



## ГАЛЛОЦИАНИН КАК ФЛУОРОГЕН ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ NADPH-ЗАВИСИМОЙ ПРОДУКЦИИ СУПЕРОКСИДНОГО АНИОН-РАДИКАЛА КЛЕТКАМИ КРОВИ

© 2021 г. О. М. Панасенко\*, #, В. Е. Реут\*\*, И. В. Бородин\*, Д. С. Матюшкина\*,  
В. А. Иванов\*, Д. В. Григорьева\*\*, И. В. Горудко\*\*, А. В. Соколов\*, \*\*\*, С. Н. Черенкевич\*\*

\*ФГБУ “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины” ФМБА России,  
Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1а

\*\*Белорусский государственный университет, Беларусь, 220030 Минск, просп. Независимости, 4

\*\*\*Институт экспериментальной медицины, Россия, 197376 Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12

Поступила в редакцию 09.04.2020 г.

После доработки 18.04.2020 г.

Принята к публикации 21.04.2020 г.

Методами спектрофотометрии, масс-спектрометрии и спектрофлуориметрии исследовано взаимодействие красителя оксазинового ряда галлоцианина с активными формами кислорода ( $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и галогенов ( $\text{HOCl}$ ). Показано, что галлоцианин реагирует с  $\text{HOCl}$  и  $\cdot\text{O}_2^-$  (но не с  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) с образованием флуоресцирующих продуктов. С использованием ингибиторного анализа установлено, что как в системе ксантин/ксантиноксидаза, так и в присутствии активированных нейтрофилов крови человека основной вклад в превращение галлоцианина во флуорофор вносит его реакция с  $\cdot\text{O}_2^-$ . Полученные результаты позволяют заключить, что галлоцианин может выполнять роль флуорогенного хемосенсора и использоваться для оценки активации нейтрофилов, NADPH-зависимой продукции супероксидного анион-радикала нейтрофилами и другими клетками крови, а также для тестирования антиоксидантных препаратов, разрабатываемых с целью коррекции заболеваний, ассоциированных с окислительным стрессом.

**Ключевые слова:** галлоцианин, активные формы кислорода, активные формы галогенов, окислительный стресс, супероксидный анион-радикал, хлорноватистая кислота, флуоресценция

DOI: 10.31857/S0132342321010176

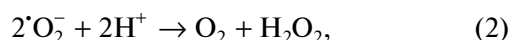
### ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы представляют собой самый многочисленный подвид гранулоцитарных лейкоцитов (до ~70%) крови человека, играющий ключевую роль в реализации клеточного звена врожденного иммунитета во многом благодаря продукции активных форм кислорода (АФК) и галогенов (АФГ). Эти соединения не только играют роль медиаторов важных внутриклеточных и межклеточных редокс-чувствительных сигнальных путей, таких как ионная проницаемость, апоптоз, нетоз и рецепторные взаимодействия, но и, будучи высокорекреационными, уничтожают патогены (бак-

терии, вирусы, грибы и др.), выполняя антимикробную функцию [1]. За продукцию АФК и АФГ в нейтрофилах отвечают главным образом ферменты: NADPH-оксидаза (КФ 1.6.3.1), супероксиддисмутаза (SOD, КФ 1.15.1.1) и миелопероксидаза (МРО, КФ 1.11.2.2). Активация нейтрофилов в ответ на провоспалительный стимул сопровождается сборкой NADPH-оксидазного комплекса, который катализирует реакцию восстановления молекулярного кислорода ( $\text{O}_2$ ) до супероксидного анион-радикала ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) [2]:



В результате дисмутации  $\cdot\text{O}_2^-$  (спонтанной или катализируемой SOD) образуется пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ):

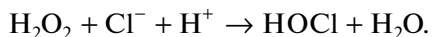


являющийся субстратом фермента азурофильных гранул нейтрофилов – МРО [1, 3]. МРО в организ-

Сокращения: 4-АВАН – гидразид 4-аминобензойной кислоты; СР – церулоплазмин; fMLP – N-формил-метиллейцил-фенилаланин; МРО – миелопероксидаза; РМА – форбол-12-миристан-13-ацетат; SOD – супероксиддисмутаза; АФГ – активные формы галогенов; АФК – активные формы кислорода; ФСБ – фосфатно-солевой буфер.

# Автор для связи: (тел.: +7 (499) 246-44-90; эл. почта: o-panas@mail.ru).

ме человека катализирует главным образом окисление хлорида до хлорноватистой кислоты (НОСІ):



АФК и особенно АФГ (включая НОСІ), образующиеся при активации нейтрофилов и обладающие повышенной реакционной способностью, реагируют со многими биологически важными молекулами (нуклеиновыми кислотами, белками, липидами, антиоксидантами и др.), повреждают клетки и ткани организма, вызывая окислительный/галогенирующий стресс, провоцирующий развитие воспалительных заболеваний: сердечно-сосудистых, нейродегенеративных, онкологических и др. [3–5]. Становится понятно, насколько важно контролировать и оценивать активность ферментов, ответственных за образование АФК и АФГ. Очевидно, что регистрация продукции клетками АФК/АФГ дает возможность разработки новых методов и подходов, направленных на профилактику, диагностику и мониторинг эффективности терапии заболеваний, ассоциированных с окислительным/галогенирующим стрессом. Среди методов, используемых для обнаружения АФК и АФГ (масс-спектрометрия в сочетании с различными вариантами хроматографии, иммуоферментный анализ, хемилюминесценция, спиновые ловушки и др.), флуоресцентный анализ отличается высокой чувствительностью и доступностью [6–8].

