

ДЕЙСТВИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА АДГЕЗИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА И СОПУТСТВУЮЩУЮ СЕКРЕЦИЮ

© 2023 С.И. Галкина^{1*}, Е.А. Голенкина¹, Н.В. Федорова¹, А.Л. Ксенофонтов¹,
М.В. Серебрякова¹, В.И. Стадничук², Л.А. Баратова¹, Г.Ф. Судына^{1*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119991 Москва, Россия; электронная почта: galkina@genebee.msu.ru; sudina@genebee.msu.ru

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
физический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.07.2023

После доработки 17.10.2023

Принята к публикации 20.10.2023

Нейтрофилы играют двойственную роль в защите организма. Они способны проникать в инфицированные ткани и уничтожать там болезнетворные микроорганизмы, выделяя агрессивные бактерицидные вещества. Попадая в окружающие ткани, агрессивные продукты секреции нейтрофилов инициируют развитие воспалительных процессов. Инвазия нейтрофилов в ткани наблюдается при развитии пневмонии у пациентов с легочными заболеваниями различной этиологии, включая острый респираторный дистресс-синдром при коронавирусной инфекции. Синтетический кортикостероидный гормон дексаметазон оказывает терапевтическое действие при лечении заболеваний легких, в том числе снижает смертность пациентов с тяжелым течением COVID-19. Мы изучили острые (краткосрочные) эффекты дексаметазона на адгезию нейтрофилов к фибриногену и сопутствующую секрецию. Дексаметазон не влиял ни на прикрепление нейтрофилов к субстрату, ни на их морфологию. Продукция активных форм кислорода и оксида азота нейтрофилами в процессе адгезии также не изменялась в присутствии дексаметазона. Дексаметазон стимулировал высвобождение металлопротеиназы в дополнение к белкам, секретируемым нейтрофилами при адгезии в контрольных условиях, и избирательно стимулировал высвобождение свободной аминокислоты гидроксизина, продукта лизилгидроксилазы. Металлопротеиназы играют ключевую роль и тесно взаимодействуют с лизилгидроксилазой в процессах перестройки внеклеточного матрикса. Терапевтический эффект дексаметазона может быть связан с его способностью через изменение состава секреции нейтрофилов реорганизовывать внеклеточный матрикс, следствием чего может быть улучшение газообмена у больных с тяжелым течением легочных заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: нейтрофильное воспаление, нейтрофил, адгезия, секреция, гидроксизин, металлопротеиназа, лизилгидроксилаза, активные формы кислорода, оксид азота.

DOI: 10.31857/S0320972523120114, EDN: NRPREO

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы играют двоякую роль в возникновении и течении воспаления. Они вносят вклад в защиту организма от инфекций благодаря способности мигрировать из кровеносных сосудов в инфицированные ткани и уничтожать вторгшиеся патогенные микробы, секретируя бактерицидные агенты. Те же самые агрессивные бактерициды могут вызвать

развитие воспаления в окружающих тканях хозяина. Интегрин-зависимая адгезия нейтрофилов к тканям, сопровождающаяся секрецией противовоспалительных медиаторов, происходит при реперфузии после ишемии и на ранних стадиях диабета [1–3]. Инвазия нейтрофилов в легкие наблюдается также при развитии пневмонии у больных муковисцидозом, хронической обструктивной болезнью легких и другими легочными заболеваниями, включая

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ЛГ – лизилгидроксилаза; MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9; HBSS – сбалансированный солевой раствор Хенкса; DAF-2 – диаминофлуоресцеин; DCF – 2',7'-дихлорфлуоресцеин; D-PBS – фосфатно-солевой буфер Дульбекко; PMA – форбол 12-миристанат 13-ацетат.

* Адресат для корреспонденции.

острый респираторный дистресс-синдром при заболевании COVID-19 [4–7]. Количество нейтрофилов значительно увеличивается в крови у пациентов с острым респираторным дистресс-синдромом при коронавирусной болезни. Это увеличение, наряду с увеличением числа нейтрофилов по отношению к числу лимфоцитов, рассматривается как предвестник критического состояния и смертности пациентов [8].

Дексаметазон, синтетический глюкокортикоидный гормон (аналог преднизолона), снижает смертность у пациентов с тяжелой формой COVID-19, но механизм его действия еще предстоит выяснить [9–13]. Терапевтический эффект дексаметазона, по крайней мере частично, заключается в воздействии на активность нейтрофилов, агрессивная секреция которых рассматривается как возможная причина развития воспалений при остром респираторном дистресс-синдроме. Применение дексаметазона у пациентов с тяжелым течением COVID-19 приводило к снижению общего количества нейтрофилов и количества IFN-активных нейтрофилов, а также к увеличению количества незрелых иммуносупрессивных нейтрофилов [14].

Целью нашей работы было изучение действия дексаметазона на функциональные ответы нейтрофилов, связанные с инвазией этих клеток в ткани и их способностью инициировать воспалительные процессы. Дексаметазон, как и другие глюкокортикоиды, действует через геномный путь, но также вызывает быстрые негеномные ответы, связанные с его действием на биологические мембраны [15–17]. Зрелые нейтрофилы лишены способности к делению, и синтез белка и мРНК у них значительно снижен по сравнению с делящимися клетками. Резкие изменения в уровнях нескольких сотен мРНК в нейтрофилах человека происходят через 2 ч после взаимодействия с бактериями, но не отражаются на уровнях соответствующих мРНК, полученных через 1 ч, с некоторыми исключениями. Синтез IL-8 и экспрессия мРНК в нейтрофилах, стимулированных антителами к IgE, начинается через 3 ч после инициирующего воздействия [18, 19]. В качестве модели интегрин-зависимой адгезии нейтрофилов к тканям мы использовали адгезию к субстрату, покрытому фибриногеном. Прикрепление нейтрофилов к субстрату и сопутствующая секреция происходили и практически завершались в течение 20–25 мин [20]. Мы предполагаем, что проявившиеся за это время эффекты дексаметазона носят преимущественно негеномный характер.

Мы провели исследование действия дексаметазона на прикрепление нейтрофилов к субстрату, на морфологию прикрепленных клеток, а также на сопутствующую секрецию активных форм кислорода (АФК), оксида азота (NO), белков и свободных аминокислот. Продуцируемые нейтрофилами в процессе адгезии АФК [21–23] и NO [24] играют важную роль в развитии воспалительных процессов. Нейтрофилы содержат три типа секреторных гранул, различающихся по составу и назначению белков и пептидов. Различные сигнальные пути запускают секрецию гранул разных типов [20, 25, 26]. Секреция протеаз и порообразующих пептидов первичных гранул нейтрофилов может инициировать воспалительные процессы в тканях, а секреция металлопротеиназ четвертичных гранул может осуществлять реорганизацию внеклеточного матрикса, требующуюся для процессов инвазии и адгезии клеток.

Параллельные эксперименты проведены по изучению влияния дексаметазона на состав секреции свободных аминокислот. Ранее нами было показано, что адгезия нейтрофилов к субстрату стимулирует секрецию гидроксилизина, но практически не влияет на секрецию других аминокислот [27, 28]. Роль гидроксилизина, метаболита лизилгидроксилазы (LH 1, 2, 3 или проколлаген-лизин 2-оксоглутарат 5-диоксигеназы PLOD 1, 2, 3), в физиологии нейтрофилов не изучена. Способность к инвазии в ткани организма объединяет нейтрофилы с опухолевыми клетками. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что повышение экспрессии и активности лизилгидроксилазы связано со способностью опухолевых клеток мигрировать и образовывать метастазы при заболеваниях глиомами [29], раком легкого [30], карциномой эндометрия [31] и другими видами рака.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследованиях использовали следующие реактивы: сбалансированный солевой раствор Хенкса (HBSS) без бикарбоната натрия и фенолового красного, фосфатно-солевой буфер Дульбекко (D-PBS) без CaCl_2 , дексаметазон, форбол 12-миристат 13-ацетат (PMA), ингибитор тиоловых протеаз E64 и фибриноген плазмы человека («Sigma-Aldrich», Германия); Ficoll-Paque («Pharmacia», Швеция); Coomassie Brilliant Blue G-250 («Serva», Германия); PMSF («MP Biomedical», США); трипановый синий

(«Honeywell Fluka», США); глутаровый альдегид («Ted Pella», США); трипсин («Promega», США); 4,5-диаминофлуоресцеин диацетат (DAF-2 DA) («Merck KGaA», Германия); диацетат 6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина (Carboxy-H₂DCF-DA) («Thermo Fisher Scientific», США); растворители для аналитической хроматографии: элюент MCI Buffer L-8800-PH-1-4 и набор окрашивающих растворов нингидрина для Hitachi 29970501 («FUJIFILM Wako Chemicals GmbH», США).

Выделение нейтрофилов человека. Нейтрофилы получали из крови здоровых доноров, не получавших фармакологические препараты в течение двух недель до эксперимента. Метод получения нейтрофилов был описан ранее [23]. В качестве антикоагулянта использовался цитрат натрия. После осаждения эритроцитов 3%-ным раствором декстрана Т-500 нейтрофилы отделяли от богатой лейкоцитами плазмы центрифугированием в градиенте плотности Ficoll-Paque (1,077 мг/мл). После гипотонического лизиса оставшихся эритроцитов нейтрофилы дважды промывали в PBS, суспендировали (10^7 клеток на мл) в D-PBS, содержащем 1 мг/мл глюкозы, и хранили до экспериментов при комнатной температуре. Чистота суспензии нейтрофилов составляла 96–97%. Рутинный контроль гомогенности выделенных клеток осуществляли с помощью фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии на микроскопе Zeiss Axiovert 200M («Carl Zeiss», Германия), выявляя нейтрофилы по характерным сегментированным ядрам. Для оценки жизнеспособности выделенные нейтрофилы окрашивали красителем трипановым синим, который окрашивает поврежденные, но не проникает в жизнеспособные клетки. Нейтрофилы инкубировали 15 мин при 37 °С в 0,5 мМ растворе трипанового синего и отмывали PBS. Процент окрашенных клеток не превышал 1–2% ($n = 3000$).

