образцов на лед и последующим центрифугированием в течение 8 мин при 2500 g. Полученные супернатанты использовали для регистрации активности лизоцима, которую определяли по скорости лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus*. Анализируемую пробу (100 мкл) добавляли к 900 мкл суспензии *M. lysodeikticus* в 0,1 М Na₂HPO₄/KH₂PO₄ буфере (pH 6,2) и при 37 °С регистрировали изменение оптической плотности полученной суспензии на длине волны 450 нм с применением компьютеризированного спектрофотометра РВ 2201 («СОЛАР», Минск, Беларусь). Активность лизоцима определяли по тангенсу угла наклона линейного участка полученных экспериментальных кривых.

Внутриклеточную концентрацию свободных ионов кальция ([Ca²⁺]_i) в нейтрофилах определяли с применением флуоресцентного зонда фура 2-АМ. К 1 мл (10⁷ кл/мл) отмытых нейтрофилов в HEPES-буфере, содержащем 4,4 мМ MgSO₄, 1,7 мМ CaCl₂, добавляли 2 мкл 0,5 мМ фура 2-АМ и инкубировали в течение 40 мин при 37 °С и постоянном перемешивании. Нагруженные зондом клетки отмывали от инкубационной среды дважды HEPES-буфером в течение 5 мин при 400 g. Отмытые нейтрофилы сохраняли в качестве исходной суспензии в концентрации 10⁷ кл/мл. Для измерения [Ca²⁺]_i в кювету спектрофлуориметра вносили 0,9 мл HEPES-буфера, содержащего 4,4 мМ MgSO₄, 1,7 мМ CaCl₂ и 100 мкл исходной суспензии клеток. Измерение интенсивности флуоресценции проводили на длине волны 510 нм (возбуждение флуоресценции – 340 нм и 380 нм) при 37 °С в кинетическом режиме с использованием спектрофлуориметра CM 2203 («СОЛАР», Минск, Беларусь). Концентрацию цитоплазматического кальция рассчитывали по известной методике [8].

Структурную организацию актинового цитоскелета в нейтрофилах изучали методом лазерной конфокальной микроскопии (конфокальный микроскоп NanoFinder 30, Tokyo Instruments). Для приготовления препаратов суспензию нейтрофилов в концентрации 10⁷ кл/мл в ФСБ, содержащем 1 мМ CaCl₂, 0,5 мМ MgCl₂, инкубировали 15 мин с рЛф (250 мкг/мл). Затем клетки фиксировали 4 % параформальдегидом и через 10 мин отмывали ФСБ. Отмытые клетки наносили на поверхность покровных стекол, покрытых поли-L-лизинном. Через 30 мин образцы промывали 3 раза ФСБ. Покровные стекла с нейтрофилами инкубировали 5 мин с 0,1 % тритоном Х-100 для пермеабиллизации мембран, затем образцы отмывали 3 раза в ФСБ и проводили визуализацию F-актина. Для этого покровные стекла с нейтрофилами инкубировали 40 мин с фаллоидином – высокоафинным зондом на фибриллярный актин (F-актин), конъюгированным с Alexa Fluor 488, (0,165 мкМ), после чего стекла отмывались

от избытка флуоресцентного зонда ФСБ (2 раза по 10 мин) и дистиллированной водой (1 раз 10 мин). Покровные стекла с нейтрофилами монтировали на предметные стекла, обезжиренные 96 % спиртом, с использованием полимеризующейся смолы для флуоресцентной микроскопии. Для возбуждения флуоресценции флуоресцентного зонда использовали лазер с длиной волны 473 нм, для детекции флуоресценции использовали фильтры 505-535 нм. Получение и обработку изображений осуществляли при помощи прилагаемого к микроскопу программного обеспечения «NanoFinder Data Viewer».

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с использованием программного пакета Origin 7.0. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость различий между значениями среднего рассчитывали по критерию Стьюдента, считая различия достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Кинетические кривые представлены как типичные для серии из 5-7 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения способности рЛф связываться с нейтрофилами был применен метод проточной цитофлуориметрии, позволяющий непосредственно визуализировать связывание белка, меченного флуорофором, с плазматической мембраной клетки. С использованием FITC-меченного рЛф показано (рис. 1), что рЛф связывается с поверхностью лейкоцитов, в том числе и с нейтрофилами.

