

ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ

Луценко В.Е.¹, Григорьева Д.В.¹, Черенкевич С.Н.¹, Панасенко О.М.^{2,3},
Соколов А.В.^{2,4,5}, Горудко И.В.¹

¹ Белорусский государственный университет

просп. Независимости, 4, г. Минск, 220030, Республика Беларусь; e-mail: nika.lutsenko@tut.by

² ФГБУ ФНКЦ физико-химической медицины ФМБА России

г. Москва, РФ

³ ФГБОУ ВО Российский национальный исследовательский медицинский университет

имени Н.И. Пирогова Минздрава России,

г. Москва, РФ

⁴ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»

г. Санкт-Петербург, РФ

⁵ Санкт-Петербургский государственный университет

г. Санкт-Петербург, РФ

Поступила в редакцию: 01.07.2018.

Аннотация. Показана принципиальная возможность оценки функциональной активности нейтрофилов флуоресцентным методом с использованием целестинового синего В и галлоцианина. Установлено, что в клеточных суспензиях окисление галлоцианина связано с продукцией супероксидного анион-радикала, а целестинового синего В – с продукцией активных форм галогенов. С использованием красителей галлоцианина и целестинового синего В показана возможность избирательной регистрации активных форм кислорода и галогенов флуоресцентным методом при активации нейтрофилов широким спектром агонистов различной природы. Сделан вывод о том, что указанные красители могут быть использованы при разработке методов идентификации активных форм кислорода и галогенов в клеточных суспензиях, оценки функционального состояния нейтрофилов, разработке терапевтических методов лечения с помощью антиоксидантов при заболеваниях, ассоциированных с развитием окислительного/галогенирующего стресса.

Ключевые слова: нейтрофилы, окислительный стресс, активные формы кислорода, активные формы галогенов, галлоцианин, целестиновый синий В, флуоресценция.

Активные формы кислорода (АФК) и галогенов (АФГ) играют решающую роль в физиологических процессах, таких как биосинтез, межклеточная сигнализация, апоптоз, уничтожение патогенов и др. Однако они также способствуют развитию широкого спектра патологий, прогрессирование многих из которых ведет к смерти. Среди них сердечно-сосудистые, онкологические, неврологические и другие заболевания [1]. Существует несколько источников АФК, одним из которых является НАДФН-оксидаза нейтрофилов – самой многочисленной группы циркулирующих лейкоцитов у взрослого человека (60 %) [2]. Первичный продукт активности НАДФН-оксидазы – супероксидный анион-радикал (O_2^-), является предшественником широкого спектра активных форм кислорода, азота и галогенов [3]. Преобразование АФК в АФГ, в частности в хлорноватистую (НОСl), бромноватистую (НОBr) и иодноватистую (НОI) кислоты, катализируется миелопероксидазой (МПО), которая в больших количествах (2-5 % от сухого веса клеток) содержится в азурофильных гранулах нейтрофилов [4]. Увеличение активности/концентрации МПО и продуктов взаимодействия биомолекул с НОСl выявлено при различных заболеваниях: атеросклероз, ревматоидный артрит, острая почечная недостаточность, муковисцидоз и др. [4, 5].

Чувствительные методы обнаружения АФГ и продуктов их реакций с биологическими молекулами необходимы как для лучшего понимания механизмов межмолекулярных взаимодействий, протекающих в организме, так и для разработки стратегий терапевтического вмешательства с использованием антиоксидантов, регистрации и контроля активности НАДФН-оксидазы и МПО. Среди методов, направленных на обнаружение АФК и АФГ, можно выделить иммуноферментный анализ, масс-спектрометрию, методы электронного парамагнитного (в том числе метод спиновых ловушек) и ядерного магнитного резонанса, проточной цитофлуориметрии, конфокальной микроскопии, электрохимический метод и др. [6, 7]. В большинстве своем эти методы являются дорогостоящими и/или малодоступными. Флуоресцентный анализ, отличающийся высокой чувствительностью и доступностью, также широко применим для обнаружения АФК и АФГ.

В качестве субстратов для качественной и количественной оценки образования АФК и АФГ *in vitro* используют такие вещества как монохлордимедон, тирозин, 5-тио-2-нитробензойную кислоту, тетраметилбензидин, ненасыщенные фосфатидилхолины, таурин, дигидрородамин, аминофенилфлуоресцеин и другие [6, 8-10]. Следует отметить, что лишь некоторые из перечисленных субстратов обладают избирательностью в отношении АФК или АФГ, многие из них не позволяют осуществлять непрерывную регистрацию образования соответствующих продуктов, обладают ограниченной стабильностью на свету,

являются коммерчески недоступными или же требуют создания специальных стандартизированных условий наблюдения, что стимулирует поиск новых веществ, пригодных для чувствительного обнаружения АФК и АФГ.