Измерение количества прикрепленных нейтрофилов. Методика определения процента прикрепленных нейтрофилов основана на измерении абсорбции 2,3-диаминофеназина, продукта катализируемого миелопероксидазой окисления о-фенилендиамина дигидрохлорида (OPD) с помощью H₂O₂ [32]. Перед экспериментом 96-луночные культуральные планшеты («Greiner bio-one», Германия) инкубировали в течение 2 ч с раствором фибриногена (30 мкг/мл) при комнатной температуре и промывали PBS. Нейтрофилы высевали в лунки, покрытые фибриногеном (2×10^5 клеток на лунку), 96-луночного планшета в растворе HBSS, содержащем 10 мМ HEPES (pH 7,4).

Клетки инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона. После удаления не прикрепившихся к субстрату или слабо прикрепившихся клеток двукратным промыванием теплым PBS в лунки добавляли по 0,1 мл 4 мМ H₂O₂ в пермеабилизирующем буфере (67 мМ Na₂HPO₄, 35 мМ лимонной кислоты, 0,1% (w/v) Triton X-100), содержащем 5,5 мМ OPD, на 5 мин. Реакцию останавливали равным объемом 1 М H₂SO₄. Поглощение на длине волны 490 нм измеряли с помощью устройства для чтения микропланшетов CLARIOstar («BMG Labtech», Германия). Количество прикрепившихся клеток определяли по калибровочной кривой.

Измерение внутриклеточной продукции АФК нейтрофилами. Количественную оценку влияния дексаметазона на накопление АФК в цитозоле нейтрофилов производили путем измерения интенсивности зеленой флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (DCF), продукта окисления 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеина диацетата (H₂DCF-DA). Нейтрофилы инкубировали с 5 мкМ карбокси-H₂DCF-DA в течение 60 мин при комнатной температуре, промывали PBS и хранили в D-PBS до использования. Затем нейтрофилы высевали в покрытые фибриногеном лунки 96-луночного планшета (4×10^5 клеток на лунку) в HBSS, содержащем 10 мМ HEPES (pH 7,4), и инкубировали 30 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона или 5 нМ РМА. Интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения и испускания (488 и 525 нм соответственно) контролировали с помощью устройства CLARIOstar.

Количественная оценка продукции NO нейтрофилами. Продукция оксида азота нейтрофилами количественно оценивалась по интенсивности флуоресценции триазолофлуоресцеина (DAF-2T), продукта реакции DAF-2 с NO, как описано ранее [24]. Нейтрофилы инкубировали в течение 60 мин с 5 мкМ DAF-2 при комнатной температуре, промывали PBS и хранили в темноте в D-PBS до использования. Нагруженные DAF-2 нейтрофилы высевали в лунки, покрытые фибриногеном (4×10^5 клеток на лунку), 96-луночного планшета, и инкубировали 30 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона. Интенсивность флуоресценции DAF-2 (возбуждение/испускание — 488/525 нм) измеряли с помощью устройства CLARIOstar.

Метод сканирующей электронной микроскопии и количественная оценка действия дексаметазона на морфологию прикрепленных нейтрофилов. Сканирующую электронную микроскопию использовали для сравнения морфологии нейтрофилов, прикрепленных к покровным стеклам, покрытым фибриногеном, в контрольных условиях или в присутствии дексаметазона. Изолированные нейтрофилы помещали на покровные стекла, покрытые фибриногеном, на 25 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в контрольных условиях или в присутствии 0,1–1 мкМ дексаметазона. Прикрепленные клетки фиксировали 2,5%-ным глutarовым альдегидом в HBSS, содержащем 10 мМ HEPES, 0,5 мМ PMSF в качестве ингибитора сериновых протеаз и 5 мМ ЭДТА в качестве ингибитора металлопротеиназ. Перед обезвоживанием клетки дополнительно фиксировали 1%-ной четырехокисью осмия в 0,1 М растворе какодилата натрия, содержащем 0,1 М сахарозы (pH 7,3). Для обезвоживания клетки проводили через ряд растворов ацетона (10–100%) и сушили в аппарате Бальцера в критической точке с жидким CO₂ в качестве переходной жидкости. После напыления золотом/палладием образцы исследовали при 15 кВ с помощью сканирующего электронного микроскопа Camscan S-2 («Cambridge Instrument Corporation», Великобритания).

Для количественной оценки влияния дексаметазона на морфологию нейтрофилов измеряли площадь, занимаемую прикрепленными клетками на субстрате, периметр и коэффициент поляризации клеток. Коэффициент поляризации рассчитывали как соотношение длинной и короткой осей клетки, если ее форму представить в виде эллипса [33]. Программу ImageJ-win64 использовали для измерения параметров клеток на изображениях, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии. Для каждой экспериментальной группы измеряли параметры 10–15 клеток.

Отбор внеклеточной среды для выделения и идентификации аминокислот и белков, секретированных нейтрофилами в процессе адгезии. Для этих экспериментов 6-луночные культуральные планшеты («Greiner bio-one») инкубировали в течение 2 ч с раствором фибриногена (5 мкг/мл) и промывали. Нейтрофилы высевали в каждую лунку (3×10^6 клеток на лунку) и инкубировали в течение 25 мин при 37 °С в инкубаторе с 5% CO₂ в контрольных условиях (в HBSS, содержащем 10 мМ HEPES при pH 7,35) или в присутствии дексаметазона (0,1–10 мкМ). После этого отбирали образцы внеклеточной среды и добавляли смесь инги-

биторов (5 мМ ЭДТА, ингибитор металлопротеиназ; 200 мкМ PMSF, ингибитор сериновых протеиназ; 10 мкМ E64, ингибитор цистеиновых протеиназ, 0,025% азида натрия, ингибитор миелопероксидазы). Затем образцы внеклеточной среды подвергали центрифугированию (5 мин при 400 g) для удаления неприкрепленных клеток.

Аминокислотный анализ и подготовка образцов. Для аминокислотного анализа образцы внеклеточной среды из трех одинаковых лунок объединяли и концентрировали на Centrивap Concentrator («Labconco», США). Затем белки осаждали сульфосалициловой кислотой (4,4%) и удаляли центрифугированием при 18 000 g. Супернатанты дополнительно центрифугировали через ультрафильтры Vivaspin 500 Membrane 3000 PES MWCO («Sartorius», Германия). Аминокислоты разделяли и количественно определяли с использованием анализатора аминокислот L-8800 («Hitachi», Япония). Процедуры проводили в стандартном режиме, согласно инструкции производителя («Hitachi High-Technologies Corporation», Япония, 1998 г.). Концентрированные и не содержащие белков образцы внеклеточной среды разделяли на ионообменной колонке 2622SC (PH) («Hitachi», P/N 855-4506; 4,6 × 60 мм) с использованием ступенчатого градиента четырех натрий-ацетатных буферов при скорости потока 0,4 мл/мин при 57 °С. Для постколоночной дериватизации использовали смесь равных объемов нингидринового буфера R2 и раствора нингидрина R1 («Wako Pure Chemical Industries», Япония; P/N 298-69601). Образование окрашенных продуктов оценивали путем измерения поглощения при 570 нм встроенным детектором анализатора аминокислот. Данные обрабатывали с помощью программы MultiChrom для Windows («Амперсанд», Москва, Россия).

Выделение и разделение белков, секретированных нейтрофилами, при адгезии к фибриногену. Для выделения белков образцы внеклеточной среды из шести одинаковых лунок объединяли и смешивали с равным объемом смеси (хлороформ/метанол = 2/1, (v/v)). После смешивания с помощью Vortex и шейкера при 4 °С в течение 30 мин полученную смесь подвергали центрифугированию при 11 000 g в течение 20 мин для разделения фаз. Хлороформенную фазу собирали и после выпаривания растворителя подвергали электрофорезу. Наша предыдущая работа показала, что хлороформенная фаза содержит почти все белки внеклеточной среды, а водно-метанольная фаза содержит только следовые коли-

чества белков. Белки хлороформенной фазы разделяли одномерным электрофорезом в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (SDS-PAGE) с использованием оборудования MiniPROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США) и 15%-ного полиакриламидного геля в невосстанавливающих условиях, как было опубликовано ранее [20]. Белковые полосы в геле окрашивали 0,22%-ным Coomassie Brilliant Blue G-250.

