

УДК 577.27:576.524:577.352.465

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО АТР НА ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОТВЕТЫ ГРАНУЛОЦИТОВ КОСТНОГО МОЗГА МЫШИ

© 2019 г. Д. А. Серов^a, *, М. Е. Асташев^a, И. В. Тихонова^a, В. Г. Сафронова^a

^aИнститут биофизики клетки Российской академии наук — обособленное подразделение
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр
“Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук”,
Институтская ул., 3, Пушкино, Московская обл., 142290, Россия

*e-mail: dmitriy_serov_91@mail.ru

Поступила в редакцию 17.04.2019 г.

После доработки 17.07.2019 г.

Принята к публикации 18.07.2019 г.

Внеклеточный АТР — мощный воспалительный медиатор и регулятор активности нейтрофильных гранулоцитов (нейтрофилов) в очаге воспаления, роль которого в регуляции функционально интактных гранулоцитов костного мозга не изучена. Исследовано влияние АТР на динамику изменения концентрации ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в цитоплазме, генерацию активных форм кислорода (АФК) и адгезию гранулоцитов. Изменение $[Ca^{2+}]_i$ оценивали методом флуоресцентной видеомикроскопии с использованием Fura-2 АМ. Поиск клеток с кальциевой активностью проводили с помощью разработанной нами автоматизированной процедуры. АФК регистрировали с использованием метода люминол-зависимой хемилюминесценции. Адгезию оценивали в стандартном адгезионном тесте. В популяции гранулоцитов мыши идентифицированы клетки, отвечавшие генерацией кальциевых спайков на 10 мкМ АТР ($35.2 \pm 4.0\%$). Автоматизированный поиск позволил выделить четыре субпопуляции клеток: без кальциевой активности ($53.1 \pm 8.2\%$), отвечавших на АТР ($23.4 \pm 4.9\%$), на добавку раствора Хенкса ($16.9 \pm 2.5\%$), на АТР и раствор Хенкса ($6.7 \pm 1.5\%$). АТР значительно усиливал адгезию гранулоцитов. Апираза, гидролизующая эндогенный АТР, не вызвала значительных изменений адгезии. АТР не влиял на дыхательный взрыв, индуцированный бактериальным пептидом N-формил-MLF (fMLF). Ответ на fMLF значительно усиливался под действием апиразы, в присутствии цитохалазина D данный эффект не наблюдался. Таким образом, экзогенный АТР усиливал генерацию кальциевых спайков в популяции гранулоцитов костного мозга мыши и их адгезионные свойства. Вероятно, частичное подавляющее действие эндогенного АТР на дыхательный взрыв обусловлено механизмом, вовлекающим цитоскелет.

Ключевые слова: нейтрофильные гранулоциты, АТР, цитоплазматический кальций, адгезия, дыхательный взрыв

DOI: 10.1134/S0233475519060094

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофильные гранулоциты (нейтрофилы) являются ключевыми эффекторами врожденного иммунитета, они играют важную роль в инактивации патогенов. Нейтрофилы выполняют многочисленные функции, включая фагоцитоз, деградацию, генерацию активных форм кислорода (АФК) [1], а также участвуют в функционировании адаптивного иммунитета [2]. Известно, что даже у одного вида животных состояние нейтрофилов зависит от их локализации [3]. Гранулоциты костного мозга отличаются от гранулоцитов из очага острого воспаления, активированных *in vivo*, интактным статусом.

Внеклеточный АТР, высвобождаемый при инфекции, механическом повреждении тканей,

апоптозе или некрозе клеток, является одним из ключевых активаторов иммунных клеток [4, 5]. В ряде случаев сами нейтрофилы могут быть источником АТР, который высвобождается через поры, образованные коннексином 43, в частности, при стимуляции бактериальным пептидом N-формил-Met-Leu-Phe (fMLF) [6]. Секретируемый АТР усиливал миграцию и активируемый fMLF дыхательный взрыв нейтрофилов мыши, выделенных из очага острого воспаления [7]. Его действие на гранулоциты костного мозга не исследовано.

Нейтрофилы человека экспрессируют широкий спектр пуриновых рецепторов, чувствительных к АТР: P2X1, P2X5, P2X7, P2Y2, P2Y6, P2Y11 [8–12]. На нейтрофилах мыши локализованы ре-

цепторы P2X₁, P2X₇ и P2Y₂ [9, 10, 13]. Рецептор P2X₇ обнаружен на гранулоцитах костного мозга мыши, P2X₁ и P2Y₂ — на нейтрофилах из очага воспаления. Рецепторы семейства P2X представляют собой тримерные лиганд-управляемые катионные каналы, рецепторы семейства P2Y — семидоменные трансмембранные рецепторы, ассоциированные с G-белками [8]. Активация рецепторов семейств P2X и P2Y приводит к увеличению концентрации кальция в цитоплазме, запуску внутриклеточных сигнальных каскадов, регулирующих функциональные ответы гранулоцитов: хемотаксис, адгезию, продукцию АФК [7, 13, 14]. Цитоплазматический кальций является универсальным вторичным мессенджером, регулирующим β 2-интегрин-зависимую адгезию нейтрофилов [15], сборку NADPH-оксидазы и генерацию АФК [16]. Концентрация ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в цитоплазме служит важной характеристикой функциональной активности нейтрофилов. Экспрессия рецепторов P2X₂ и P2Y₂ на нейтрофильных гранулоцитах костного мозга и их участие в регуляции функциональных ответов на АТР не исследованы.

В работах, посвященных влиянию АТР на функции нейтрофилов из очага воспаления, не учитывали неоднородность популяции нейтрофилов [7, 10]. Однако накапливаются факты, показывающие фенотипическую гетерогенность и функциональную многосторонность популяции нейтрофилов [17]. Получены экспериментальные данные, указывающие на неоднородность экспрессии поверхностных маркеров в популяции нейтрофилов (например, CD16, CD11b) и продукции АФК в ответ на fMLF [18]. Описаны нейтрофилы нормальной плотности с классической провоспалительной активностью и нейтрофилы пониженной плотности, проявляющие иммуносупрессирующие свойства [19, 20]. Ранее мы обнаружили неоднородность популяции гранулоцитов из очага острого воспаления по чувствительности к никотину: только 30% клеток отвечали на никотин генерацией кальциевых спайков [21]. Вопрос о неоднородности популяции нейтрофильных гранулоцитов по чувствительности к другим биологически активным веществам, в частности к АТР, на сегодняшний день остается открытым. В настоящей работе исследовано влияние АТР на функциональные ответы гранулоцитов в популяции в целом, оценена неоднородность популяции по динамике изменения $[Ca^{2+}]_i$ в ответ на АТР. Рассмотрены такие функциональные ответы, связанные с изменением $[Ca^{2+}]_i$, как генерация АФК и адгезия.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использовали аденозин-5'-трифосфат (АТР), бактериальный пептид N-формил-MLF (fMLF), АТР-дифосфогидролазу ([EC 3.6.1.5], апираза), цитохалазин D, 5-амино-2,3-дигидро-1,4-фталазиндион (люминол), перколл (все Sigma Aldrich, США); двухволновой кальций-чувствительный зонд Fura-2 AM (Thermo Fisher Scientific, США), культуральную среду RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), антитела (клон RB6-8C5) к рецептору Ly-6G/Ly-6C (Gr-1), меченные фикоэритрином (PE) (Bio-Legend, США), бисбензидин Н 33258 (2-[2-(4-гидроксифенил)-6-бензимидазол]-6-(1-метил-4-пиперазил)-бензимидазол) (Merck/Millipore, Германия), краситель Романовского-Гимза (Минимед-Р, Россия), этанол, изопропанол (Эпифань, Тульская обл., Россия).