Ранее [11, 12] было показано, что краситель целестиновый синий В (СВ) является перспективным агентом для регистрации продукции АФГ и их производных нейтрофилами. Тем не менее, помимо несомненных преимуществ, данный краситель обладает рядом недостатков. Так, СВ не растворим в воде и фосфатно-солевом буфере, нестабилен на свету, необходимо присутствие таурина в буферном растворе, кроме того, кинетические кривые окисления СВ в клеточных суспензиях при активации рядом стимуляторов имеют достаточно длительный лаг-период, что затрудняет идентификацию продукции АФГ нейтрофилами. В связи с этим перспективной является разработка альтернативного метода идентификации АФГ нейтрофилами. Среди исследуемых ранее красителей [11] интерес представляет галлоцианин (GC). Он является структурным аналогом СВ, однако отличается хорошей растворимостью в фосфатно-солевом буфере и большей фотостабильностью.

Цель данной работы – исследовать возможность использования галлоцианина для регистрации продукции АФК и АФГ нейтрофилами, а также произвести сравнительный анализ возможности применения красителей галлоцианина и целестинового синего В для оценки функционального состояния нейтрофилов крови человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве стимуляторов нейтрофилов были выбраны: форбол 12-миристинат 13-ацетат (РМА), N-формил-метионил-лейцил-фенилаланин (fMLP), а также растительные лектины различной углеводной специфичности: WGA (*Triticum vulgare* агглютинин) – GlcNAc-специфичный лектин зародышей пшеницы, САВА (*Caragana arborescens* агглютинин) – лектин караганы древовидной, специфичный к остаткам GalNAc, Con A (*Canavalia ensiformis* агглютинин) – маннозосвязывающий лектин семян канавалии мечевидной, галактозо-специфичный лектин сои SBA (*Glycine hispida* агглютинин), а также GalNAc/галактозо-специфичный лектин семян фасоли обыкновенной PHA-L (*Phaseolus vulgaris* агглютинин).

Нейтрофилы выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности гистобака. Венозную кровь здоровых доноров, стабилизированную 109 мМ цитратом натрия (1:9, v/v), смешивали с 6 %-ным раствором декстрана Т70 (5:1, v/v), что приводило к осаждению эритроцитов в течение 40 мин при комнатной температуре. При помощи пластиковых шприцов собирали слой обогащенной лейкоцитами плазмы в пробирки и центрифугировали в течение 7 мин при 400 g. Далее примесь эритроцитов удаляли гипотоническим лизисом, добавляя к осадку клеток сначала 3 мл охлажденного 0,2 %-ного NaCl, а затем восстанавливали изотоничность путем добавления 3 мл 1,6 %-ного NaCl, содержащего 20 мг/мл D-глюкозы. Полученную суспензию центрифугировали в течение 7 мин при 400 g. Если смесь клеток содержала эритроциты, гипотонический лизис проводили повторно. 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), наслаивали по 5–6 мл полученной суспензии на 3 мл гистобака-1077 и центрифугировали в течение 10 мин при 400 g при комнатной температуре. Полученный осадок нейтрофилов отмывали в ФСБ, содержащем 2 мг/мл D-глюкозы и хранили при 4 °C в течение нескольких часов. Содержание нейтрофилов в клеточной суспензии составляло 97–98 %, число жизнеспособных клеток по тесту с трипановым синим – не менее 96 %.

Продукцию 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 °C), содержащей 1 мкМ скополетина, 20 мкг/мл пероксидазы хрена и 1 мМ NaN₃, добавляли активатор. Как правило, для стандартизации условий эксперимента предварительно готовили «коктейль» реакционной смеси путем смешивания водных растворов 0,2 мМ скополетина, 2 мг/мл пероксидазы хрена и 0,1 М NaN₃ в соотношении 1:2:2 (v/v/v). Кинетику окисления скополетина регистрировали по уменьшению интенсивности флуоресценции (длина волны возбуждения – 350 нм, регистрации – 460 нм).