Далее нами было исследовано влияние рЛф на активацию НАДФН-оксидазы нейтрофилов, регистрируемую флуоресцентным методом по окислению скополетина пероксидазой хрена в присутствии образующегося при респираторном взрыве H_2O_2 . Как видно из данных, представленных на рисунке 2, рЛф не влиял на продукцию H_2O_2 клетками в базальных условиях (без агониста), однако усиливал fMLP-индуцированный респираторный взрыв нейтрофилов. Так, в присутствии рЛф (250 мкг/мл) скорость окисления скополетина в суспензии fMLP-активированных нейтрофилов увеличивалась на $33 \pm 7\%$.

Нейтрофилы в организме, как правило, подвергаются параллельному и/или последовательному воздействию интермедиатов, их активация чаще всего происходит на фоне измененного, "праймированного", состояния. Праймирующий стимул вызывает метаболическую перестройку, не приводящую к активации клетки, следствием его влияния является усиление ответа на последующую активацию [9]. Судя по всему, рЛф является праймирующим агентом для нейтрофилов.

В зависимости от рецептора, через который действует праймирующий агент, могут реализовываться разные механизмы праймирования нейтрофилов: изменения в уровне экспрессии адгезивных молекул на поверхности клетки, высвобождение содержимого гранул, полимеризация актина, фосфорилирование белков, синтез белка *de novo*, модуляция внутриклеточной концентрации ионов кальция, активация фосфолипаз, образование биоактивных липидов и пр. [10]. Отвечая более выраженной реакцией, праймированные нейтрофилы не только выполняют свое физиологическое назначение (оно связано с подготовкой к экстремному выходу из сосудов и уничтожению фагоцитарных объектов), но и включаются в патологическое воспаление – развитие ревматоидного артрита, сепсиса и пр. [11]. В связи с этим изучение внутриклеточных сигнальных систем, вовлеченных в праймирование, поможет раскрыть механизмы, которыми регулируются специфические функции нейтрофилов, и развить терапевтические стратегии, направленные на подавление чрезмерной цитотоксичности нейтрофилов.

Как правило, праймирование НАДФН-оксидазного комплекса ассоциировано с различными изменениями в клетке, включающими частичное фосфорилирование p47phox, конформационные изменения комплекса p47phox/p40phox/p67phox и транслокацию цитохрома b558 из внутриклеточных гранул на плазматическую

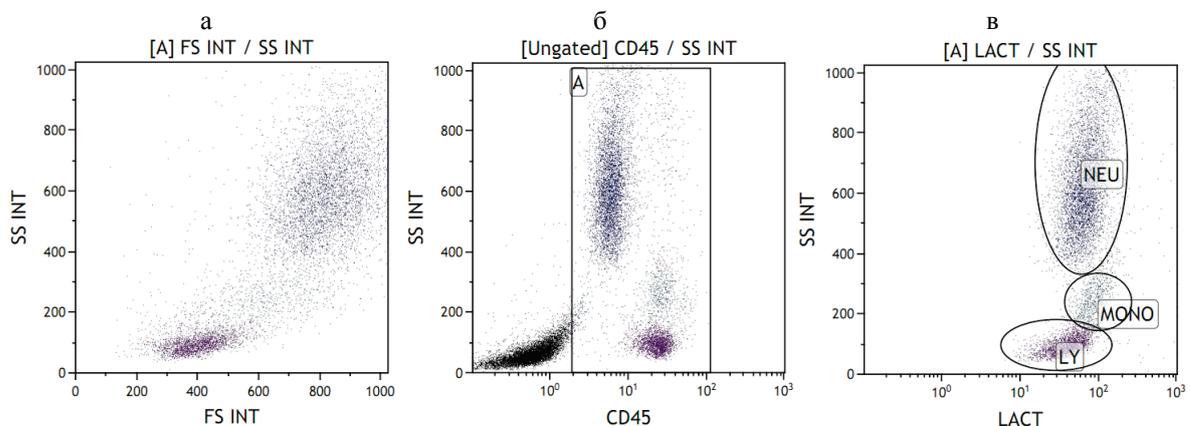


Рисунок 1. Связывание рЛф с нейтрофилами: а – диаграмма бокового-прямого (SS-FS) светорассеяния для суспензии лейкоцитов крови: по оси абсцисс – малоугловое светорассеяние, характеризующее размер клеток, по оси ординат – боковое светорассеяние, характеризующее структуру клеток; б – гистограмма распределения CD45 на лейкоцитах периферической крови; в – гистограмма распределения рЛф-FITC на лейкоцитах периферической крови

