

CHEMILUMINESCENCE OF ACTIVATED NEUTROPHILS IN THE PRESENCE OF MELATONIN

Kavalenka A.I., Semenkova G.N.

Belarusian State University, Department of Biophysics, Nezalezshnosity ave., 4, 220030, Minsk, Belarus. E-mail: kavalenka@bsu.by

The influence of $1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ mol/l melatonin *in vitro* on oxygen activating reaction in human blood neutrophils was studied using chemiluminescence method. It was shown that melatonin interacts with myeloperoxidase in the presence of $O_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 and doesn't influence on $O_2^{\cdot-}$ generation by NADPH-oxidase in neutrophils activated during adhesion and f-MLP action. Melatonin inhibits luminol dependent chemiluminescence of neutrophils and doesn't affect on lucigenin dependent chemiluminescence. The effects of melatonin are intensified with the increase of melatonin concentration and the continuance of its action on the cells. The obtained data testifies that melatonin in concentration more than $1 \cdot 10^{-8}$ mol/l can modulate oxygen activating reaction of neutrophils and other myeloperoxidase dependent processes.

УДК 577.3

ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ АКТИВИРОВАННЫХ НЕЙТРОФИЛОВ В ПРИСУТСТВИИ МЕЛАТОНИНА

Коваленко Е.И., Семенкова Г.Н.

Белорусский государственный университет, кафедра биофизики,
пр. Независимости, 4, Минск, 220030, Беларусь. E-mail: kavalenka@bsu.by

Изучено влияние мелатонина в концентрациях $1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л на кислородактивирующие реакции нейтрофилов крови человека в условиях *in vitro* хемилюминесцентным методом. Показано, что мелатонин взаимодействует с миелопероксидазой в присутствии $O_2^{\cdot-}$ и H_2O_2 и не влияет на генерацию $O_2^{\cdot-}$ НАДФН-оксидазой в нейтрофилах, активированных в ходе адгезии и действии fMLP. Мелатонин ингибирует люминол-опосредованную хемилюминесценцию нейтрофилов и незначительно влияет на люцигенин-опосредованную. Эффективность действия мелатонина возрастает с увеличением его концентрации и продолжительности воздействия на клетки. Полученные данные свидетельствуют о том, что мелатонин в концентрациях выше $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л может оказывать модулирующее влияние на кислородактивирующие реакции нейтрофилов и другие процессы, идущие с участием миелопероксидазы.

Введение

Мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) — гормон, синтезируемый эпифизом, обеспечивающий регуляцию суточных биологических ритмов [1]. Мелатонин (МТ) действует в рамках эндокринной системы, влияя на секрецию гонадотропинов, кортикотропина, тиреотропина, соматотропина, серотонина [1]. Фармакологические препараты на основе синтетического мелатонина эффективно используются для лечения пациентов с нарушениями сна, при депрессивном синдроме, десинхронозах, неврозах, истощении, повышенной утомляемости. Однако, оказалось, что круг процессов, на которые влияет МТ, значительно шире. Так, например, выявлены антипролиферативные и иммуностимулирующие эффекты МТ [2]. Следует отметить, что, несмотря на большой объем полученных данных, механизмы действия МТ, особенно на клетки иммунной системы, нуждаются в более глубоком исследовании. Целью данной работы было изучить влияние МТ в концентрациях $1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л на кислородактивирующие реакции нейтрофилов крови человека в условиях *in vitro*.

Известно, что нейтрофилы, активирующиеся в ходе иммунных реакций, усиливают потребление молекулярного O_2 и могут генерировать значительные количества активных форм кислорода (АФК), среди которых $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, $\cdot O_2$, $HOCl$ [3]. В различных ситуациях формирование АФК может иметь для организма-хозяина благоприятные или пагубные последствия. Так, генерация больших количеств АФК во внеклеточной среде с участием НАДФН-оксидазы плазматической мембраны и секретлируемой во внеклеточную

среду миелопероксидазы (МПО) при воспалении способствует внеклеточному уничтожению патогенных микроорганизмов, но может и вызывать повреждение тканей собственного организма [4]. Полагают, что кратковременная генерация небольших количеств АФК при действии хемотаксических веществ выполняет, в большей степени, сигнальную роль и связана с “праймингом”, подготовкой клеток к участию в воспалительных реакциях, стимуляцией накопления в клетках антиоксидантных ферментов [4].

