

ГЕНЕРАЦИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В МОНОЦИТАХ ПРИ АДГЕЗИИ К СТЕКЛУ

© А. А. Крюков, Г. Н. Семенкова, С. Н. Черенкевич

*Кафедра биофизики Белорусского государственного университета, Минск;
электронный адрес: Кафедра биофизики Белорусского государственного университета, Минск;
электронный адрес: Krjukovaa@mail.ru*

С применением методов люминолзависимой и люцигенинзависимой хемилюминесценции (ХЛ) изучены процессы активации кислорода в моноцитах, стимулированных адгезией к стеклу. Показано, что причиной ХЛ является генерация активных форм кислорода (АФК) при взаимодействии моноцитов с поверхностью стекла. Выход АФК при адгезии моноцитов к стеклу зависит от концентрации ионов Са во внеклеточной среде. Повышение уровня цитозольного Са²⁺ при увеличении концентрации внеклеточного Са²⁺ сопровождается активацией фосфолипазы А₂, 5-липоксигеназы и циклооксигеназы. Ионы магния не влияют на активацию кислорода клетками. Инкубирование клеток в среде без глюкозы или добавление в клеточную суспензию блокатора гликолиза 2-дезоксид-Д-глюкозы приводит к снижению интенсивности ХЛ. С помощью ингибиторного анализа установлено, что образование активных форм кислорода в моноцитах связано с метаболизмом арахидоновой кислоты и зависит от активности фосфолипазы А₂.

Ключевые слова: моноциты, НАДФН-оксидаза, активные формы кислорода, адгезия, хемилюминесценция.

Принятые сокращения: АК — арахидоновая кислота, АФК — активные формы кислорода, ДАБЦО — 1,4-диазобисцикло-2,2,2-октан, 5-ЛО — 5-липоксигеназа, люм-ХЛ — люминолзависимая хемилюминесценция, люц-ХЛ — люцигенинзависимая хемилюминесценция, МПО — миелопероксидаза, СК — салицилгидроксамиковая кислота, СОД — супероксиддисмутаза, ХЛ — хемилюминесценция.

Одной из особенностей моноцитарных клеток является их способность адгезировать к поверхности стекла или пластика. Адгезия моноцитов *in vitro* к немодифицированным поверхностям осуществляется в первую очередь через специализированные структуры — адгезины типа LFA-1, С3bi-рецептор и другие молекулы семейства интегринов (Ковальчук, Чередеев, 1991). Прилипание и распластывание клеток — важнейшие свойства моноцитов, макрофагов и нейтрофилов, необходимые для фагоцитоза, межклеточной кооперации и экстравазации. Нами установлено, что адгезия нейтрофилов к подложкам из различных материалов (стекло, целлюлоза, монокарбоксицеллюлоза) сопровождается генерацией активных форм кислорода (АФК) с участием НАДФН-оксидазы, миелопероксидазы (МПО) и ферментов метаболизма арахидоновой кислоты (АК) — 5-липоксигеназы (5-ЛО) и циклооксигеназы — и зависит от концентрации внеклеточного Са²⁺ (Семенкова, 1989; Коваленко, 2002). Способность фагоцитов генерировать АФК при адгезии может изменяться при ряде патологических состояний. Ранее нами показано, что у больных полинозом выход АФК при адгезии моноцитов к стеклу значительно выше, чем у здоровых людей (Семенкова *et al.*, 2004), а у альвеолярных макрофагов и моноцитов крови пациентов с саркоидозом легкого продукция АФК, обусловленная адгезией, снижена по сравнению с нормой (Семенкова *et al.*, 1997). Изменение кислородоактивирующей способно-

сти клеток при этих патологиях коррелировало с продукцией цитокинов (интерлейкинов-1β и -6) (Tahanovich *et al.*, 2001; Коваленко и др., 2005) и сопровождалось изменением путей метаболизма арахидоновой кислоты (АК; Семенкова *et al.*, 2004).

В ряде работ обсуждается сигнальная роль АФК в иммунных реакциях (Thannickal, Fanburg, 2000). Мы предположили, что системы генерации АФК, связанные с процессом адгезии клеток к неспецифическим подложкам, принимают участие в формировании функционального ответа фагоцитов. Анализ собственных данных и данных литературы позволил нам использовать процесс генерации АФК моноцитами при адгезии к стеклу в качестве простой и удобной модели для оценки функционального состояния этих клеток в норме и при патологии (Семенкова *et al.*, 2001, 2004).

Явление образования АФК при адгезии мононуклеаров к неспецифическим подложкам описано в единичных работах, в которых отсутствует детальное представление о механизмах этого процесса (Ohyama *et al.*, 2001). С целью установления молекулярных механизмов активации кислорода моноцитами крови человека при адгезии к стеклу в настоящей работе проведен сравнительный анализ люминолзависимой (люм-ХЛ) и люцигенинзависимой (люц-ХЛ) хемилюминесценции (ХЛ) этих клеток, а также изучено влияние факторов среды и ингибиторов метаболизма АК на продукцию АФК в моноцитах.