Продукцию АФК и АФГ нейтрофилами оценивали флуоресцентным методом с использованием красителей (GC и СВ). К нейтрофилам (10⁶ кл/мл) в ФСБ, содержащем 1 мМ CaCl₂ и 0,5 мМ MgCl₂ (в случае СВ раствор содержал также 20 мМ таурина), добавляли СВ/GC (20/5 мкМ), а также исследуемый активатор и сопутствующие вещества при необходимости. Оба красителя не обладают собственной флуоресценцией, увеличение интенсивности которой по сравнению с фоновым уровнем происходит при их окислении. Длины волн возбуждения и регистрации флуоресценции для GC – 360 нм и 490 нм соответственно, для СВ – 460 нм и 590 нм. Регистрацию проводили при 37 °C и постоянном перемешивании. В качестве параметра, характеризующего продукцию АФК и АФГ нейтрофилами, была выбрана степень окисления (*h*) – изменение интенсивности флуоресценции, вызванное окислением красителей, по сравнению с фоновым уровнем через 7 минут после начала активации.

Статистическая обработка данных.

Статистическую и графическую обработку полученных данных выполняли в пакете программ OriginPro 2016. Сглаживание сигналов флуоресценции проводили с использованием локально-линейной модели «Lowess». Данные на рисунках представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего. Статистические различия считали достоверными при статистической значимости $p < 0,05$, рассчитанной по критерию Стьюдента.

Типичные кинетические кривые представляют собой инвариант 3-5 независимых экспериментов с образцами разных доноров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее в серии бесклеточных экспериментов нами было показано, что GC окислялся HOCl, но не H₂O₂. При исследовании флуоресцентных характеристик окисленного GC было выявлено, что для проведения экспериментов оптимальными длинами волн возбуждения и регистрации флуоресценции являются 360 нм и 490 нм соответственно [13].

Следующим шагом в исследовании возможности использования GC в качестве флуоресцентного зонда для регистрации продукции АФГ стали бесклеточные эксперименты в системе «МПО-H₂O₂-СГ». Как видно из данных, представленных на рисунке 1, добавление H₂O₂ (50 мкМ) к раствору, содержащему МПО (2 нМ) и GC (5 мкМ), приводило к увеличению интенсивности флуоресценции, свидетельствующему об образовании окисленного продукта. В присутствии ингибитора ферментативной активности МПО – гидразида 4-аминобензойной кислоты (4-АВАН) (100 мкМ) [14], окисление GC не регистрировалось. Также необходимо отметить, что присутствие в среде таурина (5 мМ) – сквенджера HOCl, приводило к ингибированию окисления GC, что также является дополнительным свидетельством того, что GC, в отличие от своего структурного аналога СВ, не окисляется производными HOCl, а именно хлораминами таурина.

Далее нами было проведено исследование изменений флуоресцентных характеристик GC в суспензии нейтрофилов, активированных агонистами различной природы. В качестве стандартных активаторов нейтрофилов, как правило, используют зимозан, латекс, сульфат бария, РМА, fMLP и др. [15]. Нами были выбраны хемотаксический пептид fMLP и форболовый эфир РМА. Действуя по рецептор-зависимому механизму (связываясь с рецепторами, ассоциированными с G-белками), fMLP инициирует сборку и активацию НАДФН-оксидазы, но не вызывает экзоцитоз МПО из азурофильных гранул нейтрофилов и, следовательно, не инициирует продукцию АФГ. Для реализации указанных процессов при действии на клетки fMLP, необходима предварительная инкубация нейтрофилов с цитохалазином В (сyt В), препятствующим полимеризации фибриллярного актина кортикального цитоскелета [16]. РМА, являясь липофильным соединением, легко проникает в клетки и, ввиду схожести молекулярной структуры с диацилглицеролом, активирует протеинкиназу С, вызывает респираторный взрыв [17] и дегрануляцию азурофильных гранул нейтрофилов [18].

На рисунке 2а представлены типичные кинетические кривые окисления GC в суспензии активированных нейтрофилов. На данном рисунке можно видеть ожидаемое, исходя из описанных выше литературных данных, окисление GC в суспензии клеток при действии РМА и в системе сyt В + fMLP. Также наблюдалось окисление GC в суспензии fMLP-активированных нейтрофилов, что свидетельствует о том, что этот зонд вероятнее всего окисляется $^{\bullet}O_2^-$ – предшественником H₂O₂ (одного из субстратов МПО). Косвенным подтверждением данного предположения является тот факт, что, как было показано нами ранее [12], окисление аналога GC – СВ в суспензии активированных fMLP нейтрофилов не происходит.