Одним из высокочувствительных методов регистрации АФК в различных биологических системах является метод хемилюминесценции (ХЛ) с использованием физических или химических усилителей свечения [3]. Нами проведено исследование влияния МТ на интенсивность ХЛ, обусловленной генерацией АФК нейтрофилами при их активации хемотаксическим пептидом fMLP и в процессе адгезии клеток на стекло в отсутствие и присутствии химических усилителей ХЛ люминола и люцигенина. Люцигенин применяется для регистрации O_2^- , который в нейтрофилах образуется, главным образом, при активации НАДФН-оксидазы, а свечение люминола связывают, преимущественно, с его окислением МПО в присутствии H_2O_2 и O_2^- .

Материалы и методы

Реагенты. В работе использованы мелатонин, люминол, люцигенин, f-MLP, салицилгидроксамиковая кислота (SA), дифенилиодид (DPI), каталаза, супероксиддисмутаза (СОД), декстран-500, фиколл-400, 30 % раствор H_2O_2 , Triton X-100 («Sigma», США); урографин («Schering AG», Германия). Остальные реагенты производства «Анализ-Х», Беларусь.

Выделение нейтрофилов. Нейтрофилы изолировали из консервированной крови здоровых доноров стандартным методом. Процедура выделения включала седиментацию эритроцитов в течение 1 ч при комнатной температуре, удаление тромбоцитов с помощью центрифугирования, разделение лейкоцитов в градиенте плотности фиколл-урографина ($1,077 \text{ г/см}^3$), гипотонический лизис остатка эритроцитов дистиллированной водой. Полученные нейтрофилы суспензировали в сбалансированном солевом растворе Эрла (рН 7,2). Содержание нейтрофилов в пробах составляло $2 \cdot 10^6$ клеток/мл. В пробы добавляли $CaCl_2$ в концентрации $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л, люминол и люцигенин – $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л, fMLP – $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Ингибиторы использовали в концентрациях: каталазу – 25 нг/мл, СОД – 25 нг/мл, DPI – 0,4 ммоль/л, SA – 25 ммоль/л.

Генерация нейтрофилами АФК. Хемилюминесценцию, обусловленную генерацией нейтрофилами АФК, наблюдали при активации клеток в ходе адгезии и при внесении fMLP при $37^\circ C$. В одних экспериментах нейтрофилы предварительно инкубировали с добавлением МТ в различных концентрациях на протяжении 1,5 ч при $37^\circ C$, в других – мелатонин добавляли в суспензию клеток после начала адгезии клеток в ходе измерения интенсивности ХЛ. Кинетические зависимости интенсивности ХЛ регистрировали с помощью компьютеризированного комплекса, включающего биохемилюминометр БХЛ-1 (Белгосуниверситет, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom («Новые аналитические системы», Беларусь). Интегральную интенсивность ХЛ клеток вычисляли как площадь под кинетической кривой, полученной за время измерения 4 мин, в программе Unichrom.

Влияние МТ на уровень МПО активности нейтрофилов. Клетки ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) инкубировали с добавлением $5 \cdot 10^{-3}$ моль/л $CaCl_2$ в отсутствие или присутствии МТ в различных концентрациях в течение 1 ч при $37^\circ C$. Затем клетки разрушали добавлением 0,1 % Triton X-100 и оценивали активность МПО в образцах ХЛ методом.

