

УДК 577.334

ХЛОРНОВАТИСТАЯ КИСЛОТА – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ ВТОРИЧНЫЙ МЕССЕНДЖЕР В ПРОЦЕССЕ РАЗВИТИЯ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛОВ

© 2024 г. Г. Н. Семенкова¹, И. И. Жолнеревич², М. А. Мурина³,
Н. В. Амаэгбери^{2,*}, Д. И. Рошупкин⁴

¹Белорусский государственный медицинский университет, Минск, 220083, Белоруссия

²Белорусский государственный университет, Минск, 220030, Белоруссия

³Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина
Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435, Россия

⁴Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава России,
Москва, 117513, Россия

*E-mail: n.amaegberi@gmail.com

Поступила в редакцию 17.09.2024

После доработки 24.09.2024

Принята к публикации 25.09.2024

Хлорноватистая кислота и гипохлорит-ионы (HOCl/OCl^-) образуются в галогенирующем цикле миелопероксидазы, локализованной преимущественно в нейтрофилах, и играют первостепенную роль в антимикробной защите. В работе представлены результаты исследования влияния экзогенных HOCl/OCl^- в микромолярных концентрациях на механизмы формирования респираторного взрыва стимулированными к фагоцитозу нейтрофилами. Показано, что этот окислитель способен оказывать стимулирующее действие на функциональную активность нейтрофилов, что выражается в увеличении выхода активных форм кислорода и хлора (АФКХ) и секреторной дегрануляции клеток. Усиление респираторного взрыва связано с активацией НАДФН-оксидазы, ФИ-3К, MAP-киназ ERK1/2 и уменьшением вклада внутриклеточной миелопероксидазы в продукцию АФКХ нейтрофилами. Установлено, что HOCl/OCl^- в исследуемых концентрациях способны ингибировать активность миелопероксидазы. Сделано предположение, что хлорноватистую кислоту следует рассматривать в качестве нового потенциального вторичного мессенджера, регулирующего функции нейтрофилов.

Ключевые слова: нейтрофилы, хлорноватистая кислота, NaOCl , активные формы кислорода и хлора, миелопероксидаза, секреторная дегрануляция

Принятые сокращения: АФКХ – активные формы кислорода и хлора; МПО – миелопероксидаза; СБСРЭ – сбалансированный буферный солевой раствор Эрла; ФИ-3К – фосфатидилинозитол-3-киназа; ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат; ХЛ и Люм-ХЛ – хемилюминесценция и люминолзависимая ХЛ соответственно; АВАН – гидразид 4-аминобензойной кислоты; DPI – хлорид дифенилендиония; PI – йодистый пропидий.

DOI: 10.31857/S0041377124050071, EDN: DUNSPQ

Хлорноватистая кислота и ионы гипохлорита (HOCl/OCl^-) образуются в галогенирующем цикле гемсодержащих пероксидаз млекопитающих, важнейшей из которых является миелопероксидаза (МПО) (донор: H_2O_2 -оксидоредуктаза, ЕС 1.11.1.7), локализованная преимущественно в нейтрофилах (Arnhold, Malle, 2022). Стимуляция нейтрофилов к фагоцитозу сопровождается усилением генерации супероксидных анион-радикалов (O_2^-) НАДФН-оксидазой

этих клеток (Zeng et al., 2019). Под действием супероксиддисмутазы O_2^- спонтанно трансформируется в пероксид водорода, который в реакции, катализируемой МПО, взаимодействует с хлорид-ионами с образованием HOCl/OCl^- . Хлорноватистая кислота является высокорреакционным интермедиатом и участвует в реакциях хлорирования и окисления, модифицируя или фрагментируя белки, ДНК, липиды и другие соединения (Prütz, 1996; Panasencko et

al., 2007; Winter et al., 2008; Andrés et al., 2022). Благодаря этим свойствам, HOCl уничтожает патогены. Однако, гиперпродукция HOCl может приводить к цитотоксическим эффектам в отношении клеток хозяина и провоцировать воспаление, которое является причиной развития ряда патологий, таких как сердечно-сосудистые (Teng et al., 2017; Ndrepera, 2019), ревматоидные (Fernandes et al., 2012; Leopold, Schiller, 2024), нейродегенеративные и др. (Ray, Katyal, 2016; Pravalika et al., 2018). Выявлено, что в очаге воспаления количество МПО, секретируемой накопленными нейтрофилами, достигает 1–2 мМ (Weiss, 1989; Kettle, Winterbourn, 1994; Hampton et al., 1998), а в интерстициальной жидкости воспаленных тканей фагоциты продуцируют до 25–50 мМ/ч HOCl (Ulfig, Leichert, 2021). В результате МПО и ее основной продукт HOCl в высоких концентрациях регулируют ряд событий в очаге воспаления посредством структурной модификации биологически важных молекул или их деструкции.

Молекулярные механизмы цитодеструктивного и регуляторного действия хлорноватистой кислоты в высоких концентрациях при воспалении активно изучаются, но остается до конца невыясненной роль этого соединения в низких концентрациях в процессах метаболизма. В настоящее время доказано участие пероксида водорода в процессах сигнализации (Gamaley et al., 1994; Kulahava et al., 2007; Ткачук и др., 2012; Sies, 2017; Fichman et al., 2024). Следует отметить, что уже существуют данные о способности HOCl выполнять функцию сигнальной молекулы. Показано, что экзогенная хлорноватистая кислота усиливает образование супероксидных анион-радикалов и индуцирует апоптоз в опухолевых клетках (Baueg, 2018; Семенкова и др., 2024), вызывает транслокацию транскрипционных факторов в ядро Т-лимфоцитов (Schoonbroodt et al., 1997), активирует белки-супрессоры опухолей и тем самым регулирует рост клеток (Vile et al., 1998), контролирует активность металлопротеиназ (Fu et al., 2004; Wang et al., 2022).

Ранее нами установлено, что для стимулированных адгезией нейтрофилов, подвергшихся воздействию нетоксичных концентраций NaOCl, характерно нарушение клеточной подвижности, изменение формы и размеров клеток, происходит реорганизация цитоскелета, обусловлен-

ная перераспределением F-актина (Kuznetsova et al., 2017). Это позволяет предположить, что хлорноватистая кислота в микромолярных концентрациях может влиять на функциональную активность нейтрофилов.

