

биофизические свойства клеток [14]. Так, в культуре гиппокампальных нейронов продолжительная инкубация гомоцистеина не вызывала изменение свойств одиночных потенциалов действия, но снижалась адаптация и ширина потенциалов действия в ответ на ритмическую активность [9]. Таким образом, можно предположить, что пренатальное воздействие высоких доз гомоцистеина может приводить к увеличению возбудимости клеток и нейрональной сети гиппокампа в целом. Так, например, у больных с гипергомоцистеинемией показано увеличение возбудимости центральной нервной системы и повышение вероятности возникновения эпилепсии [15, 16].

Работа поддержана грантом РНФ № 14-15-00618.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Boldyrev A.A.* // *Neurochemical J.* 2007. V. 1. P. 14-20.
2. *Beltowski J. et al.* // *Adipobiology.* 2012. V. 4. P. 77-84.
3. *Arutjunyan A. et al.* // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2012. V. 5. No 2. P. 179-85.
4. *DenHeijer T. et al.* // *Brain.* 2003. V. 126. No 1. P. 170-5.
5. *Dufouil C. et al.* // *Ann. Neurol.* 2003. V. 53. No 2. P. 214-35.
6. *Wright C.B. et al.* // *Stroke.* 2005. V. 36. P. 1207-11.
7. *Gerasimova E. et al.* // *BioNanoScience.* 2016. DOI 10.1007/s12668-016-0326-6.
8. *Shi J., Aamodt S.M., Townsend M., Constantine-Paton M.* // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. No 16. P. 6233-44.
9. *Schaub C. et al.* // *Exp. Brain Res.* 2013. V. 225. P. 527-34.
10. *Tamagnini F., Novelia J., Kerrigan T.L. et al.* // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. V. 9. 372.
11. *Lee P.T. et al.* // *Electroanalysis.* 2014. V. 26. P. 1488-96.
12. *Ben Ari Y.* // *Nat. Rev. Neurosci.* 2002. V. 3. P. 728-39.
13. *Lipton S.A. et al.* // *PNAS.* 1997. V. 94. P. 5923-8.
14. *Ganapathy P.S. et al.* // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. V. 52. No 8. P. 5515-24.
15. *Bleich S et al.* // *Epilepsia.* 2006. V. 47. P. 934-8.

## ОБРАЗОВАНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК НЕЙТРОФИЛОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ СТЕАРИЛАМИН-СОДЕРЖАЩИХ ЛИПОСОМ И ИХ ВЛИЯНИЕ НА КИСЛОРОДНЫЙ ВЗРЫВ

*Лотош Н.Ю.<sup>1</sup>, Тимохина С.О.<sup>2</sup>, Малащенко И.К.<sup>3</sup>, Сорокоумова Г.М.<sup>2</sup>,  
Василов Р.Г.<sup>3</sup>, Селищева А.А.<sup>1,3</sup>*

<sup>1</sup>МГУ имени М.А. Ломоносова, биологический факультет, Москва, РФ

<sup>2</sup>Московский технологический университет (МИТХТ), Москва, РФ

<sup>3</sup>Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,  
Москва, РФ

**Введение.** Липосомы используются как лекарственная форма для направленной доставки лекарственных препаратов [1]. Введение в состав

липосом из фосфатидилхолина (ФХ) положительно заряженных липидов (например, стеариламина (СА)) дает возможность получить катионные липосомы. Интерес к этим соединениям обусловлен тем, что из-за наличия положительного заряда при встраивании в мембраны липосом они могут быть использованы как вектор для направленного транспорта лекарств к клеткам, имеющим отрицательный заряд [2]. Взаимодействие липосом с разными типами клеток и липопротеинами крови может влиять как на фармакокинетику и эффективность действия лекарств, так и на функции клеток-мишеней. Так, катионные алкиламины ингибируют образование клетками активных форм кислорода (АФК). Механизм ингибирующего действия алкиламинов с длиной цепи не менее 12 углеводородных атомов (миристил-, лаурил-, стеариламин) был изучен при реконструкции НАДФН-оксидазы из мембранной и цитозольной фракций клеточной линии HL-60, дифференцированной в нейтрофил-подобные клетки [3]. Авторы считали, что эффект ингибирования обусловлен влиянием алкиламинов как на активность НАДФН-оксидазы, так и на транслокацию цитозольных компонентов к мембране и сборку фермента.