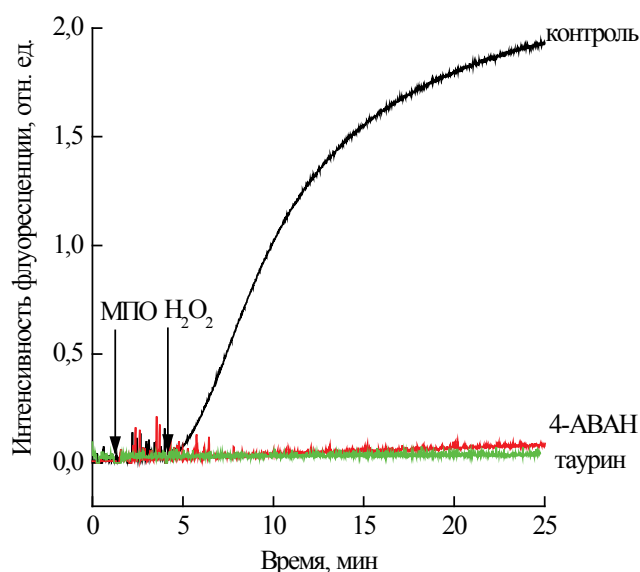


Рисунок 1. Типичные кинетические кривые окисления GC в системе «МПО-H₂O₂-СГ» в отсутствие и присутствии 4-АВАН (100 мкМ) или таурина (5 мМ)

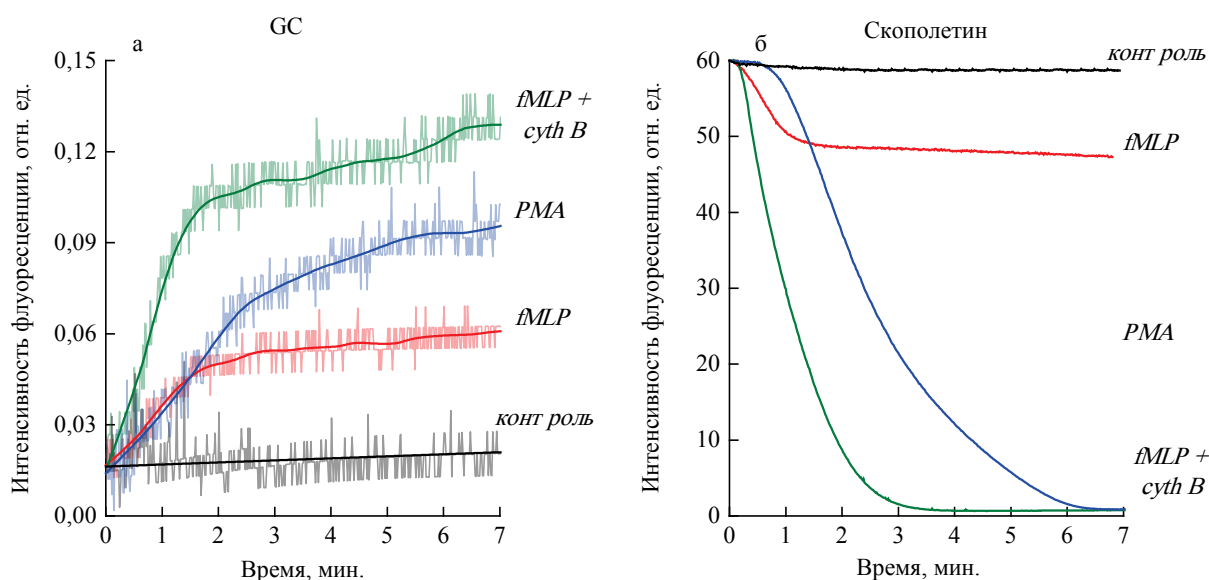


Рисунок 2. Кинетические кривые изменения интенсивности флуоресценции GC (а) и скополетина (б) в суспензии нейтрофилов (10^6 кл/мл) в отсутствие агонистов (контроль) и активированных fMLP (500 нМ) в отсутствие и в присутствии cyth B (2,5 мкг/мл) или PMA (50 нМ)

Одной из широко используемых методик регистрации респираторного взрыва нейтрофилов является так называемый скополетинный тест, в основе которого лежит использование системы « H_2O_2 – пероксидаза хрена – скополетин». Так, при респираторном взрыве нейтрофилов, образуется $^{\bullet}O_2^-$, дисмутирующий до H_2O_2 , используя который пероксидаза хрена окисляет скополетин до нефлуоресцирующего продукта. Присутствующий в суспензии NaN_3 ингибирует каталазу, а также МПО при физиологических значениях pH [19]. При проведении сравнительного анализа продукции АФК нейтрофилами при стимуляции клеток PMA и fMLP с использованием скополетинного теста и GC были выявлены схожие зависимости. Из рисунка 2б видно, что PMA и fMLP вызывают продукцию H_2O_2 нейтрофилами, регистрируемую по падению интенсивности флуоресценции скополетина вследствие его окисления. Также видно, что cyth B усиливает активацию НАДФН-оксидазы, что соответствует литературным данным [3, 20]. Таким образом, можно предположить, что усиление fMLP-индуцированного окисления GC в суспензии нейтрофилов, предварительно инкубированных с cyth B, также является следствием прайминга НАДФН-оксидазы и усиления продукции $^{\bullet}O_2^-$ клетками. Исходя из представленных данных следует, что окисление GC в суспензии активированных нейтрофилов обусловлено, по всей вероятности, действием АФК, генерируемых НАДФН-оксидазой, а не АФГ, образующихся в реакциях, катализируемых МПО. Предполагается, что $^{\bullet}O_2^-$ окисляет GC, не успев дисмутировать до H_2O_2 – субстрата МПО в условиях экзоцитоза фермента.