Влияние МТ на дегрануляцию азурофильных гранул нейтрофилов. Суспензии нейтрофилов ($2 \cdot 10^6$ клеток/мл) помещали в стеклянные цилиндрические кюветы и инкубировали в течение 1 ч при $37^\circ C$ с добавлением $CaCl_2$ ($5 \cdot 10^{-3}$ моль/л) в отсутствие или присутствии МТ в различных концентрациях. Нейтрофилы при адгезии на дно кювет активировались и секретируют содержимое гранул во внеклеточную среду. По окончании инкубирования

надосадочную жидкость собирали и центрифугировали при 400 g в течение 7 мин для осаждения неадгезировавших клеток. В полученных образцах внеклеточной жидкости определяли активность секретированной МПО.

Хемилюминесцентное определение активности МПО. В исследуемые образцы вносили $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л H_2O_2 и $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л люминола и с помощью измерительного комплекса, описанного выше, регистрировали кинетические зависимости ХЛ при реакциях окисления люминола, катализируемых МПО. Затем рассчитывали интегральную интенсивность как площадь под кинетической кривой, записанной за время 2 мин, и выражали в отн.ед. МПО активность считали пропорциональной интегральной интенсивности ХЛ.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0. На рисунках представлены средние значения параметров для трех экспериментов, стандартное отклонение и доверительная вероятность р.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 показаны значения интегральной интенсивности люминол-опосредованной ХЛ нейтрофилов в ходе адгезии клеток на стекло (рис. 1, А) и при действии fMLP (рис. 1, Б). Клетки предварительно были проинкубированы при 37 °С в течение 1,5 ч в отсутствие (к) или присутствии

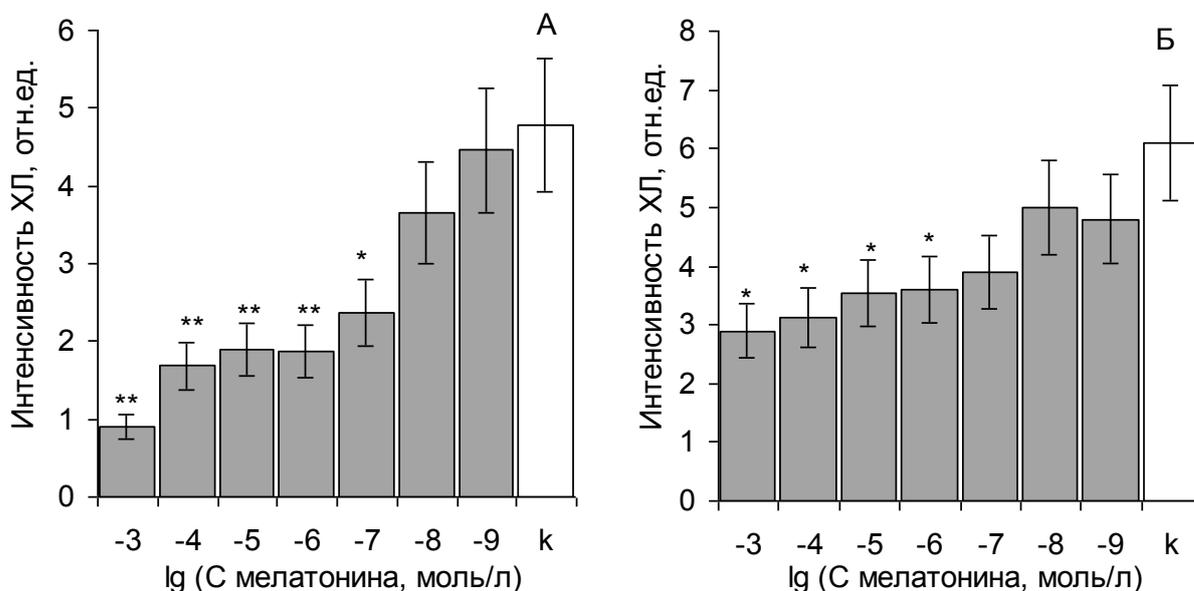


Рис. 1. Интегральная интенсивность люминол-опосредованной ХЛ нейтрофилов при адгезии (А) и действии f-MLP (Б) в случае предварительного инкубирования клеток в отсутствие (к) и присутствии мелатонина в различных концентрациях при 37 °С в течение 1,5 ч. * - $p > 0,95$; ** - $p > 0,99$.