Идентификация белков методом масс-спектрометрии. Из каждой окрашенной Coomassie Brilliant Blue белковой полосы вырезали кусочки геля, обезвоживали, сушили на воздухе и проводили трипсиновый гидролиз прямо в геле, как описано ранее [20]. Образовавшиеся в результате гидролиза пептиды экстрагировали 0,5%-ной трифторуксусной кислотой и подвергали масс-спектрометрическому анализу. Аликвоты образцов смешивали на стальной мишени с 2,5-дигидроксibenзойной кислотой (30 мг/мл в 30%-ном ацетонитриле, в 0,5%-ной трифторуксусной кислоте) и высушивали при комнатной температуре. Белки MALDI-MS идентифицировали с использованием масс-спектрометра MALDI-ToF-ToF Ultraflextreme («Bruker», Германия), как описано ранее [20]. Молекулярные ионы $[M]^+$ измеряли в отражательном режиме. Точность измерения моноизотопного массового пика не превышала 30 ppm. Программное обеспечение Mascot 2.5.01 (<http://www.matrixscience.com>, по состоянию на 3 января 2021 г.) и база данных белков млекопитающих Swissprot использовались для поиска пептидных «отпечатков пальцев». Совпадения белков считались значимыми ($p < 0,05$), если оценка была > 68 .

Статистический анализ. Все эксперименты по изучению прикрепления нейтрофилов и морфологии прикрепленных клеток, количественной оценке образования АФК и NO, а также оценке аминокислотного и белкового состава секреции нейтрофилов повторяли трехкратно с использованием крови разных доноров. Для сравнения средних значений во всех случаях, кроме исследования секреции аминокислот, использовали однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA). Количественные характеристики профиля секреции аминокислот описывали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа с тестом Тьюки (two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test). Статистическую обработку и построение графиков количественных данных осуществляли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9.5.0 (GraphPad, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дексаметазон не влияет на прикрепление нейтрофилов к фибриногену и на морфологию прикрепленных клеток. Используя сканирующую электронную микроскопию, мы сравнили морфологию нейтрофилов, которые прикреплялись к субстратам, покрытым фибриногеном, в контрольных условиях или в присутствии дексаметазона (рис. 1, а–д). Дексаметазон в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ не влиял на морфологию прикрепленных нейтрофилов (рис. 1, а). Определение средней площади, занимаемой клетками на субстрате, среднего периметра и среднего коэффициента поляризации клеток было проведено с помощью программы ImageJ-win64 на микрофотографиях клеток. Значимой разницы в значениях этих параметров между контрольными клетками и клетками, прикрепившимися к фибриногену в присутствии дексаметазона, не обнаружено (рис. 1, б–г).

Мы также изучали влияние дексаметазона на прикрепление нейтрофилов к субстрату. После прикрепления нейтрофилов к фибриногену и удаления не прикрепившихся к субстрату клеток количество прочно прикрепленных клеток определяли по интенсивности поглощения 2,3-диаминофеназина, окрашенного продукта катализируемого миелопероксидазой окисления о-фенилендиамина дигидрохлорида. Присутствие дексаметазона в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ не влияло на прикрепление нейтрофилов к фибриногену в наших экспериментах (рис. 1, д).

Продукция активных форм кислорода нейтрофилами при адгезии к фибриногену не изменялась в присутствии дексаметазона. Интегрин-зависимая адгезия к субстрату сама по себе, в отсутствие других стимулов, инициирует продукцию АФК нейтрофилами [21, 22]. Результаты настоящей статьи демонстрируют, что адгезия нейтрофилов к субстрату, покрытому фибриногеном, в контрольных условиях также сопровождается продукцией АФК. При этом присутствие дексаметазона в диапазоне концентраций 0,1–10 мкМ не влияет на продукцию АФК нейтрофилами, по результатам измерения флуоресценции через 30 мин после начала процесса адгезии (рис. 2, а).

Следует отметить, что адгезия сама по себе является довольно слабым индуктором генерации АФК. Так, добавление даже незначительного количества классического стимулятора NADPH-оксидазы, РМА, уже через 30 мин обеспечивало пятикратное превышение интенсивности флуоресценции в сравне-

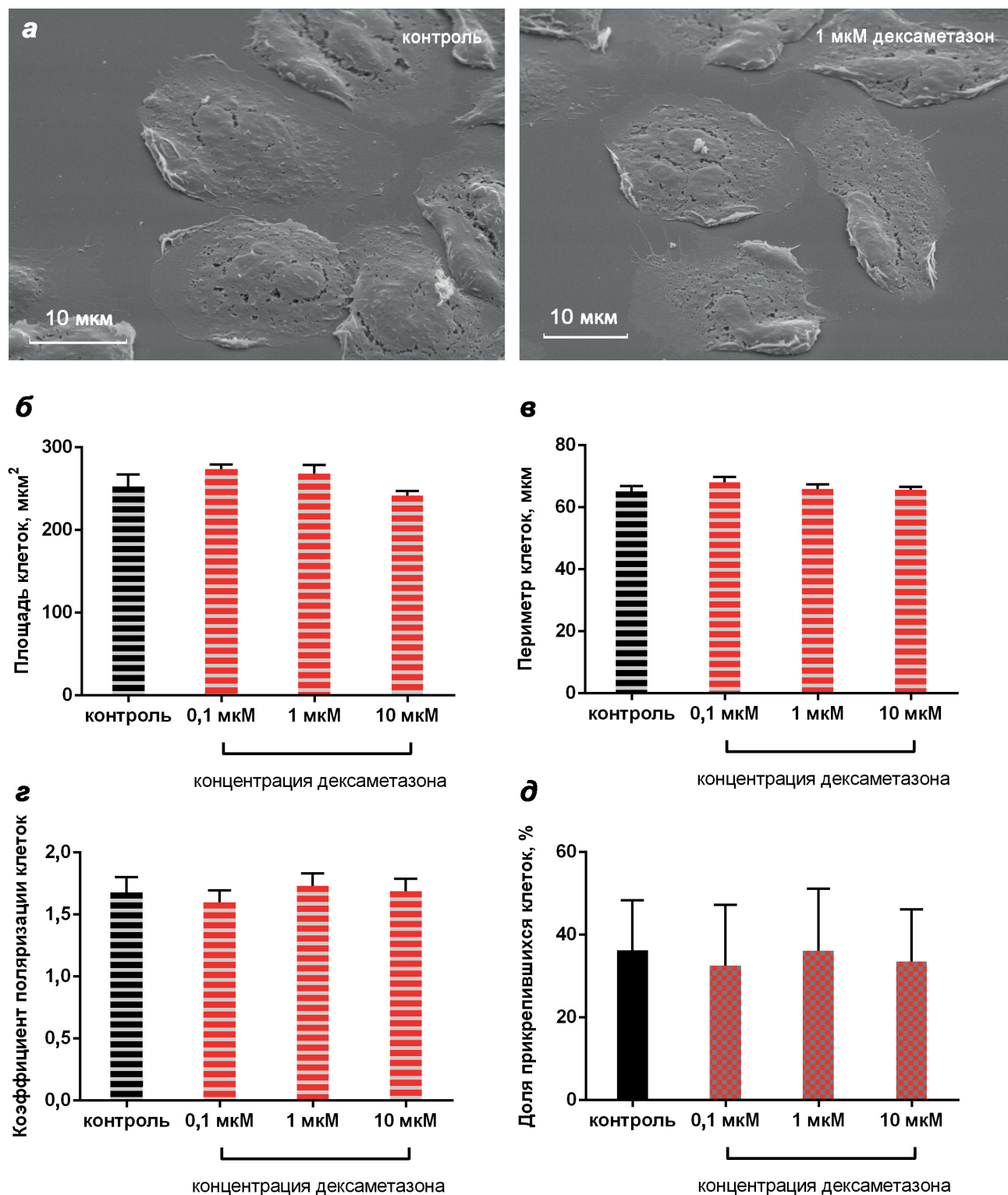


Рис. 1. Влияние дексаметазона на прикрепление нейтрофилов к субстрату и морфологию прикрепленных клеток. *а* – Изображения нейтрофилов, полученные с помощью сканирующей электронной микроскопии. Нейтрофилы прикреплялись к субстратам, покрытым фибриногеном, в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 1 мкМ дексаметазона. На рисунке представлены типичные изображения нейтрофилов, наблюдавшиеся в трех независимых экспериментах. *б* – Средние значения площади, занимаемой нейтрофилами на субстрате, *в* – периметра и *г* – коэффициента поляризации клеток, определенные с помощью программы ImageJ-win64 на микроскопических изображениях. *д* – Доля прочно прикрепленных нейтрофилов в процентах от общего числа клеток, которые прикреплялись к субстрату, покрытому фибриногеном, в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона. Представлены данные (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) трех независимых экспериментов с кровью разных доноров (*б–д*)