Материал и методика

Выделение моноцитов из периферической крови здоровых людей осуществляли путем центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина по стандартной методике (Ковальчук, Чередеев, 1991). Морфологический контроль показал, что содержание моноцитов в полученной фракции мононуклеаров составляет не менее 80—90 %. Жизнеспособность клеток, установленная в тесте с трипановым синим, составила 95 %.

Генерацию АФК оценивали по люм-ХЛ и люц-ХЛ с помощью биохемилюминометра БХЛ-1 (Минск, Беларусь) в сбалансированном солевом растворе Эрла при 37 °С, рН 7.4 (Vetohin et al., 1986; Ветохин и др., 1987). Интегральную интенсивность ХЛ или суммарный выход АФК определяли как площадь под кривой, записанной в течение 20 мин. Суспензию моноцитов наслаивали на дно кварцевой кюветы диаметром 40 мм. Перед началом измерений в анализируемую пробу объемом 1 мл добавляли $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л люминола или люцигенина и регистрировали кинетические зависимости интенсивности ХЛ клеток при их адгезии к стеклянному дну кюветы. Число моноцитов в 1 мл пробы составляло $5 \cdot 10^5$.

Определение концентрации ионов кальция в цитозоле осуществляли флуоресцентным методом с использованием Ca^{2+} -индикатора Fura 2-AM, длины волн возбуждения составляли 340 и 380 нм, длина волны флуоресценции — 520 нм (Maravall et al., 2000). Флуоресцентные измерения проводили при 37 °С на флуориметре LSF 1211A («СОЛАР», Беларусь). Расчет внутриклеточной концентрации кальция проводили с помощью известной формулы Гринкевича (Maravall et al., 2000). Полученные результаты представлены как средняя величина и среднее квадратичное отклонение для 5 независимых измерений.

Изучение адгезивности клеток к стеклу проводили следующим образом. Стеклянные пластинки помещали в чашки Петри, добавляли 1 мл суспензии моноцитов и в течение 1 ч инкубировали в термостате при 37 °С. Затем пластинки промывали в среде Эрла (рН 7.4) и с помощью светового микроскопа и камеры Горяева подсчитывали число клеток, адгезированных к стеклянным пластинкам на единицу площади. При статистической обработке результатов определяли среднюю величину и среднее квадратичное отклонение для 3—5 независимых измерений. Достоверность различий оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента при $P = 0.95$.

В работе были использованы: индометацин, МК-886, аспирин, супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, маннит, 2-дезоксид-D-глюкоза, люминол, РМА, fMLP и арахидоновая кислота (АК; Sigma, США); Fura 2-AM (Molecular Probes, США); люцигенин (Fluka, Швейцария); 1,4-диазабикло-2,2,2-октан (ДАБЦО; Merck, Германия); салицилгидроксамиковая кислота (СК; Aldrich, Германия); среда Эрла (в моль/л): $1.1 \cdot 10^{-1}$ NaCl, $5.4 \cdot 10^{-3}$ KCl, $9.0 \cdot 10^{-4}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $5.0 \cdot 10^{-4}$ CaCl_2 , $8.0 \cdot 10^{-4}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $5.6 \cdot 10^{-3}$ глюкозы и $2.62 \cdot 10^{-2}$ NaHCO_3 .

Результаты и обсуждение

Генерация АФК клетками при стимуляции моноцитов запускается в результате активации НАДФН-оксидазы. Вместе с НАДФН-оксидазой в процессах образова-

ния АФК в моноцитах участвует МПО, которая при активации клеток секретируется из гранул во внеклеточную среду (Brown et al., 2001). Для того чтобы оценить вклад МПО и НАДФН-оксидазы в процессы генерации АФК в моноцитах при адгезии к стеклу, нами проведен сравнительный анализ люм-ХЛ и люц-ХЛ. В литературе показано, что при концентрации люцигенина $5 \cdot 10^{-6}$ — $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л интенсивность люц-ХЛ лейкоцитов прямо пропорциональна концентрации супероксидных анион-радикалов и не зависит от активности МПО (Li, Zhu, 1998). Люминол легко окисляется при действии АФК, таких как $\text{O}_2^{\bullet -}$, OH^{\bullet} , O_2^- , H_2O_2 , а также HOCl , возникающим при активации МПО (Tarpey, Fridovich, 2001).

На рис. 1, а представлены зависимости интенсивностей люм-ХЛ и люц-ХЛ моноцитов крови человека от времени после внесения клеток в стеклянную кювету. Видно, что интенсивность люм-ХЛ достигает максимума через 8, а люц-ХЛ — через 20 мин после начала контакта клеток с поверхностью стекла. Суммарные значения интенсивности как люм-ХЛ, так и люц-ХЛ линейно зависят от концентрации клеток (данные не показаны).

