

УДК 579.61

ВЛИЯНИЕ БИНАЗЫ НА ИНДУКЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ГРАНУЛОЦИТАХ И МОНОЦИТАХ ВЕНОЗНОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА

¹Миронов В.А., ¹Ширшиков Ф.В., ¹Калачева Н.В., ²Черепнев Г.В.

¹Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, e-mail: public.mail@ksu.ru;

²ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Казань, e-mail: rkb2_rt@mail.ru

Изучено влияние двух концентраций (40 и 400 мкг/мл) биназы (РНКаза *Bacillus intermedius*) на индукцию активных форм кислорода в моноцитах и гранулоцитах венозной крови человека методом лазерной проточной цитофлуориметрии. Установлено, что биназа избирательно действует на *E. coli*- и фоболмиристатат-зависимый окислительный взрыв в гранулоцитах и не влияет на эти процессы в моноцитах. Профиль ответа гранулоцитов зависит от используемого индуктора окислительного взрыва и концентрации биназы. В условиях окислительного взрыва, стимулированного *E. coli*, биназа концентрационно зависимо увеличивает долю клеток, продуцирующих АФК, и интенсивность генерации АФК на клетку. В гранулоцитах, *in vitro* стимулированных ФМА, наблюдается тенденция к разнонаправленному концентрационно зависимому действию биназы на интенсивность продукции АФК на клетку.

Ключевые слова: биназа, гранулоциты, моноциты, активные формы кислорода, проточная цитометрия

EFFECTS OF BINASE ON REACTIVE OXYGEN SPECIES GENERATION BY HUMAN PERIPHERAL BLOOD GRANULOCYTES AND MONOCYTES

¹Mironov V.A., ¹Shirshikov F.V., ¹Kalacheva N.V., ²Cherepnev G.V.

¹Kazan (Volga region) State University, Kazan, e-mail: public.mail@ksu.ru;

²Kazan State Medical Academy, Kazan, e-mail: rkb2_rt@mail.ru

Effects of binase (RNase of *Bacillus intermedius*, 40 and 400 µg/ml) on reactive oxygen species (ROS) generation by human peripheral blood granulocytes and monocytes were tested by flow cytometry. We found that binase selectively affected *E. coli*- and phorbol myristate acetate (PMA) – induced oxidative burst in granulocytes and did not influence ROS generation in monocytes. The response pattern of granulocytes depends on the ROS inducer and the binase concentration. In a setting of *E. coli*-induced oxidative burst, binase upregulated both the ROS-producing granulocyte subset and the relative ROS generation per a single cell in a concentration-dependent manner. In the PMA-stimulated granulocytes, there was a tendency for differential concentration-dependent effects of binase on intracellular ROS generation.

Keywords: binase, granulocytes, monocytes, reactive oxygen species, flow cytometry

Фагоцитирующие клетки крови – гетерогенная популяция, опосредующая антиинфекционную резистентность в рамках естественного иммунитета (гранулоциты) и адаптивного иммунитета (процессинг и представление антигенов моноцитами) [4]. Накоплено много данных об участии моноцитов и гранулоцитов в развитии соматических заболеваний, например, ишемической болезни сердца и атеросклероза, а также в формировании злокачественных образований [5, 6, 7]. Кроме того, фагоциты генерируют активные формы кислорода (АФК) и в случае нарушения своих функций становятся источником повреждения и гибели клеток [8]. В связи с этим поиск соединений, способных модулировать функциональную активность фагоцитов, является актуальной проблемой современной медицинской науки и практики.

Цель настоящей работы – исследовать влияние биназы (РНКаза *Bacillus intermedius*) на *E. coli*- и фоболмиристатат-зависимую генерацию АФК в моноцитах и гранулоцитах крови человека. Выбор объекта исследования обусловлен тем, что ранее нами было показано, что биназа

в зависимости от концентрации оказывает дифференцированное действие на функциональную активность перитонеальных макрофагов крысы [2].

