

СТЕАРИЛАМИН ВЫЗЫВАЕТ БЫСТРОЕ ОБРАЗОВАНИЕ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК (НЕТОЗ), НЕ ЗАВИСЯЩЕЕ ОТ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА

© 2019 г. Н. Ю. Лотош^{1*}, А. А. Селищева^{1,2}, Н. В. Воробьева²

* E-mail: natalotosh@gmail.com

¹ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», Москва, Россия;

²ФГБОУ ВО МГУ им. М. В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, Россия

Поступила: 15.03.2019. Принята: 27.03.2019

Методом конфокальной флуоресцентной микроскопии было показано, что стеариламин (СА) в концентрации 0,2 мг/мл вызывает образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. По сравнению с форболовым эфиром мирилата ацетата (ФМА) — классическим активатором нетоза — при воздействии СА этот процесс протекает быстрее (30–60 мин), тогда как при действии ФМА за 2–3 часа. С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) было показано, что СА не активирует НАДФН-оксидазу. СА дозозависимо подавлял кислородный взрыв (КВ) клеток, стимулированных ФМА, зимозаном и латексом. Прямое доказательство того, что активные формы кислорода (АФК) не требуются в нетозе, было получено на примере нейтрофилов, выделенных из крови пациентов с хронической гранулематозной болезнью (ХГБ). Из результатов следует, что образование нейтрофильных внеклеточных ловушек под действием СА протекает по неклассическому механизму.

Ключевые слова: конфокальная флуоресцентная микроскопия, люминол-зависимая хемилюминесценция, нейтрофильные внеклеточные ловушки, нетоз, стеариламин

DOI: 10.31857/S102872210006650-0

Адрес: 123098 Москва, пл. Академика Курчатова, 1. НИЦ «Курчатовский институт», Лотош Наталья Юрьевна.

Тел: +7 (916) 456-16-89

E-mail: natalotosh@gmail.com

Авторы:

Лотош Н. Ю., к.х.н., научный сотрудник Отдела биотехнологий и биоэнергетики ФГБУ НИЦ «Курчатовского института», Москва, Россия;

Селищева А. А., д.х.н., инженер-исследователь ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт», ведущий научный сотрудник ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова», Москва, Россия;

Воробьева Н. В., к.б.н., старший научный сотрудник ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова», Москва, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Нетоз — защитный механизм, при котором нейтрофилы выбрасывают содержимое ядра и гранул во внеклеточную среду. Наряду с этим активируется НАДФН-оксидаза и вырабатываются АФК. В результате образуются нейтрофильные внеклеточные ловушки, которые видны как длинные нити ДНК или облакопо-

добные структуры [1]. Для изучения нетоза *in vitro* обычно используют форболовый эфир ацетата мирилата (ФМА). При стимуляции клеток ФМА нетоз развивается по пути, который считается классическим [2]. В этом случае выработка АФК — непереносимое условие для развития нетоза, однако роль АФК до конца не выяснена. Другой характерный признак «классического» нетоза — это длительность процесса 2–3 часа. В последнее время появились сообщения о нетозе, развитие которого отличается от классического: АФК-независимый быстрый нетоз [3].

Ранее нами было изучено влияние катионных липосом, состоящих из фосфатидилхолина (ФХ) и содержащих стеариламин (ФХ-СА липосомы), на формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек и КВ. Показали, что инкубация нейтрофилов с ФХ-СА липосомами приводит к быстрому нетозу [4]. Оценка АФК с помощью люминол-зависимой ХЛ показала, что липосомы из ФХ, так же как и ФХ-СА липосомы, могли вызывать КВ через 2–3 часа после

их добавления к клеткам, что, возможно, обусловлено принесенным ФХ или липидными радикалами, а не непосредственно СА. Стоит отметить, что пустые ФХ-липосомы не вызывали нетоз. ФХ-СА липосомы вызывали нетоз гораздо раньше, чем происходил КВ. Чтобы однозначно ответить на вопрос о необходимости АФК для нетоза и исключить влияние ФХ, в данной работе использовали СА, растворенный в ДМСО. Чтобы оценить возможность участия длинноцепочечных жирных кислот в развитии нетоза, в качестве контроля использовали стеариновую кислоту (С18).

