

М.Н. Стародубцева, И.А. Никитина¹, Н.И. Егоренков², Е.И. Коваленко³, А.И. Грицук

¹ Гомельский государственный медицинский университет, Гомель, Беларусь

² Гомельский государственный технический университет им. П. О. Сухого, Гомель, Беларусь

³ Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

РЕОРГАНИЗАЦИЯ АКТИНОВОГО ЦИТОСКЕЛЕТА ЛЕЙКОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

M.N. Starodubtseva¹, I.A. Nikitina¹, N.I. Yegorenkov², E.I. Kovalenko³, A.I. Gritsuk¹

Gomel State Medical University, Gomel, Suhoy's

Gomel State Technical University, Gomel,³

Belarusian State University, Minsk, Belarus

LEUKOCYTE ACTIN CYTOSKELETON REORGANIZATION IN OXIDATIVE STRESS

Резюме. Методом атомно-силовой микроскопии изучена реорганизация структуры лидирующего края лейкоцитов (нейтрофилов и тимоцитов) адгезированных к стеклу, в условиях окислительного стресса, индуцированного пероксинитритом. Выявлено, что пероксинитрит в низких концентрациях (порядка нескольких мкМ) стимулирует, а при высоких концентрациях (сотни мкМ) подавляет сборку актиновых структур (ламеллоподий и филоподий) нейтрофилов и тимоцитов.

Ключевые слова: атомно-силовая микроскопия, лейкоциты, цитоскелет, актин, пероксинитрит, окислительный стресс.

Миграция лейкоцитов в область воспаления и последующий фагоцитоз лейкоцитами патогенов связана с динамикой актиновых структур цитоскелета. Лидирующий край мигрирующей клетки содержит два основных типа динамических актиновых структур: ламеллоподий и филоподий [1, 2]. Ламеллоподии образуются в виде тонкого слоя лидирующего края клетки и содержат разветвленную сеть F-актиновых филаментов. Отдельные ламеллоподии могут сливаться в сплошное кольцо - ламеллоплазму, которая окружает клетку, распластанную на субстрате [3]. Ламеллоподии и филоподии участвуют в процессах «прощупывания» пространства окружающего клетку, распластывании клеток на субстрате, в хемотаксисе, межклеточном взаимодействии и фагоцитозе [4, 5].

Актиновые филаменты в структуре ламеллоподий ориентированы под углом 70° один к другому и образуют дендритоподобные структуры, плотность которых уменьшается по мере удаления от плазмалеммы. В местах ветвления актиновых структур находится белковый комплекс Agr2/3, а на растущем конце актинового филамента находятся кегирующий белок и белки типа WAVE, N-WASP, формин и др., регулирующие сборку актиновых структур [1]. Из ламеллоподий выходят филоподий и микровыступы или микроспайки - тонкие, пальцеобразные структуры, толщиной

Abstract. Structure reorganization of the leading edge of leucocytes adhered to glassy plates under the stimulation by peroxynitrite-induced oxidative stress was investigated. It was revealed that peroxynitrite at low concentrations (of order of μM) could stimulate and at high concentration (of hundred μM) inhibit filopodia and lamellipodium assemble in neutrophils and thymocytes.

Key words: atomic force microscopy, leucocytes, cytoskeleton, actin, peroxynitrite, oxidative stress.

100-300 нм. Внутри филоподий актин формируется в тесный пучок филаментов из F-актина и миозина-X. Филоподий имеют быстрорастущий конец, ориентированный по направлению к плазматической мембране и противоположно направленный медленно растущий конец [6]. В основе динамического поведения актиновых структур цитоскелета лежит обратимое превращение глобулярного актина в фибриллярный (G-F трансформация) и его взаимодействие с актин-связывающими белками [7]. Сборка и разборка актиновых структур, а также регуляция динамики филоподий и ламеллоподия происходит при участии ионов кальция и малых ГТФ-аз [8]. Нарушение процессов сборки и разборки актиновых структур сопровождается нарушением нормальной жизнедеятельности клетки, в том числе ее опухолевой трансформацией.