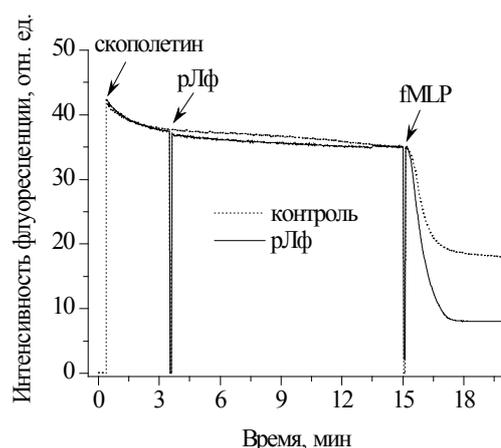


Рисунок 2. Типичные кинетические кривые окисления скополетина (1 мкМ) в суспензии нейтрофилов (1×10^6 кл/мл), активированных fMLP (1 мкМ) в отсутствие и в присутствии рЛф (250 мкг/мл)

мембрану посредством экзоцитоза содержимого гранул нейтрофилов [12]. В нейтрофилах в состоянии покоя лишь 15 % субъединиц цитохрома b558 (gp91phox и p22phox) локализованы в плазматической мембране, оставшиеся 85 % – в мембране специфических гранул и секреторных везикул. Одной из стадий процесса дегрануляции является контакт внешней поверхности липидного бислоя мембраны, окружающей гранулу, с внутренней поверхностью плазматической мембраны с последующим полным сливанием гранулы с плазматической мембраной [13]. Нами было показано, что рЛф в концентрациях, характерных для очагов воспаления, инициирует дегрануляцию специфических гранул нейтрофилов, регистрируемую по высвобождению во внеклеточную среду лизоцима – фермента, содержащегося в азурофильных и специфических гранулах клеток. Так, при действии рЛф в физиологических концентрациях (вплоть до 100 мкг/мл) экзоцитоз лизоцима не регистрировался, при добавлении рЛф в концентрациях 250 мкг/мл и 500 мкг/мл выход лизоцима увеличивался на 21 ± 4 % и 55 ± 5 %, соответственно, по сравнению с выходом белка в контроле. Стимуляция дегрануляции специфических гранул при действии рЛф, по всей видимости, способствует также увеличению содержания цитохрома b558 в плазматической мембране нейтрофилов, что является одним из возможных механизмов прайминга респираторного взрыва нейтрофилов при действии рЛф.

Важную роль в праймировании нейтрофилов играют ионы кальция [14]. Так, активация многих ферментов, участвующих в регуляции респираторного взрыва (например, протеинкиназы C, митоген-активируемых протеинкиназ и др.), зависит от цитозольных Ca^{2+} и не происходит в их отсутствие. В работе [15] показано, что праймирующий эффект липополисахаридов зависит от внутриклеточных Ca^{2+} и блокируется их хелаторами. Finkel T.N. с соавторами впервые обнаружили нейтрофил-праймирующую активность кальций-специфического ионофора, иономицина [16]. Поэтому далее нами было исследовано влияние рЛф на изменение концентрации цитозольных ионов кальция в нейтрофилах. На рисунке 3а приведены типичные кинетические кривые рЛф-индуцированного увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах. Видно, что с увеличением концентрации рЛф в среде пик увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках увеличивался (рис. 3б).