В последнее время предложено большое количество низкомолекулярных флуорогенных зондов, позволяющих в том числе в режиме реального времени регистрировать продукцию различных АФК и АФГ как внутри, так и вне клетки: 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат, дигидрородамин 123, 10-ацетил-3,7-дигидроксибензоксазин (Amplex Red), аминифенилфлуоресцеин (2-[6-(4'-амино)бензоксазин-3-он-9-ил]бензойная кислота) и др. [6–11]. Однако указанные зонды не всегда являются достаточно чувствительными и специфичными при анализе тех или иных АФК/АФГ, зачастую их синтез весьма трудоемок, что значительно увеличивает стоимость, либо они попросту неудобны в анализе (плохая растворимость в воде, недостаточная стабильность и т.п.). Например, упомянутые 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат, дигидрородамин 123 и аминифенилфлуоресцеин одинаково хорошо окисляются свободными радикалами, пероксинитритом и НОСІ [6, 9]. Amplex Red, предназначенный для определения  $\text{H}_2\text{O}_2$  в присутствии пероксидаз, легко окисляется под действием АФГ. Более того, такие восстановители, как NADH и глутатион, могут заметно исказить результат анализа [10, 11].

Ранее нами был предложен кинетический спектрофотометрический метод для измерения галогенирующей активности МРО, основанный на

обесцвечивании под действием АФГ красителя оксазинового ряда — целестинового синего В [12]. Позднее мы показали, что этот краситель с успехом может быть использован для выявления НОСІ, продуцируемой активированными нейтрофилами, методами проточной цитометрии и конфокальной микроскопии [13].

В настоящей работе мы сосредоточили свое внимание на другом красителе оксазинового ряда — галлоцианине (4-гидрокси-7-диметиламино-1-карбоксихемиоксазон-3 хлорид). Он — структурный аналог целестинового синего В, но отличается большей фотостабильностью, относительно хорошей растворимостью в фосфатно-солевом буфере и легко синтезируется с выходом, близким к количественному. Благодаря в том числе этим свойствам, галлоцианин уже более полувека используется при гистологическом анализе для окраски ядер [14] и количественного определения нуклеиновых кислот [15]. Нами было исследовано взаимодействие галлоцианина с основными АФК ( $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и АФГ (НОСІ) с целью использования красителя для выявления продукции этих соединений активированными нейтрофилами.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

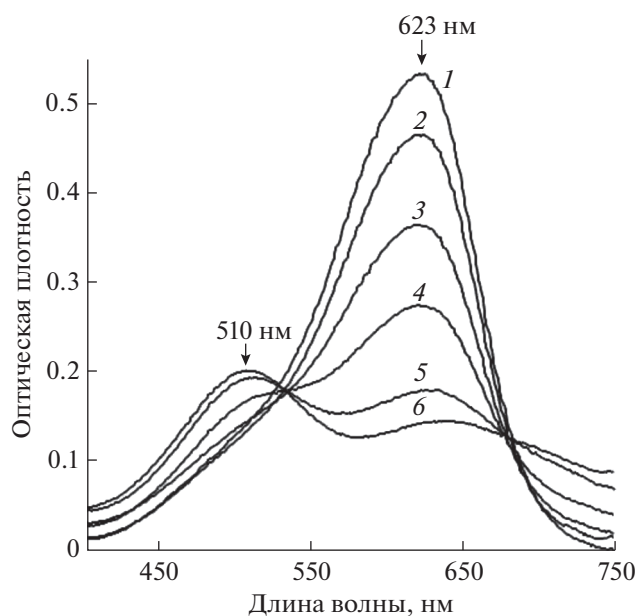
**Взаимодействие галлоцианина с  $\cdot\text{O}_2^-$ .** Известно, что диоксид калия ( $\text{KO}_2$ ) в водной среде гидролизуетсЯ с образованием короткоживущего супероксидного анион-радикала:



который быстро дисмутирует до пероксида водорода по реакции (2). Суммарное уравнение реакции выглядит так:



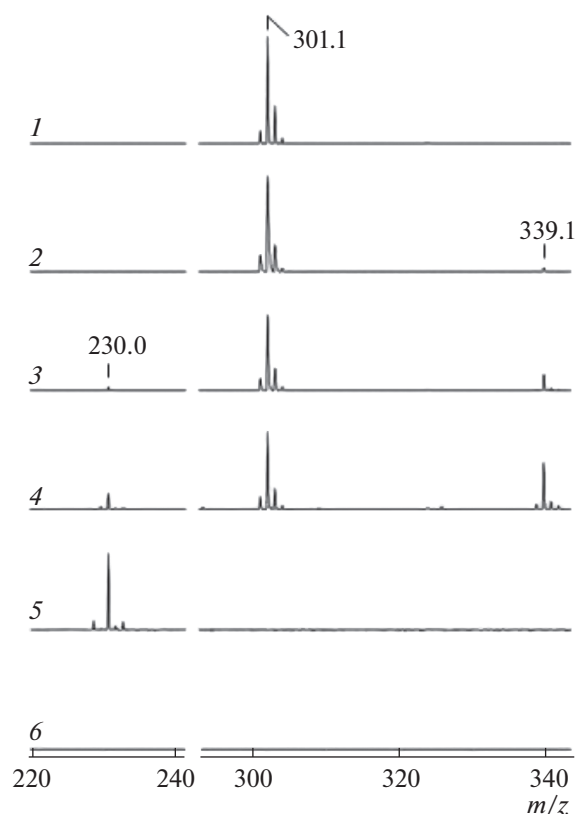
Для исследования взаимодействия галлоцианина с  $\cdot\text{O}_2^-$  к раствору галлоцианина добавляли навеску сухого  $\text{KO}_2$ , перемешивали и регистрировали спектры поглощения в видимой области (400–750 нм). Результаты измерения приведены на рис. 1. Видно, что раствор галлоцианина имеет максимум поглощения при 623 нм. По мере увеличения концентрации добавленного  $\text{KO}_2$  наблюдается снижение высоты этого пика, одновременно появляется пик поглощения с максимумом при 510 нм, увеличивается его интенсивность, при этом окраска раствора меняется с синей на бледно-фиолетовую. В совокупности это свидетельствует о расхождении галлоцианина и образовании как минимум одного продукта. В контрольных экспериментах мы показали, что добавление к галлоцианину (20 мкМ) раствора  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10–1000 мкМ), образующегося по реакции (4), не приводит к изменению



**Рис. 1.** Спектры поглощения галлоцианина до и после добавления к нему  $\text{KO}_2$ . Среда измерения — ФСБ-2, pH 7.4 (см. “Эксперим. часть”). Концентрация галлоцианина — 20 мкМ. Концентрация  $\text{KO}_2$  (мМ): 1 — 0; 2 — 0.22; 3 — 0.76; 4 — 0.98; 5 — 1.31; 6 — 1.64.