Целью данной работы является изучение действия СА-липосом на кислородный взрыв (КВ) нейтрофилов человека, как интактных, так и стимулированных различными активаторами (зимозаном, форбол-12-миристат-13-ацетатом (форболовым эфиром)) методом хемилюминесценции люминола, а так же обнаружение нейтрофильных внеклеточных ловушек с помощью световой и флуоресцентной микроскопии.

**Материалы и методы. Липосомы.** В исследованиях использовали липосомы из ФХ и из смеси ФХ:СА (9:1 по весу), т.е. ФХ-липосомы и липосомы, содержащие стеариламин – СА-липосомы. Полученные липосомы имели диаметр  $140 \pm 49$  нм и различались по дзета-потенциалу: ФХ-липосомы имели потенциал  $-1,74 \pm 0,31$  мВ, а СА-липосомы  $+11,4 \pm 0,44$  мВ. Для эксперимента использовали липосомы в конечной концентрации 0,08, 0,4 и 2 мг/мл. СА-липосомы содержали, соответственно, 0,008, 0,04 и 0,2 мг/мл СА (0,03, 0,15 и 0,74 мМ СА). Липосомы хранили при 4°C, измерения размера и дзета-потенциала в течение 3-х месяцев показали, что липосомы стабильны в этот промежуток времени.

**Группа обследуемых.** Группа состояла из 20 практически здоровых добровольцев от 30 до 60 лет. Критериями включения в группу являлись нормальные значения показателей клинического анализа крови, в том числе СОЭ, а также уровня С-реактивного белка.

**Выделение нейтрофилов** проводили из 3 мл гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фикола (1,077 и 1,119 г/см<sup>3</sup>). Подсчет клеток проводили в камере Горяева. Получали  $2-10 \times 10^6$  кл/мл.

**Кислородный взрыв нейтрофилов** оценивали методом люминол-зависимой хемилюминесценции с помощью хемилюминометра Lum-1200 (ДИСофт, Россия) в присутствии 0,28 мМ люминола. Нейтрофилы ( $0,8-6 \times 10^5$ ) и ФХ- и СА-липосомы в различной концентрации (0,08, 0,4 и 2 мг/мл) предварительно инкубировали при 37°C 15 мин, а затем клетки активировали неопсонизированным зимозаном (0,5 мг/мл), либо форболовым эфиром (10 нМ). В качестве контроля клетки инкубировали с раствором Хенкса в тех же условиях. Учитывали следующие параметры КВ: максимальную интенсивность хемилюминесценции люминола, приведенную к одной клетке ( $I_{\max}$ , мВ/кл) и время достижения максимальной интенсивности ( $T_{\max}$ , ч).

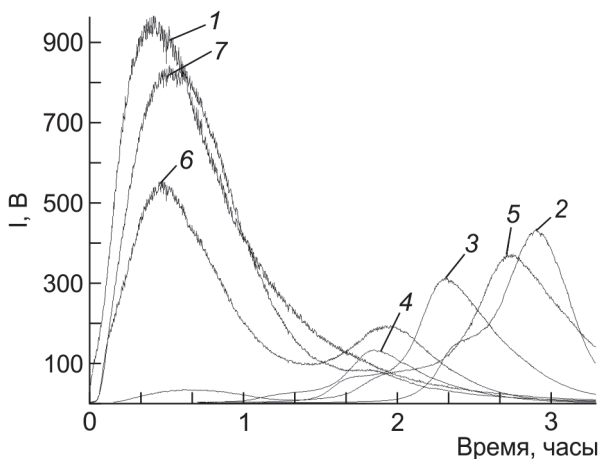
**Флуоресцентная и световая микроскопия.** Суспензию выделенных нейтрофилов инкубировали с ФХ- и СА-липосомами (2 мг/мл) в течение 15 и 90 минут при 37°C, затем наносили на предметное стекло с L-полилизинном, фиксировали в метаноле. ДНК-структуры выявляли с помощью акридинового оранжевого (0,1 мг/мл). Микроскопию проводили на флуоресцентном конфокальном микроскопе FluoView Olympus 10i (Япония) при  $\lambda_{\text{возбуждения}}$  502 нм и  $\lambda_{\text{испускания}}$  526 нм. Препараты для световой микроскопии нейтрофилов окрашивали по Романовскому двухкомпонентным набором Deltalab (Испания). Микроскопию проводили на микроскопе Leica DM 1000 (Германия).

**Результаты и обсуждение.** Провели сравнительное исследование действия ФХ-липосом и СА-липосом на КВ нейтрофилов человека, активированных зимозаном или форболовым эфиром.

Методом хемилюминесценции люминола показали, что ФХ-липосомы не оказывают достоверного действия на интенсивность кислородного взрыва, в то время как СА-липосомы действовали дозозависимым образом. СА-липосомы, содержащие 0,03 мМ СА, ингибировали действие обоих активаторов, а при увеличении концентрации СА до 0,74 мМ вызывали образование нового пика хемилюминесценции. Пример хемилюминограммы, полученной для КВ нейтрофилов, активированных зимозаном приведен на рис. 1. Для нейтрофилов, активированных форболовым эфиром, получили схожую картину, данные не приводятся.

Значения максимальной интенсивности, полученные для клеток, предварительно инкубированных с липосомами (2 мг/мл) или с раствором Хенкса (контроль) и активированных зимозаном, приведены в таблице 1.

Экспериментальные данные, в которых новый пик возникал на 2-3 часу реакции (т.е. был отсроченным) были получены для большего числа добровольцев (15 человек из 20). В остальных случаях новый пик хемилюминесценции появлялся быстрее пика, вызванного активацией зимозаном (8-12 минута).



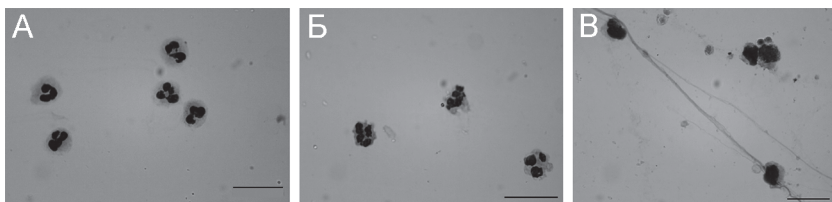
**Рис. 1.** Пример кислородного взрыва нейтрофилов, регистрируемого по хемилюминесценции люминола, в присутствии: 1. зимозана; 2. СА-липосом (СА 0,74 мМ); 3. СА-липосом (СА 0,15 мМ); 4. СА-липосом (СА 0,03 мМ); 5. зимозана и СА-липосом (СА 0,74 мМ); 6. зимозана и СА-липосом (СА 0,15 мМ); 7. зимозана и СА-липосом (СА 0,03 мМ).

**Таблица 1.** Влияние липосом, содержащих 0,74 мМ СА на максимальную интенсивность КВ нейтрофилов, активированных зимозаном (n = 15).

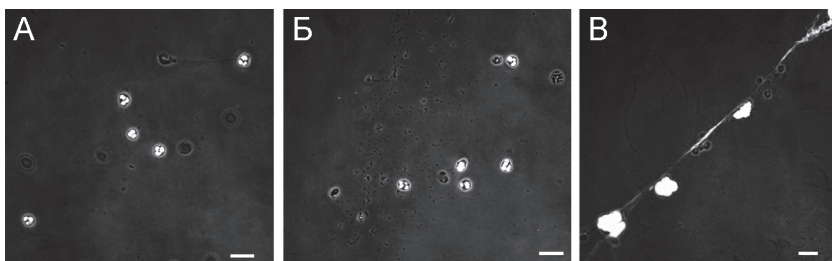
	$I_{\max}$ , мВ/кл Средние значения $\pm$ стандартное отклонение	$I_{\max}$ , мВ/кл Минимальное значение	$I_{\max}$ , мВ/кл Максимальное значение
Контроль: нейтрофилы, инкубированные с раствором Хенкса	2,14 $\pm$ 2,1	0,059	7,4
Нейтрофилы, инкубированные с ФХ-липосомами	1,80 $\pm$ 1,8	0,035	4,9
Нейтрофилы, инкубированные с СА-липосомами (основной пик)	0,22 $\pm$ 0,2*	0,003	0,64
Нейтрофилы, инкубированные с СА-липосомами (новый отсроченный пик)	3,16 $\pm$ 4,4*	0,067	15,6

\* –  $p < 0,05$  по сравнению с  $I_{\max}$  контроля.