На рис. 1, б показано влияние специфических перехватчиков АФК на суммарный выход люм-ХЛ моноцитов при адгезии к стеклу. Добавление к моноцитам СОД, дисмутирующей $\text{O}_2^{\bullet -}$, приводит к уменьшению интегральной интенсивности люм-ХЛ на 60—70 %. Маннит, перехватчик гидроксильных радикалов OH^{\bullet} , и каталаза, утилизирующая H_2O_2 , вызывают незначительное снижение выхода люм-ХЛ. Перехватчик синглетного кислорода (ДАБЦО) не влияет на ХЛ-ответ моноцитов. Выявлено, что ингибирование МПО при добавлении СК приводит к уменьшению на 10—23 % выхода АФК в моноцитах при адгезии. Из этих данных следует, что основной вклад в люм-ХЛ моноцитов при адгезии к стеклу вносят супероксидные анион-радикалы и лишь частично — H_2O_2 , радикалы OH^{\bullet} и продукты, образованные с участием МПО.

Как установлено ранее, адгезия нейтрофилов к стеклу сопровождается люм-ХЛ (Semenkova et al., 1997). Чтобы подтвердить предположение о том, что причиной люм-ХЛ моноцитов также является адгезия клеток к стеклу, нами изучена люм-ХЛ клеток в условиях, препятствующих адгезии. Для этого суспензию моноцитов наслаивали на 20%-ный раствор фиколла, который препятствует контакту клеток со стеклом. В этом случае люм-ХЛ не наблюдали (данные не показаны). Можно заключить, что причиной люм-ХЛ является взаимодействие моноцитов с поверхностью стекла.

В условиях, препятствующих контакту клеток со стеклом, такие индукторы АФК, как хемотактический пептид fMLP, латекс, форболовый эфир (РМА), ФГА и АК, не вызывали генерацию АФК в моноцитах (данные не показаны). Следовательно, индуцированное стимуляторами метаболизма образование АФК в моноцитах наблюдается только в условиях адгезии, а адгезивность клеток можно рассматривать как примиряющий к генерации АФК фактор.

Известно, что образование АФК во многих типах клеток сопряжено с функционированием пентозофосфатного пути (Маянский, Маянский, 1987). Активированная НАДФН-оксидаза восстанавливает молекулярный кислород до $\text{O}_2^{\bullet -}$, что сопровождается окислением НАДФН. Регенерация НАДФН осуществляется за счет параллельной активации ферментов пентозофос-

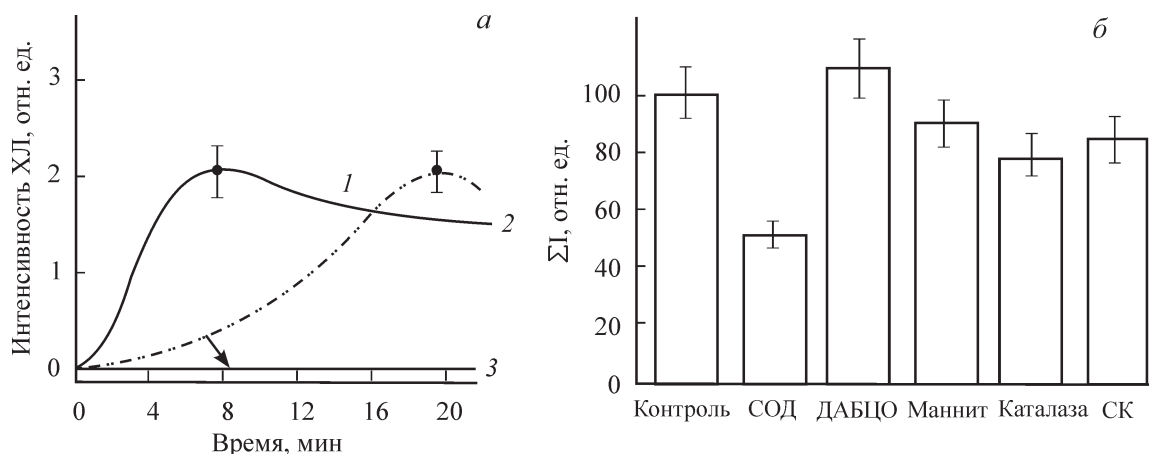


Рис. 1. Генерация АФК в моноцитах при адгезии к стеклу в присутствии во внеклеточной среде $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л CaCl_2 . а — типичные кинетические зависимости интенсивности люм-ХЛ (1) и люц-ХЛ (2) моноцитов; б — влияние специфических перехватчиков на суммарный выход (ΣI) АФК в моноцитах при адгезии клеток. Концентрации (моль/л): СОД — $8 \cdot 10^{-4}$, ДАБЦО — $1 \cdot 10^{-4}$, маннита — $5 \cdot 10^{-4}$, каталазы — $1 \cdot 10^{-4}$, СК — $2 \cdot 10^{-5}$. Здесь и на рис. 2—4 и 6 вертикальные отрезки — погрешность измерений.

фатного пути, утилизирующих глюкозу. Нами было изучено влияние глюкозы на процесс генерации АФК моноцитами при адгезии к стеклу. Показано, что инкубирование клеток в течение 1 ч в среде без глюкозы приводит к уменьшению интенсивности люм-ХЛ моноцитов более чем в 2 раза. Добавление к суспензии клеток не утилизируемого аналога глюкозы 2-дезоксид-глюкозы ($6 \cdot 10^{-3}$ моль/л) приводит к снижению выхода АФК в моноцитах в 1.5 раза. Приведенные данные позволяют считать, что генерация АФК при адгезии моноцитов к стеклу — процесс, зависящий от потребления клетками глюкозы.