В пользу данного предположения свидетельствует и проведенный нами ингибиторный анализ. Так, ингибитор МПО – 4-АВАН (100 мкМ), не влиял на окисление GC при активации нейтрофилов fMLP (500 нМ) в присутствии cyth B (2,5 мкг/мл). Стоит отметить, что в предыдущих исследованиях [21, 22] нами было показано, что 4-АВАН (100 мкМ) достоверно снижал степень окисления СВ в суспензиях fMLP-активированных нейтрофилов, предварительно инкубированных с cyth B (2,5 мкг/мл), непосредственно указывая на то, что СВ окисляется соединениями, образующимися в реакциях с участием МПО. Стоит отметить, что ни маннитол – перехватчик OH^{\bullet} , ни таурин – перехватчик $HOCl$, не оказывали влияния на параметры окисления GC в суспензии fMLP-активированных нейтрофилов. В то же время супероксиддисмутаза (50 мкг/мл), катализирующая дисмутацию $^{\bullet}O_2^-$ до H_2O_2 , достоверно уменьшала степень (14 ± 4 % от контроля) окисления GC при активации нейтрофилов fMLP. Из полученных данных следует, что окисление GC в суспензии нейтрофилов происходит за счет образования $^{\bullet}O_2^-$, а возможное образование АФГ и их производных не вносит существенного вклада в данный процесс.

Таким образом, исходя из описанных выше данных, а также наших предыдущих исследований [12] можно заключить, что комплексный подход к оценке функциональной активности нейтрофилов с применением флуоресцентных красителей GC и СВ дает возможность избирательно регистрировать как продукцию АФК клетками (с использованием GC), так и продукцию АФГ и их производных (с помощью СВ). Данный подход был применен нами при изучении влияния растительных лектинов на функциональные ответы нейтрофилов крови человека. Ранее [23–25] было показано, что наряду с известными агонистами (fMLP, PMA, цитокины) многие растительные лектины – белки, способные к обратимому и избирательному связыванию углеводов и различных природных углеводных компонент гликоконъюгатов – оказывают стимулирующее действие на нейтрофилы, индуцируя генерацию АФК, а также способствуя экзоцитозу содержимого гранул нейтрофилов. Присутствие лектинов также идентифицировано в тканях, биологических жидкостях и на поверхности клеток человека и