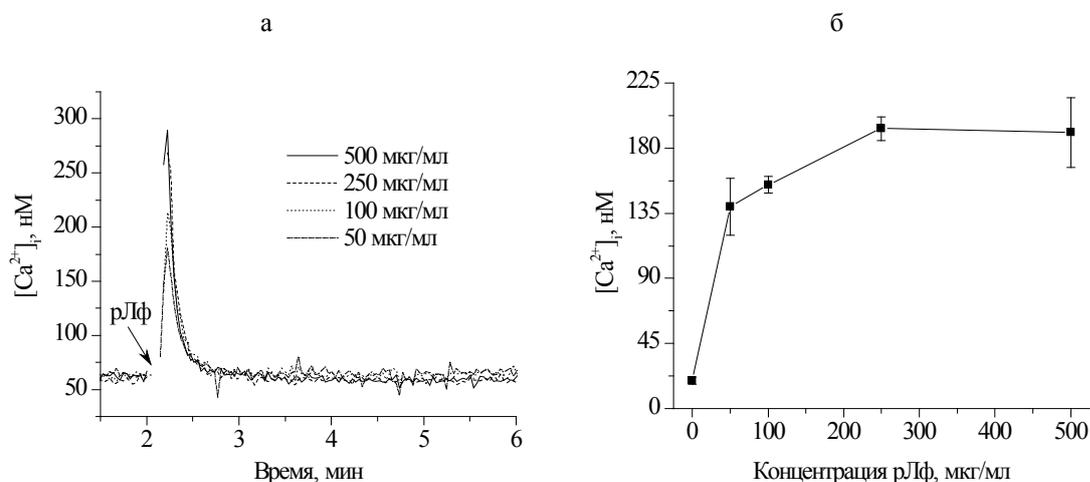


Рисунок 3. Влияние рЛф на Ca^{2+} -сигнализацию в нейтрофилах: а – типичные кинетические кривые изменения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах в Ca^{2+} -содержащей среде при действии рЛф в различных концентрациях; б – зависимость увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах от концентрации добавленного рЛф

Поскольку увеличение $[Ca^{2+}]_i$ может быть обусловлено высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо и/или поступление внеклеточных Ca^{2+} в клетку через каналы плазматической мембраны [17], далее нами были идентифицированы пути увеличения концентрации цитоплазматических Ca^{2+} в нейтрофилах при действии рЛф. Как видно из данных, представленных на рисунке 4, добавление рЛф к суспензии нейтрофилов в бескальциевой среде, содержащей 1 мМ ЭДТА – хелатор внеклеточных Ca^{2+} , вызывало значительно меньшее увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах по сравнению с эффектом рЛф в Ca^{2+} -содержащей среде. В нейтрофилах большая часть высвобождаемых из внутриклеточных депо Ca^{2+} запасена в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и митохондриях, число которых в зрелых нейтрофилах мало. РЛф, добавленный к суспензии нейтрофилов в бескальциевой среде, проинкубированных с тапсигаргином (ТГ) (2 мкМ) – блокатром Ca^{2+} -АТФазы ЭР, не вызывал увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в клетках. Таким образом, мобилизация Ca^{2+} из ЭР вносит лишь ~20 % в эффект рЛф на Ca^{2+} -отклик нейтрофилов, следовательно, ~80 % – вход внеклеточных Ca^{2+} через каналы плазматической мембраны. Вход Ca^{2+} в клетки осуществляется в основном через потенциал-зависимые, рецептор-управляемые и депо-зависимые Ca^{2+} -каналы [17]. При использовании $NiCl_2$ – блокатора потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов Т-типа, регистрировалось значительно меньшее увеличение $[Ca^{2+}]_i$, вызванное добавлением рЛф (рис. 4). Предварительное инкубирование клеток с верапамилом – антагонистом потенциал-управляемых Ca^{2+} -каналов L-типа, не влияло на рЛф-индуцированное увеличение $[Ca^{2+}]_i$. Ca^{2+} -ответ на стимуляцию рЛф нейтрофилов имеет вид кривой с острым подъемом и спадом в течение 1 мин, максимум $[Ca^{2+}]_i$ в цитоплазме достигается через 2-3 с после начала стимуляции. Известно, что через каналы Т-типа в клетки поступает быстрая составляющая кальциевого тока и после открытия каналы Т-типа быстро инактивируются. Каналы L-типа, будучи активированными, сохраняют это состояние довольно долго [17]. Принимая во внимание вышесказанное, можно заключить, что рЛф, по-видимому, стимулирует открытие потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов Т-типа, которые обеспечивают увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах. Кроме того, необходимо отметить, что при последующем добавлении $CaCl_2$ к активированным рЛф нейтрофилам в бескальциевой среде наблюдалось повторное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ на 70 ± 7 нМ, что является свидетельством депо-зависимого входа Ca^{2+} , ассоциированного с частичным опустошением ЭР при действии рЛф.