Известно, что в генерации АФК при стимуляции лейкоцитов важную роль играет вход внеклеточного Ca^{2+} в цитозоль клетки. Так, индуцированный ионофорами вход Ca^{2+} в клетку сопровождается активацией протеинкиназы С и кальмодулинзависимых киназ (Thelen et al., 1993). Это приводит к фосфорилированию цитозольных компонентов НАДФН-оксидазы, что инициирует ее сборку с последующей активацией и образованием су-

пероксида. Нами изучена люм-ХЛ моноцитов при адгезии к стеклу в присутствии внеклеточного Ca^{2+} при различных его концентрациях (рис. 2). На этом рисунке видно, что не только интенсивность, но и вид кинетических кривых люм-ХЛ моноцитов при адгезии к стеклу зависят от концентрации Ca^{2+} во внеклеточной среде. Так, при концентрациях CaCl_2 выше $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л типичные кинетические зависимости интенсивности люм-ХЛ описываются двумя стадиями.

На рис. 3 представлены зависимости от концентрации ионов кальция во внеклеточной среде максимальной интенсивности (I_{\max}) люц-ХЛ и первой стадии люм-ХЛ, характеризующие выход только O_2^- и АФК соответственно, и интегральной интенсивности (ΣI) при адгезии моноцитов. На рис. 3 видно, что при увеличении концентрации CaCl_2 максимальная интенсивность люм-ХЛ уменьшается, а интегральная интенсивность люм-ХЛ возрастает. В то же время значения максимальной и интегральной интенсивностей люц-ХЛ с увеличением кон-

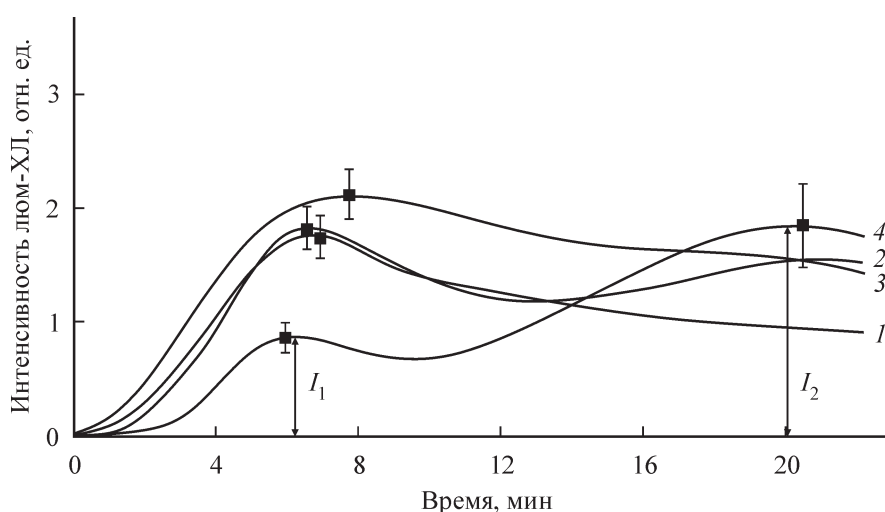


Рис. 2. Люминолзависимая хемилюминесценция моноцитов при адгезии к стеклу в отсутствии (1) и в присутствии (2—4) CaCl_2 в различных концентрациях.
 Концентрации (моль/л): CaCl_2 — $5 \cdot 10^{-3}$ (2), $7.5 \cdot 10^{-3}$ (3) или $1 \cdot 10^{-2}$ (4).