Основными методами изучения этих структур являются электронная микроскопия, флуоресцентная микроскопия (спекл-микроскопия, фотоинактивация, FRAP - fluorescent recovery after photobleaching) и атомно-силовая микроскопия (АСМ) [2]. АСМ клеток крови осуществляют либо на воздухе с химически фиксированными и/или высушенными препаратами клеток, либо в жидкой среде после очень «слабой» фиксации клеток химическими агентами, предотвращающими возможный

разрыв плазмалеммы при сканировании в результате механического воздействия. При АСМ-анализе поверхностных структур клеток на воздухе предел разрешения составляет менее 1 нм, что на два-три порядка ниже предела разрешения, который можно достичь в жидкой среде (200 нм).

В ходе выполнения иммунной функции клетки крови производят различные активные формы кислорода (АФК) и азота (АФА), включая пероксинитрит (пероксинитрит-анион, ONOO^- ; пероксиазотистая кислота, HOONO). В организме пероксинитрит образуется в результате реакции двух соединений радикальной природы, относящихся к АФА и АФК - монооксида азота и супероксид анион-радикала, играющих ключевую роль во многих процессах, протекающих в норме и при патологии [9]. Пероксинитрит является естественным регулятором иммунной функции. При этом лейкоциты способны продуцировать пероксинитрит и отличаются высокой чувствительностью к его действию. В нано- и микромолярных концентрациях пероксинитрит, выступая в роли провоспалительного агента, активирует нейтрофилы, стимулирует продукцию цитокинов лимфоцитами, моноцитами и тромбоцитами. В высоких концентрациях пероксинитрит подавляет иммунный ответ, вызывая гибель лейкоцитов [10].

Пероксинитрит легко проходит через мембраны клеток и вступает в реакции окисления, нитрования и нитрозилирования с молекулами как в мембранной, так и в цитозольной частях клетки, протекающие преимущественно по свободно-радикальному механизму с участием радикалов "ОН", " NO_2 " и " CO_3 ". Важными механизмами, лежащими в основе пероксинитрит-индуцированной гибели клеток, являются: деэнергизация клеток в результате дисфункции митохондрий, нарушение водного и ионного гомеостаза и изменения структуры и динамики цитоскелета [11-13]. Ранее было показано, что пероксинитрит вызывает изменение параметров митохондриального окисления клеток крови, реорганизацию мембранного скелета эритроцитов, нарушение проницаемости мембраны эритроцитов для катионов [14-15]. Состояние цитоскелета лейкоцитов при воздействии на них пероксинитрита является малоизученной проблемой, несмотря на ее актуальность и научно-практическую значимость.

Целью работы являлось исследование пространственной организации актиновых структур цитоскелета и структурно-динамических характеристик поверхности лейкоцитов крови человека и тимоцитов крысы в условиях окислительного стресса, вызванного действием пероксинитрита.

Материалы и методы

Синтез пероксинитрита. Пероксинитрит получали в реакции NaNO_2 и H_2O_2 в кислых водных растворах с последующим быстрым их защелачиванием [16]. Для этого 100 мл 1,2М NaNO_2 быстро смешивали со 100 мл раствора H_2O_2 (10 мл 30% H_2O_2 , 60 мл 1 М HNO_3 , 30 мл H_2O) и к полученной смеси добавляли 100 мл 1,5 М NaOH . Избыток H_2O_2 удаляли фильтрацией раствора пероксинитрита через гранулированный MnO_2 . Раствор пероксинитрита замораживали и хранили при температуре -20°C в течение 3-7 дней, затем использовали его верхний (желтый) слой в качестве рабочего раствора пероксинитрита. Концентрацию пероксинитрита определяли спектрофотометрически ($\epsilon_{302\text{nm}}=1670 \text{ см}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$).