спектра поглощения галлоцианина (данные не приведены). Это значит, что галлоцианин не вступает в реакцию с  $\text{H}_2\text{O}_2$ . В таком случае можно заключить, что изменение спектра поглощения галлоцианина при добавлении к нему  $\text{KO}_2$  обусловлено его реакцией с  $^{\bullet}\text{O}_2^-$ , образующимся в качестве интермедиата при гидролизе  $\text{KO}_2$  по реакции (3).

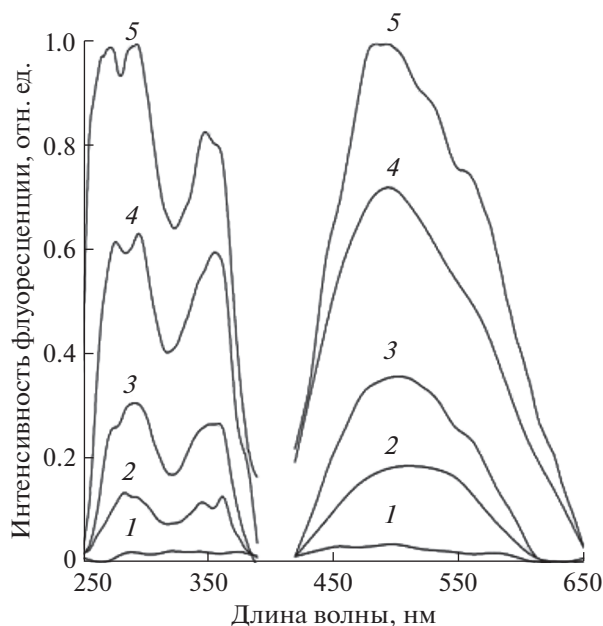
Этот факт подтверждают изображенные на рис. 2 масс-спектры галлоцианина, зарегистрированные до и после добавления к нему  $\text{KO}_2$  в различных концентрациях. Масс-спектр галлоцианина (спектр 1 на рис. 2) представляет собой моноизотопное распределение, максимально интенсивный пик ( $m/z$  301.1) соответствует массе катиона  $[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5]^+$ , состоящего из основных изотопов ( $^{12}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ ,  $^{14}\text{N}$ ,  $^{16}\text{O}$ ). По мере роста концентрации  $\text{KO}_2$  сначала появляется (спектр 2 на рис. 2), увеличивается (спектры 3 и 4), а затем исчезает (спектр 5) сигнал с  $m/z$  339.1. Параллельно, начиная с концентрации  $\text{KO}_2$  2.84 мМ, появляется и увеличивается сигнал с  $m/z$  230.0. При концентрации  $\text{KO}_2$  11.38 мМ (спектр 5 на рис. 2) пик от исходного галлоцианина ( $m/z$  301.1) исчезает полностью и остается только сигнал с  $m/z$  230.0. Такой результат можно объяснить, если предположить, что в реакции галлоцианина с  $\text{KO}_2$  сначала образуется продукт с  $m/z$  339.1, который в конце концов превращается в соединение с  $m/z$  230.0. Как минимум один из продуктов является флуо-



**Рис. 2.** Масс-спектры галлоцианина до и после добавления к нему  $\text{KO}_2$ . Среда измерения — ФСБ-2, pH 7.4 (см. “Эксперим. часть”). Концентрация галлоцианина — 80 мкМ. Концентрация  $\text{KO}_2$  (мМ): 1 — 0; 2 — 1.14; 3 — 2.84; 4 — 5.69; 5 — 11.38; 6 — масс-спектр матрицы (2,5-дигидроксibenзойной кислоты) в отсутствие галлоцианина.

рофором, что подтверждают результаты, приведенные на рис. 3, из которого видно, что добавление к раствору галлоцианина  $\text{KO}_2$  приводит к возникновению флуоресценции, которая усиливается по мере увеличения концентрации  $\text{KO}_2$  (максимумы в спектре возбуждения в области 260–370 нм, испускания — 480–500 нм, рис. 3).

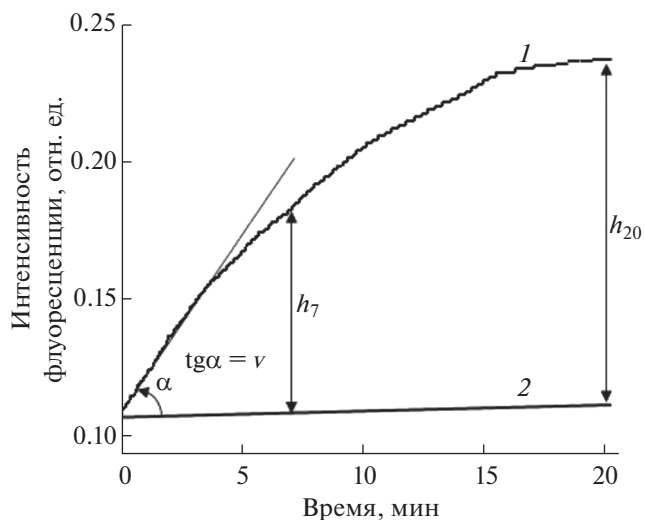
Помимо  $\text{KO}_2$  для продукции  $^{\bullet}\text{O}_2^-$  нами был использован фермент ксантиноксидаза, который в присутствии ксантина катализирует восстановление  $\text{O}_2$  до  $^{\bullet}\text{O}_2^-$  [16]. Результаты эксперимента приведены на рис. 4. Видно, что в присутствии ксантиноксидазы и ее субстрата ксантина наблюдается увеличение интенсивности флуоресценции при 490 нм (возбуждение при 360 нм) (кривая 1 на рис. 4), тогда как в отсутствие ксантина ферментативная реакция не идет, и притом интенсивности флуоресценции отсутствует (кривая 2 на рис. 4). Этот результат свидетельствует о взаимодействии синтезирующегося в ферментативной реакции  $^{\bullet}\text{O}_2^-$  с галлоцианином с образованием флуорофора. Из данных, представленных на рис. 5,



**Рис. 3.** Спектры возбуждения и испускания флуоресценции галлоксианина до и после добавления к нему  $\text{KO}_2$ . Среда измерения – ФСБ-1, pH 7.4 (см. “Эксперим. часть”). Концентрация галлоксианина – 5 мкМ. Концентрация  $\text{KO}_2$  (мМ): 1 – 0; 2 – 0.7; 3 – 1.6; 4 – 2.7; 5 – 4.1. Возбуждение – при 360 нм, испускание – при 490 нм.