Известно, что при праймировании нейтрофилов активность протеинкиназ может увеличиваться в несколько раз [18]. Одним из механизмов праймирования является усиление фосфорилирования белков по остаткам тирозина. К настоящему времени хорошо охарактеризован ряд сигнальных путей, активируемых тирозинкиназами. Они включают фосфолипазу С (PLC) и фосфатидилинозитол-3-киназу, активация которых приводит к высвобождению различных сигнальных интермедиаторов, одними из которых как раз и являются Ca^{2+} [19]. В работе [20] показано, что генистеин, неспецифический ингибитор тирозинкиназ, снижал Соп А-индуцированную Ca^{2+} мобилизацию в нейтрофилах на 60 %. Такие ингибиторы тирозинкиназ как гербимидин А и метил-2,5-дигидроксидинамат, ингибировали β_2 -интегрин-индуцированную Ca^{2+} -сигнализацию. Для других типов рецепторов было показано, что PLC-у является одним из субстратов для Syk – одной из тирозинкиназ Src-семейства. Поэтому далее было исследовано, вовлечены ли тирозинкиназы в Ca^{2+} -сигнал нейтрофилов в ответ на рЛф. Типичные кинетические кривые рЛф-индуцированного увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах в отсутствие и в присутствии генистеина представлены на рисунке 5а. Так, генистеин в исследуемом диапазоне концентраций (10-100 мкМ) ингибирует Ca^{2+} -отклик нейтрофилов на рЛф (рис. 5б), что свидетельствует в пользу вовлеченности тирозинкиназ в прайминг нейтрофилов при действии рЛф. Можно предположить, что праймирующий эффект рЛф определяется частичным фосфорилированием p47phox, подготавливая его к последующей полной активации. Таким же реакциям фосфорилирования при действии рЛф могут подвергаться и остальные цитозольные субъединицы НАДФН-оксидазного комплекса.

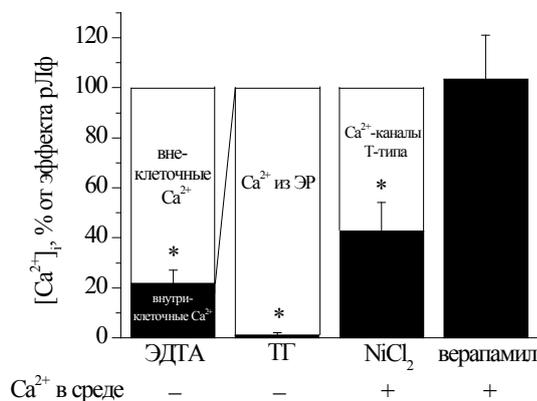


Рисунок 4. Влияние ЭДТА (1 мМ) – хелатора внеклеточных Ca^{2+} , ТГ (2 мкМ) – блокатора Ca^{2+} -АТФазы ЭР, $NiCl_2$ (1 мМ) – блокатора Ca^{2+} -каналов Т-типа и верапамила (10 мкМ) – ингибитора Ca^{2+} -каналов L-типа на рЛф-индуцированное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах. Эксперименты с ЭДТА и ТГ были проведены в бескальциевой среде, эксперименты с $NiCl_2$ и верапамилом – в Ca^{2+} -содержащей среде. * $p < 0,05$ по сравнению с эффектом рЛф

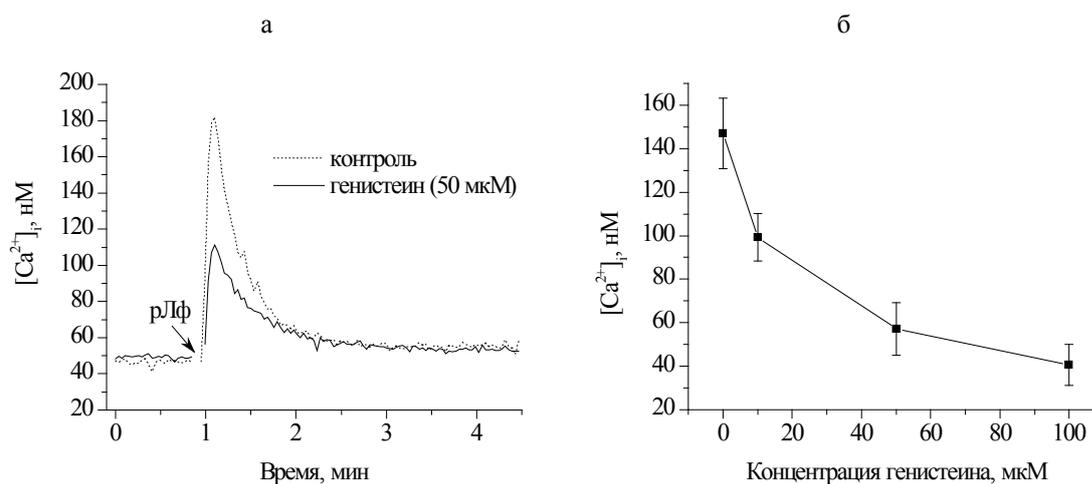


Рисунок 5. Влияние генистеина (ингибитора тирозинкиназ) на рЛФ-индуцированный Ca^{2+} -отклик нейтрофилов: а – типичные кинетические кривые изменения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах (1×10^6 кл/мл) в отсутствие и в присутствии генистеина (50 мкМ) в Ca^{2+} -содержащей среде при действии рЛФ (250 мкг/мл); б – зависимость рЛФ (250 мкг/мл)-индуцированного увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах от концентрации генистеина