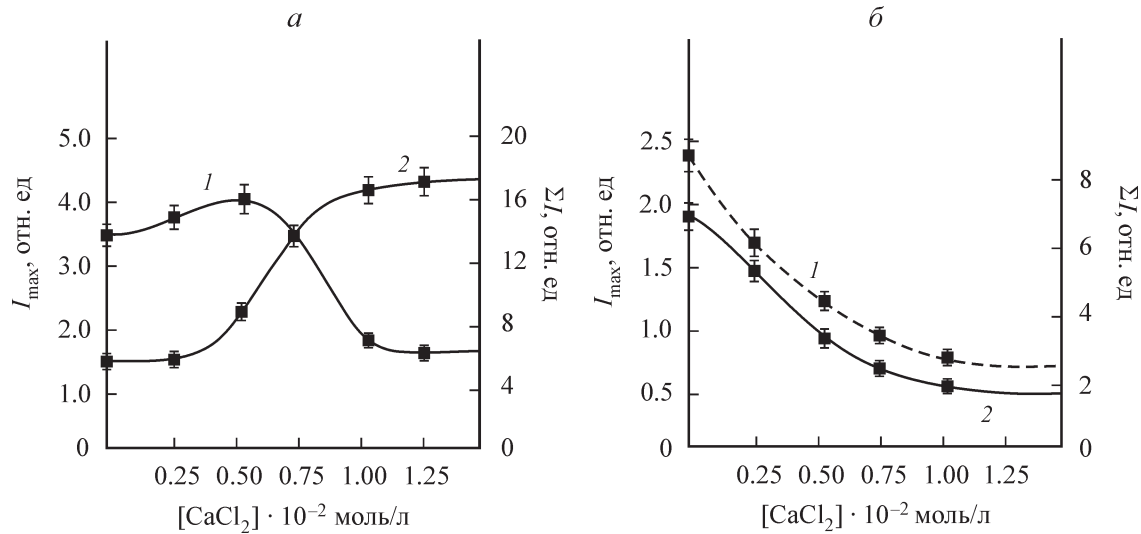
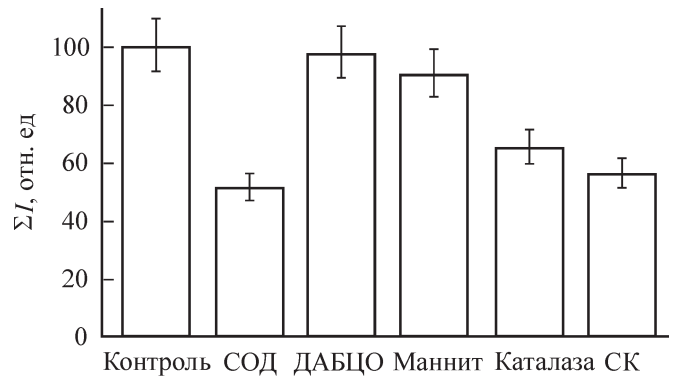


Рис. 3. Зависимость максимальной (I_{max}) (1) и интегральной (ΣI) (2) интенсивностей люм-ХЛ (а) и люц-ХЛ (б) моноцитов при адгезии к стеклу от концентрации $CaCl_2$.

Рис. 4. Влияние специфических перехватчиков на суммарный выход (ΣI) АФК в моноцитах при адгезии клеток к стеклу в присутствии $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л $CaCl_2$.

Концентрации (моль/л): СОД — $8 \cdot 10^{-4}$, ДАБЦО — $1 \cdot 10^{-4}$, маннит — $5 \cdot 10^{-4}$, каталазы — $1 \cdot 10^{-4}$, СК — $2 \cdot 10^{-5}$.



центрации Ca^{2+} вне клетки уменьшаются. Сравнительный анализ люм-ХЛ и люц-ХЛ моноцитов позволяет заключить, что с ростом концентрации экзогенного $CaCl_2$ в моноцитах происходит перераспределение вклада различных кислородоактивирующих систем в продукцию АФК: выход радикалов O_2^- уменьшается, тогда как выход других АФК увеличивается.

В литературе показано, что люм-ХЛ клеток обусловлена преимущественно окислением люминола пероксидом водорода в присутствии ионов Cl^- в реакции, катализируемой МПО (Albrecht, Jungi, 1993). Поскольку в присутствии $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л $CaCl_2$ отношение интенсивности люм-ХЛ моноцитов на второй стадии (I_2) к интенсивности на первой (I_1) в несколько раз выше (рис. 2), то вклад МПО в генерацию АФК превалирует на второй стадии люм-ХЛ. На участие пероксида водорода и МПО в процессе окисления люминола указывают также результаты, представленные на рис. 4, полученные при исследовании влияния каталазы и СК на выход АФК в моноцитах. Добавление каталазы или СК в клеточную суспензию приводит к снижению интегральной интенсивности люм-ХЛ на 36 и 50–40 % от исходного уровня соответственно. Отсутствие полного уменьшения интенсивности люм-ХЛ моноцитов каталазой может быть объяснено образованием в хемилюминесцентной реакции помимо H_2O_2 других типов АФК.

Одной из причин изменения вида кинетических кривых люм-ХЛ при варьировании концентраций $CaCl_2$ мо-

жет быть изменение способности клеток прикрепляться к стеклу (Bechard et al., 2001). Для проверки этого предположения нами проведено сравнительное изучение степени адгезии моноцитов на поверхности стекла в отсутствие и в присутствии $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л $CaCl_2$. Установлено, что адгезия клеток на 30 % выше в присутствии Ca^{2+} во внеклеточной среде, чем в их отсутствие.

Зависимость концентрации свободных ионов Ca в цитозоле моноцитов от времени при различных концентрациях внеклеточного Ca^{2+} показана на рис. 5. В отсутствие внеклеточного Ca^{2+} среднее значение концентрации внутриклеточного цитозольного Ca^{2+} составляло $8.5 \cdot 10^{-8}$ моль/л. При добавлении $CaCl_2$ к моноцитам происходит быстрое повышение концентрации свободного внеклеточного кальция.

В литературе показано, что ионы магния участвуют в стабилизации клеточных мембран, медируют вход Ca^{2+} в клетки и вызывают высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных кальциевых депо (Ebel et al., 2004). Нами установлено, что внеклеточный Mg^{2+} не влияет на процессы образования АФК в моноцитах (данные не приводятся).