Выделение нейтрофилов и их обработка пероксинитритом. Нейтрофилы выделяли из периферической крови здоровых доноров по методу, описанному в работе [17]. Венозную гепаринизированную кровь инкубировали в присутствии декстрана Т-500 в течение 60 мин при комнатной температуре. Взвесь клеток над слоем осевших эритроцитов разделяли в градиенте плотности фиколлюрографина. Примесь эритроцитов удаляли при помощи осмотического шока в холодной дистиллированной воде. Клетки ресуспендировали в фосфатном буфере (60 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, 83 мМ NaCl , 5 мМ KCl , 1 мМ CaCl_2 , рН 7,4). Содержание нейтрофилов в суспензии клеток было не менее 95%. Нейтрофилы обрабатывали пероксинитритом в течение 10 минут в различных концентрациях - от 1 мкМ до 1 мМ моделирующих соответственно действие физиологических концентраций и условия пероксидного стресса.

Выделение тимоцитов и их обработка пероксинитритом. Тимоциты выделяли из тимуса половозрелых белых крыс. После умерщвления животных путем декапитации, извлекали тимус, отмывали его от крови физиологическим раствором и охлаждали в вышеуказанном фосфатном буфере (рН 7,4). Извлеченный орган сначала разрезали на крупные части, а затем пинцетом выщипывали более мелкие фрагменты. Полученный материал суспендировали в фосфатном буфере и фильтровали. Фильтрат тимоцитов концентрировали путем центрифугирования в течение 5 мин при 1000 об./мин, а затем обрабатывали пероксинитритом в концентрации 30 и 300 мкМ в течение 3 мин.

Подготовка клеток для АСМ-исследования. Для подготовки к АСМ-исследованиям, клеточную суспензию помещали на обезжиренные предметные стекла и инкубировали при комнатной температуре в течение часа, не допуская высушивания образцов. Затем препарат фиксировали 1%

глутаровым альдегидом (30 мин), однократно промывали в фосфатном буфере и трехкратно - в дистиллированной воде. Обработка препарата глутаровым альдегидом предотвращает обезвоживание клеток, что позволяет сохранить форму клеток близкую к нативной. После этого клетки высушивали при комнатной температуре. Морфологический анализ клеточной популяции проводили с помощью световой микроскопии (окраска по Романовскому-Гимзе).

АСМ клеток и анализ данных АСМ. АСМ-исследования проводили на атомно-силовом микроскопе "НТ-206" («МикроТестМашины», Беларусь) в контактном режиме сканирования с использованием игл типа CSC38 («MicroMash»). Регистрировали топографию, карты вертикальных отклонений острия АСМ-зонда и карты латеральных сил поверхности клеток. Зонд осуществляет сканирование образца в горизонтальной плоскости, при этом изгиб кантилевера (консоли, на конце которой расположен АСМ-зонд) поддерживается постоянным за счет использования обратной связи и вертикальных перемещений кантилевера, которые фактически описывают топографию исследуемой поверхности (topography). Во время сканирования образца вследствие неоднородности свойств его поверхности возникает крутильная деформация кантилевера, обусловленная моментом сил (torsion), действующим на острие зонда. Угол кручения при небольших отклонениях пропорционален боковой (латеральной) силе. Получаемые при этом карты латеральных сил участка поверхности образца несут в себе информацию не только о неровностях поверхности, но и распределении адгезионно-фрикционных и упругих свойств исследуемого материала.

Статистический анализ данных. Результаты измерений представлены в виде границ доверительного интервала с доверительной вероятностью 95 % (n обозначает размер выборки). Сравнения выборочных характеристик проводили с использованием t-критерия Стьюдента для независимых групп и критерия Фишера.

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлено трехмерное изображение интактного нейтрофила периферической крови человека, полученное при помощи АСМ в контактном режиме сканирования в воздушной среде. На АСМ-изображениях нейтрофилов на периферии клетки, в области контакта клетки с подложкой, хорошо различима структура ламеллоподий. Зернистая структура ламеллоподий на периферии клетки отдаленно напоминает структуру подмембранного скелета эритроцитов и лучше всего проявляется на картах латеральных сил (рис. 2). Фи-

лоподии, вырастающие в виде пальцеобразных структур на лидирующем крае из слоя ламеллоплазмы, имеют жесткий центральный каркас (рис. 2). Формирование центрального пучка актиновых филаментов происходит на быстрорастущем конце филоподий, где наблюдаются округлые образования как на конце центрального пучка актиновых филаментов, так и на растущем конце филоподий (рис. 2). При контакте клеток с латексными частичками, стимулирующими реорганизацию актинового цитоскелета нейтрофилов, можно наблюдать образование подий (утолщенных филоподий) (рис. 3, а, б).

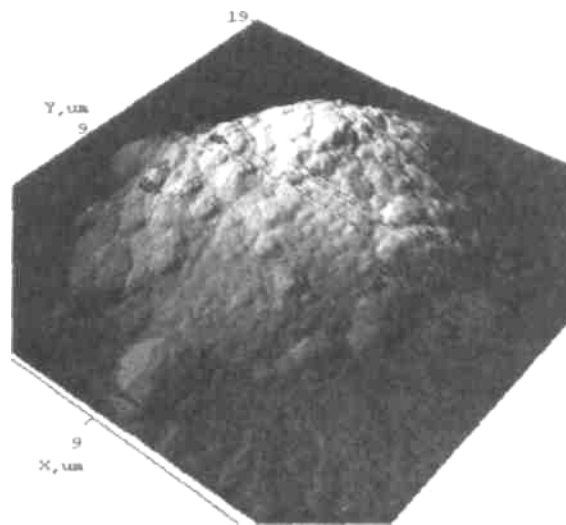


Рис. 1. АСМ-изображение адгезированного к стеклянной пластинке нейтрофила. Размеры областей сканирования: 19 мкм x 19 мкм

Тимоциты, в сравнении с нейтрофилами, имеют более гладкую поверхность с редко встречающимися выраженными структурными элементами (рис. 4, а). Активная миграционная подвижность нейтрофилов и тимоцитов из капилляров в прилегающие ткани обусловлена наличием филоподий. У тимоцитов они обычно собраны в группы на одном конце клетки (рис. 4, б).

Обработка нейтрофилов пероксинитритом изменяет структуру и свойства актиновых элементов цитоскелета. Пероксинитрит в концентрации 200 мкМ практически полностью ингибирует образование актиновых структур нейтрофилов. Так, если в суспензии контрольных нейтрофилов хорошо выраженные актиновые структуры обнаружены у 32±8% клеток, то при обработке 200 мкМ пероксинитритом - всего лишь у 5±6% (p<0,001). Нейтрофилы, обработанные пероксинитритом после контакта с частицами латекса, в отличие от контрольных клеток (рис. 3, а, б), имеют небольшое число коротких филоподий (рис. 3, в, г).

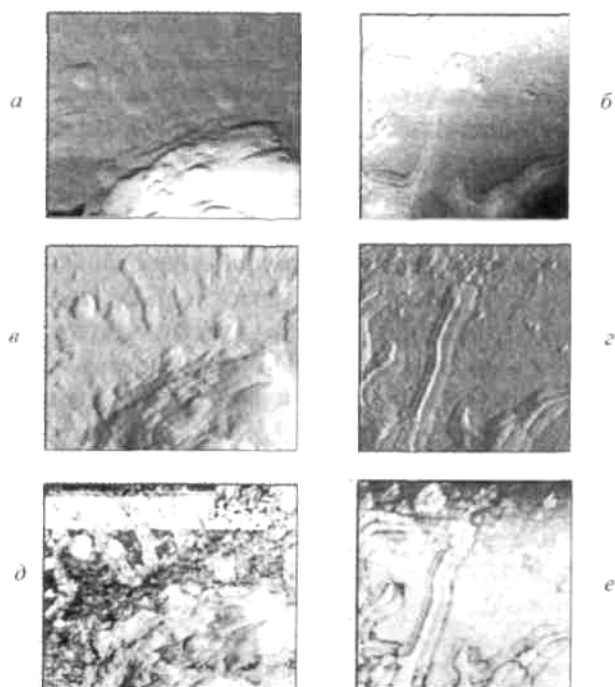


Рис. 2. Топография (а, б), карты вертикальных отклонений консоли (в, з) и карты латеральных сил (д, е) участков поверхности адгезированных к стеклянной пластинке нейтрофилов.

Размеры областей сканирования: 7,8 мкм*6,5 мкм (а, в, д), 3,0 мкм*3,0 мкм (б, з, е). На АСМ-изображениях различимы ламеллоподии и филоподии. Структура филоподий наиболее четко видна на картах латеральных сил

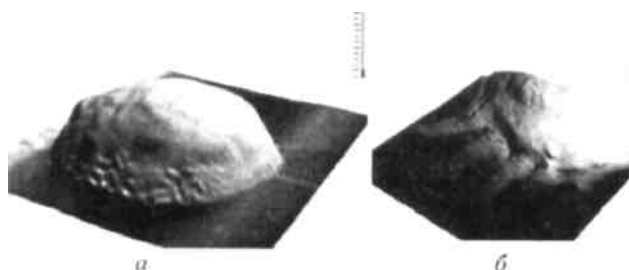


Рис. 4. АСМ-изображения адгезированных к стеклянной пластинке тимоцитов (топография). Размеры областей сканирования: 9 мкм * 9 мкм (а), 4 мкм * 4 мкм (б)

Пероксинитрит в концентрациях 1 мкМ активирует сборку структур ламеллоподий и филоподий. Это проявляется в виде увеличения толщины слоя ламеллоплазмы при адгезии нейтрофилов к подложке. По данным световой микроскопии у 92±4% популяции контрольных нейтрофилов без нарушения целостности плазматической мембраны, их средний диаметр равен 10,9±0,3 мкм (n=221), тогда как после обработки клеток пероксинитритом в концентрации 1 и 100 мкМ, он одинаково увеличивался соответственно до 12,0±0,5 мкм (n=108, p<0,001) и 12,0±0,3 мкм (n=490, p<0,001). При этом стократное различие использованных концентраций пероксинитрита (1 и 100 мкМ) существенно отражалось на морфологических характеристиках их поверхности. После воздействия на нейтрофилы 1 мкМ пероксинитрита

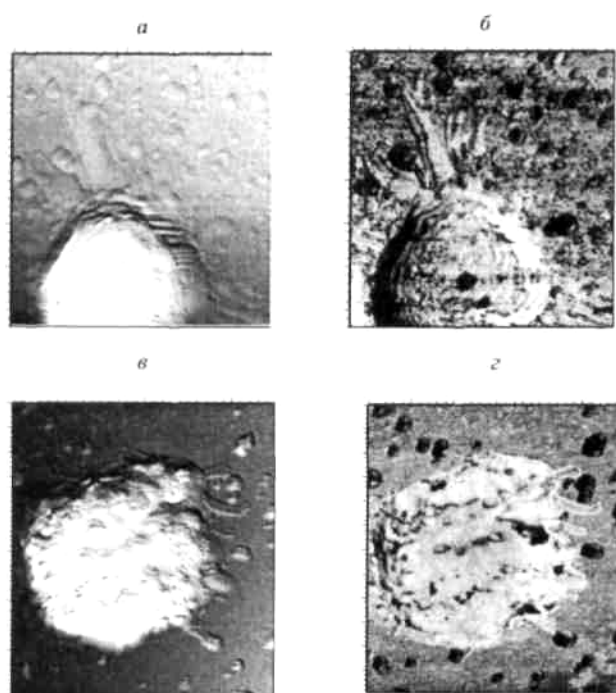


Рис. 3. Топография (а, в) и карты латеральных сил (б, з) нейтрофилов, адгезированного к стеклянной пластинке в среде с латексными частицами без (а, б) и после обработки пероксинитритом (в, з). Концентрация пероксинитрита - 200 мкМ.

Размеры областей сканирования: 13,5 мкм x 12,7 мкм (а, б), 12 мкм x 12 мкм (в, з)

они имеют хорошо развитый слой ламеллоплазмы (рис. 5, а), тогда как при обработке клеток этим агентом в концентрации 100 мкМ - гранулированную поверхность (рис. 5, б).

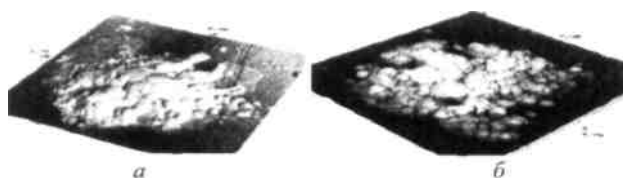


Рис. 5. АСМ-изображения адгезированных к стеклянной пластинке нейтрофилов после обработки пероксинитритом. Размеры областей сканирования: 19,6 мкм * 19,6 мкм (а), 17,5 мкм * 17,5 мкм (б)

Обработка тимоцитов пероксинитритом вызывает изменения их морфологии, аналогичные таковым у нейтрофилов. При воздействии на тимоциты в концентрации 30 мкМ не только возрастал диаметр клеток с 6,35±0,51 мкм (n=10) в контрольной выборке до 7,33±0,81 мкм (p<0,05), но и активировалась в них сборка филоподий (рис. 6). Так, если у контрольных тимоцитов длина филоподий составляет 1,8±0,8 мкм, то после обработки пероксинитритом она была сопоставима с диаметром самих клеток. Вместе с тем, общее число филоподий после обработки тимоцитов пероксинитритом, как правило, сокращалась и не превышала 2-3 на клетку.

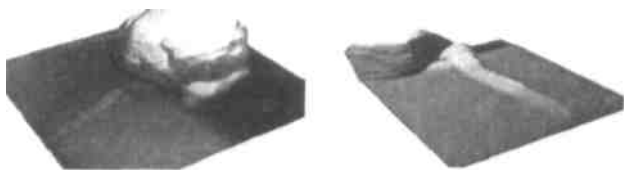


Рис. 6. АСМ-изображения адгезированных к стеклянной пластинке тимоцитов после их обработки пероксинитритом в концентрации 30 мкМ (топография). Размеры областей сканирования: 12 мкм x 12 мкм (а), 6,5 мкм x 6,5 мкм (б)

Увеличение концентрации пероксинитрита до 120 мкМ существенного не влияло на диаметр тимоцитов, но изменяло процессы образования филлоподий (рис. 7, а). При этом большинство тимоцитов теряют способность формировать филлоподии, однако минорная фракция тимоцитов, сохранившая способность к их образованию, характеризуется: уменьшением числа филлоподий, приходящихся на одну клетку, уменьшением размеров филлоподий и нарушением структуры их быстрорастущих концов (рис. 7, б).

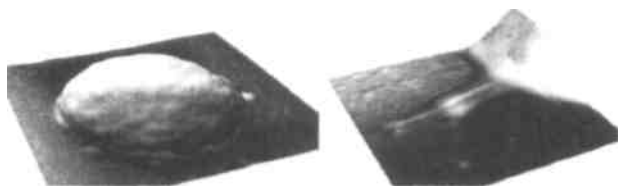


Рис. 7. АСМ-изображения адгезированных к стеклянной пластинке тимоцитов после обработки пероксинитритом в концентрации 120 мкМ (топография). Размеры областей сканирования: 10 мкм * 10 мкм (а), 4 мкм * 4 мкм (б)

Подобную динамику изменений структур цитоскелета в зависимости от концентрации активных форм азота подтверждают и литературные данные. Так, было показано, что при обработке нейронов и глиальных клеток относительно небольшими концентрациями нитрита натрия, как NO-генерирующего агента, в клетках активируются процессы сборки этих структур, тогда как при воздействии его высоких концентраций усиливаются процессы их разборки [18].

Заключение

Методом атомно-силовой микроскопии показано, что низкие (до нескольких мкМ) концентрации пероксинитрита стимулируют реорганизацию актинового цитоскелета лейкоцитов, способствуя адгезии клеток за счет активации формирования ламеллоподий и филлоподий. Увеличение концентрации пероксинитрита, моделирующее состояние окислительного стресса, приводит к подавлению

формирования структур актинового цитоскелета лейкоцитов.

Благодарность

Выполнение исследования финансировалось Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (Б09-020).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bugyi B., Le Clainche Ch., Romet-Lemonne G. et al. How do in vitro reconstructed actin-based motility assay provide insight into in vivo behavior? // FEBS Lett. 2008. Vol. 582. P. 2086-2092.
2. Ladwein M., Klements R. On the Rho'd: the regulation of membrane protrusions by Rho-GTPases // FEBS Lett. 2008. Vol. 582. P. 2066-2074.
3. Козинец Г., Симоварт Ю. Поверхностная архитектура клеток периферической крови. Таллин: Валгус, 1984. 116 с.
4. Kay R.R., Langridge P., Traynor D. et al. Changing directions in the study of chemotaxis // Nature Reviews Mol. Cell Biol. 2008. Vol. 9. P. 455-463.
5. Janetopoulos Vh., Firtel R.A. Directional sensing during chemotaxis // FEBS Lett. 2008. Vol. 582. P. 2075-2085.
6. Mattila P.K., Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions // Nature Rev. 2008. Vol. 9. P. 446-454.
7. Хайтлина СЮ. Механизмы сегрегации изоформ актина в клетке // Цитология. 2007. № 5. С. 345-354.
8. Катанаев В.Л. Внутриклеточная передача сигнала при хемотаксисе нейтрофилов // Биохимия. 2001. № 4. С. 437-456.
9. Ванин А.Ф. Оксид азота в биологии: история, состояние и перспективы исследований // Биохимия. 1998. № 7. С. 867-869.
10. Starodubtseva M.N., Kavalenka A.I., Petrenyov D.R. et al. Effects of peroxynitrite on morphology and functions of neutrophils // In: Handbook of free radicals: formation, types and effects Editor: Dimitri Kozyrev and Vasily Slutsky. Nova Science Publishers, Inc. 2010. (In press).
11. Cook S.A., Poole-Wilson P.A. Cardiac myocyte apoptosis // Eur. Heart J. 1999. Vol. 20. P. 1619-1629.
12. Radi R., Cassina A., Hodara R. Nitric oxide and peroxynitrite interactions with mitochondria // J. Biol. Chem. 2002. Vol. 277. P. 401^09.
13. Radi R., Cassina A., Hodara R. et al. Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria // Free Rad. Biol. Med. 2002. Vol. 33. P. 1451-1464.
14. Starodubtseva, M.N., Kuznetsova, T.G., Chizhik, S.A. et al. Atomic force microscopy observation of peroxynitrite-induced erythrocyte cytoskeleton reorganization // Micron. 2007. Vol. 38. P. 782-786.
15. Starodubtseva M.N., Tattersall A.L., Kuznetsova T.G. et al. Structural and functional changes in the membrane and membrane skeleton of red blood cells induced by peroxynitrite // Bioelectrochemistry. 2008. Vol. 73. P. 155-162.
16. Robinson K.M., Beckman J.S. Synthesis of peroxynitrite from nitrite and hydrogen peroxide // Methods Enzymol. 2005. Vol. 396. P. 207-214.
17. Kavalenka A.I., Semenova G.N., Cherenkevich S. N. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro. // Cell Tissue Biol. 2007. № 1. P. 551-559.
18. Самосудова Н.В., Реутов В.П., Ларионова Н.П. Оксид азота как регулятор контрастности основных элементов цитоскелета // Цитология. 2000. № 1. С. 72-78.