Существует классификация праймирующих агентов: быстрые агенты (фактор активации тромбоцитов, лейкотриен В₄, С₅а субъединица системы комплемента), которые действуют через 3-5 мин и обычно включают активацию тирозинкиназ, и длительно действующие агенты (липолисахариды, фактор некроза опухоли-α, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, интерлейкин 8), проявление эффекта которых регистрируется после 15-60 мин их действия [12]. Таким образом, учитывая приведенные выше данные о вовлеченности тирозинкиназ, а также тот факт, что предварительной инкубации нейтрофилов с рЛФ в течение 5 мин было достаточно для праймирования респираторного взрыва нейтрофилов, можно заключить, что рЛФ является быстрым праймирующим агентом.

Праймирование нейтрофилов, как правило, сопровождается изменением морфологии клетки путем перестройки актина, а именно F-актина. Актиновый цитоскелет может служить средством для координации процесса сборки НАДФН-оксидазы. Однако к настоящему времени точные механизмы влияния реорганизации цитоскелета на активацию НАДФН-оксидазы полностью не раскрыты. В работе [12] обобщены данные по ассоциации субъединиц НАДФН-оксидазного комплекса с актином или актин-связывающими белками. Так, р67phox и р40phox взаимодействуют с коронином – цитоплазматическим актин-связывающим белком, участвующим в поддержании динамичности актинового цитоскелета. Моезин, F-актин-связывающий белок, связывается с р47phox и р40phox фосфоинозитол-зависимым образом, а кофлин ассоциирован с р67phox. Для изучения вовлеченности реорганизации микрофиламентов цитоскелета в ответ нейтрофилов при действии рЛФ

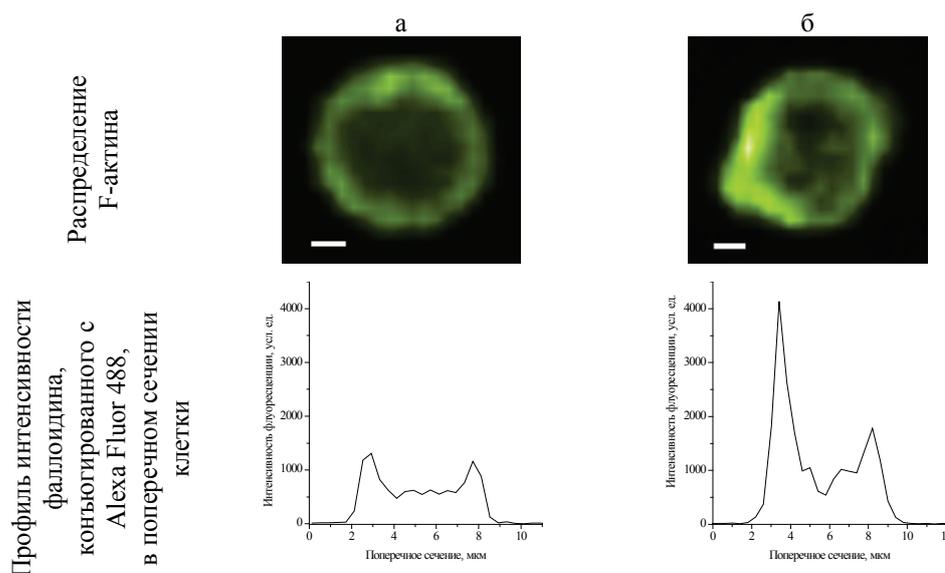


Рисунок 6. Изменения актинового цитоскелета нейтрофилов в отсутствие (а) и в присутствии (б) рЛФ (250 мкг/мл), регистрируемые по флуоресценции фаллоидина, конъюгированного с Alexa Fluor 488. Профили интенсивности флуоресценции в поперечном сечении клетки приведены на нижней панели. Масштабная линейка на фотографии – 1 мкм