Материалы и методы исследований

РНКаза *Bacillus intermedius* (биназа) – катионный белок с молекулярной массой 12,3 кДа, изоэлектрической точкой pI 8,9 и максимальной каталитической активностью при pH 8,5. В работе использовали гомогенный препарат РНКаза, полученный по методу [1].

Генерацию АФК в моноцитах и гранулоцитах измеряли методом проточной цитометрии с использованием тест-набора Phagoburst® (*OPREGEN Pharma, Germany*) по инструкции производителя. Для индукции АФК применяли лиофильно высушенную опсонизированную культуру бактерий *E. coli* и фобол-12-миристат-13-ацетат (ФМА). Внутриклеточную продукцию АФК регистрировали при окраске дигидроадином 123 (DHR123).

Выделение суспензии лейкоцитов периферической крови

Лейкоциты выделяли из венозной крови здоровых доноров-добровольцев, от которых было получено информированное согласие. Протокол исследования одобрен этическим комитетом ГАУЗ РКБ-2 МЗ РТ. Гепаринизированную венозную кровь отстаивали в течение 30 минут при 37°C, отбирали слой сыворотки с лейкоцитами и отмывали клетки центрифуги-

гированием (200 г, 10 мин). Полученный осадок лейкоцитов ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере (рН 7,4) до конечной концентрации 10^6 клеток/мл и раскапывали по 250 мкл в пробирки для проточной цитометрии (Falcon 352054, BD).

Детекция АФК в тесте Phagoburst®

В опытные пробы вносили раствор биназы в фосфатно-солевом буфере (конечная концентрация 400 и 40 мкг/мл) и 20 мкл рабочего раствора DHR123 по инструкции производителя. DHR123 под действием АФК превращался в родамин 123 (Rh123), флуоресценцию которого регистрировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (Becton Dickinson, USA), оснащенном двумя лазерами с длиной волны 488 и 635 нм. В качестве положительного контроля использовали образец, стимулированный ФМА (10^{-7} М). На каждый вариант опыта просчитывали не менее 25000 клеточных событий. Моноцитарный и гранулоцитарный гейты определяли по параметрам светорас-

сеяния. Измерения проводили в программе CellQuest Pro (BD Biosciences), статистический анализ полученных результатов выполняли по критерию Колмогорова-Смирнова и критерию χ^2 с коррекцией Yates в пакете прикладных программ Statistica 6.0.

Результаты исследований и их обсуждение

Согласно схеме, принятой нами ранее, эксперименты проводились с двумя концентрациями биназы: 40 мкг/мл (Bi-40) – нетоксичная и 400 мкг/мл (Bi-400) – токсичная [3]. Полученные результаты представлены в таблице. В качестве индуктора АФК наряду с *E. coli* мы использовали ФМА, который инициирует кислородный взрыв без адгезии и поглощения патогена.

Влияние биназы на индукцию АФК в моноцитах и гранулоцитах

Образец	Моноциты		Гранулоциты	
	Доля АФК-генерирующих клеток, %	Геометрическое среднее генерации АФК/клетку, усл. ед.	Доля АФК-генерирующих клеток, %	Геометрическое среднее генерации АФК/клетку, усл. ед.
Клетки интактные	3,29	8,54	0,05	24,10
Клетки + Bi-40	2,87	8,03	0,16	31,10
Клетки + Bi-400	5,84	11,31	0,36	32,20
Клетки + <i>E. coli</i>	25,88 ^A	8,83	42,49 ^B	44,50 ^B
Клетки + Bi-40 + <i>E. coli</i>	25,62 ^A	8,72	51,43 ^{B, C}	46,10 ^{B, C}
Клетки + Bi-400 + <i>E. coli</i>	17,83 ^A	7,87	55,18 ^{B, C}	71,00 ^{B, C}
Клетки + ФМА	74,43 ^A	14,60 ^A	97,98 ^B	131,00 ^B
Клетки + Bi-40 + ФМА	68,78 ^A	14,61 ^A	98,05 ^B	151,20 ^B
Клетки + Bi-400 + ФМА	65,92 ^A	12,10 ^A	97,99 ^B	113,40 ^B

Примечания:

^A – $P < 0.01$ по сравнению с контролем (интактные моноциты);

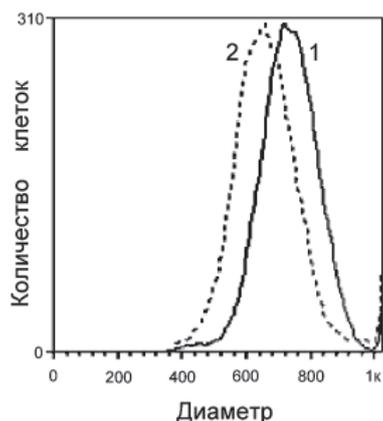
^B – $P < 0.001$ по сравнению с контролем (интактные гранулоциты);

^C – $P < 0.01$ по сравнению с гранулоциты + *E. Coli*.

Моноциты: ФМА и *E. coli* стимулируют генерацию АФК в моноцитах. Биназа в обеих концентрациях достоверно не влияет на базальную продукцию АФК. В моноцитах, *in vitro* стимулированных *E. coli*, биназа в исследованных концентрациях не увеличивает долю АФК-продуцирующих клеток и не меняет интенсивность продукции АФК/клетку (таблица). В моноцитах, стимулированных ФМА *in vitro*, биназа также достоверно не модифицирует генерацию АФК.

Гранулоциты: ФМА и *E. coli* стимулируют генерацию АФК в гранулоцитах. Биназа в обеих концентрациях достоверно не влияет на базальную продукцию АФК. В условиях окислительного взрыва, стимулированного *E. coli*, биназа концентрационно зависимо

увеличивает долю клеток, продуцирующих активные формы кислорода, на 21 и 30% ($P < 0,01$, (см. таблицу). У гранулоцитов, стимулированных *E. coli*, снижается интенсивность прямого светорассеяния, что указывает на уменьшение диаметра клеток (рисунок). Биназа не модифицирует изменение диаметра гранулоцитов, вызванное *E. coli* (данные не показаны). Таким образом, биназа, *per se* не увеличивая долю спонтанно АФК-генерирующих гранулоцитов, меняет физиологическое состояние последних, заставляя их откликаться на стимуляцию *E. coli* количественным (процент АФК-генерирующих клеток) и качественным (интенсивность генерации АФК/клетку) приростом продукции кислородных радикалов (см. таблицу).



Изменение диаметра гранулоцитов:
 1 – интактные клетки, диаметр = 734 усл. ед.;
 2 – клетки, стимулированные *E. coli*,
 диаметр = 658 усл. ед. ($P < 0,01$, критерий
 Колмогорова–Смирнова)

В гранулоцитах человека, *in vitro* стимулированных ФМА, биназа не меняет долю клеток, продуцирующих активные формы кислорода. Но при этом наблюдается тенденция к разнонаправленному концентрационно зависимому действию биназы на интенсивность продукции АФК на клетку (см. таблицу).

Выполненные исследования показали, что биназа избирательно и различным образом действует на *E. coli*–и ФМА-зависимый окислительный взрыв в гранулоцитах и не влияет на эти процессы в моноцитах. Характер ответа гранулоцита зависит от концентрации биназы и от используемого индуктора. Если опсонизированные *E. coli* активируют фагоциты через *Fc*-рецепторы, то действие ФМА опосредовано только протеинкиназой С (ПКС). Форболовые эфиры (в том числе ФМА) легко проникают в клетку и, имея структурное сходство с диацилглицерином, взаимодействуют с его участком связывания на молекуле ПКС. Далее активированная ПКС осуществляет фосфорилирование НАДФН-оксидазы, которая в свою очередь инициирует продукцию активных форм кислорода (респираторный взрыв) [9]. Таким образом, в гранулоцитах биназа модулирует генерацию АФК как на мембранном (индуктор *E. coli*), так и на внутриклеточном (индуктор ФМА) уровне.