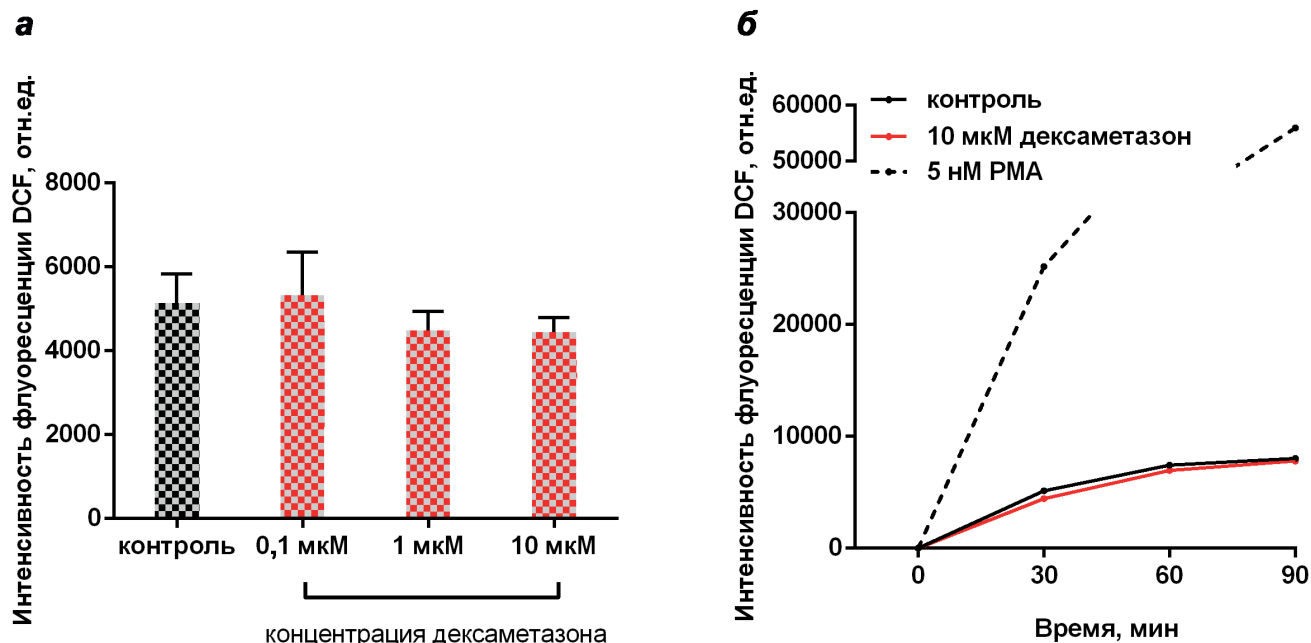


Рис. 2. Влияние дексаметазона на продукцию АФК нейтрофилами при адгезии к фибриногену. *а* – Интенсивность флуоресценции DCF, измеренная через 30 мин после начала инкубации нагруженных $H_2DCF\text{-}DA$ нейтрофилов, в покрытых фибриногеном 96-луночных планшетах при 37°C в атмосфере $5\%\text{ CO}_2$ в контрольных условиях и в присутствии 0,1; 1 и 10 мкМ дексаметазона. Данные представляют интенсивность флуоресценции DCF (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение) по результатам трех независимых экспериментов с кровью разных доноров. *б* – Типичные кинетические кривые флуоресценции DCF, зарегистрированные в процессе адгезии контрольных нейтрофилов в присутствии 10 мкМ дексаметазона или 5 нМ РМА

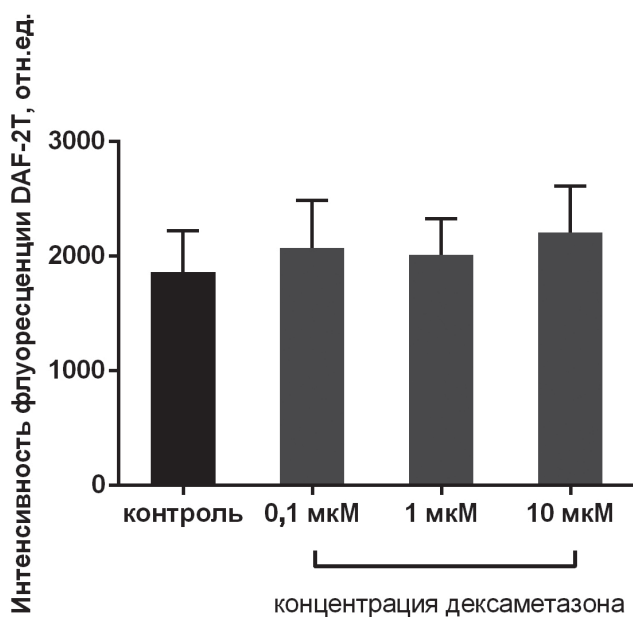


Рис. 3. Влияние дексаметазона на продукцию NO нейтрофилами при адгезии к фибриногену. Нагруженные DAF-2 нейтрофилы (4×10^5 клеток на мл) высевали в лунки, покрытые фибриногеном, на 30 мин при 37°C в атмосфере $5\%\text{ CO}_2$ в контрольных условиях или в присутствии 0,1; 1 или 10 мкМ дексаметазона. Представлены значения интенсивности флуоресценции DAF-2T (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; возбуждение/испускание – 488/525 нм), полученные в трех независимых экспериментах, выполненных на крови разных доноров

нии с контрольными образцами, стремительно нарастая во времени (рис. 2, б).

Производство NO нейтрофилами при адгезии не изменяется в присутствии дексаметазона. NO сам по себе и во взаимодействии с O_2 может играть важную роль в окислительных процессах и развитии воспаления. Данные о влиянии дексаметазона на продукцию NO весьма противоречивы [34–36]. Мы изучали влияние дексаметазона на высвобождение NO нейтрофилами при адгезии. Наши данные показали, что дексаметазон в концентрации 0,1–10 мкМ не влиял на продукцию NO нейтрофилами в течение 30 мин инкубации над субстратами, покрытыми фибриногеном (рис. 3).

Влияние дексаметазона на секрецию свободных аминокислот нейтрофилами в процессе адгезии. Наша предыдущая работа показала, что нейтрофилы имеют стабильный профиль секреции свободных аминокислот. Адгезия к субстрату сильно и избирательно влияет на секрецию гидроксилизина, но секреция других аминокислот не зависела от адгезии клеток [27, 28].

Дексаметазон в концентрации 0,1–1 мкМ статистически значимо стимулировал высвобождение гидроксилизина, но не влиял на секрецию других свободных аминокислот (рис. 4). Для исключения возможности появ-

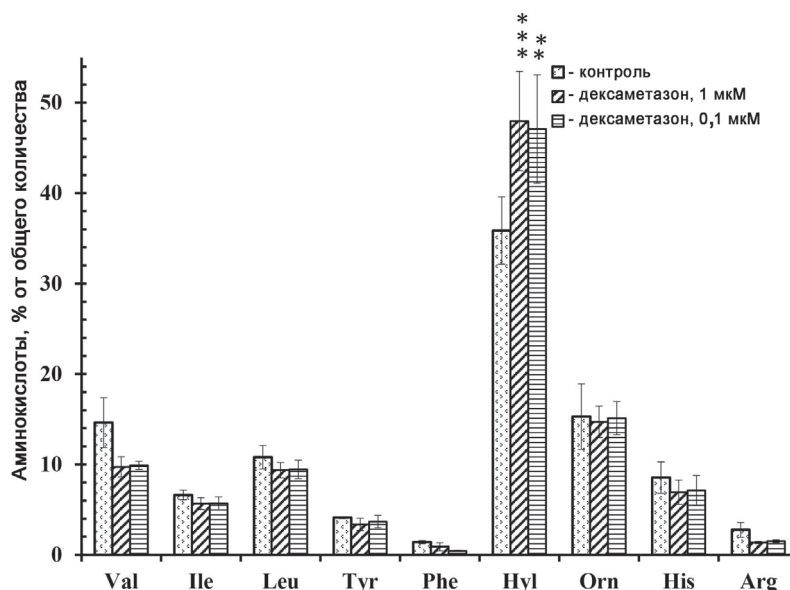


Рис. 4. Влияние дексаметазона на состав секреции свободных аминокислот, секретируемых нейтрофилами при адгезии к фибриногену. Нейтрофилы прикрепляли к субстратам, покрытым фибриногеном, в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 0,1 или 1 мкМ дексаметазона. Количество аминокислот представлено в процентах от общего содержания найденных свободных аминокислот (среднее значение $\pm$ стандартное отклонение). Аминокислотные профили построены по результатам трех независимых экспериментов, проделанных на крови разных доноров. * Достоверные различия по сравнению со значением для той же аминокислоты в контрольных клетках (** $p < 0,001$; *** $p < 0,0006$)

ления аминокислот во внеклеточной среде в результате разрушения клеток нейтрофилы после эксперимента и забора внеклеточной среды окрашивали трипановым синим. Процент мертвых (окрашенных) клеток не превышал 2% ни в одном образце.

Влияние дексаметазона на состав секреции белков нейтрофилами при адгезии к фибриногену. Интегрин-зависимая адгезия нейтрофилов сопровождается секрецией цитозольных белков и белков из внутриклеточных гранул трех типов, секреторных пузырьков и из цитоплазмы. Поскольку секреция белков из этих источников запускается разными стимулами, белковый состав секрета существенно зависит от условий [20]. После завершения адгезии нейтрофилов к субстрату (25 мин) отбирали внеклеточную среду, концентрировали и разделяли белки электрофорезом в полиакриламидном геле (SDS-PAGE). Окрашивание гелей серебром выявило многочисленные полосы, указывающие на то, что нейтрофилы выделяют большое количество белков при адгезии (данные не представлены). Чтобы иметь возможность идентифицировать белки с помощью масс-спектрометрии, гели в этой работе были окрашены красителем Coomassie Brilliant Blue, который выявляет только ограниченное количество основных белковых полос. Однако этот метод позволил нам различить профили белков, характерные для секреции нейтрофилов

во время адгезии в контрольных условиях и в присутствии дексаметазона.

Основными белками, секретируемыми нейтрофилами при адгезии к фибриногену в контрольных условиях и статистически значимо идентифицированными с помощью масс-спектрометрии, были лактоферрин (ЛФ), липокалин нейтрофилов, ассоциированный с желатиназой (NGAL), и лизозим — белки, преимущественно локализованные в специфических гранулах; сывороточный альбумин, локализованный в секреторных пузырьках; цитозольные белки S100A8 и S100A9 (рис. 5). Для исключения возможности появления белков во внеклеточной среде в результате гибели клеток нейтрофилы после опытов окрашивали трипановым синим. Процент погибших нейтрофилов не превышал 1–2%.