далее с использованием метода лазерной конфокальной микроскопии было исследовано влияние рЛф на состояние актинового цитоскелета нейтрофилов. Показано, что интактные нейтрофилы имели округлую форму с четко выраженным кортикальным цитоскелетом, который на срезе имел вид плотного кольца (рис. 6а). После инкубации нейтрофилов с рЛф (250 мкг/мл) их форма изменялась, что свидетельствует о реорганизации актинового цитоскелета (рис. 6б). Так, в присутствии рЛф выявлено перераспределение фибриллярного актина: деполимеризация кортикального актинового цитоскелета и сосредоточение F-актина у края клеточной поверхности с образованием псевдоподий различной формы у 73 ± 8 % клеток по сравнению с 22 ± 1 % активированных клеток в контроле. Подтверждением этих данных явилась локализация острых пиков интенсивности фаллоидина, конъюгированного с Alexa Fluor 488, на периферии клеток, проинкубированных с рЛф (рис. 6б, нижняя панель). Можно предположить, что реорганизация актинового цитоскелета нейтрофилов при действии рЛф будет приводить к изменению конформации р47phox/p40phox/p67phox комплекса.

Таким образом, рЛф, связываясь с плазматической мембраной нейтрофилов, запускает активационный сигнал, включающий в себя активацию тирозинкиназ, увеличение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция, а также реорганизацию актинового цитоскелета клеток, приводящий к экзоцитозу содержимого специфических гранул, в том числе цитохрома b558, что, в конечном итоге, ведет к праймированию клеток и последующему усилению fMLP-индуцированного респираторного взрыва нейтрофилов.

Работа выполнена при финансовой поддержке БРФФИ (Б18Р-058) и РФФИ (18-515-00004).

Список литературы / References:

1. García-Montoya I.A., Cendón T.S., Arévalo-Gallegos S., Rascón-Cruz Q. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, vol. 1820, pp. 226-236.
2. Ward P.P., Paz E., Conneely O.M. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview. *Cell Mol. Life Sci.*, 2005, vol. 62, pp. 2540-2548.
3. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, vol. 13, pp. 159-175.
4. Suzuki Y.A., Lopez V., Lönnnerdal B. Mammalian lactoferrin receptors: structure and function. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, vol. 62, pp. 2560-2575.
5. Oseas R., Yang H.H., Baehner R.L., Boxer L.A. Lactoferrin: a promoter of polymorphonuclear leukocyte adhesiveness. *Blood*, 1981, vol. 57, pp. 939-945.
6. Francis N., Wong S.H., Hampson P., Wang K., Young S.P., Deigner H.P., Salmon M., Scheel-Toellner D., Lord J.M. Lactoferrin inhibits neutrophil apoptosis via blockade of proximal apoptotic signaling events. *Biochem. Biophys. Acta*, 2011, vol. 1813, pp. 1822-1826.
7. Лукашевич В.С., Будевич А.И., Семак И.В., Кузнецова В.Н., Малюшкова Е.В., Пыж А.Э., Новаковская С.А., Рудниченко Ю.А., Попков Н.А., Ивашкевич О.А., Залуцкий И.В. Получение рекомбинантного лактоферрина человека из молока коз-производителей и его физиологические эффекты. *Доклады НАН Беларуси*, 2016, т. 60, № 1, с. 72-81. [Lukashevich V.S., Budevich A.I., Semak I.V., Kuznetsova V.N., Malyushkova E.V., Pyzh A.E., Novakovskaya S.A., Rudnichenko Yu.A., Popkov N.A., Ivashkevich O.A., Zalutsky I.V. The production of recombinant human lactoferrin from milk of goat producers and its physiological effects. *Doklady NAN Belarusi*, 2016, vol. 60, no. 1, pp. 72-81. (In Russ.)]
8. Gryniewicz G., Poenie M., Tsien R.Y. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, no. 6, pp. 3440-3450.
9. Condliffe A.M., Kitchen E., Chilvers E.R. Neutrophil priming: pathophysiological consequences and underlying mechanisms. *Clin. Sci. (Lond.)*, 1998, vol. 94, pp. 461-471.
10. Swain S.D., Rohn T.T., Quinn M.T. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. *Antioxid. Redox Signal*, 2002, vol. 4, pp. 69-83.
11. Маянский А.Н. НАДФН-оксидаза нейтрофилов: активация и регуляция. *Цитокины и воспаления*, 2007, т. 6, № 3, с. 3-13. [Mayanskiy A.N. NADPH-oxidase of neutrophils: activation and regulation. *Tsitokiny i vospaleniye*, 2007, vol. 6, no. 3, pp. 3-13. (In Russ.)]
12. Sheppard F.R., Kelher M.R., Moore E.E., McLaughlin N.J., Banerjee A., Silliman C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, vol. 78, pp. 1025-1042.
13. Lacy P., Eitzen G. Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front. Biosci.*, 2008, vol. 13, pp. 5559-5570.
14. Görlach A., Bertram K., Hudcova S., Krizanova O. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox Biol.*, 2015, vol. 6, pp. 260-271.
15. Forehand J.R., Pabst M.J., Phillips W.A., Johnston R.B. Lipopolysaccharide priming of human neutrophils for an enhanced respiratory burst. Role of intracellular free calcium. *J. Clin. Invest.*, 1989, vol. 83, pp. 74-83.
16. Finkel T.H., Pabst M.J., Suzuki H., Guthrie L.A., Forehand J.R., Phillips W.A., Johnston R.B. Priming of neutrophils and macrophages for enhanced release of superoxide anion by the calcium ionophore ionomycin. Implications for regulation of the respiratory burst. *J. Biol. Chem.*, 1987, vol. 262, pp. 12589-12596.
17. Митрошина Е.В., Ведунова М.В., Калинцева Я.И. *Кальциевый имиджинг в клеточных культурах и тканях*. Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 2011, 28 с.