В активацию кислорода моноцитами помимо НАДФН-оксидазы и МПО могут вносить вклад ферменты метаболизма АК — циклооксигеназы I и II типов и 5-ЛЮ (Olof, 2000). Образование свободной АК в моноцитах происходит в основном в результате реакции гидролиза фосфолипидов цитозольной кальцийзависимой

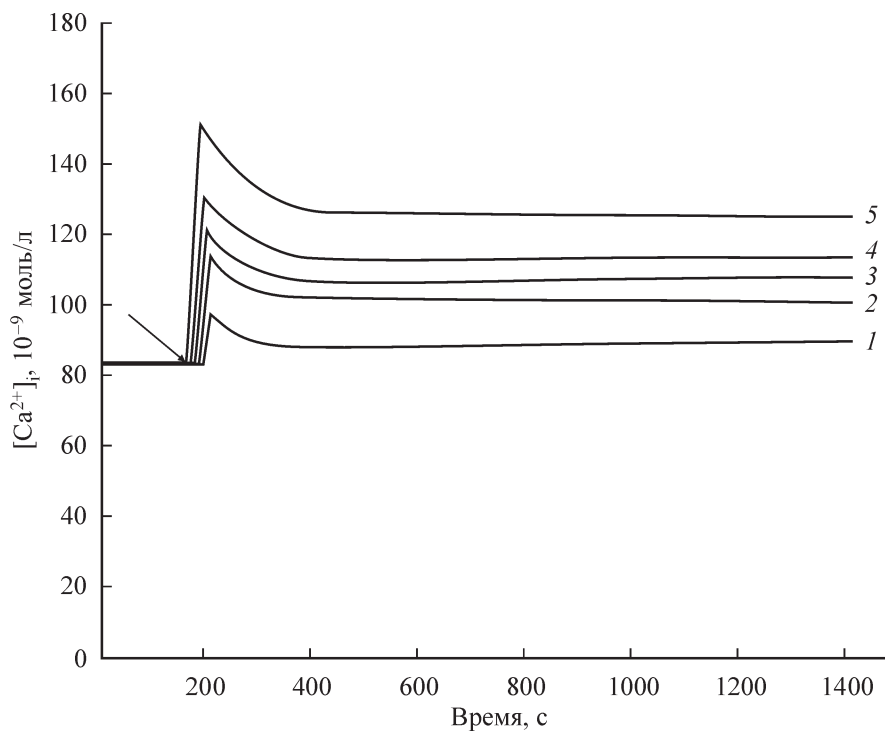


Рис. 5. Изменение концентрации цитозольного кальция в моноцитах при следующих концентрациях внеклеточного $CaCl_2$ (в моль/л): $2.5 \cdot 10^{-3}$ (1), $5.0 \cdot 10^{-3}$ (2), $7.5 \cdot 10^{-3}$ (3), $1.0 \cdot 10^{-2}$ (4) или $1.3 \cdot 10^{-2}$ (5).

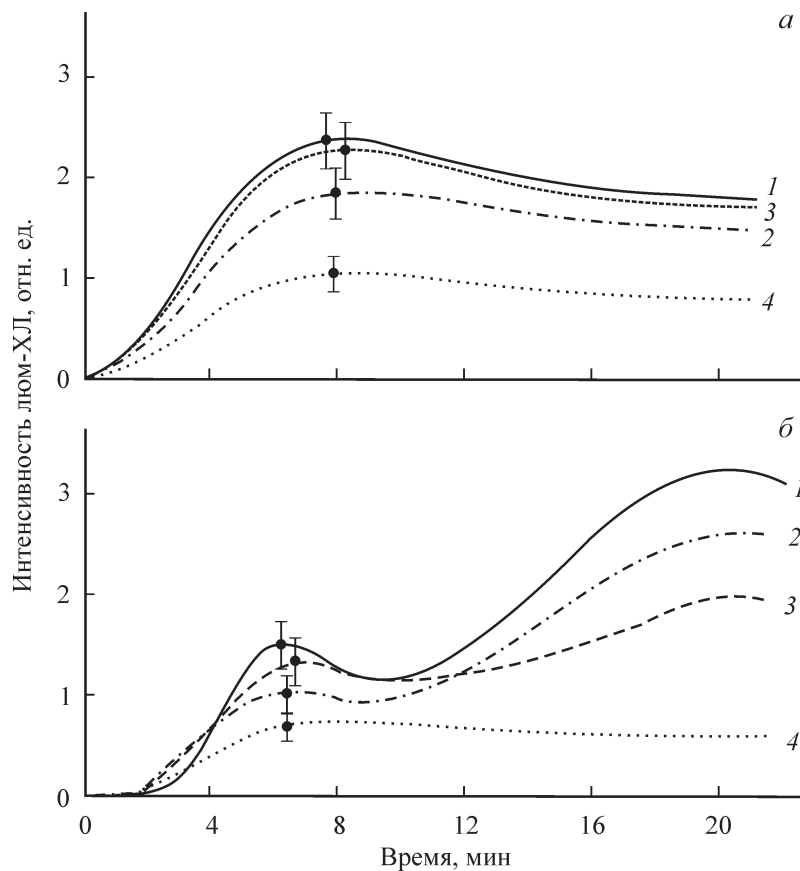


Рис. 6. Влияние аспирина (2), МК-886 (3) и индометацина (4) на интенсивности люм-ХЛ моноцитов. *а* — в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л $CaCl_2$; *б* — в присутствии $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л $CaCl_2$. 1 — контроль.