При исследовании нейтрофилов методом световой и флуоресцентной микроскопии, инкубация в течение 15 и 90 минут с ФХ-липосомами не приводила к нарушению целостности клеток и изменению характерной для нейтрофилов структуры ядра. Результат инкубации с СА-липосомами зависел от времени: при 15-минутной инкубации не наблюдалось каких-либо изменений в клетке. После 90-минутной инкубации ядро теряло сегментированность и увеличивалось в размере, происходила деконденсация ядра. В некоторых клетках происходил выброс тонких нитей ДНК во внеклеточное пространство, т.е. образовывались нейтрофильные внеклеточные ловушки (рис. 2 и 3).



**Рис. 2.** Световая микроскопия нейтрофилов, окраска по Романовскому, увеличение  $\times 100$ , количество клеток во взвеси  $6,5 \times 10^5$ . Инкубация 90 мин при  $37^\circ\text{C}$  в присутствии: А. раствора Хенкса (контроль); Б. 2 мг/мл ФХ-липосом; В. СА-липосом (СА 0,074 мМ). А, Б и В – шкала 20 мкм.



**Рис. 3.** Флуоресцентная микроскопия нейтрофилов, окраска акридиновым оранжевым, увеличение  $\times 60$ , количество клеток во взвеси  $6,5 \times 10^5$ . Инкубация 90 мин при  $37^\circ\text{C}$  в присутствии: А. раствора Хенкса (контроль); Б. 2 мг/мл ФХ-липосом; В. СА-липосом (СА 0,074 мМ). А, Б и В – шкала 20 мкм

На основании этих результатов можно сделать вывод о том, что СА-липосомы являются многофункциональным стрессорным фактором, который способен влиять на активность ферментов, ответственных за генерацию активных форм кислорода и вызывать образование внеклеточных нейтрофильных ловушек.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Mahallagam J., Nemunaitis J.S., Malik L. et al.* // Cancer Chemother. Pharmacol. 2014. V. 74. No 10. P. 1241-50.
2. *Silva A.L., Marcelino H.R., Verissimo L.M. et al.* // J. Nanosci. Nanotechnol. 2016. V. 16. No 2. P. 1339-45.
3. *Sawai T., Asada M., Nishizawa Y. et al.* // Jpn. J. Pharmacol. 1999. V. 80. No 3. P. 237-42.

## ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ CD25 В Т-КЛЕТКАХ ЛЕЙКЕМИИ JURKAT

*Марахова И.И., Митюшова Е.В., Аксенов Н.Д., Шатрова А.Н.*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, РФ

**Введение.** Формирование высокоаффинного рецептора интерлейкина-2 (ИЛ-2R), в состав которого входит альфа-субъединица, является решающим условием для запуска пролиферативного и иммунного ответа Т-лимфоцитов. Нарушение механизмов, контролирующих экспрессию альфа-цепи рецептора, приводит к развитию аутоиммунных заболеваний и иммунодефицита [1-3]. Ранее мы показали, что в лимфоцитах периферической крови человека высокая активность STAT5 является необходимым условием экспрессии CD25 (маркер альфа-субъединицы рецептора ИЛ-2) и последующего вступления Т-лимфоцитов в цикл размножения [4]. Т-клеточная линия Jurkat была получена на основе клеток острого лимфобластного лейкоза [5]. Т-клетки Jurkat производят собственный Т-клеточный ростовой фактор интерлейкин-2 (ИЛ-2) и поддерживают высокий пролиферативный потенциал при ведении в культуре в отсутствие экзогенного ИЛ-2 [5, 6]. Как и в нормальных Т-лимфоцитах человека, у пролиферирующих клеток Jurkat на поверхности не экспрессируется CD25, что указывает на отсутствие высокоаффинного рецептора ИЛ-2 в этих трансформированных клетках. Цель настоящего исследования - выяснить возможность индукции альфа-цепи рецептора ИЛ-2 (оцениваемой по уровню поверхностной экспрессии CD25, маркера альфа-цепи) в клетках Jurkat и оценить роль JAK/STAT сигнализации в экспрессии альфа-цепи рецептора ИЛ-2. Интерес к проведению такого исследования связан с тем, что сведения о действии ингибиторов тирозинкиназ JAK на функционирование JAK/STAT сигнального пути в нормальных Т-клетках привлекаются для поисков терапевтических агентов при лечении лимфоидных заболеваний. Установлено, что STAT можно «выключать» в клетках без значительных токсических