Цель настоящей работы заключалась в изучении механизмов влияния экзогенной хлорноватистой кислоты в микромолярных концентрациях на формирование респираторного взрыва нейтрофилами.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Реактивы. В работе использовали: декстран-500, гистопак-1077, люминол, среду RPMI-1640, пептид fMLP (N-формилметионил-лейцил-фенилаланин), пероксид водорода, гипохлорит натрия, PD-98059 (2-(2-амино-3-метоксифенил)-4Н-1-бензопиран-4-он), DPI (хлорид дифенилениодония), АВАН (гидразид 4-аминобензойной кислоты), LY294002 (2-(морфолин-4-ил)-8-фенил-4Н-1-бензопиран-4-он), LPS (липополисахарид В), ФМА (форбол-12-миристан-13-ацетат), ФГА (фитогемагглютинин), GSH (восстановленный глутатион), бактерии *Micrococcus lysodeikticus*, МПО, Triton X-100, Нерес (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота), PI (йодистый пропиций) (все реактивы фирмы Sigma, США); ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин; Carl Roth, Германия); суспензию латекса для фагоцитоза (1.5 мкм; "ПанЭко", Россия). Компоненты для приготовления фосфатного (PBS), фосфат-цитратного буферных растворов, а также сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) получены от фирм "Анализ Х" (Белоруссия) и "Реахим" (Россия).

Нейтрофилы выделяли из гепаринизированной крови кроликов и здоровых людей в градиенте плотности гистобака-1077 по стандартной методике (Böyum, 1976). Клетки суспендировали в среде RPMI-1640 (рН 7.4). Полученные суспензии хранили при температуре тающего льда. Жизнеспособность клеток, оцениваемая с помощью трипанового синего, составляла 95–97%. Перед изучением функциональной активности клетки переводили в раствор СБСРЭ, рН 7.4.

Рабочие растворы гипохлорита натрия (NaOCl) готовили из его коммерческого 5%-го раствора путем разбавления раствором 0.15 М NaCl пе-

ред началом эксперимента. Концентрацию гипохлорит-ионов определяли спектрофотометрически по поглощению OCl^- при 290 нм и рН 12 (молярный коэффициент экстинкции $\varepsilon_{290} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Morris, 1966). Конечное значение рН в экспериментах было примерно таким же, как рКа для HOCl (7.5), поэтому предполагается, что в растворе присутствуют примерно равные количества HOCl и OCl^- . К контрольным образцам добавляли соответствующее количество 0.15 М NaCl .

Регистрация активных форм кислорода и хлора (АФКХ). Генерацию АФКХ нейтрофилами человека изучали методом люминол-зависимой хемилюминесценции (Люм-ХЛ) на биохемилюминометре БХЛ-1 (БГУ, Белоруссия) с использованием системы сбора и обработки данных “Юнихром” (“Новые аналитические системы”, Белоруссия). Люм-ХЛ нейтрофилов кролика регистрировали на люмиагрегометре (P.I.C.A.) (Chrono-log Corporation, США). Концентрация люминола составляла 20 мкмоль/л, нейтрофилов в суспензии – 1 млн/мл. Нейтрофилы стимулировали к фагоцитозу добавлением к суспензии клеток в СБСРЭ 0.1 мкМ $f\text{MLP}$ или 25 мкг/мл LPS , или 5 мкг/мл ФМА, или 20 мкл суспензии латекса, или адгезией к поверхности кварцевого стекла. NaOCl добавляли к суспензии клеток в СБСРЭ до внесения стимулятора и люминола. Пробоподготовку и регистрацию Люм-ХЛ проводили при температуре 37 °С. Интенсивность свечения выражали в усл. ед. На рисунках представлены усредненные зависимости интегральной интенсивности ХЛ по данным не менее 5 независимых экспериментов. Интегральную интенсивность определяли как площадь под кинетической кривой интенсивности ХЛ люминола в суспензии нейтрофилов, рассчитанной с момента начала стимуляции в течение 10 мин регистрации. Светосумму рассчитывали численным интегрированием кривой интенсивности с использованием метода прямоугольников (программа Excel 2000).

Использование ингибиторов. Влияние NaOCl на процессы внутриклеточной сигнализации в нейтрофилах определяли с помощью специфических ингибиторов компонентов сигнальных путей, вовлеченных в генерацию АФКХ: DPI для НАДФН-оксидазы; АВАН для МПО; вещество PD-98059 для MAP-киназы ERK1/2; вещество LY-294002 для фосфатиди-

линозитол-3-киназы (ФИ-3К). NaOCl вносили в суспензию клеток за 10 мин до введения ингибиторов, на 20 мин, затем нейтрофилы стимулировали адгезией и регистрировали Люм-ХЛ.

Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из клеток (Shugar, 1952). Активность лизоцима в супернатанте оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрически при длине волны 450 нм на спектрофлуориметре CM 2203 (“Солар”, Минск, Белоруссия). Предварительно свежеизолированные нейтрофилы обрабатывали NaOCl в соответствующей концентрации и инкубировали в СБСРЭ рН 7.4 в течение 15 мин при температуре 37 °С.

Пероксидазную активность МПО определяли по скорости окисления ТМБ пероксидом водорода в присутствии МПО в окрашенный продукт – 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндиимин (Pulli et al., 2013). В фосфат-цитратный буферный раствор (рН 5.0) добавляли МПО (2 ед./мл), NaOCl в концентрации из диапазона 1–100 мкМ и инкубировали 10 мин при 37 °С. Затем вносили 1.6 мМ ТМБ. Реакцию инициировали добавлением 0.3 мМ H_2O_2 , через 5 мин реакцию останавливали добавлением 2 н раствора серной кислоты. Оптическую плотность регистрировали на спектрофлуориметре CM2203 при длине волны 450 нм. Для расчета концентрации продукта ферментативной реакции использовали $\varepsilon = 5.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Жизнеспособность клеток оценивали флуоресцентным методом с использованием йодистого пропидия (PI; длина волны возбуждения и регистрации соответственно 530 и 640 нм) на спектрофлуориметре CM 2203. Суспензию нейтрофилов (1 млн/мл в СБСРЭ) контрольную и содержащую NaOCl (5–100 мкМ) инкубировали в течение 15 мин при 37 °С. Затем к образцам добавляли 10 мкМ раствора PI. Клетки перемешивали, выдерживали в течение 5 мин и измеряли интенсивность флуоресценции F_{d1} . Затем клетки разрушали с помощью 10%-ного раствора тритон X-100 и регистрировали интенсивность флуоресценции F_{t1} . Жизнеспособность клеток определяли по формуле:

$$\frac{(F_{t1} - F_{t2}) - (F_{d1} - F_{d2})}{(F_{t1} - F_{t2})} \cdot 100\%$$

где F_{d1} , F_{t2} – параметры интенсивности флуоресценции PI в клеточной суспензии в отсутствие (F_{d1}) и в присутствии (F_{t1}) тритона X-100, F_{d2} и F_{t2} – параметры интенсивности флуоресценции PI в СБСРЭ в отсутствие (F_{d2}) и в присутствии (F_{t2}) тритона X-100 соответственно (Kato et al., 1999).

Статистическая обработка результатов. Использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Различия между контрольной и экспериментальной группами анализировали с помощью теста Даннета. Результаты представлены в виде среднего значения из трех и более независимых экспериментов и его стандартного отклонения. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследовано действие гипохлорита натрия на усиленную люминолом ХЛ стимулированных ФМА нейтрофилов крови кролика (рис. 1). Установлено, что характер действия NaOCl зависит от его концентрации. В низкой концентрации (5–10 мкМ) наблюдается усиление ХЛ; как правило, введение 5–10 мкМ NaOCl сопровождается усилением интенсивности свечения в максимуме в 2.5–3 раза соответственно по сравнению с контролем. Следовательно, в низких концентрациях экзогенный гипохлорит оказывает синергический (стимулирующий) эффект: в сочетании с агонистом (ФМА) резко усиливает ХЛ в системе стимулированные нейтрофилы–люминол. При более высоких концентрациях NaOCl (20–40 мкМ) наблюдается практически полное снижение интенсивности свечения (рис. 1, кривые 4, 5). По-видимому, тушение Люм-ХЛ в суспензии нейтрофилов гипохлоритом натрия в концентрации свыше 20 мкМ свидетельствует о подавлении функциональной активности самих клеток.

Подобный эффект был зарегистрирован нами при изучении влияния NaOCl на способность нейтрофилов крови человека генерировать АФКХ. Как видно из рис. 2, преинкубирование нейтрофилов в течение 10 мин с NaOCl приводит к значительному повышению интенсивности Люм-ХЛ при стимуляции к фагоцитозу как специфическими (fMLP, LPS), так и неспецифическими (латекс и адгезия) стимуляторами (рис. 2а, б), что свидетельствует об усилении

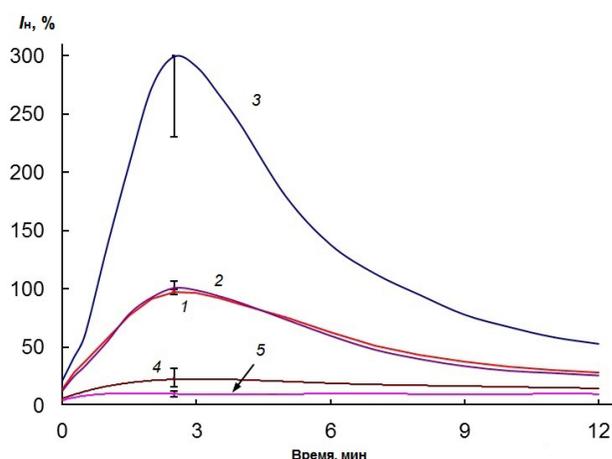


Рис. 1. Кинетические кривые интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов кролика, стимулированных ФМА в контроле (1) и при действии гипохлорита натрия (2–5) соответственно в конечных концентрациях 1, 10, 20 и 40 мкМ. ФМА (5 мкг/мл) вводили в суспензию нейтрофилов (10^6 клеток в 1 мл) сразу после люминола (20 мкМ). Время предварительного инкубирования клеток с гипохлоритом натрия 5 мин. I_n , (%) – нормированная интенсивность ХЛ: в контроле (1) в максимуме интенсивность свечения принята за 100%. Представлены усредненные зависимости интенсивности ХЛ по данным 10 независимых экспериментов; разброс данных представлен среднеквадратичной ошибкой средней величины.

генерации АФКХ. Увеличение интенсивности ХЛ клеток по сравнению с контролем наблюдается в диапазоне концентраций NaOCl от 7.5 до 75 мкМ (а в случае стимуляции адгезией – до 50 мкМ). Так, при добавлении 15 мкМ NaOCl к суспензии клеток за 30 мин до начала их адгезии к поверхности стекла интегральная интенсивность Люм-ХЛ повышается более чем в 3 раза по сравнению с контролем. При использовании других стимуляторов фагоцитоза выход Люм-ХЛ повышался в 1.5–2 раза.

Известно, что NaOCl сам индуцирует ХЛ люминола (Рошупкин и др., 2006). При этом NaOCl, вносимый в раствор этого индикатора, вызывает кратковременную вспышку ХЛ, длительность которой не превышает 3–5 с.

Чтобы исключить вклад в ХЛ нейтрофилов свободнорадикальных продуктов, образуемых при взаимодействии люминола с NaOCl, нами изучена зависимость максимальной интенсивности ХЛ, возникающей в реакции окисления люминола NaOCl в исследуемом диапазоне концентраций. Как показано на рис. 3, свечение практически не регистрируется при концентрации гипохлорита натрия от 1.5 до 45 мкМ.

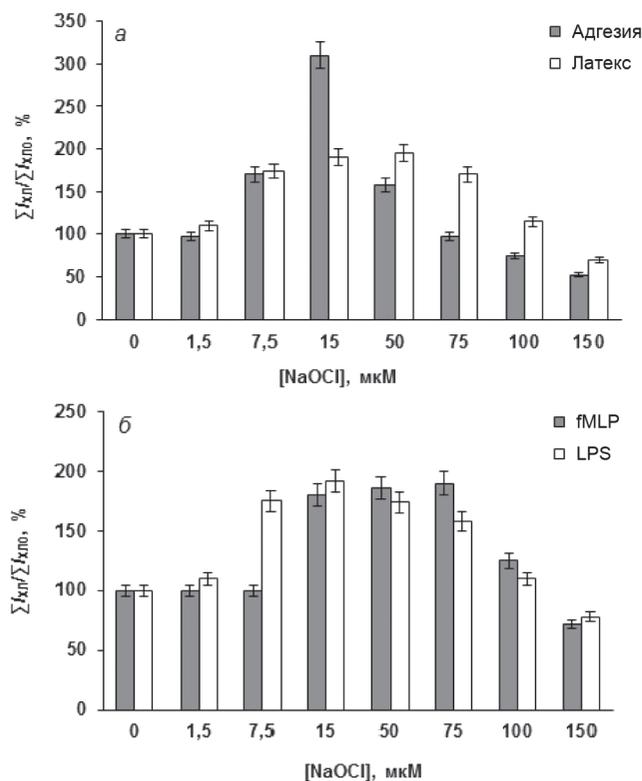


Рис. 2. Зависимость суммарной интенсивности люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) нейтрофилов человека, стимулированных латексом и адгезией (а), а также fMLP и LPS (б), от концентрации NaOCl. Интегральная интенсивность ХЛ клеток в присутствии ($\Sigma I_{ХЛ}$) и в отсутствие ($\Sigma I_{ХЛО}$) NaOCl измерена в течение 10 мин с момента добавления люминола. Концентрация fMLP – 0.1 мкМ, LPS – 25 мкг/мл. Время предварительного инкубирования нейтрофилов с NaOCl 10 мин. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

Дальнейшее повышение концентрации NaOCl до 150 мкМ приводило к увеличению выхода радикальных продуктов. Причем, зарегистрированная в первые 3–5 с максимальная интенсивность ХЛ была в десятки раз выше, чем в системе NaOCl–люминол–нейтрофилы. Следовательно, представленные на рис. 1 и 2 данные не связаны с прямым взаимодействием люминола с NaOCl, а обусловлены изменением функциональной активности нейтрофилов.

Образование АФКХ в нейтрофилах при их стимуляции к фагоцитозу сопряжено с активацией мембранных рецепторов, что в дальнейшем приводит к запуску процессов внутриклеточной сигнализации, включающих сборку НАДФН-оксидазного комплекса и усиление транслокации МПО к плазматической мембране (Zeng et al., 2019). Как уже отмечалось, некото-

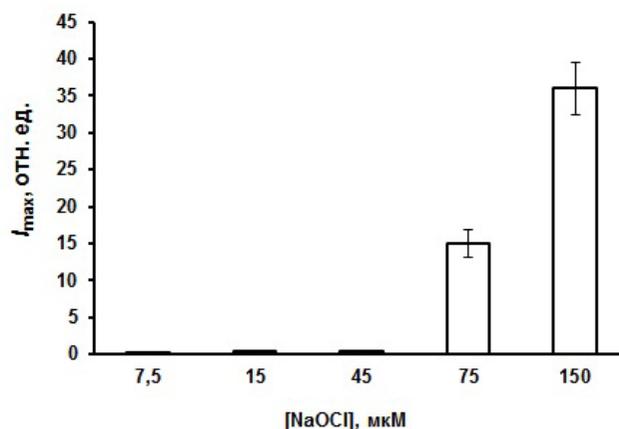


Рис. 3. Зависимость максимальной интенсивности хемилюминесценции (I_{max}) от концентрации гипохлорита натрия (NaOCl) в реакции окисления им люминола. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

рые типы активных форм кислорода, в частности H_2O_2 , играют роль вторичных мессенджеров в формировании функционального отклика клеток (Kulahava et al., 2007; Ткачук и др., 2012). Нами изучено влияние на генерацию АФКХ специфических ингибиторов ферментов, участвующих в процессах трансдукции активационного сигнала в нейтрофилах, до и после их предварительного инкубирования с 15 мкМ NaOCl (рис. 4).

После обработки клеточной суспензии гипохлоритом натрия степень ингибирования продукции АФКХ нейтрофилами возрастает при подавлении активности НАДФН-оксидазы с помощью DPI, ФИ-3К – веществом LY-294002 и ERK1/2 – веществом PD-98059. При этом степень ингибирования АФКХ значительно снижается при блокировании активности МПО с помощью АВАН. Из этих данных следует, что преинкубирование нейтрофилов с 15 мкМ NaOCl приводит к перераспределению вклада ферментов, продуцирующих активные метаболиты: уменьшается продукция хлорноватистой кислоты ферментом МПО и увеличивается образование супероксидных анион-радикалов НАДФН-оксидазой, что приводит к увеличению выхода пероксида водорода в результате дисмутации O_2^- .

Обработка клеток, предварительно инкубированных со специфическими ингибиторами ФИ-3К и ERK1/2, а также NaOCl, приводит к значительному повышению степени инги-