МЕТОДЫ

Выделение нейтрофилов. Нейтрофилы выделяли из венозной крови в градиенте плотности фикола.

Флуоресцентная микроскопия. Нейтрофильные внеклеточные ловушки визуализировали с помощью флуоресцентного конфокального микроскопа FluoView Olympus 10i (Япония). Нейтрофилы культивировали при 37 °С в присутствии 0.2 мг/мл СА или С18, или 40 нМ ФМА (во всех образцах содержание ДМСО 2%), фиксировали метанолом и окрашивали акридиновым оранжевым.

Кислородный взрыв нейтрофилов оценивали методом люминол-зависимой ХЛ с помощью хемилюминометра Lum-1200 (ДИСофт, Россия). Нейтрофилы инкубировали с 0.2; 0.04 и 0.008 мг/мл СА 15 мин при 37 °С и стимулировали ФМА (40 нМ), зимозаном (0.1 мг/мл) или латексом (размер частиц 1.2 мкм).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек. Были проанализированы образцы нейтрофилов, полученных от пяти добровольцев. Установили, что инкубация нейтрофилов с СА вызывает нетоз. Наблюдала как «миксы» ядра и цитоплазмы, так и сами ловушки (нити или облака). Поскольку нетоз, вызываемый ФМА, подробно описан в литературе, время образования ловушек при инкубации с СА сравнивали со временем их образования под влиянием ФМА. Во всех случаях происходило быстрое образование ловушек. В одних случаях клетки начинали образовывать ловушки уже через 30 мин после инкубации с СА, а через час 100% клеток были подвержены нетозу. В других случаях ловушки начинали образовываться через час, но

уже через 90 мин все клетки были задействованы в процессе. ФМА активировал ловушки гораздо позднее – через 120–180 мин, причем процент нетотических клеток никогда не достигал 100%.

Сравнительно недавно было установлено, что на поверхности нейтрофилов локализованы рецепторы жирных кислот. Чтобы оценить возможность участия остатков жирных кислот в индукции нетоза, нами было исследовано действие С18 на нейтрофилы. Мы показали, что инкубация С18 с нейтрофилами сопровождалась образованием немногочисленных ловушек, процент которых не превышал 10.

Отдельно стоит отметить результаты эксперимента с нейтрофилами, выделенными от пациентов с ХГБ. При этом заболевании нарушена функция НАДФН оксидазы, и нейтрофилы не способны генерировать АФК. В этом случае ФМА не вызывает нетоз. Оказалось, что СА способен вызывать нетоз таких клеток: через 60 мин нетоз развивался у 50% клеток больного ХГБ, а через 120 мин – практически у всех клеток.

Кислородный взрыв нейтрофилов. СА оказывал дозозависимое ингибирующее действие на КВ: в концентрации 0.2 мг/мл СА полностью подавлял генерацию АФК клетками, стимулированными ФМА, зимозаном и латексом. Меньшие концентрации СА (0.04 и 0.008 мг/мл) такого действия не оказывали. Кроме того, стоит отметить, что сам по себе СА не вызывал активацию НАДФН-оксидазы, поскольку при стимулировании клеток в течение трех часов пика ХЛ не наблюдали.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время исследования нетоза показали, что существуют как минимум два типа этого процесса. Один, активируемый ФМА и другими химическими и микробными факторами, развивается в течение 2–3 ч, причем для этого процесса необходимы АФК, роль которых не выяснена окончательно. Другой тип нетоза (неклассический) развивается значительно быстрее (30–60 мин) и не зависит от АФК. Этот тип нетоза описан для таких активаторов как внутриклеточные паразиты и стафилококк [3, 5].