Животные. В исследовании использованы мыши-самцы линии BALB/c массой 22–30 г. Животные были приобретены в питомнике лабораторных животных “ПУЩИНО” (ФИБХ РАН, Пущино, Россия). Все эксперименты проведены в соответствии с протоколами, одобренными комитетом по этике Института биофизики клетки РАН (No.12306, 2006). Животные были адаптированы к конвенциональным условиям и получали питье и корм *accessio libero*.

Изоляция гранулоцитов. Гранулоциты костного мозга выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности перколла по стандартной методике [21]. Выделенные клетки промывали и ресуспендировали в среде Хенкса (мМ): 138 NaCl, 6 KCl, 1 MgSO₄, 1 Na₂HPO₄, 5 NaHCO₃, 5.5 глюкоза, 10 HEPES, pH 7.3. Клетки хранили при 4°C в течение 1 ч перед началом эксперимента. Нейтрофильные гранулоциты идентифицировали по окрашиванию антителом к Gr-1, меченным PE, и форме ядра, которое окрашивали с помощью бисбензидина Н 33258. Доля сегментоядерных Gr-1+ клеток составляла более 80%. Выживаемость клеток, оцениваемая по окраске трипановым синим, составляла 98–100%.

Оценка концентрации ионов кальция в цитоплазме гранулоцитов. Влияние АТР на динамику концентрации свободного кальция в цитоплазме определяли по следующему протоколу: клетки (10⁶ клеток/мл) наносили на круглое покровное стекло (диаметр 25 мм) в капле полного сбалансированного солевого раствора Хенкса объемом 100 мкл и инкубировали во влажной камере в течение 20 мин при 37°C для прикрепления. Клетки окрашивали 5 мкМ Fura-2 AM в течение 45 мин при 37°C в присутствии апиразы (1 ед. акт. мл⁻¹) для удаления эндогенного АТР.

Непосредственно перед измерением стекло с клетками помещали в камеру для покровных стекол (Warner Instruments, США), трижды промывали 1 мл раствора Хенкса. Регистрировали флуоресценцию клеток в поле зрения при возбуждающих длинах волн 340 (F340) и 380 (F380) нм с помощью флуоресцентной имиджинг-системы, собранной Асташевым М.Е. [22]. Измерения проводили при постоянном протоке солевой среды и термостатировании при 37°C, что обеспечивалось подогревом предметного столика с камерой для покровных стекол и подаваемых растворов. В каждом эксперименте оценивали $[Ca^{2+}]_i$ без воздействий (базовый уровень) в течение 1 мин после добавки раствора Хенкса (контроль, 1 мин) или 10 мкМ АТР (2 мин).

Запись и первичную обработку данных проводили с помощью программного обеспечения WinFluorXE (J. Demster, Strathclyde Electrophysiology Software, Великобритания), дальнейшую обработку — с помощью программы ImageJ (NIH, США). Изменение $[Ca^{2+}]_i$ оценивали по отношению F340/F380. Для автоматического поиска клеток с кальциевыми спайками использовали программу, основанную на расчете статистических моментов третьего (асимметрия, As) и четвертого (эксцесс, Ex) порядков для распределения значений F340/F380 по частоте встречаемости в записи от каждой отдельной клетки [23].

Кальциевые спайки представляют собой транзистентные сигналы: кратковременное увеличение исследуемого параметра (F340/F380) с последующим восстановлением до исходного уровня. В астрофизике для поиска транзистентных сигналов применяется подход, основанный на рассмотрении последовательности измерений динамической характеристики в виде набора индивидуальных независимых измерений. В этом случае проводят анализ формы распределения значений исследуемого параметра по частоте встречаемости путем вычисления статистических характеристик распределения — моментов [24]. Формула для вычисления момента n -го порядка μ_n имеет вид:

$$\mu_n = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^n,$$

где $\bar{x}$ — среднее арифметическое ряда данных, N — количество изменений.

Второй момент μ_2 — это среднеквадратическое отклонение, применяемое как мера размаха ряда данных. Моменты более высоких порядков также имеют геометрический смысл для описания формы распределения. Третий момент μ_3 позволяет

вычислить безразмерную величину асимметрии (As) распределения:

$$As = \frac{\mu_3}{\mu_2^{3/2}}.$$

Величина As показывает степень асимметричности формы распределения. При наличии транзистентных сигналов в экспериментальной записи величина As будет принимать положительные значения, при отсутствии — колебаться около нуля [25].

Четвертый момент μ_4 позволяет оценить безразмерную величину эксцесса (Ex). Величина Ex характеризует островершинность или плосковершинность распределения [24, 26]. В случае появления транзистентных сигналов данная величина принимает положительные значения, при отсутствии транзистентных сигналов — варьирует около нуля.

$$Ex = \frac{\mu_4}{\mu_2^2} - 3.$$

Величины As и Ex рассчитывали по указанным формулам. В каждом образце анализировали не менее 500 клеток. Для каждой клетки в автоматическом режиме строили временной ряд F340/F380 и вычисляли значения As и Ex для всех вариантов эксперимента: As_0 , Ex_0 (база), As_1 , Ex_1 (добавка раствора Хенкса) и As_2 , Ex_2 (добавка 10 мкМ АТР). Строили двумерные гистограммы распределения клеток в системах координат: As_0Ex_0 , As_1Ex_1 , As_2Ex_2 . В каждом эксперименте выделяли область, соответствующую клеткам с транзистентными кальциевыми ответами, и подсчитывали количество клеток, попадающих в выделенную область, оценивая таким способом долю активности клеток (рис. 2а, 2б). Для оценки неоднородности популяции по доле клеток с характерной активностью строили двумерные диаграммы распределения в системе координат As_1As_2 в каждом эксперименте, затем данные усредняли по всем экспериментам (рис. 2в, 2г). Для каждого из экспериментальных условий проведено пять независимых измерений, каждое из которых выполнено на клетках отдельного животного.

Адгезионная проба. Адгезионная проба выполнена по протоколу, описанному ранее [21]. Суспензию гранулоцитов (по 3×10^5 клеток) добавляли в лунки 96-луночного планшета (Corning, США), содержащие раствор Хенкса с добавлением 1 мМ Ca^{2+} . В определенные лунки предварительно добавляли 10 мкМ АТР или апиразу (1 ед. акт. мл⁻¹). После фиксации 96% этанолом, окрашивания красителем Романовского-Гимза и лизиса изопропанолом измеряли светопоглощение образцов при длине волны 492 нм (OD_{492}) на

микропланшетном фотометре Infinity F50 (Tecan, Австрия). Значения OD_{492} в каждом образце нормировали по значениям OD_{492} , полученным на контрольных клетках. Проведено шесть независимых измерений, каждое из которых выполнено на клетках отдельного животного.