видно, что интенсивность флуоресценции ( $h_{20}$ ) и химическая реакция галлоксианина ( $v$ ) в системе ксантин/ксантиноксидаза практически полностью подавляются в присутствии SOD. Этот факт свидетельствует о решающем вкладе  $\cdot\text{O}_2^-$  в химические превращения красителя.

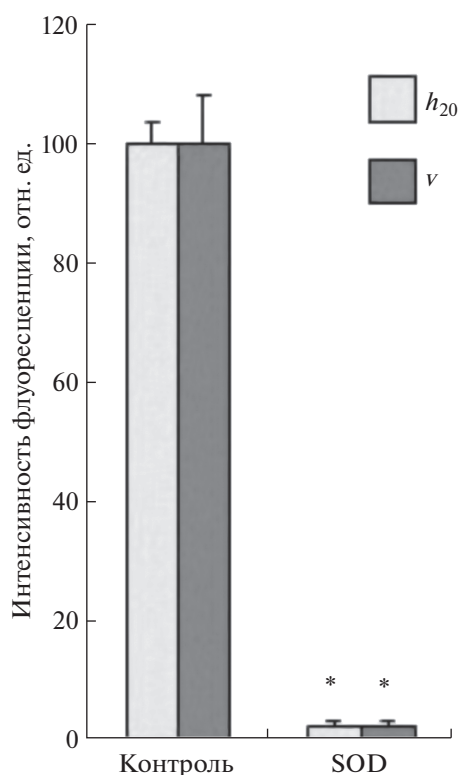
**Взаимодействие галлоксианина с HOCl.** На рис. 6 приведены спектры поглощения галлоксианина до и после добавления к нему HOCl в различных концентрациях. Видно, что раствор галлоксианина имеет максимум поглощения при 623 нм (спектр 1 на рис. 6а). Рассчитанный из этого спектра молярный коэффициент экстинкции составил  $\epsilon_{623} = 28000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , что хорошо согласуется с данными литературы [17, 18]. Добавление HOCl к красителю приводило к уменьшению оптической плотности раствора при длине волны 623 нм и появлению менее интенсивной полосы поглощения с максимумом при 475 нм (рис. 6а), что свидетельствует об образовании продукта реакции. Из вставки на рис. 6а видно, что падение концентрации галлоксианина происходит пропорционально концентрации добавленной HOCl так, что коэффициент стехиометрии HOCl : галлоксианин равен  $\sim 1.5$ . Однако, как видно из рис. 6б, дальнейшее увеличение концентрации HOCl приводит к снижению оптической плотности раствора при 475 нм и появлению полосы поглощения при



**Рис. 4.** Кинетика изменения интенсивности флуоресценции галлоксианина в системе ксантин/ксантиноксидаза (кривая 1). Концентрация галлоксианина – 5 мкМ, ксантина – 1 мМ, ксантиноксидазы – 0.52 мкМ. Среда измерения – ФСБ-1, pH 7.4 (см. “Эксперим. часть”). Кривая 2 – контрольная кривая, полученная в отсутствие ксантина. Возбуждение – при 360 нм, испускание – при 490 нм. На рисунке обозначены определяемые параметры: интенсивность флуоресценции по сравнению с фоновым уровнем через 7 ( $h_7$ ) или 20 ( $h_{20}$ ) мин после запуска реакции и скорость химического превращения галлоксианина ( $v$ ).

416 нм. В ходе реакции сине-фиолетовая окраска исходного раствора галлоксианина сначала меняется на оранжевую, а при дальнейшем увеличении концентрации HOCl раствор обесцвечивается. Такой результат говорит о том, что HOCl реагирует с галлоксианином с образованием как минимум двух продуктов, первый из которых, имеющий полосу поглощения при 475 нм, является промежуточным и при более высоких концентрациях HOCl претерпевает превращение в продукт, поглощающий при 416 нм.

Такой вывод подтверждают и приведенные на рис. 7 масс-спектры галлоксианина, зарегистрированные до и после добавления к нему HOCl в различных концентрациях. Видно, что по мере увеличения концентрации HOCl интенсивность сигнала, соответствующего массе катиона исходного галлоксианина  $[\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_5]^+$  ( $m/z$  301.1), постепенно снижается. Параллельно появляются сигналы с  $m/z$  328.3 и 452.0, по всей вероятности, соответствующие двум продуктам реакции HOCl с галлоксианином. Как минимум один из этих продуктов является флуорофором. Об этом свидетельствуют представленные на рис. 8 спектры возбуждения и испускания флуоресценции раствора галлоксианина после добавления к нему HOCl в различных концентрациях. Видно, что по мере возрастания концентрации добавленной к галлоксианину HOCl наблюдается увеличение интенсивно-