[Mitroshina E.V., Vedunova M.V., Kalintseva Ya.I. *Calcium imaging in cell cultures and tissues*. Nizhny Novgorod: Nizhny Novgorod State University. N.I. Lobachevsky, 2011, 28 p. (In Russ.)]

18. McLeish K.R., Knall C., Ward R.A., Gerwins P., Coxon P.Y., Klein J.B., Johnson G.L. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades during priming of human neutrophils by TNF-alpha and GM-CSF. *J. Leukoc. Biol.*, 1998, vol. 64, pp. 537-545.

19. Naccache P.H. Signaling in neutrophils: a retro look. *ISRN Physiology*, 2013, vol. 2013, 13 p.

20. Asahi M., Taniguchi T., Hashimoto E., Inazu T., Maeda H., Yamamura H. Activation of protein-tyrosine kinase p72syk with concanavalin A in polymorphonuclear neutrophils. *J. Biol. Chem.*, 1993, vol. 268, pp. 23334-23338.

PRIMING EFFECT OF RECOMBINANT HUMAN LACTOFERRIN ON THE NEUTROPHIL ACTIVITY

Grigorieva D.V.¹, Terekhova M.S.¹, Shamova E.V.¹, Efremov N.A.², Malyushkova E.V.¹, Semak I.V.¹,
Cherenkevich S.N.¹, Sokolov A.V.³, Panasenko O.M.⁴, Gorudko I.V.¹

¹Belarusian State University

Nezavisimosti av., 4, Minsk, 220030, Republic of Belarus; e-mail: dargr@tut.by

²State Institution «N.N. Alexandrov Republican Scientific and Practical Center of Oncology and Medical Radiology»
agrorodok Lesnoy, Minsk region, 223040, Republic of Belarus; e-mail: hakumen737@gmail.com

³Research Institute of Experimental Medicine

ul. Akademika Pavlova, 12, St. Petersburg, 197376, Russia; e-mail: biochemsokolov@gmail.com

⁴Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine, Federal Medical Biological Agency
ul. Malaya Pirogovskaya, 1a, Moscow, 119435, Russia; e-mail: o-panas@mail.ru

Abstract. It was established that recombinant human lactoferrin (rhLf), isolated from transgenic goats milk, binds to human neutrophils. This binding leads to an increase in intracellular Ca²⁺ due to the mobilization of Ca²⁺ from the endoplasmic reticulum and influx of extracellular Ca²⁺ through the store-operating calcium channels and T-type calcium channels. It was found that expose of neutrophils to rhLf lead to actin cytoskeleton reorganization and increase in intracellular protein tyrosine phosphorylation. RhLf augmented fMLP-induced respiratory burst of neutrophils. Together, these finding indicate that rhLf has a modulating effect on the functional neutrophil properties. Obtained results can be used to regulate the body's immune response, aimed to enhance the functional activity of neutrophils in pathologies associated with decreased killer capacity of these cells.

Key words: recombinant human lactoferrin, neutrophils, respiratory burst, calcium ions, tyrosine kinases, actin cytoskeleton.