Оценка продукции АФК. Продукцию АФК гранулоцитами оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции (ХЛ) по стандартной методике [21]. Для каждого измерения готовили 12 образцов: рабочий объем 200 мкл, 2×10^5 клеток в среде Хенкса, содержащей 1 мМ Ca^{2+} и 0.35 мМ люминол. Образцы инкубировали в присутствии 10 мкМ АТР или апиразы (1 ед. акт. мл⁻¹) или апиразы (1 ед. акт. мл⁻¹) в сочетании с 5 мкМ цитохалазином D в течение 20 мин при 37°C. Контролем служили клетки, инкубируемые без добавок. ХЛ регистрировали на приборе ХЕМИ-ЛЮМ-12, разработанном Санталовым Б.Ф. (ИБК РАН, Пушкино). После регистрации базового уровня ХЛ инициировали респираторный взрыв 5 мкМ fMLF. Образование АФК оценивали по максимальному и интегральному значениям интенсивности ХЛ (интенсивность и продукция АФК соответственно). Продукцию АФК рассчитывали за 50 с после стимуляции fMLF. Эффект исследуемого вещества рассчитывали как отношение параметра, полученного от клеток, обработанных исследуемым агентом, к параметру контрольных клеток, принятому за 100%.

Статистическая обработка результатов. Результаты обрабатывали с помощью программы Sigma-Plot (Systat Software, Cranes Software International Ltd.). Экспериментальные данные представлены в виде среднего значения со стандартной ошибкой. Статистическую значимость различий оценивали по критерию Вилкоксона.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Ca²⁺-активность

В популяции гранулоцитов до воздействий присутствовали клетки со спонтанной кальциевой активностью (рис. 1а) и без нее (рис. 1б). Распределение значений F340/F380 в клетках без исходной кальциевой активности имело вид симметричных пиков и характеризовалось величинами $As \leq 0.6$ и $Ex \approx 0$ (рис. 1г). Клетки, генерирующие кальциевые спайки, характеризовались распределениями F340/F380 со значениями $As > 0.6$ и $Ex > 0$. Распределения F340/F380 активных клеток были шире по сравнению с распределениями неактивных клеток и имели форму множественных пиков (рис. 1в). Таким образом, по значениям As , отражающим форму распределения F340/F380, можно оценивать наличие каль-

циевых спайков в каждой отдельной клетке. Часть клеток отвечала генерацией Ca^{2+} -спайка на добавление раствора Хенкса и/или реагировала на последующую аппликацию 10 мкМ АТР (рис. 1д). Ответы клеток не были синхронными и происходили с лаг-периодом, длительность которого варьировала. В популяции присутствовали клетки, не отвечающие на добавку АТР (рис. 1е).

Во всех экспериментальных условиях распределение клеток в координатах As и Ex имело подковообразную форму (пример на рис. 2а). Клетки, не проявлявшие Ca^{2+} -мобилизующей активности, находились в основании “подковы”, характеризовались значениями Ex и As , близкими к 0. Отрицательные значения As со значениями $Ex > 10$ характерны для клеток с непрерывным монотонным увеличением $[Ca^{2+}]_i$ (“натекающие” клетки). При дальнейшем анализе указанные клетки не учитывались (рис. 2а). Клетки, ответившие на 10 мкМ АТР кальциевыми спайками, идентифицировали по значениям $As > 0.6$ и $Ex > 0$. Статистический анализ показал, что до каких-либо воздействий кальциевая активность присутствует в среднем у $17.1 \pm 2.7\%$ клеток (рис. 2б). На добавку раствора Хенкса реагировали $23.0 \pm 2.5\%$ гранулоцитов. Доля гранулоцитов, ответивших на 10 мкМ АТР, составляла $35.2 \pm 4.0\%$, что было статистически выше количества активных клеток при базовых условиях или при добавке раствора Хенкса ($n = 5$, $p < 0.05$). Полученные данные указывают на присутствие субпопуляции гранулоцитов с высокой чувствительностью к АТР.

Далее мы проанализировали полученные данные в координатах As_1As_2 , т.е. для каждой клетки были сопоставлены значения асимметрии после добавки раствора Хенкса без АТР и в его присутствии (рис. 2в). Были выделены четыре субпопуляции клеток: 1) без Ca^{2+} -активности в ходе всего эксперимента; 2) генерирующие Ca^{2+} -спайки в ответ на добавку раствора Хенкса (механическое воздействие); 3) генерирующие Ca^{2+} -спайки в ответ на 10 мкМ АТР; 4) генерирующие Ca^{2+} -спайки в ответ на АТР и добавку раствора Хенкса. Оказалось, что к первой группе относится $53.1 \pm 8.2\%$ клеток, ко второй — $16.9 \pm 2.5\%$, к третьей — $23.4 \pm 4.9\%$, к четвертой — $6.7 \pm 1.5\%$ (рис. 2г). Таким образом, популяция гранулоцитов костного мозга неоднородна по способности клеток генерировать кальциевые спайки в ответ на АТР.

Функциональные ответы

Далее мы исследовали влияние АТР на функции, в которых участвует Ca^{2+} -сигнализация: адгезия и дыхательный взрыв [15, 16]. Мы оценивали эффект АТР на популяцию изолированных

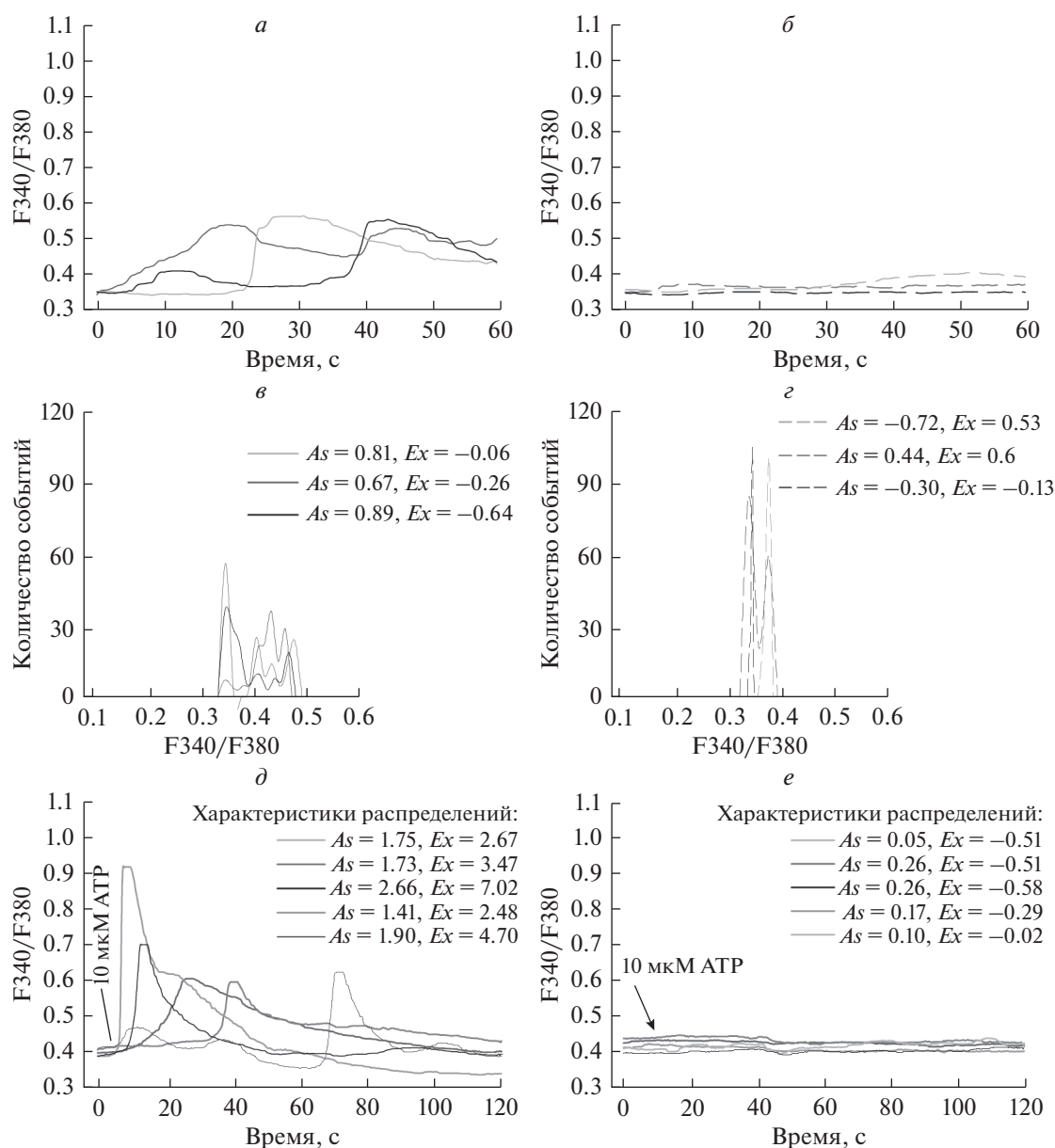


Рис. 1. Кальциевая активность в популяции гранулоцитов костного мозга мыши и ее анализ. Примеры записей F340/F380 клеток со спонтанной кальциевой активностью (а) и без нее (б). Примеры распределений значений F340/F380 по частоте встречаемости для активных (в) и неактивных (з) клеток. Примеры записей F340/F380 одиночных клеток, ответивших (д) или не ответивших (е) кальциевыми спайками на 10 мкМ АТР (момент добавки отмечен стрелкой). В блоках в, з, д, е указаны значения асимметрии (As) и эксцесса (Ex) для распределения значений F340/F380 по частоте встречаемости.

гранулоцитов костного мозга в целом. Известно, что гранулоциты разных фенотипов в популяции могут проявлять себя специфическим образом в функциональных ответах [27, 28]. Однако изучение реакций отдельных групп клеток требует дополнительных процедур механического разделения, что не входило в задачи данной работы.

Гранулоциты реагировали на 10 мкМ АТР усилением адгезии практически в 2 раза по сравнению с контрольными клетками (рис. 3). Апираза

(1 ед. акт. мл⁻¹) не оказывала значительного влияния на адгезию, что указывает на отсутствие влияния эндогенного АТР на адгезию гранулоцитов, тогда как экзогенный АТР может значительно модифицировать адгезионные свойства гранулоцитов.

Добавление 10 мкМ АТР не влияло на базовый уровень генерации АФК гранулоцитами и не инициировало респираторный взрыв. Респираторный взрыв, инициированный 5 мкМ fMLF, не

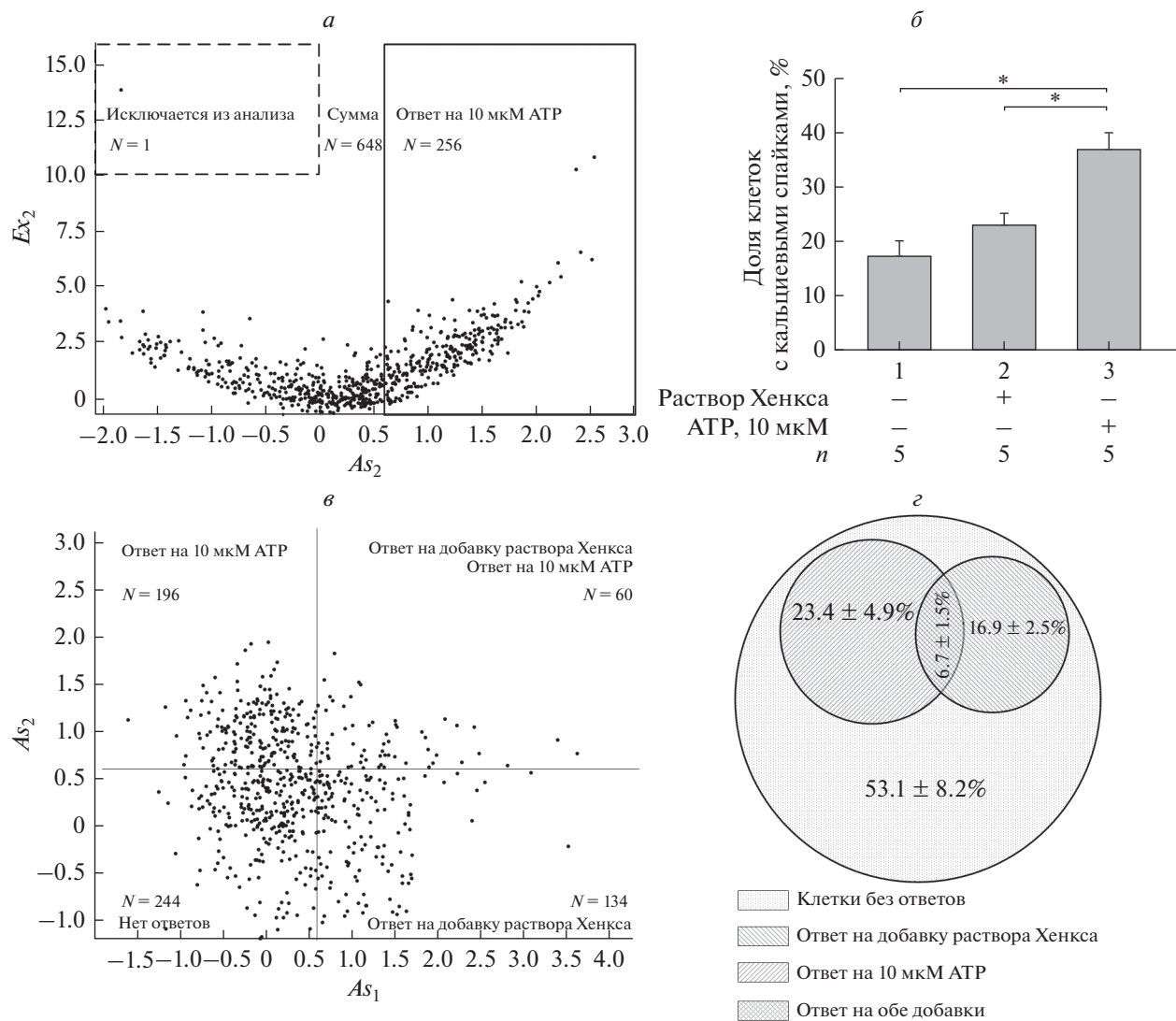


Рис. 2. Анализ гетерогенности популяции гранулоцитов костного мозга мыши. *а* — Двумерная гистограмма распределения клеток по асимметрии As_2 и эксцессу Ex_2 , рассчитанных для распределений F340/F380 клеток в одной из анализируемых популяций в присутствии 10 мкМ АТР. На гистограмме отображены параметры клеток после подачи 10 мкМ АТР. Выделенная сплошной линией область — клетки с характеристиками $As > 0.6$ и $Ex > 0$. Выделенная пунктиром область — клетки с характеристиками $As \leq 0$ и $Ex > 10$, N — количество клеток, попавших в выделенные области. *б* — Среднее значение доли клеток с кальциевыми спайками в популяции при базовых условиях (1), после добавки раствора Хенкса (2) или в присутствии 10 мкМ АТР (3), $p < 0.05$, $n = 5$. *в* — Двумерная гистограмма распределения клеток в системе координат As_1 (подача раствора Хенкса) и As_2 (10 мкМ АТР): слева внизу ($As_1 \leq 0.6$, $As_2 \leq 0.6$) — неактивные клетки; справа внизу ($As_1 > 0.6$, $As_2 \leq 0.6$) — клетки, ответившие кальциевыми спайками только на добавку раствора Хенкса; слева сверху ($As_1 \leq 0.6$, $As_2 > 0.6$) — клетки, ответившие только на 10 мкМ АТР; справа сверху ($As_1 > 0.6$, $As_2 > 0.6$) — клетки, ответившие на обе добавки. N — количество клеток в каждой из четвертей (всего 634 клетки). *г* — Диаграмма, отражающая усредненное соотношение гранулоцитов костного мозга мыши по чувствительности к 10 мкМ АТР и/или механическому воздействию (добавка раствора Хенкса). В каждом образце анализировали не менее 500 клеток.

изменялся при действии 10 мкМ АТР (рис. 4а). Предварительная инкубация клеток с апиразой (1 ед. акт. мл⁻¹) статистически значимо увеличивала амплитуду ответа и продукцию АФК в ответ на 5 мкМ fLMF (рис. 4б). При совместном действии апиразы и 5 мкМ цитохалазина D ответ на 5 мкМ fLMF не изменялся по сравнению с ответом контрольных клеток (рис. 4в, 4г), что указы-

вает на участие актинового цитоскелета в регуляции эндогенным АТР продукции АФК гранулоцитами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно результатам работы, АТР участвует в регуляции активности гранулоцитов костного мозга: экзогенный АТР вызывает генерацию

кальциевых спайков в $35.2 \pm 4.0\%$ клеток и в 2 раза усиливает адгезивные свойства; эндогенный АТР, вероятно, регулирует интенсивность дыхательного взрыва по механизму, вовлекающему цитоскелет (рис. 5).

В популяции гранулоцитов содержатся клетки с разной чувствительностью к АТР. Неоднородность клеток по чувствительности к АТР проявлялась не только в наличии или отсутствии кальциевого ответа, но отражалась на временных характеристиках ответов (рис. 1д). Часть клеток отвечала на АТР с незначительной задержкой после подачи стимула, другая часть — с задержкой около минуты. Кальциевые ответы в течение первых секунд после добавки АТР, вероятно, вызваны активацией ионотропных рецепторов семейства P2X [9]. Кальциевые спайки, возникшие с задержкой после добавки АТР, возможно, обусловлены активацией метаболитических рецепторов семейства P2Y либо внутриклеточного сигнального каскада, запускаемого входом кальция через рецепторы семейства P2X [8]. Предположение основано на экспериментальном определении экспрессии рецепторов семейств P2X и P2Y в гранулоцитах [7–10, 28]. Разнородность гранулоцитов по чувствительности к АТР, возможно, объясняется присутствием в популяции клеток с разным набором и уровнями экспрессии рецепторов семейств P2X и/или P2Y. Также могут играть роль другие факторы, в частности, экспрессия поверхностных маркеров зрелости [7, 19]. Идентификация типов рецепторов, регулирующих функциональные ответы гранулоцитов мыши, требует дальнейших исследований.

Мы впервые применили автоматизированный алгоритм поиска клеток с кальциевыми спайками в популяции на основе анализа статистических моментов третьего и четвертого порядков. Данный подход снижает время, затрачиваемое на обработку данных, и исключает субъективную интерпретацию анализируемых сигналов, что зачастую происходит при выборе клеток вручную.

Обнаруженная нами группа гранулоцитов, отвечающая кальциевыми спайками на добавку раствора Хенкса, вероятно, обладает высокой чувствительностью к напряжению сдвига, что усиливает адгезию нейтрофилов к эндотелию и эндотелиальной трансмиграции [30]. Напряжение сдвига вызывает увеличение экспрессии CD11b/CD18 на нейтрофилах человека и изменение их морфологии, а также усиливает эффект фактора активации тромбоцитов на указанные параметры [31].

Нами впервые обнаружено усиление адгезии гранулоцитов костного мозга мыши в ответ на АТР (рис. 3). Полученный результат согласуется с данными, полученными на изолированных ней-

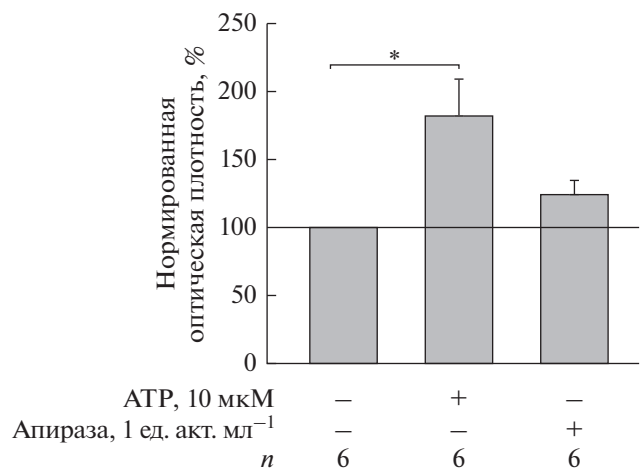


Рис. 3. Влияние АТР на адгезию гранулоцитов костного мозга. АТР вносили в конечной концентрации 10 мкМ, апиразу — 1 ед. акт. мл⁻¹. Эффект исследуемого вещества рассчитывали как отношение параметра, полученного от клеток, обработанных данным агентом, к параметру контрольных клеток, принятому за 100%. * $p < 0.05$, $n = 6$.

трофилах человека [8, 32]. Показано, что в нейтрофилах мыши действие АТР может быть опосредовано рецепторами P2X1 [13]. Усиление адгезии гранулоцитов в ответ на АТР, вероятно, связано с увеличением доли клеток с кальциевыми спайками (рис. 1 и 2), так как известно, что кальциевая сигнализация регулирует функционирование интегринов и адгезию клеток [33].

Нами показано, что 10 мкМ АТР не модифицировал вызванную fMLF продукцию АФК гранулоцитами костного мозга мыши (рис. 4). Однако обнаружено усиление продукции АФК нейтрофилами периферической крови человека под действием АТР [7]. Авторы оценивали продукцию АФК по изменению мембранного потенциала митохондрий. Расхождение наших результатов с этими данными может объясняться различиями в исследуемых объектах и в методике оценки продукции АФК. Показано также, что АТР вызывает генерацию кальциевых спайков в нейтрофилах человека, но не индуцирует заметного усиления активности NADPH-оксидазы [14], что согласуется с нашими результатами. Противоречие между увеличением $[Ca^{2+}]_i$ под влиянием АТР и отсутствием эффекта АТР на уровень продукции АФК частично можно объяснить тем, что нейтрофилы несут на своей поверхности эктоапиразы CD39 и CD73, которые гидролизуют АТР до АМР и АМР до аденозина соответственно [34, 35]. Таким образом, внесение АТР может привести к активации не только рецепторов семейств P2X или P2Y, но и рецепторов аденозина (AR) [36]. Аденозин распознается рецепторами A_{2B} и A₃, активаци-

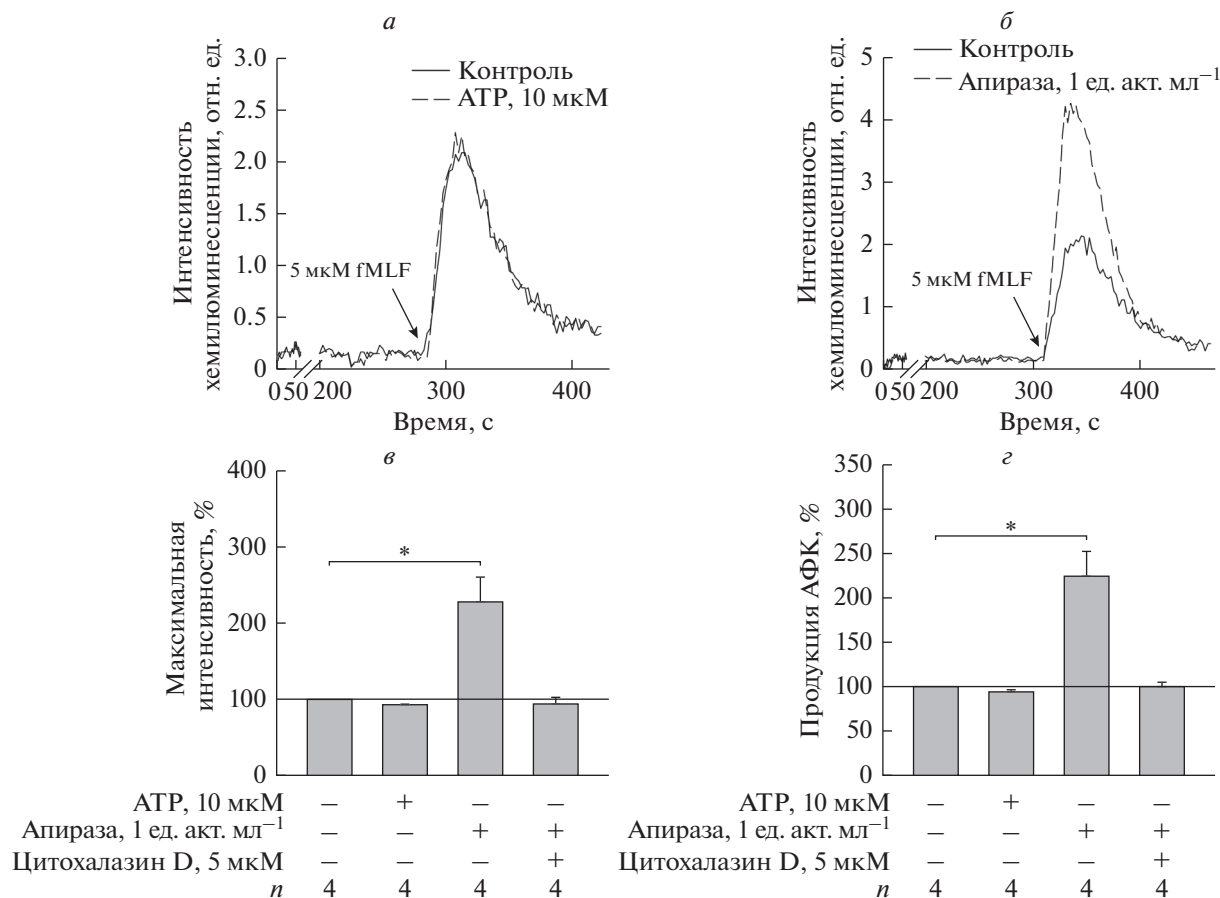


Рис. 4. Влияние АТР на вызванный fMLF дыхательный взрыв гранулоцитов костного мозга мыши. Дыхательный взрыв инициировали 5 мкМ fMLF (отмечено стрелкой). Пробы предварительно инкубировали без добавок (контроль) или с 10 мкМ АТР, или с апиразой (1 ед. акт. мл⁻¹), или с 5 мкМ цитохалазином D в течение 20 мин во влажной камере при 37°C. Приведены примеры экспериментальных записей люминол-зависимой хемилюминесценции в ответ на fMLF в контроле и после инкубации с АТР (а) или апиразой (б) в течение 20 мин, момент добавки fMLF показан стрелкой. в — Действие АТР, апиразы и цитохалазина D на максимальную интенсивность люминол-зависимой хемилюминесценции, вызванной fMLF. г — Действие АТР, апиразы и цитохалазина D на продукцию АФК в течение 50 с после добавки fMLF. Эффект исследуемого вещества рассчитывали как отношение параметра, полученного от клеток, обработанных данным агентом, к параметру контрольных клеток, принятому за 100%. * $p < 0.05$, $n = 6$.

ция которых снижает продукцию АФК нейтрофилами [36, 37]. При этом полного ингибирования дыхательного взрыва не происходит, потому что на мембране нейтрофилов экспрессирована F0F1-АТР-синтаза, катализирующая синтез АТР *de novo* [38]. Отсутствие эффекта экзогенного АТР на респираторный взрыв гранулоцитов может объясняться балансом регуляторного действия рецепторов АТР и аденозина на активность NADPH-оксидазы [5]. Нельзя исключить также влияние адгезии на дыхательный взрыв [39]. Обнаружено, что адгезия нейтрофилов человека, праймированных липополисахаридом, к необработанной поверхности ингибировала дыхательный ответ на 1 мкМ fMLF [40]. Вероятно, полученные результаты также объясняются ингибирующим влиянием адгезии на генерацию АФК

гранулоцитами костного мозга мыши при действии АТР.

Апираза усиливала ответ гранулоцитов на fMLF (рис. 4), что может указывать на роль эндогенного АТР в отрицательной регуляции продукции АФК гранулоцитами мыши. Показано, что стимуляция нейтрофилов fMLF приводит к секреции эндогенного АТР через поры, образованные коннексином 43 [6, 7]. Цитохалазин D блокировал эффект апиразы на респираторный взрыв (рис. 4), что указывает на совместное функционирование пуриновых рецепторов и цитоскелета в регуляции продукции АФК гранулоцитами костного мозга. Взаимосвязь с цитоскелетом свойственна рецепторам, сопряженным с G-белками [41]. Наличие лаг-периода в кальциевых ответах (рис. 1) свидетельствует в пользу участия ассоциированных с G-белками рецепторов P2Y1

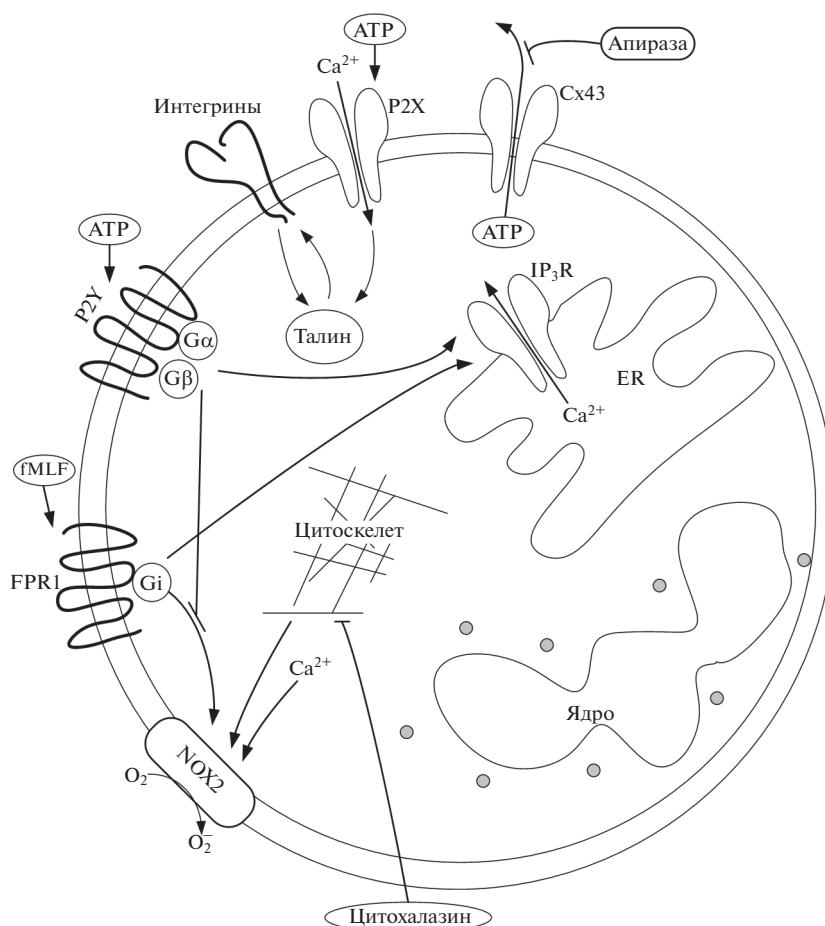


Рис. 5. Схематическое представление компонентов АТФ-зависимых сигнальных путей в гранулоцитах костного мозга.

и/или запуска внутриклеточных сигнальных каскадов ионами Ca^{2+} , поступившими в клетку через рецепторы P2X. Ранее было показано, что активный цитоскелет гранулоцитов костного мозга участвует в регуляции продукции АФК, активируемой через низкоаффинные рецепторы формилпептидов mFPR2 и RhoA/ROCK-сигнальный путь [42], поэтому блокирование действия апиразы цитохалазином D, возможно, частично обусловлено его влиянием на сигнализацию mFPR2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

АТФ влияет на кальциевые ответы, адгезию и респираторный взрыв гранулоцитов костного мозга мыши. Выявлена неоднородность популяции клеток по чувствительности к АТФ, которая проявлялась, в частности, в генерации кальциевых спайков. Экзогенный АТФ усиливал адгезию гранулоцитов и не влиял на fMLF-индуцированную продукцию АФК. Эндогенный АТФ, вероят-

но, действует как отрицательный регулятор активности NADPH-оксидазы.

Авторы благодарят Е.А. Вульфийс за обсуждение статьи и конструктивную критику, Б.Ф. Санталова за разработку и техническую поддержку прибора ХЕМИЛЮМ-12, А.А. Гриневича за разработку программного обеспечения для анализа данных по хемилюминесценции, М.В. Васильчикову и М.А. Грабарскую за техническую помощь при проведении экспериментов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ № 17-00-00058 в рамках проекта № 17-00-00064 (КОМФИ).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gretchen S., Selders G.S., Fetz A.E., Radic M.Z., Bowlin G.L. 2017. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regen. Biomater.* **4** (1), 55–68.
2. Rosales C., Lowell C.A., Schnoor M., Uribe-Querol E. 2017. Neutrophils: Their role in innate and adaptive immunity. *J. Immunol. Res.* **2017**, 9748345. doi 10.1155/2017/9748345

3. Itou T., Collins L.V., Thorén F.B., Dahlgren C., Karlsson A. 2006. Changes in activation states of murine polymorphonuclear leukocytes (PMN) during inflammation: A comparison of bone marrow and peritoneal exudate PMN. *Clin. Vaccine Immunol.* **13** (5), 575–583.
4. Cekic C., Linden J. 2016. Purinergic regulation of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **16** (3), 177–192.
5. Wang X., Chen D. 2018. Purinergic regulation of neutrophil function. *Front. Immunol.* **9**, 399. doi 10.3389/fimmu.2018.00399
6. Eltzschig H.K., Eckle T., Mager A., Kuper N., Karcher C., Weissmuller T., Boengler K., Schulz R., Robson S.C., Colgan S.P. 2006. ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ. Res.* **99** (10), 1100–1108.
7. Bao Y., Ledderose C., Graf A.F., Brix B., Birsak T., Lee A., Zhang J., Junger W.G. 2015. mTOR and differential activation of mitochondria orchestrate neutrophil chemotaxis. *J. Cell. Biol.* **210** (7), 1153–1164.
8. Wang X., Qin W., Xu X., Xiong Y., Zhang Y., Zhang H., Sun B. 2017. Endotoxin induced autocrine ATP signaling inhibits neutrophil chemotaxis through enhancing myosin light chain phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 4483–4488.
9. Karmakar M., Katsnelson M.A., Dubyak G.R., Pearlman E. 2016. Neutrophil P2X7 receptors mediate NLRP3 inflammasome-dependent IL-1 β secretion in response to ATP. *Nat. Commun.* **7**, 10555. doi 10.1038/ncomms10555
10. Chen Y., Corriden R., Inoue Y., Yip L., Hashiguchi N., Zinkernagel A., Nizet V., Insel P.A., Junger W.G. 2006. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P2Y2 and A3 receptors. *Science.* **314** (5806), 1792–1795.
11. Sil P., Hayes C.P., Reaves B.J., Breen P., Quinn S., Sokolove J., Rada B. 2017. P2Y6 receptor antagonist MRS2578 inhibits neutrophil activation and aggregated neutrophil extracellular trap formation induced by gout-associated monosodium urate crystals. *J. Immunol.* **198**, 428–442.
12. Vaughan K.R., Stokes L., Prince L.R., Marriott H.M., Meis S., Kassack M.U., Bingle C.D., Sabroe I., Surprenant A., Whyte M.K. 2007. Inhibition of neutrophil apoptosis by ATP is mediated by the P2Y11 receptor. *J. Immunol.* **179**, 8544–8553.
13. Darbousset R., Delierneux C., Mezouar S., Hego A., Lecut C., Guillaumat I., Riederer M.A., Evans R.J., Dignat-George F., Panicot-Dubois L., Oury C., Dubois C. 2014. P2X1 expressed on polymorphonuclear neutrophils and platelets is required for thrombosis in mice. *Blood.* **124**, 2575–2585.
14. Brasen J.C., Lars Folke Olsen L.F., Hallett M.B. 2011. Extracellular ATP induces spikes in cytosolic free Ca²⁺ but not in NADPH oxidase activity in neutrophils. *Biochim. Biophys. Acta.* **1813**, 1446–1452.
15. Schaff U.Y., Yamayoshi I., Tse T., Griffin D., Kibathi L., Simon S.I. 2008. Calcium flux in neutrophils synchronizes β 2 integrin adhesive and signaling events that guide inflammatory recruitment. *Ann. Biomed. Eng.* **36** (4), 632–646.
16. Brechard S., Tschirhart E.J. 2008. Regulation of superoxide production in neutrophils: Role of calcium influx. *J. Leukoc. Biol.* **84** (5), 1223–1237.
17. Silvestre-Roig C., Hidalgo A., Soehnlein O. 2016. Neutrophil heterogeneity: Implications for homeostasis and pathogenesis. *Blood.* **127** (18), 2173–2181.
18. Pillay J., Ramakers B.P., Kamp V.M., Loi A.L.T., Lam S.W., Hietbrink F., Leenen L.P., Toolb A.T., Pickkers P., Koenderman L. 2010. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J. Leukoc. Biol.* **88** (1), 211–220.
19. Grieshaber-Bouyer R., Nigrovic P.A. 2019. Neutrophil heterogeneity as therapeutic opportunity in immune-mediated disease. *Front. Immunol.* **10**, 346. doi 10.3389/fimmu.2019.00346
20. Rosales C. 2018. Neutrophil: A cell with many roles in inflammation or several cell types? *Front. Physiol.* **20** (9), 113.
21. Safronova V.G., Vulfius C.A., Shelukhina I.V., Mal'tseva V.N., Berezhnov A.V., Fedotova E.I., Miftahova R.G., Kryukova E.V., Grinevich A.A., Tsetlin V.I. 2016. Nicotinic receptor involvement in regulation of functions of mouse neutrophils from inflammatory site. *Immunobiology.* **221** (7), 761–772.
22. Асташев М.Е. 2017. Open-source установка для микрофлуоресцентного Ca²⁺-анализа. В кн.: *Международная конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация”*. Ред. Зинченко В.П., Бережнов А.В. Пушино, с. 395–400.
23. Асташев М.Е. Серов Д.А., Тихонова И.В., Вульфийс Е.А., Сафронова В.Г. 2019. Анализ распределения клеточной популяции с помощью статистических моментов высокого порядка. Цитометрический подход. В кн.: *Международная конференция “Рецепторы и внутриклеточная сигнализация”*. Ред. Зинченко В.П., Бережнов А.В. Пушино, с. 395–400.
24. Šimberová S., Suk T. 2013. Analysis of dynamic processes by statistical moments of high orders. *Progress in pattern recognition, image analysis, computer vision, and applications. Conf. Proc.* p. 33–40.
25. Козбань А.И. 2006. *Прикладная математическая статистика. Для инженеров и научных работников*. М.: Физматлит. 816 с.
26. Айвазян С.А., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. 1983. *Прикладная статистика: основы моделирования и первичная обработка данных*. М.: Финансы и статистика. 471 с.
27. Leliefeld P.H.C., Pillay J., Vriskoop N., Heeres M., Tak T., Kox M., Rooijakkers S.H.M., Kuijpers T.W., Pickkers P., Leenen L.P.H., Koenderman L. 2018. Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Adv.* **2**, 1344–1455.
28. Uhl B., Vadlau Y., Zuchtriegel G., Nekolla K., Sharaf K., Gaertner F., Massberg S., Krombach F., Reichel C.A. 2016. Aged neutrophils contribute to the first line of defense in the acute inflammatory response. *Blood.* **128**, 2327–2337.
29. Alkayed F., Kashimata M., Koyama N., Hayashi T., Tamura Y., Azuma Y. 2012. P2Y11 purinoceptor medi-

- ates the ATP-enhanced chemotactic response of rat neutrophils. *J. Pharmacol. Sci.* **120**, 288–295.
30. Cinamon G., Shinder V., Shamri R., Alon R. 2004. Chemoattractant signals and $\beta 2$ integrin occupancy at apical endothelial contacts combine with shear stress signals to promote transendothelial neutrophil migration. *J. Immunol.* **173** (12), 7282–7291.
 31. Mitchell M.J., Lin K.S., King M.R. 2014. Fluid shear stress increases neutrophil activation via platelet-activating factor. *Biophys. J.* **106** (10), 2243–2253.
 32. Freyer D.R., Boxer L.A., Axtell R.A., Todd R.F. 3rd. 1988. Stimulation of human neutrophil adhesive properties by adenine nucleotides. *J. Immunol.* **141** (2), 580–586.
 33. Sjaastad M.D., Nelson W.J. 1997. Integrin-mediated calcium signaling and regulation of cell adhesion by intracellular calcium. *Bioessays.* **19** (1), 47–55.
 34. Corriden R., Chen Y., Inoue Y., Beldi G., Robson S.C., Insel P.A., Junger W.G. 2008. Ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1 (E-NTPDase1/CD39) regulates neutrophil chemotaxis by hydrolyzing released ATP to adenosine. *J. Biol. Chem.* **283**, 28480–28486.
 35. Lennon P.F., Taylor C.T., Stahl G.L., Colgan S.P. 1998. Neutrophil-derived 5'-adenosine monophosphate promotes endothelial barrier function via CD73-mediated conversion to adenosine and endothelial A2B receptor activation. *J. Exp. Med.* **188**, 1433–1443.
 36. Barletta K.E., Cagnina R.E., Burdick M.D., Linden J., Mehrad B. 2012. Adenosine A(2B) receptor deficiency promotes host defenses against gram-negative bacterial pneumonia. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186** (10), 1044–1450.
 37. van der Hoeven D., Wan T.C., Auchampach J.A. 2008. Activation of the A₃ adenosine receptor suppresses superoxide production and chemotaxis of mouse bone marrow neutrophils. *Mol. Pharmacol.* **74** (3), 685–696.
 38. Gao J., Zhang T., Kang Z., Ting W., Xu L., Yin D. 2017. The F0F1 ATP synthase regulates human neutrophil migration through cytoplasmic proton extrusion coupled with ATP generation. *Mol. Immunol.* **90**, 219–226.
 39. Zhao T., Benard V., Bohl B.P., Bokoch G.M. 2003. The molecular basis for adhesion-mediated suppression of reactive oxygen species generation by human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **112** (11), 1732–1740.
 40. Sanui T., Takeshita M., Fukuda T., Tanaka U., Alshargabi R., Aida Y., Nishimura F. 2017. Adhesion attenuates respiratory burst induced by different modes of triggering in resting or LPS-primed neutrophils. *Immunobiology.* **222** (89), 865–871.
 41. Schappi J.M., Krbanjevic A., Rasenick M.M. 2014. Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: Coordination of signaling and structure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838** (2), 674–681.
 42. Filina J.V., Gabdoulkhakova A.G., Safronova V.G. 2014. RhoA/ROCK downregulates FPR2-mediated NADPH oxidase activation in mouse bone marrow granulocytes. *Cell Signal.* **26** (10), 2138–2346.

The Influence of Exogenous ATP on Functional Responses of Murine Bone Marrow Granulocytes

D. A. Serov^{1, *}, M. E. Astashev¹, I. V. Tikhonova¹, V. G. Safronova¹

¹*Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 3, Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia*

**e-mail: dmitriy_serov_91@mail.ru*

Extracellular ATP is a potent inflammatory mediator and a regulator of neutrophil activity in an inflammatory site. The role of ATP in the regulation of bone marrow granulocyte functions remains unexplored. The aim of this work was to study effects of ATP on the cytoplasmic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), generation of reactive oxygen species (ROS), and adhesion of bone marrow granulocytes. Changes of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ were estimated by fluorescence imaging with Fura-2 AM ratiometric probe. For detection of cells with calcium activity in a population we developed an automated procedure based on the calculation of skewness and kurtosis of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ distribution. ROS generation was recorded using luminol-dependent chemiluminescence technique. Cell adhesion was evaluated by a standard absorbance (492 nm) method. The population of bone marrow granulocytes contained cells that generated calcium spikes in response to 10 μM ATP ($35.2 \pm 4.0\%$). Four groups of cells were identified: responding to ATP ($23.4 \pm 4.9\%$), to the addition of Hanks' solution ($16.9 \pm 2.5\%$), to both ATP and Hanks' solution ($6.7 \pm 1.5\%$), and cells not responding to either stimulus ($53.1 \pm 8.2\%$). ATP increased the adhesion of granulocytes, while apyrase, which hydrolyzes ATP, did not significantly change the adhesion. ATP did not influence the respiratory burst initiated by the bacterial peptide N-formyl-MLF (fMLF). Apyrase significantly enhanced the response to fMLF, and cytochalasin D inhibited this effect. In summary, exogenous ATP enhances adhesion and generation of calcium spikes in a population of bone marrow granulocytes. Endogenous ATP likely blocks respiratory burst through a mechanism involving the cytoskeleton. The studied granulocyte population contains cells with different ATP sensitivity.

Keywords: neutrophilic granulocytes, ATP, cytoplasmic calcium, adhesion, respiratory burst