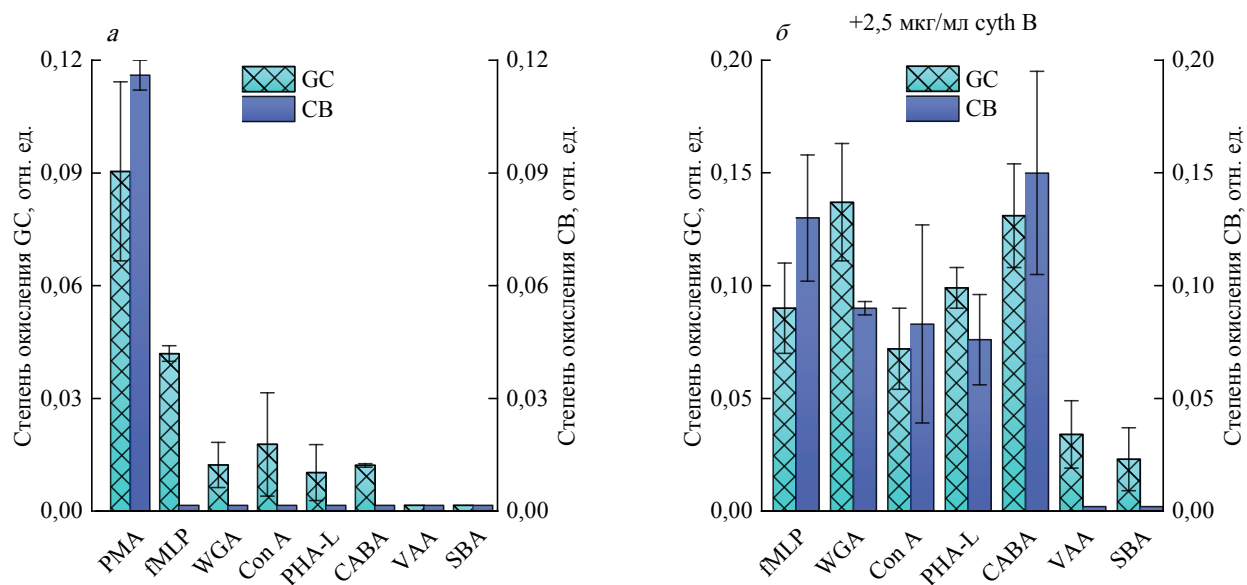


Рисунок 3. Влияние PMA, fMLP, а также растительных лектинов на степень окисления GC и CB в отсутствие (а) и в присутствии (б) cyth B (2,5 мкг/мл) в суспензиях нейтрофилов

животных. Роль этих белков в организме связана с регуляцией процессов иммунной системы и рецепции, запускающих эффекторные функции клеток [26].

В данной части работы мы исследовали влияние лектинов: WGA, Con A, PHA-L, SABA, VAA и SBA, а также уже ранее упомянутых стимуляторов (PMA и fMLP) на продукцию АФК и АФГ нейтрофилами. На рисунке 3 приведены данные по влиянию агонистов нейтрофилов на степень окисления CB и GC.

Как уже отмечалось выше, окисление CB в суспензиях нейтрофилов происходит вследствие продукции АФГ нейтрофилами, что и проиллюстрировано на рисунке 3а (окисление CB в суспензии нейтрофилов, активированных fMLP, в отсутствие cyth B не происходит). Как видно из рисунка 3б, лектины WGA, SABA, Con A и PHA-L (100 мкг/мл) вызывали респираторный взрыв и экзоцитоз МПО из нейтрофилов в присутствии cyth B (2,5 мкг/мл), о чем свидетельствует увеличение интенсивности флуоресценции окисленного CB, в то время как VAA и SBA (50 и 100 мкг/мл соответственно) были неактивны в этом отношении. Необходимо отметить, что используемые лектины вызывали продукцию АФГ нейтрофилами лишь в присутствии cyth B, что согласуется с данными литературы о том, что блокировка микрофиламентной системы клеток способствует высвобождению содержимого азурофильных гранул при активации лектинами [25]. WGA, SABA, Con A и PHA-L инициировали респираторный взрыв нейтрофилов и в отсутствие cyth B (рисунок 3 а, данные с GC), в присутствии cyth B данный эффект усиливался за счет праймирования НАДФН-оксидазы. Кроме того, из рисунка 3 видно, что VAA и SBA способны инициировать сборку и активацию НАДФН-оксидазы клеток при их предварительной инкубации с cyth B.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных данных можно заключить, что использование красителей галлоцианина и целестинового синего В является перспективным для оценки функционального состояния нейтрофилов, избирательной регистрации продукции активных форм кислорода и галогенов нейтрофилами.

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

Список литературы / References:

1. Brieger K., Schiavone S., Miller Jr F.J., Krause K.H. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss medical weekly*, 2012, vol. 142, p. w13659.
2. Зак К.П. Роль нейтрофильных лейкоцитов в патогенезе сахарного диабета 1-го типа у человека (аналитический обзор с включением собственных данных). *Международный эндокринологический журнал*, 2016, № 2 (74), с. 130-139. [Zak K.P. The role of neutrophilic leukocytes in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus in humans (an analytical review with the inclusion of own data). *Mezhdunarodnyi endokrinologicheskii zhurnal*, 2016, no. 2 (74), pp. 130-139. (In Russ.)]
3. Мальцева В.Н., Сафронова В.Г. Неоднозначность роли нейтрофила в генезе опухоли. *Цитология*, 2009, т. 51, № 6, с. 467-474. [Maltseva V. N., Safronova V. G. Ambiguity of the role of neutrophil in tumor genesis. *Tsitologiya*, 2009, vol. 51, no. 6, pp. 467-474. (In Russ.)]
4. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. Хлорноватистая кислота как предшественник свободных радикалов в живых системах. *Успехи биол. химии*, 2013, т. 53, с. 195-244. [Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. Hypochlorous acid as a precursor of free radicals in living systems. *Uspehi biologicheskoy himii*, 2013, vol. 53, pp. 195-244. (In Russ.)]

5. Lau D., Baldus S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. *Pharmacology Therapeutics*, 2006, vol. 111, no. 1, pp. 16-26.
6. Huang J., Milton A., Arnold R.D., Huang H., Smith F., Panizzi J.R., Panizzi P. Methods for measuring myeloperoxidase activity toward assessing inhibitor efficacy in living systems. *Journal of leukocyte biology*, 2016, vol. 99, no. 4, pp. 541-548.
7. Tarpey M.M., Fridovich I. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide, and peroxyxynitrite. *Circulation research*, 2001, vol. 89, no. 3, pp. 224-236.
8. Flemmig J., Remmler J., Zschaler J., Arnhold J. Detection of the halogenating activity of heme peroxidases in leukocytes by aminophenyl fluorescein. *Free radical research*, 2015, vol. 49, no. 6, pp. 768-776.
9. Dybukt J.M., Bishop C., Brooks W. M., Thong B., Eriksson H., Kettle A.J. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. *Free Radical Biology and Medicine*, 2005, vol. 39, no. 11, pp. 1468-1477.
10. Weiss S.J., Klein R., Slivka A., Wei M. Chlorination of taurine by human neutrophils: evidence for hypochlorous acid generation. *Journal of Clinical Investigation*, 1982, vol. 70, no. 3, pp. 598-607.
11. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasenko O.M. Kinetic method for assaying the halogenating activity of myeloperoxidase based on reaction of celestine blue B with taurine halogenamines. *Free Radical Research*, 2015, vol. 49, no. 6, pp. 777-789.
12. Луценко В.Е., Григорьева Д.В., Козлов О.С., Горудко И.В., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М., Соколов А.В. Флуоресцентный метод регистрации хлорноватистой кислоты и ее производных в суспензии активированных нейтрофилов с помощью целестинового синего В. *Матер. XII междунар. науч.-техн. конф. «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2017»*, Севастополь, 2017, с. 264-268. [Lutsenko V.E., Grigoryeva D.V., Kozlov S.O., Gorudko I.V., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M., Sokolov A.V., Fluorescent method for recording hypochlorous acid and its derivatives in a suspension of activated neutrophils via celestine blue B. *Proceedings of XII International Science-Technical Conference «Aktualnie voprosy biologicheskoy fiziki i himii. BFFH – 2017»*, Sevastopol, 2017, pp. 264-268. (In Russ.)]
13. Луценко В.Е., Григорьева Д.В., Горудко И.В., Черенкевич С.Н., Панасенко О.М., Соколов А.В. Изменение спектральных и флуоресцентных характеристик галлоцианина при его взаимодействии с хлорноватистой кислотой. *Сб. науч. тр. «VI Конгресс физиков Беларуси»*, Минск, 2017, с. 170-171. [Lutsenko V.E., Grigoryeva D.V., Kozlov S.O., Gorudko I.V., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M., Sokolov A.V. Spectral and fluorescent characteristics changes of gallocyanine due to its interaction with hypochlorous acid. *Collection of scientific papers «VI Kongress fizikov Belarusi»*, Minsk, 2017, pp. 170-171. (In Russ.)]
14. Malle E., Furtmüller P.G., Sattler W., Obinger C. Myeloperoxidase: a target for new drug development? *British journal of pharmacology*, 2007, vol. 152, no. 6, pp. 838-854.
15. Образцов И.В., Годков М.А. Хемилюминесцентный анализ клеток крови в медицине: история, теория, практика. *Молекулярная медицина*, 2013, № 4, с. 3-9. [Obraztsov I.V., Godkov M.A. Chemiluminescent analysis of blood cells in medicine: history, theory, practice. *Molekulyarnaya meditsina*, 2013, no. 4, pp. 3-9. (In Russ.)]
16. 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. *Journal of leukocyte biology*, 2005, vol. 78, no. 5, pp. 1025-1042.
17. Nagaji J. The role of protein kinase C and $[Ca^{2+}]_i$ in superoxide anion synthesis and myeloperoxidase degranulation of human neutrophils. *The Kurume medical journal*, 1999, vol. 46, no. 3-4, pp. 157-162.
18. Abdel-Latif D., Steward M., Macdonald D.L., Francis G.A., Dinanier M.C., Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood*, 2004, vol. 104, no. 3, pp. 832-839.
19. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. Современные подходы при анализе окислительного стресса, или как измерить неизмеримое. *Acta Biomedica Scientifica*, 2016, т. 1, № 3 (109), ч. 2, с. 174-180. [Menshchikova E.B., Zenkov N.K. Modern approaches in the analysis of oxidative stress, or how to measure the immeasurable. *Acta Biomedica Scientifica*, 2016, vol. 1, no. 3 (109), part 2, pp. 174-180. (In Russ.)]
20. Reichl S., Vocks A., Petković M., Schiller J., Arnhold J. The photoprotein Pholasin as a luminescence substrate for detection of superoxide anion radicals and myeloperoxidase activity in stimulated neutrophils. *Free radical research*, 2001, vol. 35, no. 6, pp. 723-733.
21. Луценко В.Е. Регистрация продукции хлорноватистой кислоты в суспензии активированных нейтрофилов при помощи красителя целестинового синего В. *Сб. работ 74-й науч. конф. студ. и асп. Бел. гос. ун.*, Минск, 2017, ч. 1, с. 132-136. [Lutsenko V. E. Registration of hypochlorous acid production in a suspension of activated neutrophils using celestine blue B. *Sbornik rabot 74-oy nauchnoy konferencii studentov i aspirantov Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta*, Minsk, 2017, part 1, pp. 132-136. (In Russ.)]
22. Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудина Н.А., Костевич В.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Васильев В.Б. Активированные нейтрофилы, продуцирующие HOCl, выявляющиеся при проточной цитометрии и конфокальной микроскопии с помощью целестинового синего В. *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*, 2016, т. 1, № 3 (109), ч. 2, с. 86-91. [Kozlov S. O., Kudryavtsev I. V., Grudinina N. A., Kostevich V. A., Panasenko O. M., Sokolov A. V., Vasiliev V. B. Activated neutrophils producing HOCl, been identified by flow cytometry and confocal microscopy using celestine blue B. *Bjulleten VSNC SO RAMN*, 2016, vol. 1, no. 3 (109), part 2, pp. 86-91. (In Russ.)]
23. Gorudko I.V., Mukhortava A.V., Caraher B., Ren M., Cherenkevich S.N., Kelly G.M., Timoshenko A.V. Lectin-induced activation of plasma membrane NADPH oxidase in cholesterol-depleted human neutrophils. *Archives of biochemistry and biophysics*, 2011, vol. 516, no. 2, pp. 173-181.