В данной работе показано, что СА, положительно заряженный амин, содержащий 18 углеродных атомов, вызывает быстрый нетоз без участия АФК. Более того, СА дозозависимо блокирует КВ, вызванный ФМА, зимозаном и латексом. Известно, что они действуют по разным механизмам: ФМА стимулирует протеинкина-

зу С, вызывая активацию НАДФН-оксидазы, а зимозан и латекс индуцируют фагоцитоз. Интересно отметить, что отрицательно заряженная жирная кислота С18 почти не вызывает образование ловушек. Эти результаты и литературные данные по активирующему действию катионных липосом говорят о важной роли положительного заряда на молекуле активатора.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что положительно заряженный СА вызывает нетоз, протекающий по механизму, не требующему АФК. Прямое доказательство этого было получено при изучении действия СА на нейтрофилах пациентов с ХГБ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Воробьева Н. В., Пинегин Б. В. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, роль в норме и при патологии. Биохимия. 2014, 79 (12), 1580–1591. [Vorobjeva N. V., Pinigin B. V. Neutrophil extracellular traps: mechanisms of formation and role in health and disease. Biochemistry. 2014, 79 (12), 1286–1580].
2. Fuchs T. A., Abed U., Goosmann C., Hurwitz R., Schulze I., Wahn V., Weinrauch Y., Brinkmann V., Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. J. Cell Biol, 2007, 176, 231–241.
3. Pilszczek F. H., Salina D., Poon K. K., Fahey C., Yipp B. G., Sibley C. D., Robbins S. M., Green F. H., Surette M. G., Sugai M., Bowden M. G., Hussain M., Zhang K., Kubes P. J. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to Staphylococcus aureus. J. Immunol., 2010, 185, 7413–7425.
4. Ломов Н. Ю., Аляева С. О., Василов П. Г., Селищева А. А. Стеариламин вызывает образование нейтрофильных внеклеточных ловушек независимо от активных форм кислорода. Цитология, 2019, 61(4), 1–10. [N. Y. Lotosh, S. O. Alyaseva, R. G. Vasilov, A. A. Selischeva. Stearylamine induces ros-independent neutrophil extracellular traps. Tsitologiya, 2019, 61(4), 1–10].
5. Díaz-Godínez C., Fonseca Z., Néquiz M., Lacleste J. P., Rosales C., Carrero J. C. Entamoeba histolytica Trophozoites induce a rapid non-classical NETosis. Mechanism independent of NOX2-derived reactive oxygen species and PAD4 activity. Front. Cell. Infect. Microbiol., 2018, 8, 184.

STEARYLAMINE ACTIVATES RAPID AND ROS-INDEPENDENT FORMATION OF NEUTROPHIL EXTRACELLULAR TRAPS (NETOSIS)

© 2019 N. Y. Lotosh^{1*}, A. A. Selischeva^{1,2}, N. V. Vorobjeva²

*E-mail: natalotosh@gmail.com

¹National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, Russia

²Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, Moscow, Russia

Received: 15.03.2019. Accepted: 27.03.2019

Using confocal fluorescence microscopy it was shown that stearylamine (SA) at concentration of 0.2 mg/ml causes the neutrophil extracellular traps formation. In comparison with classic NET activator, the phorbol ether of myristate acetate (PMA), SA activates this process much faster, in 30–60 min, while under PMA stimulation it occurs in 2–3 hours. Using luminol-dependent chemiluminescence, we showed that SA does not activate NADPH oxidase. SA dose-dependently suppresses the oxidative burst stimulated with PMA, zymosan, or latex. The direct evidence that NADPH oxidase is not activated under the SA action was obtained by using neutrophils isolated from the blood of patients with chronic granulomatous disease (CGD). It is obvious from our results, that SA-induced NET formation does not require the participation of reactive oxygen species and proceeds according to a nonclassical mechanism.

Key words: fluorescence confocal microscopy, luminol-dependent chemiluminescence, NETosis, neutrophil extracellular traps, stearylamine

Authors:

Lotosh N. Y., Ph.D., Research Associate, Department of Biotechnology and Bioenergy, Kurchatov Institute, Moscow, Russia. E-mail: natalotosh@gmail.com;

Selischeva A. A., Doctor of Chemical Sciences, Research Engineer, Kurchatov Institute Research Center; Leading Research Associate, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia;

Vorobjeva N. V., Ph.D., Senior Research Associate, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia.