

МЕХАНИЗМЫ ГЕНЕРАЦИИ ОКИСЛИТЕЛЕЙ ФАГОЦИТАМИ ПРИ ДЕЙСТВИИ БЕЛКА CHI3L1

Ю. С. Леоник, Т. А. Кулагова, Е. Н. Голубева

ВВЕДЕНИЕ

Хитиназа-3-подобный белок 1-го типа (CHI3L1) представляет собой гликопротеин семейства гликозидаз (гликозилгидролаз) 18 и является аналогом хитиназ - группы ферментов, способных к расщеплению хитина. CHI3L1 способен связывать с высоким сродством хитину различной длины и с меньшим сродством гепарин и коллаген I типа, однако катализической хитиназной активности белок не проявляет. Повышенная концентрация CHI3L1 в плазме крови человека сопровождает развитие воспалительных и онкологических заболеваний, таких как артрит, тяжелые бактериальные инфекции, опухоль молочной железы, яичников, простаты, мозга, легких и др. Однако, несмотря на обилие литературных данных о роли белка CHI3L1 при воспалении, механизмы действия CHI3L1 на активацию клеток иммунной системы окончательно не установлены. Цель данного исследования – выявление механизмов генерации активных форм кислорода и хлора (АФКХ) моноцитами и нейтрофилами крови в присутствии белка CHI3L1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали нейтрофилы и мононуклеары, выделенные из периферической крови здоровых доноров в соответствии с методикой [1]. Изучение генерации АФКХ клетками крови проводили хемилюминесцентным методом (ХЛ) с использованием компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биохемилюминометр БХЛ-1 (БГУ, Минск, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom («Новые аналитические системы», Минск, Беларусь). Оценивали интегральную интенсивность (ИИ) ХЛ как площадь под кинетической кривой ХЛ. Исследование секреции миелопероксидазы (МПО) нейтрофилами проводили методом конфокальной флуоресцентной микроскопии с использованием специфических антител и спектрально-аналитического комплекса NanoFinder®HighEnd («Lotis ТII», Минск, Беларусь – «Tokyo Instruments», Токио, Япония).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нейтрофилы и моноциты при адгезии к субстрату продуцируют АФКХ. Использование люминола в качестве эмиттера ХЛ позволяет де-

тектировать широкий спектр окислителей, в том числе пероксид водорода, гипохлорит ионы, гидроксильные радикалы, синглетный кислород. Интенсивность люминолзависимой ХЛ (люм-ХЛ) в образцах, содержащих нейтрофилы, значительно выше, чем в образцах с мононуклеарами в связи с тем, что содержание МПО, катализирующей образование HOCl в несколько раз выше в азурофильтных гранулах нейтрофилов, чем в моноцитах [2]. Выявлено, что добавление CHI3L1 в концентрации 100 нг/мл к суспензии фагоцитов приводит к снижению интенсивности люм-ХЛ клеток. Из результатов анализа значений ИИ люм-ХЛ мононуклеаров и нейтрофилов в присутствии белка CHI3L1 следует, что продукция АФКХ адгезирующими клетками снижается на 34 % относительно контрольного значения в нейтрофилах и на 26 % – в мононуклеарах.

Продукция АФКХ фагоцитами обусловлена функционированием НАДФН-оксидазы и МПО. В первые минуты активации клеток адгезией происходит сборка НАДФН-оксидазы на поверхности плазматической мембраны и запускается секреторная дегрануляция, в результате которой осуществляется секреция МПО во внеклеточную среду. НАДФН-оксидаза восстанавливает молекулярный кислород до супероксидных анион-радикалов, которые являются первичными и запускают цепь свободно-радикальных реакций. Поэтому активация НАДФН-оксидазного комплекса является необходимым этапом для генерации АФКХ фагоцитами. В результате реакции дисмутации O_2^- образуется H_2O_2 . Пероксид водорода, в свою очередь, является субстратом МПО, катализирующей окисление хлорид-ионов до хлорноватистой кислоты в галогенирующем цикле этого фермента. Резкое усиление люм-ХЛ, обусловленное выходом МПО во внеклеточное пространство, регистрируется, начиная с 3-4-ой минуты после иницирования адгезии клеток. С целью выявления влияния белка на функционирование НАДФН-оксидазы была исследована продукция O_2^- фагоцитами с использованием специфического индикатора супероксидных анион-радикалов – люцигенина. Установлено, что CHI3L1 снижает генерацию O_2^- нейтрофилами стимулированными адгезией к стеклу и хемотактическим пептидом fmlp, причем снижение продукции O_2^- происходит на 20-25 % и на 10-15 % соответственно.

Было предположено, что CHI3L1 может выполнять антиоксидантную функцию, то есть вступать в реакции с АФКХ, снижая их концентрацию в биосистемах. Для изучения взаимодействия CHI3L1 со свободнорадикальными продуктами были исследованы следующие модельные системы: МПО- H_2O_2 -люминол-CHI3L1, H_2O_2 -люминол-CHI3L1, NaOCl -люминол-CHI3L1 и пероксидаза хрена (ПХ)- H_2O_2 -люминол-CHI3L1. Данные представлены в таблица.

Таблица

Интегральная интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции в модельных системах

	ИИ люм-ХЛ, % от контроля			
	МПО- H_2O_2	H_2O_2	NaOCl	ПХ
CHI3L1 100нг/мл	68±9	32±6	74±10	53±13

Видно, что при добавлении CHI3L1 в концентрации 100 нг/мл наблюдается снижение ИИ люм-ХЛ во всех модельных системах, что свидетельствует о взаимодействии белка с H_2O_2 , HOCl, а также, вероятно, о регуляции активности ферментов ПХ и МПО.

При адгезии нейтрофилов к стеклу осуществляется секреция содержимого гранул во внеклеточное пространство. МПО преимущественно содержится в азурофильных гранулах нейтрофилов, наряду с лизоцимом и другими протеолитическими ферментами. Была оценена активность МПО во внеклеточной жидкости адгезирующих 30 минут нейтрофилов. Установлено, что ИИ ХЛ в супернатанте клеток увеличивается в 4 раза в присутствии CHI3L1. Следовательно, секреция МПО во внеклеточную среду усиливается при действии на нейтрофилы CHI3L1. Оценку количества оставшейся в нейтрофилах МПО при действии белка проводили методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Из рис. 1 видно, что уже после 10 минут адгезии клеток в присутствии белка количество оставшейся МПО в них меньше, чем в контрольных клетках.

Интегральная интенсивность флуоресценции МПО в комплексе с антителами снижается в 2 раза в клетках в присутствии белка. Таким образом, количество секретируемой из нейтрофилов МПО в присутствии белка увеличивается, однако эта МПО не приводит к усилению генерации АФК нейтрофилами.

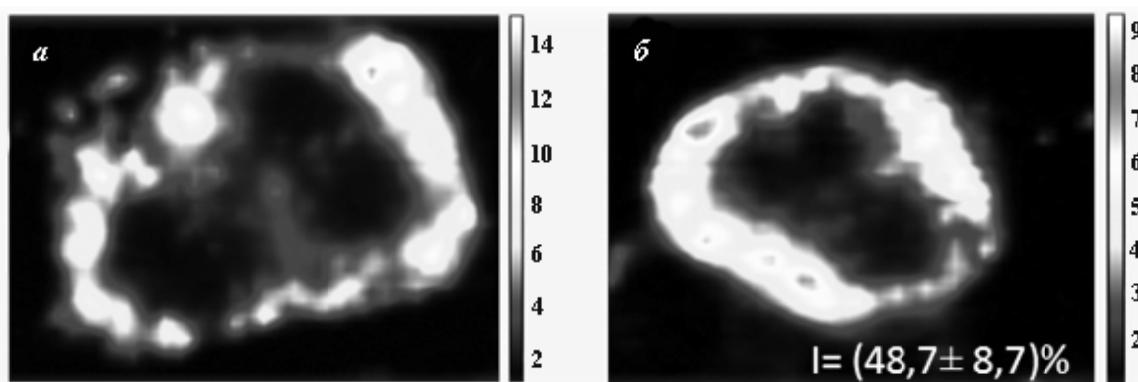


Рис. 1. Локализация и интенсивность флуоресценции миелопероксидазы в комплексе с антителами в нейтрофилах, адгезирующих к стеклу в течение 10 мин

a – контроль, б – при действии белка CHI3L1 в концентрации 100 нг/мл

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В присутствие белка CHI3L1 концентрация генерируемых нейтрофилами и моноцитами активных форм кислорода и хлора снижается. Установлено, что CHI3L1 взаимодействует с пероксидом водорода и гипохлоритом натрия, в присутствии белка снижается количество свободно-радикальных продуктов, образующихся при участии пероксидазы хрена и миелопероксидазы. Выявлено, что при действии белка CHI3L1 в концентрации 100 нг/мл усиливается секреторная дегрануляция нейтрофилов – ускоряется выход МПО во внеклеточную среду. CHI3L1 может регулировать протекание свободно-радикальных процессов в фагоцитах за счет взаимодействия с активными формами кислорода и хлора, усиления секреции и, вероятно, изменения активности миелопероксидазы.

Литература

1. *Бейум А.* Выделение лимфоцитов, гранулоцитов и макрофагов. Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика – М.: Медицина, 1980.– С. 9-36.
2. *Крюков А. А., Семенкова Г. Н., Черенкевич С. Н.* Генерация активных форм кислорода в моноцитах при адгезии к стеклу // Цитология – 2006 – Т.48, № 2 – с.142–147.

ЧИСЛЕННОЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВАНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИХ РАСПРЕДЕЛЕНИЙ

А. М. Петровский

Рассмотрим задачу, в которой данные эксперимента представляют из себя энергетическое распределение протонов отдачи (ЭРПО). Нам нужно определить энергетическое распределение нейтронов (ЭРН), а также его погрешность по данным ЭРПО. Для решения данной задачи нужно продифференцировать функцию ЭРПО [1, с. 417].

В статье предложен метод численного дифференцирования, а также два способа оценки погрешности: теоретический и стохастический (метод Монте-Карло). Решение задачи было представлено в виде алгоритма в пакете прикладных программ MATLAB.

Метод численного дифференцирования основан на аппроксимации отдельных участков ЭРПО ортонормированными полиномами [2, с. 157]. Общий принцип: берем точку, производную в которой хотим вычислить, относительно нее берем равное количество точек слева и справа (обозначим его d), на полученном участке аппроксимируем данные полиномом, вычисляем производную от полинома в выбранной точке. Результат вычисления считаем оценкой производной в данной точке. Далее, повторяем процедуру для всех точек ЭРПО