Заключение

Полученные результаты демонстрируют избирательность действия биназы на клетки крови человека и обосновывают дальнейшее изучение биназы в качестве модулятора индукции АФК в фагоцитах.

Список литературы

1. Голубенко И.А. Рибонуклеаза *Bacillus intermedium* 7P. Очистка хроматографией на фосфоцеллюлозе и некоторые

характеристики гомогенного фермента / И.А. Голубенко, Н.П. Балабан, И.Б. Лещинская // Биохимия. – 1979. – Т. 44. – С. 640–648.

2. Калачева Н.В. Влияние рибонуклеаз и их модифицированных производных на функциональную активность перитонеальных макрофагов крысы / Н.В. Калачева, Б.М. Куриненко // Биомедицинская химия. – 2005. – Т. 3. – С. 303–309.

3. Миронов В.А. Избирательное действие биназы на апоптоз субпопуляций лейкоцитов крови человека / В.А. Миронов, Ф.В. Ширшиков, Н.В. Калачева, Г.В. Черепнев // Фундаментальные исследования. – 2012. – Т. 9, № 1. – С. 53–59.

4. Ярилин А.А. Иммунология. – М.: ГЭОТАРМедиа, 2010. – 752 с.

5. Garlichs C.D. Delay of neutrophil apoptosis in acute coronary syndromes / C.D. Garlichs, S. Eskafi, I.Cicha // J.Biol. – 2004. – Vol. 75, № 5. – P. 828–835.

6. Granot Z. Tumor Entrained Neutrophils Inhibit Seeding in the Premetastatic Lung / Z.Granot, E.Henke, A.Elizabeth // Cancer Cell. – 2011. – Vol. 20, № 3. – P. 300–314.

7. Libby P. Inflammation and atherosclerosis / P.Libby, P.M. Ridker, A. Maser // Circulation. – 2002. – Vol. 105. – P. 1135–1139.

8. Morel F. The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects / F. Morel, J. Doussiere, P. Vignais // Europ. J. Biochem. – 1991. – Vol. 201, № 3. – P. 523–546.

9. Robinson J.M. The NADPH oxidase complex of phagocytic leukocytes: a biochemical and cytochemical view / J.M. Robinson, J.A. Badwey // Histochemistry. – 1995. – Vol. 103. – P. 163–180.

References

1. Golubenko I.A., Balaban N.P., Leshinskaya I.B. *Biological chemistry*, 1979. Vol. 44. pp. 640–648.
 2. Kalacheva N.V., Kurinenko B.M. *Biomedical chemistry*. 2005. Vol. 3. pp. 303–309.
 3. Mironov V.A., Shirshikov F.V., Kalacheva N.V., Cherepnev G.V. *Fundamental research*. 2012. Vol. 9, no. 1. pp. 53–59.
 4. Yarilin A.A. *Immunology*. M.: GEOTARMedia, 2010. 752 p.
 5. Garlichs C.D., Eskafi S., Cicha I. *J.Biol.* 2004. Vol. 75, no. 5. pp. 828–835.
 6. Granot Z., Henke E., Elizabeth A. *Cancer Cell*. 2011. Vol. 20, no. 3. pp. 300–314.
 7. Libby P., Ridker P.M., Maser A. *Circulation*. 2002. Vol. 105. pp. 1135–1139.
 8. Morel F., Doussiere J., Vignais P. *Europ.J.Biochem*. 1991. Vol. 201, no. 3. pp. 523–546.
 9. Robinson J.M., Badwey J.A. *Histochemistry*. 1995. Vol. 103. pp. 163–180.

Рецензенты:

Ишмухаметова Д.Г., д.б.н., профессор кафедры биохимии Института фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань;

Медянцева Э.П., д.х.н., зав. лабораторией иммунохимических методов анализа, профессор кафедры аналитической химии Химического института им. А.М. Бутлерова ФГАОУ ВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», г. Казань.

Работа поступила в редакцию 07.11.2012.