Белковый профиль секреции нейтрофилов при адгезии к фибриногену в присутствии дексаметазона включал, помимо белков, секретируемых контрольными клетками, матриксную металлопротеиназу-9, локализованную преимущественно в третичных гранулах, и цитозольный белок кальпротектин (рис. 5, таблица). Следует отметить, что дексаметазон не стимулировал высвобождение компонент первичных гранул, таких как сериновые протеазы и порообразующие пептиды, которые способны инициировать воспалительные процессы в тканях хозяина.

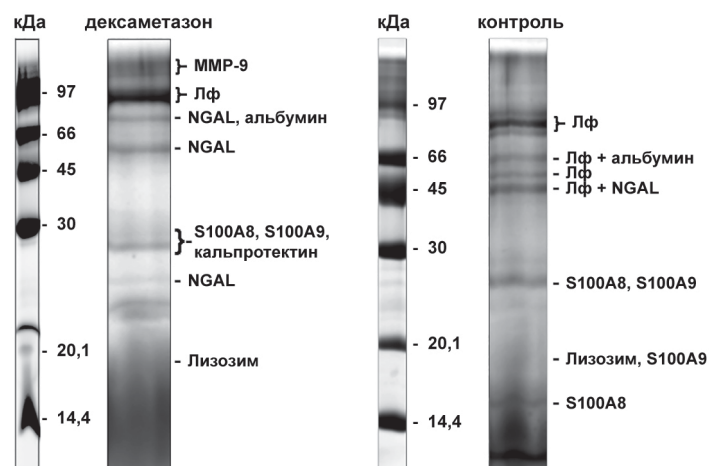


Рис. 5. Разделение SDS-PAGE белков, секретируемых нейтрофилами при адгезии к фибриногену в присутствии дексаметазона. Нейтрофилы человека инкубировали над субстратами, покрытыми фибриногеном, в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 1 мкМ дексаметазона. Образцы внеклеточной среды собирали, белки экстрагировали и разделяли с помощью 15%-ного SDS-PAGE. Гели окрашивали Coomassie Brilliant Blue. Представлены репрезентативные гели из трех аналогичных экспериментов, выполненных на крови разных доноров

Список белков, секретируемых нейтрофилами при адгезии к фибриногену

Название белка	Название белка		Пептиды, совпадающие/ общее число	Покрытие, %	Параметр достоверности (score)
	контроль	дексаметазон			
MMP9_HUMAN		MMP-9	14/50	22	97
TRFL_HUMAN	+	ЛФ	33/59	50	300
NGAL_HUMAN	+	NGAL	9/21	62	138
ALBU_HUMAN	+	альбумин	15/18	38	95
LYSC_HUMAN	+	лизозим	8/14	53	115
S10A9_HUMAN	+	S100-A9	7/24	60	96
S10A8_HUMAN	+	S100-A8	6/24	45	75
S10A8/A9_HUMAN		кальпротектин	7/24	61	101

Примечание. Нейтрофилы прикрепляли к фибриногену в течение 25 мин в контрольных условиях или в присутствии 1 мкМ дексаметазона. Белки экстрагировали из внеклеточной среды, разделяли с помощью SDS-PAGE и идентифицировали с помощью масс-спектрометрии. Данные масс-спектрометрии для идентифицированных белков были взяты из экспериментов с дексаметазоном. Сходные белки, идентифицированные во внеклеточной среде контрольных клеток, отмечены (+). Идентификация белка считалась достоверной ($p < 0,05$), если оценка была > 68 . Список включает белки, идентифицированные в трех аналогичных экспериментах, выполненных на крови разных доноров. MMP-9 – матриксная металлопротеиназа 9; ЛФ – лактоферрин; NGAL – липокалин нейтрофилов, ассоциированный с желатиназой; S100A8 и S100A9 – цитозольные белки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Дексаметазон, синтетический глюкокортикоидный гормон с иммунодепрессивным и противовоспалительным действием, используется при лечении аутоиммунных и многих других заболеваний, включая тяжелые формы COVID-19. Считается, что глюкокортикоиды проходят через клеточные мембраны

путем пассивной диффузии и соединяются в цитоплазме с внутриклеточными глюкокортикоидными рецепторами. Глюкокортикоидные рецепторы после связывания с лигандом перемещаются в ядро клетки, где они взаимодействуют с факторами транскрипции, тем самым вызывая геномные эффекты, которые изменяют экспрессию белка. Помимо геномных эффектов, глюкокортикоиды могут быстро

изменять свойства мембран, тем самым оказывая негеномное действие на клеточные процессы [16, 35, 37–39]. Острые негеномные эффекты дексаметазона на передачу сигналов и ионный транспорт изучались на эпителиальных клетках дыхательных путей. Дексаметазон быстро стимулировал обменную активность Na^+/H^+ -антипорта, но вызывал снижение внутриклеточного Ca^{2+} и ингибировал секрецию Cl^- и K^+ мембранных каналов [15, 40].

Результаты наших экспериментов демонстрируют, что краткосрочное действие (25–30 мин) дексаметазона не оказывает влияния на прикрепление нейтрофилов к покрытому фибриногеном субстрату и на продукцию АФК, сопровождающую этот процесс (рис. 1, 2). Наши результаты подтверждают ранее опубликованные данные об отсутствии влияния дексаметазона на продукцию нейтрофилами супероксид-анион-радикалов (O_2^-), измеряемую по восстановлению цитохрома *c* [41]. Более того, в экспериментах с периферическими нейтрофилами крыс наблюдалось быстрое негеномное ингибирующее действие дексаметазона на индуцированное РМА образование O_2^- [42].

Дексаметазон также не влиял на продукцию нейтрофилами NO в процессе адгезии (рис. 3). Опубликованные данные показывают, что дексаметазон в концентрации 0,1 мкМ активирует эндотелиальную NO-синтазу по быстрому нетранскрипционному пути, в течение 10 мин увеличивая выброс NO в 2,5–3 раза [34]. В нейтрофилах экспрессируется NO-синтаза нейронального типа [43]. Хотя обе изоформы являются конститутивными и Ca^{2+} -зависимыми, они регулируются по-разному [44]. Данные о влиянии дексаметазона на активность нейрональной изоформы противоречивы. Показано, что дексаметазон вызывает быстрое негеномное увеличение на 20–50% продукции NO, инициируемой внеклеточным АТР в нейронах спирального ганглия улитки [35]. Напротив, вклад дексаметазона в обезболивающий эффект блокады седалищного нерва у мышей с моделью послеоперационной боли был связан с подавлением синтеза NO [36]. Следует отметить, что дексаметазон вызывает быстрое негеномное снижение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что может способствовать подавлению продукции NO Ca^{2+} -зависимыми изоформами NO-синтазы [45].

Наши результаты демонстрируют, что дексаметазон вызывает статистически достоверное увеличение высвобождения гидроксилизина нейтрофилами в процессе адгезии и стимулирует секрецию MMP-9 в дополнение

к белкам, секретируемым в контрольных условиях (рис. 4 и 5, таблица). Ранее нами было показано, что адгезия нейтрофилов к субстрату значительно и селективно стимулирует высвобождение гидроксилизина, но не влияет на секрецию других аминокислот [27, 28]. Высвобождение гидроксилизина обеспечивается лизилгидроксилазой (ЛГ), поскольку ингибируется миноксидилом, ингибитором ЛГ [27]. ЛГ осуществляет посттрансляционную модификацию остатков лизина в молекуле коллагена в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме клеток, модулируя таким образом организацию внеклеточного матрикса [46]. В опухолевых клетках ЛГ может также секретироваться во внеклеточное пространство и модифицировать там коллаген и другие белки [47–49]. Согласно многочисленным данным, повышение экспрессии и активности ЛГ является мощным промотором метастазирования опухолей и потенциальной мишенью для лечения рака [29–31].

Ранее мы показали, что высвобождение гидроксилизина подавляется доксициклином, ингибитором матриксных металлопротеиназ. Это указывает на тесное взаимодействие между ЛГ и металлопротеиназами в процессе модификации внеклеточной среды во время адгезии нейтрофилов [27]. Металлопротеиназы играют важную роль в миграции нейтрофилов и их инвазии в ткани [50–54]. Ингибирование активности MMP-9 доксициклином предотвращает инфильтрацию нейтрофилов в легочную ткань и подавляет воспаление при заражении *Streptococcus pneumoniae* при воздействии липополисахаридами (LPS) или токсичными гербицидами [55–57]. MMP-2 и MMP-9 обеспечивают проникновение лейкоцитарных клеток в центральную нервную систему, разрушая гематоэнцефалический барьер [58]. Стимуляция секреции MMP-9 нейтрофилами при заражении микобактериями туберкулеза способствует разрушению коллагена типа 4, являющегося основой гематоэнцефалического барьера [59]. Дефицит MMP-9 сам по себе подавляет инвазию лейкоцитов в печень и защищает от реперфузии после ишемии [60].