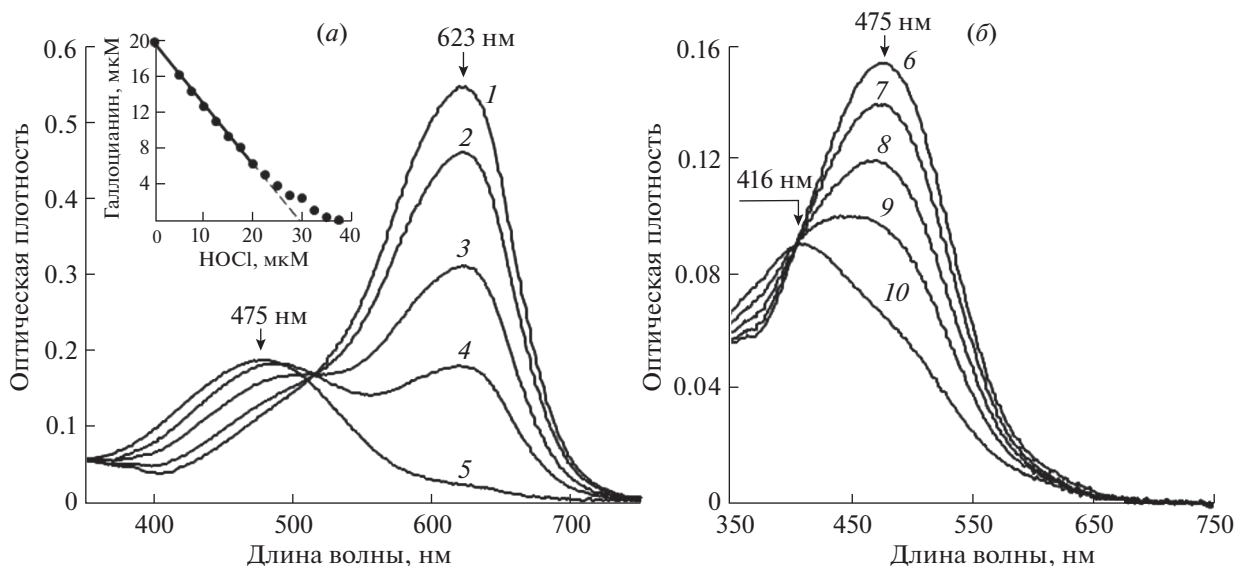


**Рис. 5.** Влияние SOD (1.6 мкМ) на интенсивность ( $h_{20}$ ) и скорость нарастания флуоресценции ( $v$ ) в системе галлоцианин + ксантин/ксантиноксидаза. Концентрация галлоцианина – 5 мкМ, ксантина – 1 мМ, ксантиноксидазы – 0.52 мкМ. Среда измерения – ФСБ-1, pH 7.4 (см. “Эксперим. часть”). Возбуждение – при 360 нм, испускание – при 490 нм.

сти флуоресценции раствора красителя (максимумы в спектре возбуждения – 269, 292 и 360 нм, испускания – 490 нм, рис. 8), что обусловлено образованием продукта реакции.

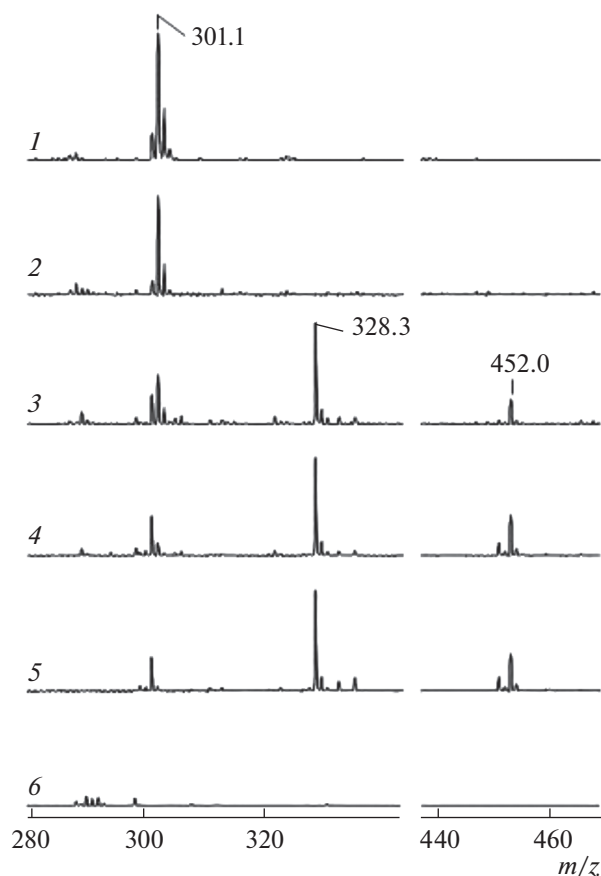
Таким образом, оба исследованных нами реагента ( $\text{O}_2^-$  и  $\text{HOCl}$ ) в бесклеточной среде реагируют с галлоцианином с образованием флуоресцирующих продуктов. Далее мы попытались выяснить, можно ли использовать галлоцианин в качестве флуорогенного хемосенсора для регистрации продукции АФК и/или АФГ нейтрофилами крови человека.

**Продукция  $\text{O}_2^-$  нейтрофилами.** Известно, что среди всех клеток крови нейтрофилы являются основными носителями МРО и NADPH-оксидазы. Стимуляция нейтрофилов приводит, с одной стороны, к сборке и активации NADPH-оксидазного ферментного комплекса, что сопровождается усиленной продукцией  $\text{O}_2^-$  [2], а с другой – к дегрануляции клеток, секреции МРО из азурофильных гранул во внеклеточное пространство и, как следствие – к синтезу  $\text{HOCl}$  [1, 4]. Оба события, как демонстрируют представленные выше результаты, должны способствовать трансформации галлоцианина в его флуорогенную форму. Для того чтобы выяснить, какая из ферментных систем нейтрофилов в большей степени ответственна за превращение галлоцианина во флуорофор, мы активировали нейтрофилы добавлением *N*-формил-метил-лейцил-фенилаланина (fMLP) или форбол-12-миристан-13-ацетата (PMA) в присутствии галлоцианина и различных веществ, способных как



**Рис. 6.** Спектры поглощения галлоцианина до и после добавления к нему  $\text{HOCl}$ . Среда измерения – ФСБ-2, pH 7.4 (см. “Эксперим. часть”). Концентрация галлоцианина – 20 мкМ. Концентрация  $\text{HOCl}$  (мкМ) (а): 1 – 0; 2 – 7.5; 3 – 15.0; 4 – 22.5; 5 – 40.0; (б): 6 – 45.0; 7 – 52.5; 8 – 60.0; 9 – 67.5; 10 – 75.0. На вставке приведена концентрационная зависимость убывающей галлоцианина в растворе при добавлении к нему  $\text{HOCl}$ , рассчитанная по убывающей оптической плотности при 623 нм.

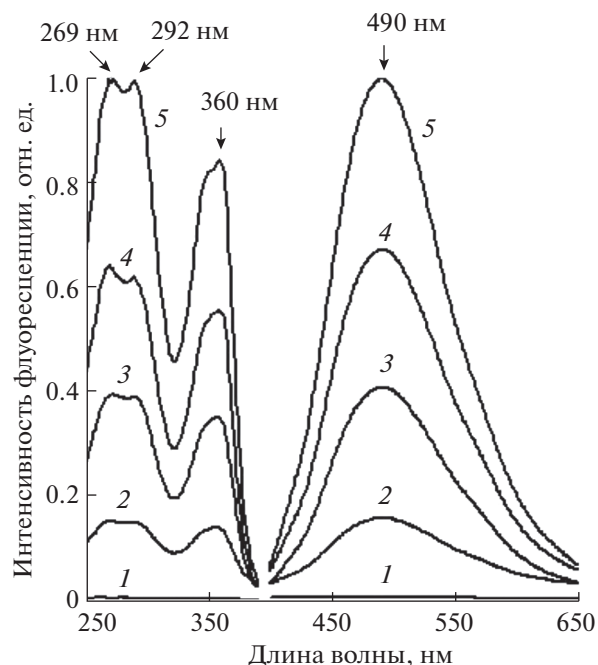




**Рис. 7.** Масс-спектры галлоцианина до и после добавления к нему  $\text{HOCl}$ . Среда измерения — ФСБ-2, pH 7.4 (см. “Эксперим. часть”). Концентрация галлоцианина — 80 мкМ. Концентрация  $\text{HOCl}$  (мМ): 1 — 0; 2 — 0.4; 3 — 4.0; 4 — 8.0; 5 — 16.0; 6 — масс-спектр матрицы (2,5-дигидроксibenзойной кислоты) в отсутствие галлоцианина.

перехватывать и/или элиминировать АФК/АФГ, так и ингибировать их продукцию, регистрируя при этом изменение интенсивности флуоресценции. Результаты экспериментов приведены в табл. 1.

Из данных табл. 1 видно, что гидразид 4-аминобензойной кислоты (4-АВАН; специфический ингибитор каталитической активности МРО, а



**Рис. 8.** Спектры возбуждения и испускания флуоресценции галлоцианина до и после добавления к нему  $\text{HOCl}$ . Среда измерения — ФСБ-1, pH 7.4 (см. “Эксперим. часть”). Концентрация галлоцианина — 5 мкМ. Концентрация  $\text{HOCl}$  (мкМ): 1 — 0; 2 — 2.5; 3 — 5.0; 4 — 7.5; 5 — 10.0. Возбуждение — при 360 нм, испускание — при 490 нм.

значит, и продукции  $\text{HOCl}$  [19]), таурин (перехватчик  $\text{HOCl}$ ) и маннитол (перехватчик гидроксильного радикала) не оказывали достоверного влияния на параметры окисления галлоцианина в присутствии активированных нейтрофилов. В то же время при добавлении к нейтрофилам SOD или церулоплазмينا (СР) значения амплитуды интенсивности флуоресценции ( $h_7$ ) и скорости реакции ( $v$ ) были значительно ниже контроля (активация нейтрофилов fMLP или РМА без ингибиторов или перехватчиков АФК/АФГ) или не определялись вовсе в результате отсутствия прироста флуоресценции спустя 20 мин после активации нейтрофилов. Как известно, SOD элими-

**Таблица 1.** Влияние ингибиторов продукции АФК/АФГ и их перехватчиков на параметры, характеризующие химическое превращение галлоцианина в суспензии нейтрофилов, активированных fMLP или РМА

Агонист	Параметр	SOD, 1.6 мкМ	СР, 1.1 мкМ	4-АВАН, 100 мкМ	Таурин, 3.2 мМ	Маннитол, 10 мМ
fMLP, 0.5 мкМ	$v$ , % от контроля	$7 \pm 5^*$	$5 \pm 4^*$	$102 \pm 29$	$98 \pm 27$	$113 \pm 20$
	$h_7$ , % от контроля	$14 \pm 4^*$	$19 \pm 18^*$	$129 \pm 30$	$92 \pm 15$	$107 \pm 35$
РМА, 50 нМ	$v$ , % от контроля	$0^{**}$	$2 \pm 3^*$	$93 \pm 19$	$105 \pm 20$	$125 \pm 20$
	$h_7$ , % от контроля	$0^{**}$	$6 \pm 9^*$	$127 \pm 23$	$104 \pm 19$	$110 \pm 15$

\*  $p < 0.05$ .

\*\* Полное отсутствие прироста флуоресценции спустя 20 мин после активации нейтрофилов.

нирует  $\cdot\text{O}_2^-$ , катализируя его дисмутацию по реакции (2) до  $\text{H}_2\text{O}_2$ , который, как нам удалось установить, не реагирует с галлоцианином (см. выше). Обнаруженный эффект СР, по всей видимости, обусловлен SOD-активностью этого белка [20]. Полученные результаты позволяют предположить, что основной вклад в окисление галлоцианина в суспензии нейтрофилов происходит за счет его реакции с  $\cdot\text{O}_2^-$ .

Следует отметить, что в крови человека подавляющее количество МРО сосредоточено в нейтрофилах и лишь незначительная ее часть — в моноцитах [1, 4]. Что касается NADPH-оксидазы, то различные ее изоформы присутствуют не только в нейтрофилах, но и практически во всех остальных типах клеток крови [2]: моноцитах [21], лимфоцитах [22], тромбоцитах [23], эритроцитах [24].