фосфолипазы A_2 (Hirabayashi, Shimizu, 2000). АК может активировать НАДФН-оксидазу моноцитов, активируя протонный канал, связанный с НАДФН-оксидазой (Selmayr et al., 1996). Параллельно с активацией фосфолипазы A_2 происходит активация 5-ЛО (Olof, 2000). Рост концентрации цитозольных ионов кальция увеличивает гидрофобность 5-ЛО, что способствует связыванию фермента с мембраной ядра и 5-ЛО-активирующим белком. В результате активирования 5-ЛО синтезирует лейкотриены и АФК. С помощью ингибиторного анализа вклада ферментов метаболизма АК в процессы генерации АФК в моноцитах при адгезии клеток к стеклу в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ и $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л $CaCl_2$ (рис. 6) выявлено, что ингибирование фосфолипазы A_2 индометацином ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) при различных концентрациях $CaCl_2$ приводит к уменьшению в 2—3 раза образования АФК в моноцитах при адгезии к стеклу. Ингибирование циклооксигеназ аспирином ($2.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л) или индометацином ($5 \cdot 10^{-7}$ моль/л) сопровождается снижением генерации АФК в моноцитах в 1.2—1.4 раза. При использовании блокатора 5-ЛО вещества МК-886 ($2 \cdot 10^{-7}$ моль/л) интенсивность люм-ХЛ моноцитов в присутствии $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л $CaCl_2$ не изменяется. Добавление МК-886 в клеточную суспензию в присутствии $1 \cdot 10^{-2}$ моль/л $CaCl_2$ приводит к снижению интенсивности второго максимума люм-ХЛ моноцитов на 30 %. Одной из причин такого действия МК-886, по-видимому, является снижение вклада МПО в генерацию АФК, поскольку ингибирование 5-ЛО в моноцитах приводит к уменьшению секреторной дегрануляции (Benrezzouk et al., 1999). Влияние индометацина, аспирина и МК-886 на адгезивность моноцитов показало, что в присутствии в клеточной суспензии индометацина происходит уменьшение адгезивности моноцитов на 36 %, тогда как в присутствии аспирина или МК-886 способность клеток прикрепляться к стеклу не изменяется.

Из полученных данных можно заключить, что образование АФК в моноцитах наблюдается только в условиях их адгезии и зависит от продолжительности контакта клеток с подложкой. Адгезия является фактором, примирующим моноциты к генерации АФК ($O_2^{\cdot -}$, OH^{\cdot} , $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2), при стимуляции fMLP, латексом, РМА, ФГА и АК. Индуцированные адгезией процессы генерации АФК в моноцитах характеризуются наличием двух стадий, связанных с активацией $O_2^{\cdot -}$, — генерирующих ферментов на обеих стадиях и миелопероксидазы азурофильных гранул преимущественно на второй стадии. Образование АФК в моноцитах зависит от концентрации внеклеточных ионов кальция и глюкозы: максимальный выход АФК наблюдается при концентрации Ca^{2+} , равной $1.5 \cdot 10^{-2}$ моль/л, и снижается в отсутствие глюкозы в 2 раза. Увеличение концентрации внеклеточных ионов кальция при адгезии моноцитов к стеклу приводит к повышению уровня цитозольного Ca^{2+} , который как вторичный мессенджер активирует 5-ЛО, циклооксигеназы и кальцийзависимую фосфолипазу A_2 . Продукты метаболизма этих соединений в свою очередь активирует НАДФН-оксидазу.

Список литературы

Ветохин С. С., Семенкова Г. Н., Черенкевич С. Н. 1987. Хемилуминесцентные методы анализа процесса активации клеток. В кн.: Люминесцентный анализ в медико-биологических исследованиях. Рига: РМИ. 81—85.

Коваленко Е. И. 2002. Активация кислорода в нейтрофилах в норме и при терапии онкогематологических заболеваний: Автореф. канд. дис. Минск: БГУ. 24 с.

Коваленко Е. И., Семенкова Г. Н., Жерносек В. Ф. 2005. Влияние СИТ на генерацию активных форм кислорода полиморфноядерными лейкоцитами и на уровень интерлейкина-1b в крови у детей с поллинозами. В кн.: Медико-социальное состояние личности: состояние и перспективы. Минск: БГУ. 2 : 163—166.

Ковальчук Л. В., Череев А. Н. 1991. Иммунорегуляторная роль моноцитов в норме и при патологии. Итоги науки и техники. Сер. «Иммунология». М.: ВИНТИ. 27 : 217 с.

Маянский А. Н., Маянский Д. Н. 1987. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. Новосибирск: Наука. 256 с.

Семенкова Г. Н. 1989. Генерация активных форм кислорода при стимуляции лимфоцитов и нейтрофилов крови человека: Автореф. канд. дис. Минск: БГУ: 24 с.