Механизм взаимодействия ЛГ и металлопротеиназ при адгезии и инвазии нейтрофилов не изучен, но некоторые данные получены для опухолевых клеток. MMP-9 представляет собой секретируемый фермент, который может быть локализован на поверхности клетки. Прикрепление MMP-9 к клеточной поверхности может защитить фермент от естественных ингибиторов и способствовать реорганизации внеклеточного матрикса для обеспечения

клеточной инвазии. Одной из молекул, ответственных за иммобилизацию MMP-9 на поверхности фибробластов в строме опухоли, является молекула ЛГ (LN3 или PLOD3). Взаимодействие между MMP-9 и LN3 запускает активацию TGF- β и дифференцировку фибробластов в миофибробласты, которые усиливают прогрессирование опухоли за счет ремоделирования стромы [61]. CD44, рецептор гиалуроновой кислоты, также может связывать MMP-9 на поверхности кератиноцитов и некоторых опухолевых клеток [62–64]. Предполагается, что локализованная на клеточной поверхности MMP-9 может протеолитически активировать TGF- β и способствовать инвазии опухоли [65].

Взаимодействие ЛГ и MMP-9 в опухолевых клетках и нейтрофилах требует интактного актинового цитоскелета. Цитохалазин D и все воздействия, так или иначе нарушающие целостность актинового цитоскелета, подавляли высвобождение гидроксизина [27] и нарушали секрецию MMP-9 при адгезии нейтрофилов [25]. Ингибирование полимеризации актина алендронатом или цитохалазином D эффективно блокировало образование комплекса CD44/MMP-9 и подавляло секрецию активной формы MMP-9 и миграцию опухолевых клеток [66, 67].

Терапевтический эффект дексаметазона может реализовываться через изменение секреции нейтрофилов, приводящее к реорганизации внеклеточного матрикса, способствующей инвазии нейтрофилов. Согласно механистической модели, у пациентов с тяжелым течением заболевания COVID-19 «брадикининовый шторм» вызывает утечку жидкости в легкие.

Предполагается, что избыток жидкости в сочетании с избытком гиалуроновой кислоты в легких пациентов приводит к образованию желеобразных структур, препятствующих поглощению кислорода и выделению углекислого газа [68]. Мы предполагаем, что индуцированная дексаметазоном активация ЛГ и секреция MMP-9 и их взаимодействие с CD44, рецептором гиалуроновой кислоты, могут нарушать образование геля и нормализовать газообмен в легких пациентов. Это предположение согласуется с тем фактом, что дексаметазон улучшает выживаемость пациентов с тяжелым течением COVID-19, получающих кислород или искусственную вентиляцию легких из-за затрудненного дыхания. У остальных пациентов препарат был неэффективен.

Вклад авторов. С.И. Галкина, Е.А. Голенкина, Г.Ф. Судьина — концепция и написание статьи; С.И. Галкина, Е.А. Голенкина, Н.И. Федорова, А.Л. Ксенофонтов, М.В. Серебрякова, В.И. Стадничук, Л.А. Баратова, Г.Ф. Судьина — проведение экспериментов, обработка и обсуждение результатов, оформление статьи. Г.Ф. Судьина, Л.А. Баратова — обеспечение ресурсов для выполнения экспериментов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Работа с нейтрофилами человека поддержана Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова. Заявка № 6-ч ред. 3 одобрена на заседании Комиссии по биоэтике № 131-д 31 мая 2021 г. Все доноры дали информированное согласие.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schofield, Z. V., Woodruff, T. M., Halai, R., Wu, M. C., and Cooper, M. A. (2013) Neutrophils — a key component of ischemia reperfusion injury, *Shock*, **40**, 463–470, doi: 10.1097/SHK.0000000000000044.
2. Patel, N. (2009) Targeting leukostasis for the treatment of early diabetic retinopathy, *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets*, **9**, 222–229, doi: 10.2174/187152909789007052.
3. Liu, W., Cronin, C. G., Cao, Z., Wang, C., Ruan, J., Pulikkot, S., Hall, A., Sun, H., Groisman, A., Chen, Y., Vella, A. T., Hu, L., Liang, B. T., and Fan, Z. (2022) Nexinhib20 inhibits neutrophil adhesion and β_2 integrin activation by antagonizing Rac-1-guanosine 5'-triphosphate interaction, *J. Immunol.*, **209**, 1574–1585, doi: 10.4049/jimmunol.2101112.
4. Giacalone, V. D., Margaroli, C., Mall, M. A., and Tirouvanziam, R. (2020) Neutrophil adaptations upon recruitment to the lung: new concepts and implications for homeostasis and disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 851, doi: 10.3390/ijms21030851.
5. Laval, J., Ralhan, A., and Hartl, D. (2016) Neutrophils in cystic fibrosis, *Biol. Chem.*, **397**, 485–496, doi: 10.1515/hsz-2015-0271.
6. Russell, D. W., Gaggar, A., and Solomon, G. M. (2016) Neutrophil fates in bronchiectasis and alpha-1 antitrypsin deficiency, *Ann. Am. Thoracic Soc.*, **13**, S123–S129, doi: 10.1513/AnnalsATS.201512-805KV.
7. Chiang, C. C., Korinek, M., Cheng, W. J., and Hwang, T. L. (2020) Targeting neutrophils to treat acute respiratory distress syndrome in coronavirus

- disease, *Front. Pharmacol.*, **11**, 572009, doi: 10.3389/fphar.2020.572009.
8. Meizlish, M. L., Pine, A. B., Bishai, J. D., Goshua, G., Nadelmann, E. R., Simonov, M., Chang, C. H., Zhang, H., Shallow, M., Bahel, P., Owusu, K., Yamamoto, Y., Arora, T., Atri, D. S., Patel, A., Gbyli, R., Kwan, J., Won, C. H., Dela Cruz, C., Price, C., et al. (2021) A neutrophil activation signature predicts critical illness and mortality in COVID-19, *Blood Adv.*, **5**, 1164-1177, doi: 10.1182/bloodadvances.2020003568.
 9. Ahmed, M. H., and Hassan, A. (2020) Dexamethasone for the treatment of coronavirus disease (COVID-19): a review, *SN Comprehensive Clin. Med.*, **2**, 2637-2646, doi: 10.1007/s42399-020-00610-8.
 10. Nhean, S., Varela, M. E., Nguyen, Y. N., Juarez, A., Huynh, T., Udeh, D., and Tseng, A. L. (2023) COVID-19: a review of potential treatments (corticosteroids, remdesivir, tocilizumab, bamlanivimab/etesevimab, and casirivimab/imdevimab) and pharmacological considerations, *J. Pharm. Pract.*, **36**, 407-417, doi: 10.1177/08971900211048139.
 11. Hong, S., Wang, H., Li, S., Liu, J., and Qiao, L. (2023) A systematic review and meta-analysis of glucocorticoids treatment in severe COVID-19: methylprednisolone versus dexamethasone, *BMC Infect. Diseases*, **23**, 290, doi: 10.1186/s12879-023-08280-2.
 12. Mohammed, M. A. (2023) Fighting cytokine storm and immunomodulatory deficiency: by using natural products therapy up to now, *Front. Pharmacol.*, **14**, 1111329, doi: 10.3389/fphar.2023.1111329.
 13. Hafkamp, F. M. J., Mol, S., Waque, I., and De Jong, E. C. (2022) Dexamethasone, but not vitamin D or A, dampens the inflammatory neutrophil response to protect at-risk COVID-19 patients, *Immune Netw.*, **22**, e36, doi: 10.4110/in.2022.22.e36.
 14. Sinha, S., Rosin, N. L., Arora, R., Labit, E., Jaffer, A., Cao, L., Farias, R., Nguyen, A. P., de Almeida, L. G. N., Dufour, A., Bromley, A., McDonald, B., Gillrie, M. R., Fritzler, M. J., Yipp, B. G., and Biernaskie, J. (2022) Dexamethasone modulates immature neutrophils and interferon programming in severe COVID-19, *Nat. Med.*, **28**, 201-211, doi: 10.1038/s41591-021-01576-3.
 15. Urbach, V., Verriere, V., Grumbach, Y., Bousquet, J., and Harvey, B. J. (2006) Rapid anti-secretory effects of glucocorticoids in human airway epithelium, *Steroids*, **71**, 323-328, doi: 10.1016/j.steroids.2005.09.014.
 16. Panettieri, R. A., Schaafsma, D., Amrani, Y., Koziol-White, C., Ostrom, R., and Tliba, O. (2019) Non-genomic effects of glucocorticoids: an updated view, *Trends Pharmacol. Sci.*, **40**, 38-49, doi: 10.1016/j.tips.2018.11.002.
 17. Ronchetti, S., Ricci, E., Migliorati, G., Gentili, M., and Riccardi, C. (2018) How glucocorticoids affect the neutrophil life, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 4090, doi: 10.3390/ijms19124090.
 18. Subrahmanyam, Y. V., Yamaga, S., Prashar, Y., Lee, H. H., Hoe, N. P., Kluger, Y., Gerstein, M., Goguen, J. D., Newburger, P. E., and Weissman, S. M. (2001) RNA expression patterns change dramatically in human neutrophils exposed to bacteria, *Blood*, **97**, 2457-2468, doi: 10.1182/blood.v97.8.2457.
 19. Monteseirin, J., Chacon, P., Vega, A., El Bekay, R., Alvarez, M., Alba, G., Conde, M., Jimenez, J., Asturias, J. A., Martinez, A., Conde, J., Pintado, E., Bedoya, F. J., and Sobrino, F. (2004) Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation, *J. Leukoc. Biol.*, **76**, 692-700, doi: 10.1189/jlb.0903441.
 20. Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Serebryakova, M. V., Romanova, J. M., Golyshev, S. A., Stadnichuk, V. I., Baratova, L. A., Sud'ina, G. F., and Klein, T. (2012) Proteome analysis identified human neutrophil membrane tubulovesicular extensions (cytonemes, membrane tethers) as bactericide trafficking, *Biochim. Biophys. Acta*, **1820**, 1705-1714, doi: 10.1016/j.bbagen.2012.06.016.
 21. Menegazzi, R., Busetto, S., Decleva, E., Cramer, R., Dri, P., and Patriarca, P. (1999) Triggering of chloride ion efflux from human neutrophils as a novel function of leukocyte beta 2 integrins: relationship with spreading and activation of the respiratory burst, *J. Immunol.*, **162**, 423-434, doi: 10.4049/jimmunol.162.1.423.
 22. Umanskiy, K., Robinson, C., Cave, C., Williams, M. A., Lentsch, A. B., Cuschieri, J., and Solomkin, J. S. (2003) NADPH oxidase activation in fibronectin adherent human neutrophils: A potential role for beta1 integrin ligation, *Surgery*, **134**, 378-383, doi: 10.1067/msy.2003.253.
 23. Galkina, S. I., Golenkina, E. A., Serebryakova, M. V., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Stadnichuk, V. I., and Sud'ina, G. F. (2022) Ivermectin affects neutrophil-induced inflammation through inhibition of hydroxylysine but stimulation of cathepsin G and phenylalanine secretion, *Biomedicines*, **10**, 3284, doi: 10.3390/biomedicines10123284.
 24. Golenkina, E. A., Galkina, S. I., Viryasova, G. M., and Sud'ina, G. F. (2023) The pro-oxidant effect of class A CpG ODNs on human neutrophils includes both non-specific stimulation of ROS production and structurally determined induction of NO synthesis, *Oxygen*, **3**, 20-31, doi: 10.3390/oxygen3010002.
 25. Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Serebryakova, M. V., Arifulin, E. A., Stadnichuk, V. I., Baratova, L. A., and Sud'ina, G. F. (2017) Mold alkaloid cytochalasin D modifies the morphology and secretion of fMLP-, LPS-, or PMA-stimulated neutrophils upon adhesion to fibronectin, *Mediat. Inflamm.*, **2017**, 4308684, doi: 10.1155/2017/4308684.
 26. Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Serebryakova, M. V., Stadnichuk, V. I., Gaponova, T. V., Baratova, L. A., Sud'ina, G. F., and Galkina, S. I. (2018) Neutrophils release metalloproteinases during adhesion