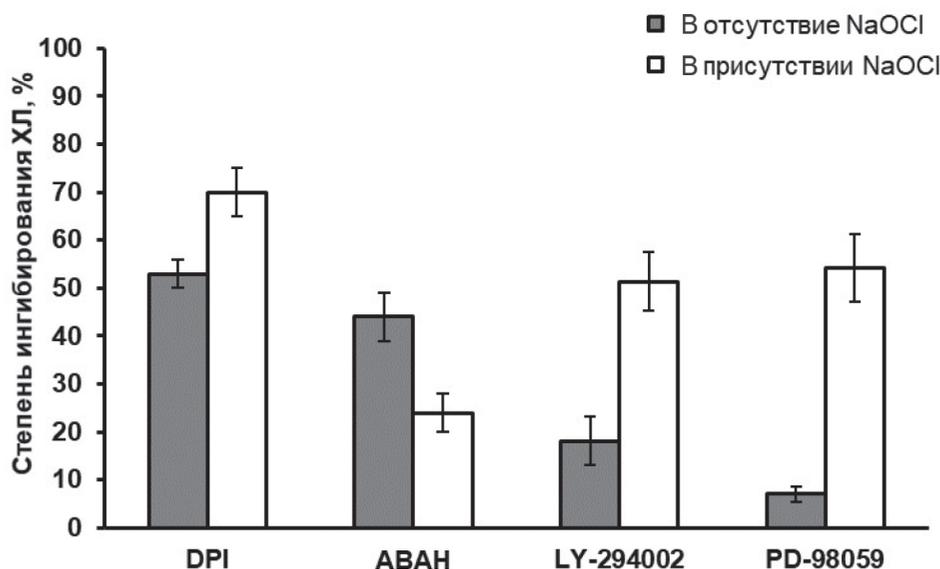


Рис. 4. Влияние ингибиторов ферментов на степень ингибирования люминол-зависимой ХЛ нейтрофилов крови человека в присутствии (светлые столбики) и в отсутствие (темные столбики) NaOCl (15 мкМ). Клетки стимулировали адгезией к поверхности стекла. Время предварительного инкубирования нейтрофилов с NaOCl – 30 мин, время регистрации ХЛ – 10 мин; температура – 37 °С, рН 7.4. Показаны ингибиторы: НАДФН-оксидазы (DPI, 1 мкМ); миелопероксидазы (АВАН, 50 мкМ); фосфатидилинозитол-3-киназы (LY-294002, 3.5 мкМ) и MAP-киназы ERK1/2 (PD-98059, 25 мкМ). По вертикали указана степень ингибирования ХЛ ($(\Sigma I_0 - \Sigma I_i) / \Sigma I_0 \cdot 100\%$), где ΣI_0 и ΣI_i – суммарная интенсивность свечения клеток в отсутствие и в присутствии ингибитора соответственно. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

бирования ХЛ, что свидетельствует об увеличении вклада этих белков в генерацию АФКХ нейтрофилами по сравнению с контролем. Увеличение вклада ФИ-3К и ERK1/2 в усиленное под действием NaOCl образование АФКХ свидетельствует о модификации сигнальных путей с вовлечением этих ферментов в формирование респираторного взрыва. Известно, что ФИ-3К участвует в активации НАДФН-оксидазы, способствует перераспределению F-актина и секреторной дегрануляции (Hirsch et al., 2000; Paclet et al., 2022). ERK1/2 также усиливает секреторную дегрануляцию нейтрофилов (Hu et al., 2015). Как показано нами ранее, в первые минуты действия на нейтрофилы 15 мкМ NaOCl происходит опосредованная перераспределением F-актина реорганизация цитоскелета, изменяется форма и размеры клеток, повышается их адгезивность (Kuznetsova et al., 2017).

Важным свойством стимулированных к фагоцитозу нейтрофилов является секреторная дегрануляция. В результате этого процесса из клеток во внеклеточное пространство выделяется содержимое азурофильных гранул, включающих лизоцим, МПО, кислые гидролазы, эластазу и другие ферменты, которые обеспечивают уничтожение чужеродного материала (Lacu,

2006). На рис. 5 показано влияние NaOCl на секрецию лизоцима из нейтрофилов. Видно, что инкубирование клеток с 1.5–5 мкМ NaOCl в течение 15 мин не влияет на выход лизоцима во внеклеточную среду, тогда как в диапазоне концентраций этого окислителя от 7.5 до 50 мкМ секреция лизоцима дозозависимо усиливается,

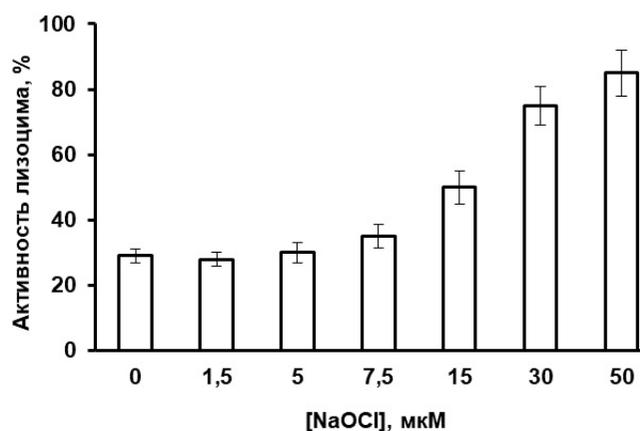


Рис. 5. Влияние гипохлорита натрия на секрецию лизоцима из нейтрофилов крови человека. Время инкубирования клеток с NaOCl – 15 мин. Секрецию лизоцима оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus*. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

что также подтверждает стимулирующее действие гипохлорита натрия на нейтрофилы.

Усиление секреторной дегрануляции нейтрофилов под действием NaOCl приводит к повышению выхода МПО во внеклеточную среду. При этом оценка вклада этого фермента в продукцию АФКХ внутри клеток (см. рис. 4) указывает на его снижение. Увеличение выхода ферментов из клеток может быть связано с цитодеструкцией. Чтобы исключить цитодеструктивное действие NaOCl, мы изучили его влияние на жизнеспособность клеток с использованием PI. Как видно из табл. 1, через 15 мин после добавления NaOCl в концентрации от 5 до 100 мкМ жизнеспособность нейтрофилов по сравнению с контролем уменьшается не более, чем на $12.8 \pm 3.2\%$. Из этого следует, что зарегистрированное нами усиление генерации АФКХ нейтрофилами после добавления NaOCl (рис. 2) в диапазоне концентраций 7.5–75 мкМ обусловлено стимулирующим действием гипохлорита на функциональную активность клеток и не связано с его цитотоксичностью.

Учитывая способность хлорноватистой кислоты эффективно взаимодействовать с молекулами белков (Prütz, 1996; Panasenکو et al., 2007), мы исследовали влияние NaOCl на пероксидазную активность МПО (рис. 6). Видно, что гипохлорит натрия в концентрациях от 5 до 100 мкМ дозозависимо снижает активность анализируемого фермента. Следовательно, экзогенный гипохлорит натрия в низких концентрациях способен значительно уменьшать активность секретированной из клеток МПО.

Таблица 1. Влияние гипохлорита натрия на жизнеспособность нейтрофилов

Концентрация NaOCl, мкМ	Жизнеспособность, %
0	100
5	97.7 ± 1.8
15	95.8 ± 2.2
30	94.3 ± 2.6
50	90.4 ± 2.5
75	89.5 ± 2.9
100	87.2 ± 3.2

Примечание. Клетки инкубировали с NaOCl в течение 15 мин.