МТ в различных концентрациях. Как видно из рис. 1, в случае преинкубирования нейтрофилов в присутствии МТ в концентрациях $1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-8}$ моль/л интегральная интенсивность люминол-опосредованной ХЛ клеток при адгезии и добавлении fMLP незначительно отличается от контроля. При преинкубировании клеток с добавлением МТ в концентрациях $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л наблюдается снижение интенсивности люминол-опосредованной ХЛ нейтрофилов в возрастающей степени при увеличении концентрации МТ. Ингибирующие эффекты МТ на люминол-опосредованную ХЛ нейтрофилов, активированных в процессе адгезии к стеклу, выше, чем при активации клеток с помощью fMLP (рис. 1, А, Б). Ранее нами было показано, что люминол-опосредованная ХЛ при адгезии нейтрофилов на стекло обусловлена, в частности, взаимодействием люминола с МПО, секретлируемой клетками из азурофильных гранул [5]. С другой стороны, fMLP не

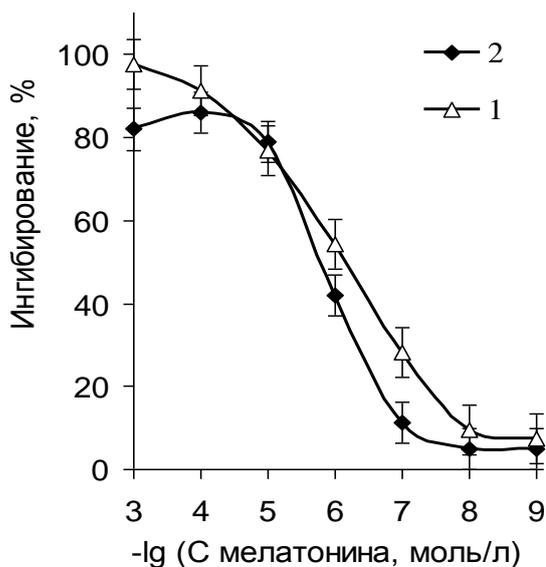


Рис. 2. Влияние МТ на интенсивность ХЛ в системах: 1 – “супернатант адгезированных клеток + H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) + люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л)”; 2 – “разрушенные клетки + H_2O_2 ($1 \cdot 10^{-5}$ моль/л) + люминол ($5 \cdot 10^{-5}$ моль/л)”.

изменению кинетики люминол-опосредованной ХЛ нейтрофилов, а при концентрациях $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л МТ (кривая 4) и выше (не показано) наблюдается снижение интенсивности ХЛ. Таким образом, МТ в концентрациях $1 \cdot 10^{-7}$ - $1 \cdot 10^{-6}$ моль/л не влияет на ХЛ нейтрофилов при его внесении в ходе регистрации ХЛ клеток, но приводит к ингибированию люминол-опосредованной ХЛ в случае предварительного инкубирования клеток с МТ в течение 1,5 ч (рис. 1, А). Следовательно, эффективность действия МТ на ХЛ нейтрофилов возрастает с увеличением продолжительности воздействия.

Изучено влияние МТ в концентрациях $1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л на люцигенин-опосредованную ХЛ нейтрофилов. Выявлено, что МТ вызывает лишь небольшой ингибиторный эффект при его добавлении в концентрации $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л и не влияет на процесс при концентрациях $1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л.

На рис. 4 представлены кинетические зависимости интенсивности ХЛ нейтрофилов при добавлении $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л МТ в ходе адгезии клеток на стекло (кривая 1). Следует отметить, что до внесения МТ интенсивность ХЛ нейтрофилов при адгезии была практически нулевой. Добавление fMLP в присутствии МТ (но не в отсутствие) также приводило к ХЛ. Таким образом, в отсутствие люминола и люцигенина МТ сам служит усилителем свечения. МТ не может быть физическим усилителем ХЛ, так как он не имеет выраженных полос флуоресценции в видимом диапазоне. Следовательно, МТ вступает в химические реакции с компонентами нейтрофилов с образованием флуоресцирующих соединений.