- in the presence of insulin, but cathepsin G in the presence of glucagon, *Mediat. Inflamm.*, **2018**, 1574928, doi: 10.1155/2018/1574928.
27. Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Serebryakova, M. V., Golenkina, E. A., Stadnichuk, V. I., Baratova, L. A., and Sud'ina, G. F. (2021) Neutrophil adhesion and the release of the free amino acid hydroxylysine, *Cells*, **10**, 563, doi: 10.3390/cells10030563.
 28. Galkina, S. I., Fedorova, N. V., Ksenofontov, A. L., Stadnichuk, V. I., Baratova, L. A., and Sud'ina, G. F. (2019) Neutrophils as a source of branched-chain, aromatic and positively charged free amino acids, *Cell Adhes. Migrat.*, **13**, 98-105, doi: 10.1080/19336918.2018.1540903.
 29. Song, Y., Zheng, S., Wang, J., Long, H., Fang, L., Wang, G., Li, Z., Que, T., Liu, Y., Li, Y., Zhang, X., Fang, W., and Qi, S. (2017) Hypoxia-induced PLOD2 promotes proliferation, migration and invasion via PI3K/Akt signaling in glioma, *Oncotarget*, **8**, 41947-41962, doi: 10.18632/oncotarget.16710.
 30. Qi, Q., Huang, W., Zhang, H., Zhang, B., Sun, X., Ma, J., Zhu, C., and Wang, C. (2021) Bioinformatic analysis of PLOD family member expression and prognostic value in non-small cell lung cancer, *Transl. Cancer Res.*, **10**, 2707-2724, doi: 10.21037/tcr-21-73.
 31. Wan, J., Qin, J., Cao, Q., Hu, P., Zhong, C., and Tu, C. (2020) Hypoxia-induced PLOD2 regulates invasion and epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinoma cells, *Genes Genomics*, **42**, 317-324, doi: 10.1007/s13258-019-00901-y.
 32. Ngo, T. T., and Lenhoff, H. M. (1980) A sensitive and versatile chromogenic assay for peroxidase and peroxidase-coupled reactions, *Anal. Biochem.*, **105**, 389-397, doi: 10.1016/0003-2697(80)90475-3.
 33. Petrov, Iu. P., Neguliaev, Iu. A., and Tsupkina, N. V. (2014) Morphology of NCTC cells upon a contact with type I collagen added to culture medium [in Russian], *Tsitologija*, **56**, 591-598.
 34. Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, Z., Limbourg, F. P., Plumier, J. C., Rebsamen, M. C., Hsieh, C. M., Chui, D. S., Thomas, K. L., Prorock, A. J., Laubach, V. E., Moskowitz, M. A., French, B. A., Ley, K., and Liao, J. K. (2002) Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase, *Nat. Med.*, **8**, 473-479, doi: 10.1038/nm0502-473.
 35. Yukawa, H., Shen, J., Harada, N., Cho-Tamaoka, H., and Yamashita, T. (2005) Acute effects of glucocorticoids on ATP-induced Ca^{2+} mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons, *Neuroscience*, **130**, 485-496, doi: 10.1016/j.neuroscience.2004.09.037.
 36. Matsuda, K., Sasaki, M., Baba, H., and Kamiya, Y. (2022) Neuronal nitric oxide synthase suppression confers the prolonged analgesic effect of sciatic nerve block with perineural dexamethasone in postoperative pain model mice, *J. Pain*, **23**, 1765-1778, doi: 10.1016/j.jpain.2022.06.001.
 37. Calzetta, L., Chetta, A., Aiello, M., Pistocchini, E., and Rogliani, P. (2022) The impact of corticosteroids on human airway smooth muscle contractility and airway hyperresponsiveness: a systematic review, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 15285, doi: 10.3390/ijms232315285.
 38. Jia, W. Y., and Zhang, J. J. (2022) Effects of glucocorticoids on leukocytes: genomic and non-genomic mechanisms, *World J. Clin. Cases*, **10**, 7187-7194, doi: 10.12998/wjcc.v10.i21.7187.
 39. Nunez, F. J., Johnstone, T. B., Corpuz, M. L., Kazarian, A. G., Mohajer, N. N., Tliba, O., Panettieri, R. A., Jr., Koziol-White, C., Roosan, M. R., and Ostrom, R. S. (2020) Glucocorticoids rapidly activate cAMP production via G(alphas) to initiate non-genomic signaling that contributes to one-third of their canonical genomic effects, *FASEB J.*, **34**, 2882-2895, doi: 10.1096/fj.201902521R.
 40. Hynes, D., and Harvey, B. J. (2019) Dexamethasone reduces airway epithelial Cl^- secretion by rapid non-genomic inhibition of KCNQ1, KCNN4 and KATP K^+ channels, *Steroids*, **151**, 108459, doi: 10.1016/j.steroids.2019.108459.
 41. Freischlag, J. A., Colburn, M. D., Quinones-Baldrich, W. J., and Moore, W. S. (1992) Alteration of neutrophil (PMN) function by heparin, dexamethasone, and enalapril, *J. Surg. Res.*, **52**, 523-529, doi: 10.1016/0022-4804(92)90322-q.
 42. Liu, D., Xiong, R., Chen, X., Li, P., Ning, Y., Peng, Y., Zhao, Y., Yang, N., and Zhou, Y. (2014) The glucocorticoid dexamethasone inhibits U937 cell adhesion and neutrophil release via RhoA/ROCK1-dependent and independent pathways, *Cell. Physiol. Biochem.*, **33**, 1654-1662, doi: 10.1159/000362948.
 43. Wallerath, T., Gath, I., Aulitzky, W. E., Pollock, J. S., Kleinert, H., and Forstermann, U. (1997) Identification of the NO synthase isoforms expressed in human neutrophil granulocytes, megakaryocytes and platelets, *Thromb. Haemost.*, **77**, 163-167, doi: 10.1055/s-0038-1655925.
 44. Bellefontaine, N., Hanchate, N. K., Parkash, J., Campagne, C., de Seranno, S., Clasadonte, J., d'Anglemonet de Tassigny, X., and Prevot, V. (2011) Nitric oxide as key mediator of neuron-to-neuron and endothelial-to-glia communication involved in the neuroendocrine control of reproduction, *Neuroendocrinology*, **93**, 74-89, doi: 10.1159/000324147.
 45. Urbach, V., Walsh, D. E., Mainprice, B., Bousquet, J., and Harvey, B. J. (2002) Rapid non-genomic inhibition of ATP-induced Cl^- secretion by dexamethasone in human bronchial epithelium, *J. Physiol.*, **545**, 869-878, doi: 10.1113/jphysiol.2002.028183.
 46. Risteli, M., Ruotsalainen, H., Salo, A. M., Sormunen, R., Sipila, L., Baker, N. L., Lamande, S. R., Vimpari-