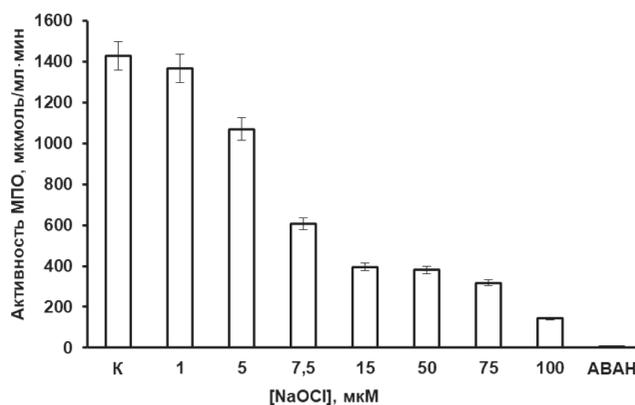


Рис. 6. Активность МПО под действием гипохлорита натрия. Время предварительного инкубирования NaOCl/АВАН с МПО – 10 мин. Концентрация АВАН – 1 мкМ. Результаты представлены как средние значения и их стандартные отклонения.

Ранее установлено, что гипохлорит натрия с наибольшей константой скорости реагирует с сульфгидрильными группами молекул, затем инактивируются тиоэфирные и только после этого аминокетильные (Мурина и др., 1989; Folkes et al., 1995). На основании этих данных можно предположить, что в нашем случае гипохлорит натрия, взаимодействуя в первую очередь с сульфгидрильными и, возможно, с другими функциональными группами мембранных белков нейтрофилов, преактивирует (праймирует) клетки, что приводит к усилению респираторного взрыва в ответ на различные стимулы. Известно, что для избирательной нейтрализации экстраклеточных оксидантов можно применять непроникающий в клетки восстановленный глутатион, действие которого обусловлено исключительно наличием сульфгидрильной группы.

Использование восстановленного глутатиона позволяет отделить АФКХ, образуемые внутри клеточных структур и генерируемые в окружающей среде (Мурина и др., 2005). Восстановленный глутатион добавляли к суспензии нейтрофилов кроликов после их инкубации в течение 3 мин с 5 мкМ NaOCl до добавления ФМА (рис. 7). Введение восстановленного глутатиона в суспензию нейтрофилов вызывает уменьшение интенсивности Люм-ХЛ в максимуме примерно на 30–35% (рис. 7, кривая 2). После добавления гипохлорита натрия (рис. 7, кривая 3), тушение ХЛ в этой системе восстановленным глутатионом было больше и составляло примерно 55% (рис. 7, кривая 4). Свечение, которое остается после действия восстановленного глутатио-

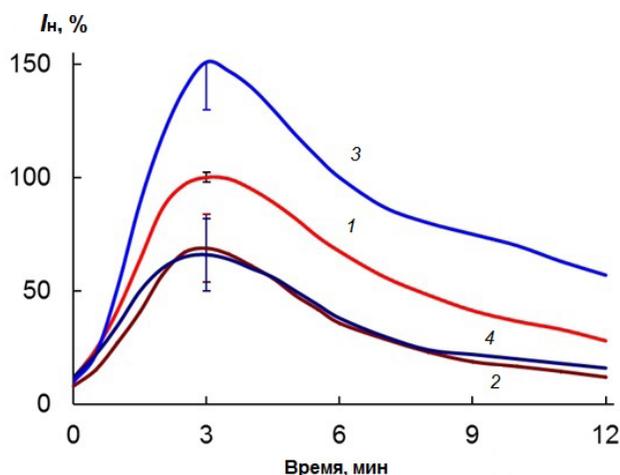


Рис. 7. Действие восстановленного глутатиона (GSH) на усиленную гипохлоритом хемиллюминесценцию люминола в суспензии нейтрофилов крови кролика. Кривая 1 — контроль (к нейтрофилам добавлен люминол и ФМА); 2 — GSH (0.2 мМ) введен в суспензию нейтрофилов до ФМА; 3 — NaOCl (5 мкМ) введен в суспензию нейтрофилов за 3 мин до ФМА; 4 — NaOCl (5 мкМ) введен в суспензию нейтрофилов за 3 мин до GSH (0.2 мМ) и ФМА. I_n — нормированная к контролю (100% в максимуме) интенсивность ХЛ. Представлены усредненные зависимости интенсивности ХЛ по данным пяти независимых опытов; разброс данных представлен среднеквадратичной ошибкой средней величины.

на как в присутствии (рис. 7, кривая 4), так и в отсутствие (рис. 7, кривая 2) экзогенного NaOCl, составляет примерно 65% по сравнению с контролем (рис. 7, кривая 1). Следовательно, восстановленный глутатион полностью подавляет усиленную гипохлоритом Люм-ХЛ нейтрофилов, обусловленную окислением люминола экстраклеточными оксидантами. Причем среди таких оксидантов основным является хлорноватистая кислота, генерируемая МПО, секреция которой во внеклеточную среду, как это следует из рис. 5, усиливается под действием экзогенного NaOCl.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из полученных данных следует, что хлорноватистая кислота и ионы гипохлорита в микромолярных концентрациях способны оказывать стимулирующее воздействие на функциональную активность нейтрофилов, что выражается в увеличении выхода АФКХ и усилении секреторной дегрануляции клеток, обработанных индукторами фагоцитоза. Наблюдаемые эффекты связаны с перераспределением вклада компонен-

тов трансдукции активационного сигнала в формирование респираторного взрыва, а именно: с активацией ФИ-3К и MAP-киназы ERK1/2. Индуцируемое HOCl/OCl⁻ повышение выхода АФКХ обусловлено усиленной продукцией под действием НАДФН-оксидазы супероксидных анион-радикалов, дисмутация которых приводит к избыточному образованию субстрата МПО пероксида водорода. Из этого следует, что под действием хлорноватистой кислоты во внеклеточной среде, где уровень МПО повышен в результате секреции содержимого азурофильных гранул, продуцируется дополнительное количество HOCl/OCl⁻. Однако образование этого окислителя не настолько велико, чтобы оказывать цитодеструктивный эффект, поскольку он дозозависимо ингибирует активность МПО. Мы полагаем, что образуемую под действием МПО хлорноватистую кислоту следует рассматривать в качестве нового потенциального вторичного мессенджера, который способен регулировать функции нейтрофилов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований “Фундаментальные основы биотехнологий” (№ 20115801), Республика Беларусь.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Забор крови у здоровых добровольцев осуществляли после информированного согласия. Исследование с использованием нейтрофилов кроликов проведено с соблюдением стандартов работы с животными и было одобрено локальным этическим комитетом ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России (протокол заседания № 2022/10/05 от 05 октября 2022 г.).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.Г.Н.: оригинальная идея и схема экспериментов, анализ и интерпретация полученных данных, написание рукописи; Ж.И.И.: проведение исследований, обсуждение результатов, подготовка статьи; М.М.А.: изучение хемиллю-

минесценции нейтрофилов крови кроликов, обсуждение результатов, подготовка статьи; А.Н.В.: измерение хемилюминесценции нейтрофилов, обработка результатов, подготовка статьи; Р.Д.И.: обсуждение результатов исследований, подготовка статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Мурина М.А., Сергиенко В.И., Рошчупкин Д.И.* 1989. Прямое и косвенное противоагрегационное действие гипохлорита натрия на обогащенную тромбоцитами плазму крови. Бюл. exper. биол. мед. Т. 107. № 12. С. 702. (*Murina M.A., Sergienko V.I., Roshchupkin D.I.* 1989. Direct and indirect antiaggregatory effect of sodium hypochlorite on platelet-rich blood plasma. Bull. Exp. Biol. Med. V. 107. No. 12. 2008. P. 702.)
- Мурина М.А., Рошчупкин Д.И., Белакина Н.С., Филиппов С.В., Халилов Э.М.* 2005. Усиленная люминолом хемилюминесценция стимулированных полиморфноядерных лейкоцитов: тушение тиолами. Биофизика. Т. 50. № 6. 1100. (*Murina M.A., Roshchupkin D.I., Belakina N.S., Filippov S.V., Khalilov E.M.* 2005. Luminol-enhanced chemiluminescence of stimulated polymorphonuclear leukocytes: quenching by thiols. Biophysics. V. 50. No. 6. P. 1100.)
- Рошчупкин Д.И., Белакина Н.С., Мурина М.А.* 2006. Усиленная люминолом хемилюминесценция полиморфноядерных лейкоцитов кролика: природа оксидантов, непосредственно вызывающих окисление люминола. Биофизика. Т. 51. № 1. С. 99. (*Roshchupkin D.I., Belakina N.S., Murina M.A.* 2006. Luminol-enhanced chemiluminescence of rabbit polymorphonuclear leukocytes: the nature of oxidants directly responsible for luminol oxidation, Biofizika. V. 51. No. 1. P. 99.)
- Семенкова Г.Н., Квачева З.Б., Жолнеревич И.И., Амаэбери Н.В., Пинчук С.В.* 2024. Гипохлорит-индуцированная модификация свойств астроцитов. Новости медико-биологических наук. Т. 24. № 1. С. 74. (*Semenkova G.N., Kvacheva Z.B., Zholnerevich I.I., Amaegberi N.V., Pinchuk S.V.* 2024. Hypochlorite-induced modification of astrocyte properties. News of medical and biological sciences. V. 24. No. 1. P. 74.)
- Ткачук В.А., Тюрин-Кузьмин П.А., Белоусов В.В., Воротников А.В.* 2012. Пероксид водорода как новый вторичный посредник. Биологические мембраны. Т. 29. № 1–2. С. 21. (*Tkachuk V.A., Tyurin-Kuzmin P.A., Belousov V.V., Vorotnikov A.V.* 2012. Hydrogen peroxide as a new secondary messenger. Biological membranes. V. 29. No. 1–2. P. 21.)
- Andrés C.M.C., Pérez de la Lastra J.M., Juan C.A., Plou F.J., Pérez-Lebeña E.* 2022. Hypochlorous acid chemistry in mammalian cells-influence on infection and role in various pathologies. Int. J. Mol. V. 23. Art. ID 10735.
- Arnhold J., Malle E.* 2022. Halogenation activity of mammalian heme peroxidases. Antioxidants. V. 11. P. 890.
- Bauer G.* 2018. HOCl and the control of oncogenesis. J. Inorg. Biochem. V. 179. P. 10.
- Bøyum A.* 1976. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. Scand. J. Immunol. V. 5. P. 9.
- Fernandes R.M. da Silva N.P., Sato E.I.* 2012. Increased myeloperoxidase plasma levels in rheumatoid arthritis. Rheumatol. Int. V. 32. P. 1605.
- Fichman Y., Rowland L., Nguyen T.T., Chen S.-J., Mittler R.* 2024. Propagation of a rapid cell-to-cell H₂O₂ signal over long distances in a monolayer of cardiomyocyte cells. Redox Biol. V. 70. Art. ID 103069.
- Folkes L.K., Candeias L.P., Wardman P.* 1995. Kinetics and mechanisms of hypochlorous acid reactions. Arch. Biochem. Biophys. V. 323. P. 120.
- Fu X., Kao J.L., Bergt C., Kassim S.Y., Huq N.P., d'Avignon A., Parks W.C., Mecham R.P., Heinecke J.W.* 2004. Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. J. Biol. Chem. V. 279. P. 6209.
- Gamaley I.A., Kirpichnikova K.M., Klyubin I.V.* 1994. Activation of murine macrophages by hydrogen peroxide. Cell Signal. V. 6. P. 949.
- Hampton M.B., Kettle A.J., Winterbourn C.C.* 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. Blood. V. 92. P. 3007.
- Hirsch E., Katanaev V.L., Garlanda C., Azzolino O., Pirolla L., Silengo L., Sozzani S., Mantovani A., Altruda F., Wymann M.P.* 2000. Central role for G protein-coupled phosphoinositide 3-Kinase γ in inflammation. Science. V. 287. P. 1049.
- Hu N., Qiu Y., Dong F.* 2015. Role of Erk1/2 signaling in the regulation of neutrophil versus monocyte development in response to G-CSF and M-CSF. J. Biol. Chem. V. 290. P. 24561.
- Kato F., Tanaka M., Nakamura K.* 1999. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents. Toxicol. in Vitro. V. 13. P. 923.
- Kettle A.J., Winterbourn C.C.* 1994. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. Methods Enzymol. V. 233. P. 502.
- Kulahava T.A., Semenkova G.N., Kvacheva Z.B., Cherenkevich S.N.* 2007. Regulation of morphological and

- functional properties of astrocytes by hydrogen peroxide. *Cell Tissue Biol.* V. 1. P. 8.
- Kuznetsova T., Kulahava T., Zholnerevich I., Amaegberi N., Semenкова G., Shadyro O., Arnhold J.* 2017. Morphometric characteristics of neutrophils stimulated by adhesion and hypochlorite. *Mol. Immunol.* V. 87. P. 317.
- Lacy P.* 2006. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* V. 2. P. 98.
- Leopold J., Schiller J.* 2024. (Chemical) Roles of HOCl in rheumatic diseases. *Antioxidants (Basel).* V. 13. P. 921.
- Morris J.C.* 1966. The acid ionization constant of HOCl from 5 to 35°. *J. Phys. Chem.* V. 70. № 12. P. 3798.
- Ndrepepa G.* 2019. Myeloperoxidase – A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta.* V. 493. P. 36.
- Paclet M.-H., Laurans S., Dupré-Crochet S.* 2022. Regulation of neutrophil NADPH oxidase, NOX2: a crucial effector in neutrophil phenotype and function. *Cell Dev. Biol.* V. 10. Art. ID 945749.
- Panasenko, O.M. Vakhrusheva T., Tretyakov V., Spalteholz H., Arnhold J.* 2007. Influence of chloride on modification of unsaturated phosphatidylcholines by the myeloperoxidase/hydrogen peroxide/bromide system. *Chem. Phys. Lipids.* V. 149. P. 40.
- Pravalika K., Sarmah D., Kaur H., Wanve M., Saraf J., Kalia K., Borah A., Yavagal D.R., Dave K.R., Bhattacharya P.* 2018. Myeloperoxidase and neurological disorder: a crosstalk. *ACS Chem. Neurosci.* V. 9. P. 421.
- Prütz W.A.* 1996. Hypochlorous acid interactions with thiols, nucleotides, DNA, and other biological substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 332. P. 110.
- Pulli B., Ali M., Forghani R., Schob S., Hsieh K.L.C., Wojtkiewicz G., Linnoila J.J., Chen J.W.* 2013. Measuring myeloperoxidase activity in biological samples. *PLoS ONE.* V. 8. Art. ID e67976.
- Ray R.S., Katyal A.* 2016. Myeloperoxidase: bridging the gap in neurodegeneration. *Neurosci. Biobehav. Rev.* V. 68. P. 611.
- Schoonbroodt S., Legrand-Poels S., Best-Belpomme M., Piette J.* 1997. Activation of the NF- κ B transcription factor in a T-lymphocytic cell line by hypochlorous acid. *Biochem. J.* V. 321. P. 777.
- Shugar D.* 1952. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 8. P. 302.
- Sies H.* 2017. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress. *Redox Biol.* V. 11. P. 613.
- Teng N., Maghzal G.J., Talib J., Rashid I., Lau A.K., Stocker R.* 2017. The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture. *Redox Rep.* V. 22. P. 51.
- Ulfing A., Leichert L.I.* 2021. The effects of neutrophil-generated hypochlorous acid and other hypohalous acids on host and pathogens. *Cell. Mol. Life Sci.* V. 78. P. 385.
- Vile G.F., Rothwell L.A., Kettle A.J.* 1998. Hypochlorous acid activates the tumor suppressor protein p53 in cultured human skin fibroblasts. *Arch. Biochem. Biophys.* V. 359. P. 51.
- Wang Y., Chuan C.Y., Hawkins C.L., Davies M.J.* 2022. Activation and inhibition of human matrix metalloproteinase-9 (MMP9) by HOCl, myeloperoxidase and chloramines. *Antioxidants.* V. 11. P. 1616.
- Weiss S.J.* 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* V. 320. P. 365.
- Winter J., Ilbert M., Graf P.C.F., Ozcelik D., Jakob U.* 2008. Bleach activates a redox-regulated chaperone by oxidative protein unfolding. *Cell.* V. 135. P. 691.
- Zeng M.Y., Miralda I., Armstrong C.L., Uriarte S.M., Bagaitkar J.* 2019. The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses. *Mol. Oral. Microbiol.* V. 34. P. 27.

HYPOCHLOROUS ACID – A POTENTIAL SECONDARY MESSENGER IN THE PROCESS OF NEUTROPHILS' RESPIRATORY BURST DEVELOPMENT

G. N. Semenkova¹, I. I. Zholnerevich², M. A. Murina³, N. V. Amaegberi², D. I. Roshchupkin⁴

¹Belarusian State Medical University, Minsk, 220083, Belarus

²Belarusian State University, Minsk, 220030, Belarus

³Lopukhin Federal Scientific and Clinical Center for Physical-Chemical Medicine
of the Federal Medical and Biological Agency, Moscow, 119435, Russia

⁴Pirogov Russian National Research Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation,
Moscow, 117513, Russia

* E-mail: n.amaegberi@gmail.com

Hypochlorous acid and hypochlorite ions are formed in the halogenating cycle of myeloperoxidase, localized mainly in neutrophils, and play a primary role in antimicrobial protection. The paper presents the results of a study of the effect of exogenous HOCl/OCl⁻ in micromolar concentrations on the mechanisms of the “respiratory burst” formation by neutrophils stimulated to phagocytosis. It is shown that this oxidizer is capable of stimulating the functional activity of neutrophils, which is expressed in an increase in the yield of reactive oxygen and chlorine species (ROCS) and secretory degranulation of cells. Enhancement of the “respiratory burst” is associated with activation of NADPH oxidase, PI-3K, MAP kinase ERK1/2 and a decrease in the contribution of intracellular myeloperoxidase to ROCS production by neutrophils. It was found that HOCl/OCl⁻ in the studied concentrations is capable of inhibiting myeloperoxidase activity. It is suggested that hypochlorous acid should be considered as a new potential secondary messenger regulating neutrophil functions.

Keywords: hypochlorous acid, NaOCl, neutrophils, reactive oxygen and chlorine species, myeloperoxidase, secretory degranulation