Согласно данным литературы, МТ может окисляться некоторыми типами пероксидаз с образованием флуоресцирующего продукта АМФК (N^1 -ацетил- N^2 -формил-5-метоксикинурамина) [6]. По-видимому, обнаруженный эффект усиления ХЛ нейтрофилов в присутствии МТ обусловлен его окислением МПО нейтрофилов. МПО способна окислять субстраты в присутствии H_2O_2 или $\text{O}_2^{\cdot-}$ [3]. Эти АФК образуются в нейтрофилах, как правило, вследствие активации НАДФН-оксидазы. Для того, чтобы проверить участие МПО, НАДФН-оксидазы и H_2O_2 или $\text{O}_2^{\cdot-}$ в МТ-зависимой ХЛ нейтрофилов, был проведен ингибиторный анализ.

является индуктором секреторной дегрануляции азурофильных гранул. Мы предположили, что эффекты МТ на люминол-опосредованную ХЛ нейтрофилов зависят от секреции клетками МПО. Исследование секреции МПО нейтрофилами и определение внутриклеточной активности МПО при добавлении МТ показало, что МТ в концентрациях $1 \cdot 10^{-6}$ - $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л приводит к сильному снижению интенсивности ХЛ, отражающей активность секретированной или внутриклеточной МПО (данные показаны на рис. 2). Сравнительный анализ зависимостей 1 и 2, позволяет заключить, что МТ не влияет на процесс секреции МПО, а ингибирует взаимодействие МПО с H_2O_2 и люминолом.

На рис. 3 показаны кинетические зависимости интенсивности люминол-опосредованной ХЛ нейтрофилов, активированных в процессе адгезии к стеклу, при добавлении МТ после начала адгезии. Обнаружено, что внесение $1 \cdot 10^{-9}$ - $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л МТ (кривые 2,3) не приводит к

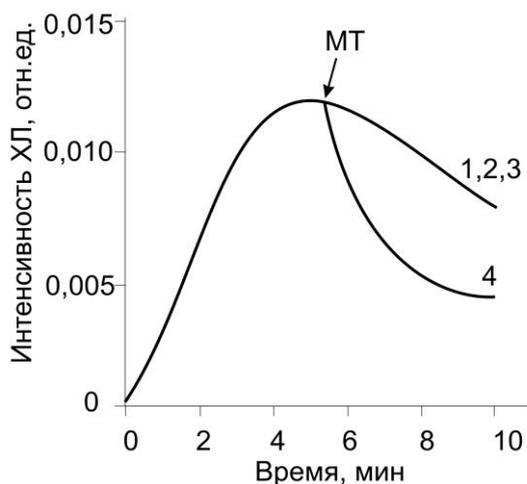


Рис. 3. Кинетические зависимости интенсивности люминол-опосредованной ХЛ нейтрофилов при адгезии клеток на стекло в случае внесения мелатонина в процессе регистрации ХЛ. 1 – в отсутствие МТ; 2,3,4 – при добавлении $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л МТ, соответственно.

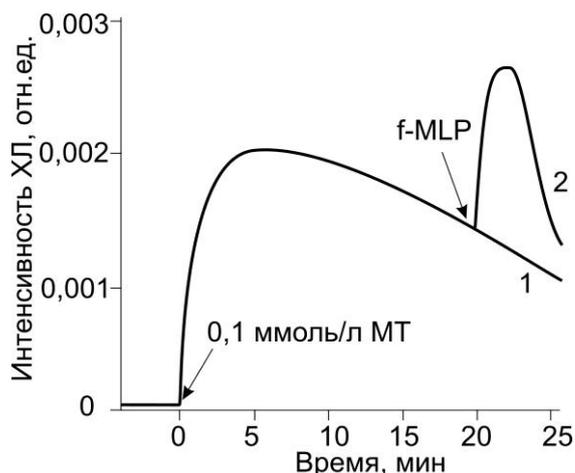


Рис. 4. Кинетические зависимости интенсивности ХЛ нейтрофилов в ходе адгезии клеток на стекло (1) и при добавлении fMLP (2) при внесении $1 \cdot 10^{-4}$ моль/л МТ.

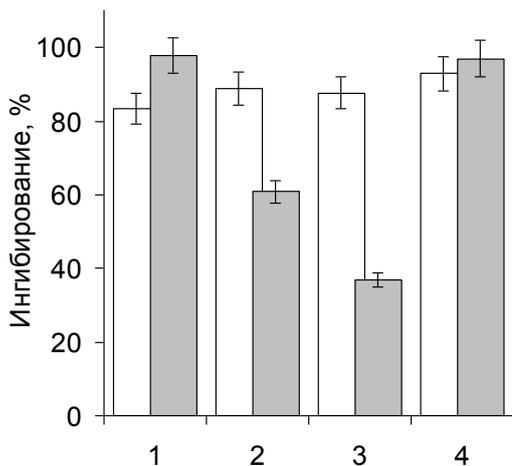


Рис. 5. Влияние СОД (1), DPI (2), каталазы (3), SA (4) на МТ-опосредованную ХЛ нейтрофилов, активированных в ходе адгезии на стекло (□) и действии fMLP (■).

На рис.5 показано влияние ингибиторов НАДФН-оксидазы (DPI), МПО (SA), антиоксидантных ферментов СОД и каталазы, утилизирующих $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 , на МТ-зависимую ХЛ нейтрофилов при их активации в ходе адгезии и действия fMLP. Как видно рис. 5, все использованные вещества приводят к сильному ингибированию МТ-зависимой ХЛ нейтрофилов. При адгезии клеток на стекло все использованные вещества снижают ХЛ на 80-90 %.

При действии fMLP степень ингибирования у СОД и SA составляет около 90 %, у DPI — 60 %, каталазы — 35 %. Различия влияния каталазы и DPI на ХЛ нейтрофилов при адгезии и действии fMLP, по-видимому, обусловлены разными механизмами активации клеток.

Заключение

Полученные данные свидетельствуют о том, что МТ взаимодействует с МПО нейтрофилов в присутствии $O_2^{\cdot -}$ и H_2O_2 , возникающих при активации НАДФН-оксидазы, блокирует взаимодействие МПО с люминолом и приводит к образованию флуоресцирующих продуктов (МТ-опосредованная ХЛ). МТ не влияет на генерацию $O_2^{\cdot -}$ НАДФН-оксидазой в нейтрофилах, активированных в ходе адгезии и действии fMLP, поскольку не оказывает существенного влияния на люцигенин-зависимую ХЛ. Таким образом, МТ в фармакологических концентрациях (более 10 нмоль/л) может оказывать модулирующее влияние на

кислородактивирующие реакции нейтрофилов и другие процессы в организме, идущие с участием МПО.

Список использованной литературы:

1. *Moore RY*. Neural control of the pineal gland. *Behav Brain Res* 1996;73:125-30.
2. *Skwarlo-Sonta K*. Melatonin in immunity: comparative aspects. *Neuroendocrinol Lett* 2002;23(1):61-6.
3. *Arnhold J*. Review: properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. *Biochemistry (Moscow)*. 2004;69(1):4–9.
4. *Гамалей И.А., Клубин И.В.* Перекись водорода как сигнальная молекула. *Цитология* 1996;38(12):1233-47.
5. *Kavalenka AI, Semenkova GN, Cherenkevich SN, Smirnova EN, Gerein V*. Systems of reactive oxygen species generation in human neutrophils: chemiluminescent analysis. *Clin Lab*. 2003; 49 (9/10): 566.
6. *Ximenes VF, Fernandes JR, Bueno VB, Catalani LH, Oliveira GH, Machado RGP*. The effect of pH on horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of melatonin: production of N-acetyl-N-formyl-5-methoxykynuramine versus radical-mediated degradation. *J Pineal Res* 2007;42:291-6.