Albrecht D., Jungi T. W. 1993. Luminol-enhanced chemiluminescence induced in peripheral blood-derived human phagocytes: obligatory requirement of myeloperoxidase exocytosis by monocytes. J. Leukocyte Biol. 54 : 300—306.

Bechard D., Scherpereel A., Hammad H., Tsiocopoulos A., Aumercier M. 2001. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. J. Immunol. 167 : 3099—3106.

Benrezzouk R., Terencio M. C., Ferrandiz M. L., Feliciano S. 1999. Inhibition of human sPLA2 and 5-lipoxygenase activities by two neo-clerodane diterpenoids. A. Life Sci. 64 : PL205—PL211.

Brown K. E., Brunt E. M., Heinecke J. W. 2001. Immunohistochemical detection of myeloperoxidase and its oxidation products in kupffer cells of human liver. Amer. J. Pathol. 159 : 2081—2089.

Ebel H., Kreis R., Günther T. 2004. Regulation of Na^+/Mg^{2+} antiport in rat erythrocytes. Biochim. biophys. acta. 1664 : 150—160.

Hirabayashi T., Shimizu T. 2000. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A (2). Biochim. biophys. acta. 1488 : 124—138.

Li Y., Zhu H. 1998. Validation of lucigenin as a chemiluminescent probe for detecting superoxide anion radical production by enzymatic and cellular systems. J. Biol. Chem. 273 : 2015—2023.

Maravall M., Mainen Z. F., Sabatini B. L., Svoboda K. 2000. Estimating intracellular calcium concentrations and buffering without wavelength rationing. Biophys. J. 78 : 2655—2667.

Ohyama M., Otake T., Morinaga K. 2001. Effect of size of man-made and natural mineral fibers on chemiluminescent response in human monocyte-derived macrophages. Environ. Health Perspect. 109 : 1033—1038.

Olof P. 2000. The molecular biology and regulation of 5-lipoxygenase. Amer. J. Crit. Care Med. 161 : 511—515.

Sellmayer A., Obermeier H., Danesch U. 1996. Arachidonic acid increases activation of NADPH oxidase in monocytic U937 cells by accelerated translocation of p47-phox and co-stimulation of protein kinase C. Cell Signal. 8 : 397—402.

Семенкова Г. Н., Коваленко А. И., Крукава А. А., Жерносек В. Ф., Смирнова Е. Н. 2004. Ability of phagocytes to generate reactive oxygen species in children with pollinosis. In: Materials of IV Symposium of Medical Physica. Ustron: Accademia Editoriale.

Семенкова Г. Н., Смирнова Е. Н., Коваленко Е. И., Черенкевич С. Н. 2001. Investigation of G-CSF influence on activity of neutrophils of healthy volunteers and oncohaematological patients by the chemiluminescence method. In: Chemiluminescence at the turn-off the millenium. Dresden: Scheda-Werbedruck. 112—117.

Семенкова Г. Н., Смирнова Е. Н., Коваленко Е. И., Gerein V., Черенкевич С. Н. 1997. Oxygen activating ability of neutrophils of children with non-Hodgkin's lymphomas at therapy with G-CSF. Exp. Oncol. 19 : 153—156.

Tahanovich A. D., Katovich I. L., Semenkov G. N., Borodina G. L., Tamashkina G. N. 2001. Cytokines reactive oxygen species produced by alveolar macrophages in sarcoidosis. Eur. Resp. J. 18 : 68.

Tarpey M. M., Fridovich I. 2001. Methods of detection of vascular reactive species: nitric oxide, superoxide, hydrogen peroxide and peroxynitrite. *Circ. Res.* 89 : 224—236.

Thannickal V. J., Fanburg B. L. 2000. Reactive oxygen species in cell signaling. *Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279 : L1005—L1028.

Thelen M., Dewald B., Baggiolini M. 1993. Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev.* 73 : 797—815.

Поступила 26 IV 2005

GENERATION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN MONOCYTES AT ADHESION TO GLASS

A. A. Kryukov, G. N. Semenкова, S. N. Cherenkevich

Department of Biophysics, Belorussian State University, Minsk;
e-mail: *Krjukovaa@mail.ru*

Processes of oxygen activation in monocytes stimulated with adhesion to glass were studied by methods of luminol-dependent and lucigenin-independent chemiluminescence. It was shown that monocyte chemiluminescence was caused by cell adhesion to glass surface. Generation of reactive oxygen species at monocyte adhesion to glass was dependent on calcium ion concentration in the medium. The increase in the level of cytosolic calcium, as the extracellular calcium concentration elevated, was accompanied by the activation of phospholipase A₂, 5-lipoxygenase and cyclooxygenases. Magnesium ions exerted no influence on oxygen activation by cells. Incubation of cells in glucose-free medium, or the addition of glycolysis blocker (2-deoxy-D-glucose) to cell suspension led to a decrease in chemiluminescence intensity. By means of inhibitory analysis, it has been established that processes of oxygen activation are related to arachidonic acid metabolism, and depend on the activity of phospholipase A₂.

Key words: monocytes, NADPH oxidase, reactive oxygen species, adhesion, chemiluminescence.