24. Pereira-da-Silva G., Caroline Carvalho F., Cristina Roque-Barreira M. Neutrophil activation induced by plant lectines: modulation of inflammatory processes. *Inflammation & Allergy-Drug Targets*, 2012, vol. 11, no. 6, pp. 433-441.
25. Timoshenko A.V., Kayser K., Gabius H.J. Lectin-triggered superoxide/H₂O₂ and granule enzyme release from cells. *Methods in Molecular Medicine*, 1998, no. 9, pp. 441-445.
26. Тимошенко А.В. Применение эндогенных лектинов в клинической диагностике. *Медицинские новости*, 1997, № 4, с. 16-20. [Timoshenko A.V. The use of endogenous lectins in clinical diagnostics. *Meditsinskiye novosti*, 1997, no. 4, pp. 16-20. (In Russ.)]

FLUORESCENT METHOD FOR ESTIMATE NEUTROPHILS FUNCTIONAL ACTIVITY

Lutsenko V.E.¹, Grigorieva D.V.¹, Cherenkevich S.N.¹, Panasenko O.M.^{2,3}, Sokolov A.V.^{2,4,5}, Gorudko I.V.¹

¹ Belarusian State University

Ave. Nezavisimosti, 4, Minsk, 220030, Republic of Belarus; e-mail: nika.lutsenko@tut.by

² Scientific Research Institute of Physical-Chemical Medicine

Moscow, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University

Moscow, Russia

⁴ Research Institute of Experimental Medicine

Saint-Petersburg, Russia

⁵ Saint Petersburg State University

Saint-Petersburg, Russia

Abstract. The principal possibility of evaluating functional neutrophils activity by fluorescent method using celestine blue B and galloycyanine has been shown. It has been established that in cell suspensions the oxidation of galloycyanine is associated with the production of a superoxide anion radical, and celestine blue B oxidation is associated with the production of reactive halogen species. The possibility of selective detection of reactive oxygen and halogen species using the fluorescent method, when neutrophils are activated by a wide range of agonists of various nature, has been shown with the use of galloycyanine and celestine blue B dye. It has been concluded that these dyes can be used in the development of methods for identifying reactive oxygen and halogen species in cell suspensions, assessing the functional state of neutrophils, developing therapeutic methods of treatment with antioxidants in diseases associated with the development of oxidative/ halogenative stress.

Key words: *neutrophils, oxidative stress, reactive oxygen species, reactive halogen species, galloycyanine, celestine blue B, fluorescence.*