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что галлоцианин может выполнять роль флуорогенного хемосенсора и использоваться для оценки NADPH-зависимой продукции супероксидного анион-радикала, по всей вероятности, не только нейтрофилами, но и другими клетками крови, а также для тестирования антиокислительных свойств препаратов, разрабатываемых с целью коррекции заболеваний, ассоциированных с окислительным стрессом.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы.** В работе использовали следующие реактивы: цитрат натрия, *N*-формил-метил-лейцил-фенилаланин (fMLP), форбол-12-мирилат-13-ацетат (РМА), гипохлорит натрия ( $\text{NaOCl}$ ), галлоцианин, диоксид калия ( $\text{KO}_2$ ), ксантиноксидазу, ксантин, гидразид 4-аминобензойной кислоты (4-АВАН), супероксиддисмутазу (SOD), таурин, маннитол, 2,5-дигидроксibenзойную кислоту фирмы Sigma (США); декстран Т70 фирмы Roth (Германия); гистопак фирмы Nyscomed (Норвегия). Остальные реактивы были производства “Реахим” (Россия) и “Белмедпрепараты” (Беларусь). Церулоплазмин (СР) выделяли из крови здоровых доноров с помощью ионообменной и аффинной хроматографии [20].

Концентрацию гипохлорит-аниона ( $\text{OCl}^-$ ) определяли по его поглощению при 290 нм и рН 12, используя коэффициент молярной экстинкции  $\epsilon_{290} = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [25]. Принимая во внимание тот факт, что  $pK_a$   $\text{HOCl}$  составляет  $\sim 7.5$  [25] и при физиологических значениях рН примерно половина кислоты находится в молекулярной форме, а остальная часть — в виде аниона, под  $\text{HOCl}$  мы подразумевали смесь  $\text{HOCl}/\text{OCl}^-$ , присутствующую в исследуемой среде.

В качестве буферного раствора использовали фосфатно-солевой буфер, содержащий 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 137 мМ  $\text{NaCl}$ , 2.7 мМ  $\text{KCl}$ ,

рН 7.4 (ФСБ-1) либо 10 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , рН 7.4 (ФСБ-2).

**Спектры поглощения** регистрировали на двухлучевых спектрофотометрах РВ 2201 (Solar, Беларусь) и Cary-50 (Varian, США).

**Флуоресцентные измерения** проводили на спектрофлуориметре СМ 2203 (Solar, Беларусь).

**Выделение нейтрофилов** осуществляли путем центрифугирования в градиенте плотности гистопака из крови здоровых доноров, как описано ранее [26]. Полученный осадок нейтрофилов отмывали в ФСБ-1, содержащем 2 мг/мл *D*-глюкозы, при 4°C и сразу использовали в эксперименте.

**Продукцию АФК и АФГ нейтрофилами** оценивали флуоресцентным методом с использованием галлоцианина. К нейтрофилам ( $10^6$  кл./мл) в ФСБ-1, содержащем 1 мМ  $\text{CaCl}_2$  и 0.5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , добавляли галлоцианин (5 мкМ), fMLP (0.5 мкМ) или РМА (50 нМ), ингибиторы продукции АФК/АФГ или их перехватчики (SOD, 4-АВАН, СР, таурин, маннитол). Регистрацию осуществляли при 37°C и постоянном перемешивании образца. Продукцию  $\cdot\text{O}_2^-$  в системе ксантин/ксантиноксидаза регистрировали в ФСБ-1 при 25°C, концентрация ксантина — 1 мМ, ксантиноксидазы — 0.52 мкМ, галлоцианина — 5 мкМ. Для регистрации флуоресценции эмпирически были подобраны значения длин волн возбуждения и испускания 360 и 490 нм соответственно. Для характеристики химического превращения красителя были выбраны следующие параметры (рис. 4): тангенс угла наклона начального линейного участка кинетической кривой изменения интенсивности флуоресценции ( $\nu$ ), характеризующий скорость реакции, и интенсивность флуоресценции образца по сравнению с фоновым уровнем через 7 ( $h_7$ ) или 20 ( $h_{20}$ ) мин после запуска активации нейтрофилов, отражающую количество накопившегося флуоресцирующего продукта реакции.

**Масс-спектры** регистрировали на масс-спектрометре Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics, Германия), оснащенном УФ-лазером (Nd), в режиме положительных ионов с использованием рефлектрона. Время задержки анализатора — 200 нс. Напряжение на электроде ускорителя составляло 25.01 кВ, накапливающем электроде — 21.71 кВ, фокусирующей линзе — 10.01 кВ. Параметры масс-спектрометра были оптимизированы для диапазона  $m/z$  50–1000. Сигнал накапливался как усредненный по 200 одиночным лазерным импульсам с постоянной мощностью лазерного излучения на уровне порогового значения для увеличения разрешения. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксibenзойную кислоту.

**Статистическую и графическую обработку данных** выполняли с использованием пакета программ OriginPro 2016. Данные представлены как

среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Различия считали статистически достоверными при значении  $p < 0.05$ , рассчитанном по критерию Стьюдента. Типичные кинетические кривые представляют собой инвариант 3–5 независимых экспериментов.

### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-515-00006) и Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант Б20Р-215).

### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Klebanoff S.J. // J. Leukoc. Biol. 2005. V. 77. P. 598–625.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.1204697>
2. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К. // Усп. совр. биол. 2006. Т. 126. С. 97–112.
3. Sies H. // Klin. Wochenschr. 1991. V. 69. P. 965–968.  
<https://doi.org/10.1007/BF01645140>
4. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. // Усп. биол. химии. 2013. Т. 53. С. 195–244. [Panasenko O.M., Gorudko I.V., Sokolov A.V. // Biochemistry (Moscow). 2013. V. 78. P. 1466–1489.]  
<https://doi.org/10.1134/S0006297913130075>
5. Панасенко О.М., Сергиенко В.И. // Вестник Российской АМН. 2010. № 1. С. 27–39.
6. Huang J., Milton A., Arnold R.D., Huang H., Smith F., Panizzi J.R., Panizzi P. // J. Leukoc. Biol. 2016. V. 99. P. 541–548.  
<https://doi.org/10.1189/jlb.3RU0615-256R>
7. Tarpey M.M., Fridovich I. // Circ. Res. 2001. V. 89. P. 224–236.  
<https://doi.org/10.1161/hh1501.094365>
8. Kettle A.J., Albrett A.M., Chapman A.L., Dickerhof N., Forbes L.V., Khalilova I., Turner R. // Biochim. Biophys. Acta. 2014. V. 1840. P. 781–793.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.07.004>
9. Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H.J., Nagano T. // J. Biol. Chem. 2013. V. 278. P. 3170–3175.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M209264200>
10. Votyakova T.V., Reynolds I.J. // Arch. Biochem. Biophys. 2004. V. 431. P. 138–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.abb.2004.07.025>
11. Grivennikova V.G., Kareyeva A.V., Vinogradov A.D. // Redox Biol. 2018. V. 17. P. 192–199.  
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.04.014>
12. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Kozlov S.O., Donskyi I.S., Vlasova I.I., Rudenko A.O., Zakharova E.T., Vasilyev V.B., Panasenko O.M. // Free Radic. Res. 2015. V. 49. P. 777–789.  
<https://doi.org/10.3109/10715762.2015.1017478>
13. Козлов С.О., Кудрявцев И.В., Грудина Н.А., Костевич В.А., Панасенко О.М., Соколов А.В., Васильев В.Б. // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2016. Т. 1. № 3 (109). Часть 2. С. 86–91.
14. Загородний В.В. // Архив патологии. 1982. Т. 44. С. 67–68.
15. Brown A., Scholtz C.L. // Stain Technol. 1979. V. 54. P. 89–92.  
<https://doi.org/10.3109/10520297909112640>
16. Borges F., Fernandes E., Roleira F. // Curr. Med. Chem. 2002. V. 9. P. 195–217.  
<https://doi.org/10.2174/0929867023371229>
17. Balavoine G.G., Geletii Y.V. // Nitric Oxide. 1999. V. 3. P. 40–54.  
<https://doi.org/10.1006/niox.1999.0206>
18. Kettisen K., Bulow L., Sakai H. // Bioconjug. Chem. 2015. V. 26. P. 746–754.  
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00076>
19. Malle E., Furtmüller P.G., Sattler W., Obinger C. // Br. J. Pharmacol. 2007. V. 152. P. 838–854.  
<https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707358>
20. Sokolov A.V., Kostevich V.A., Varfolomeeva E.Y., Grigorieva D.V., Gorudko I.V., Kozlov S.O., Kudryavtsev I.V., Mikhalechik E.V., Filatov M.V., Cherenkevich S.N., Panasenko O.M., Arnhold J., Vasilyev V.B. // Biochem. Cell Biol. 2018. V. 96. P. 457–467.  
<https://doi.org/10.1139/bcb-2017-0277>
21. Okura Y., Yamada M., Kuribayashi F., Kobayashi I., Ariga T. // J. Clin. Immunol. 2015. V. 35. P. 158–167.  
<https://doi.org/10.1007/s10875-015-0138-4>
22. Bánfi B., Molnár G., Maturana A., Steger K., Hegedüs B., Demarex N., Krause K.H. // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. P. 37594–37601.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M103034200>
23. Fuentes E., Gibbins J.M., Holbrook L.M., Palomo I. // Trends Cardiovasc. Med. 2018. V. 28. P. 429–434.  
<https://doi.org/10.1016/j.tcm.2018.03.001>
24. George A., Pushkaran S., Konstantinidis D.G., Koochaki S., Malik P., Mohandas N., Zheng Yi., Joiner C.H., Kalfa T.A. // Blood. 2013. V. 121. P. 2099–2107.  
<https://doi.org/10.1182/blood-2012-07-441188>
25. Morris J.C. // J. Phys. Chem. 1966. V. 70. P. 3798–3805.
26. Timoshenko A.V., Kayser K., Gabius H.J. // Lectin Methods and Protocols / Eds. Rhodes J.M., Milton J.D. Humana Press, 1998. P. 441–451.  
<https://doi.org/10.1385/0-89603-396-1:441>



## Gallocyanine as a Fluorogen for Identification of NADPH-Dependent Production of Superoxide by Blood Cells

O. M. Panasenko<sup>\*,#</sup>, V. E. Reut<sup>\*\*</sup>, I. V. Borodina<sup>\*</sup>, D. S. Matyushkina<sup>\*</sup>, V. A. Ivanov<sup>\*</sup>,  
D. V. Grigorieva<sup>\*\*</sup>, I. V. Gorudko<sup>\*\*</sup>, A. V. Sokolov<sup>\*,\*\*\*</sup>, and S. N. Cherenkevich<sup>\*\*</sup>

<sup>#</sup>Phone: +7 (499) 246-44-90; e-mail: o-panas@mail.ru

<sup>\*</sup>Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency,  
ul. Malaya Pirogovskaya 1a, Moscow, 119435 Russia

<sup>\*\*</sup>Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti 4, Minsk, 220030 Belarus

<sup>\*\*\*</sup>Institute of Experimental Medicine, ul. Academica Pavlova 12, Saint Petersburg, 197376 Russia

In this work spectrophotometry, mass spectrometry and fluorescence spectroscopy methods were used to investigate interaction of the oxazine dye gallocyanine with reactive oxygen ( $\cdot\text{O}_2^-$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and halogen ( $\text{HOCl}$ ) species. It was shown that gallocyanine reacts with  $\text{HOCl}$  and  $\cdot\text{O}_2^-$  but not with  $\text{H}_2\text{O}_2$  to form fluorescent products. Using inhibitory analysis it was found that both in xanthine/xanthine oxidase and in activated human blood neutrophil systems, reaction with  $\cdot\text{O}_2^-$  is responsible for gallocyanine conversion to fluorescent form. Results obtained in this study suggest that gallocyanine can act as a fluorogenic chemosensor for assessing neutrophil activation, NADPH-dependent production of superoxide anion radicals by these and other blood cells, as well as for testing antioxidant drugs, designed to intervene in disease associated with oxidative stress.

**Keywords:** gallocyanine, reactive oxygen species, reactive halogen species, oxidative stress, superoxide anion radical, hypochlorous acid, fluorescence