- Kauppinen, L., and Myllyla, R. (2009) Reduction of lysyl hydroxylase 3 causes deleterious changes in the deposition and organization of extracellular matrix, *J. Biol. Chem.*, **284**, 28204-28211, doi: 10.1074/jbc.M109.038190.
47. Salo, A. M., Wang, C., Sipila, L., Sormunen, R., Vapola, M., Kervinen, P., Ruotsalainen, H., Heikkinen, J., and Myllyla, R. (2006) Lysyl hydroxylase 3 (LH3) modifies proteins in the extracellular space, a novel mechanism for matrix remodeling, *J. Cell. Physiol.*, **207**, 644-653, doi: 10.1002/jcp.20596.
48. Chen, Y., Guo, H., Terajima, M., Banerjee, P., Liu, X., Yu, J., Momin, A. A., Katayama, H., Hanash, S. M., Burns, A. R., Fields, G. B., Yamauchi, M., and Kurie, J. M. (2016) Lysyl hydroxylase 2 is secreted by tumor cells and can modify collagen in the extracellular space, *J. Biol. Chem.*, **291**, 25799-25808, doi: 10.1074/jbc.M116.759803.
49. Wang, C., Ristiluoma, M. M., Salo, A. M., Eskelinen, S., and Myllyla, R. (2012) Lysyl hydroxylase 3 is secreted from cells by two pathways, *J. Cell. Physiol.*, **227**, 668-675, doi: 10.1002/jcp.22774.
50. Faurschou, M., and Borregaard, N. (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation, *Microbes Infect.*, **5**, 1317-1327, doi: 10.1016/j.micinf.2003.09.008.
51. Sheng, Y., Peng, W., Huang, Y., Cheng, L., Meng, Y., Kwantwi, L. B., Yang, J., Xu, J., Xiao, H., Kzhyshkowska, J., and Wu, Q. (2023) Tumor-activated neutrophils promote metastasis in breast cancer via the G-CSF-RLN2-MMP-9 axis, *J. Leukoc. Biol.*, **113**, 383-399, doi: 10.1093/jleuko/qiad004.
52. Bostanci Durmus, A., Dincer Cengiz, S., Yilmaz, H., Candar, T., Gursoy, A. Y., and Sinem Caglar, G. (2019) The levels of matrix metalloproteinase-9 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin in different stages of endometriosis, *J. Obstetrics Gynaecol.*, **39**, 991-995, doi: 10.1080/01443615.2019.1584889.
53. He, Z., Paule, M. G., and Ferguson, S. A. (2012) Low oral doses of bisphenol A increase volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in male, but not female, rats at postnatal day 21, *Neurotoxicol. Teratol.*, **34**, 331-337, doi: 10.1016/j.ntt.2012.03.004.
54. Jiguet-Jiglaire, C., Boissonneau, S., Denicolai, E., Hein, V., Lasseur, R., Garcia, J., Romain, S., Appay, R., Graillon, T., Mason, W., Carpentier, A. F., Brandes, A. A., Ouafik, L., Wick, W., Baaziz, A., Gigan, J. P., Arguello, R. J., Figarella-Branger, D., Chinot, O., and Tabouret, E. (2022) Plasmatic MMP9 released from tumor-infiltrating neutrophils is predictive for bevacizumab efficacy in glioblastoma patients: an AVAglio ancillary study, *Acta Neuropathol. Commun.*, **10**, 1, doi: 10.1186/s40478-021-01305-4.
55. Fujita, M., Harada, E., Ikegame, S., Ye, Q., Ouchi, H., Inoshima, I., and Nakanishi, Y. (2007) Doxycycline attenuated lung injury by its biological effect apart from its antimicrobial function, *Pulmonary Pharmacol. Ther.*, **20**, 669-675, doi: 10.1016/j.pupt.2006.08.006.
56. Moon, A., Gil, S., Gill, S. E., Chen, P., and Matute-Bello, G. (2012) Doxycycline impairs neutrophil migration to the airspaces of the lung in mice exposed to intratracheal lipopolysaccharide, *J. Inflamm.*, **9**, 31, doi: 10.1186/1476-9255-9-31.
57. Zhang, F., Hu, L., Wu, Y. X., Fan, L., Liu, W. T., Wang, J., Sun, H., and Zhang, J. S. (2019) Doxycycline alleviates paraquat-induced acute lung injury by inhibiting neutrophil-derived matrix metalloproteinase 9, *Int. Immunopharmacol.*, **72**, 243-251, doi: 10.1016/j.intimp.2019.04.015.
58. Feng, S., Cen, J., Huang, Y., Shen, H., Yao, L., Wang, Y., and Chen, Z. (2011) Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins, *PLoS One*, **6**, e20599, doi: 10.1371/journal.pone.0020599.
59. Ong, C. W., Pabisiak, P. J., Brilha, S., Singh, P., Roncaroli, F., Elkington, P. T., and Friedland, J. S. (2017) Complex regulation of neutrophil-derived MMP-9 secretion in central nervous system tuberculosis, *J. Neuroinflamm.*, **14**, 31, doi: 10.1186/s12974-017-0801-1.
60. Hamada, T., Fondevila, C., Busuttil, R. W., and Coito, A. J. (2008) Metalloproteinase-9 deficiency protects against hepatic ischemia/reperfusion injury, *Hepatology*, **47**, 186-198, doi: 10.1002/hep.21922.
61. Dayer, C., and Stamenkovic, I. (2015) Recruitment of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) to the fibroblast cell surface by lysyl hydroxylase 3 (LH3) triggers transforming Growth factor-beta (TGF-beta) activation and fibroblast differentiation, *J. Biol. Chem.*, **290**, 13763-13778, doi: 10.1074/jbc.M114.622274.
62. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (1999) Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion, *Genes Dev.*, **13**, 35-48, doi: 10.1101/gad.13.1.35.
63. Dorschner, R. A., Lee, J., Cohen, O., Costantini, T., Baird, A., and Eliceiri, B. P. (2020) ECRG4 regulates neutrophil recruitment and CD44 expression during the inflammatory response to injury, *Sci. Adv.*, **6**, eaay0518, doi: 10.1126/sciadv.aay0518.
64. Shao, Y., Li, L., Liu, L., Yang, Y., Huang, J., Ji, D., Zhou, Y., Chen, Y., Zhu, Z., and Sun, B. (2022) CD44/ERM/F-actin complex mediates targeted nuclear degranulation and excessive neutrophil extracellular trap formation during sepsis, *J. Cell. Mol. Med.*, **26**, 2089-2103, doi: 10.1111/jcmm.17231.
65. Yu, Q., and Stamenkovic, I. (2000) Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis, *Genes Dev.*, **14**, 163-176, doi: 10.1101/gad.14.2.163.

66. Chintala, S. K., Sawaya, R., Aggarwal, B. B., Majumder, S., Giri, D. K., Kyritsis, A. P., Gokaslan, Z. L., and Rao, J. S. (1998) Induction of matrix metalloproteinase-9 requires a polymerized actin cytoskeleton in human malignant glioma cells, *J. Biol. Chem.*, **273**, 13545-13551.
67. Samanna, V., Ma, T., Mak, T. W., Rogers, M., and Chellaiah, M. A. (2007) Actin polymerization modulates CD44 surface expression, MMP-9 activation, and osteoclast function, *J. Cell. Physiol.*, **213**, 710-720, doi: 10.1002/jcp.21137.
68. Garvin, M. R., Alvarez, C., Miller, J. I., Prates, E. T., Walker, A. M., Amos, B. K., Mast, A. E., Justice, A., Aronow, B., and Jacobson, D. (2020) A mechanistic model and therapeutic interventions for COVID-19 involving a RAS-mediated bradykinin storm, *eLife*, **9**, e59177, doi: 10.7554/eLife.59177.

EFFECT OF DEXAMETHASONE ON HUMAN NEUTROPHIL ADHESION AND CONCOMITANT SECRETION

S. I. Galkina^{1*}, E. A. Golenkina¹, N. V. Fedorova¹, A. L. Ksenofontov¹,
M. V. Serebryakova¹, V. I. Stadnichuk², L. A. Baratova¹, and G. F. Sud'ina^{1*}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; e-mail: galkina@genebee.msu.ru; sudina@genebee.msu.ru

² Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

Neutrophils play a dual role in protecting the body. They are able to penetrate infected tissues and destroy pathogens there, releasing aggressive bactericidal substances. Getting into the surrounding tissues, aggressive secretion products of neutrophils initiate the development of inflammatory processes. Invasion of neutrophils into tissues is observed during the development of pneumonia in patients with lung diseases of various etiologies, including acute respiratory distress syndrome caused by coronavirus disease. The synthetic corticosteroid hormone dexamethasone has a therapeutic effect in the treatment of lung diseases, including reducing mortality in patients with severe Covid-19. The acute (short-term) effect of dexamethasone on neutrophil adhesion to fibrinogen and concomitant secretion was studied. Dexamethasone did not affect either the attachment of neutrophils to the substrate or their morphology. The production of reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) by neutrophils during adhesion also did not change in the presence of dexamethasone. Dexamethasone stimulated the release of metalloproteinases in addition to proteins secreted by neutrophil adhesion under control conditions, and selectively stimulated the release of the free amino acid hydroxylysine, a product of lysyl hydroxylase. Metalloproteinases play a key role and closely interact with lysyl hydroxylase in the processes of rearrangement of the extracellular matrix. The therapeutic effect of dexamethasone may be associated with its ability, by changing the composition of neutrophil secretions, to reorganize the extracellular matrix in tissues, which can lead to improved gas exchange in patients with severe lung diseases.

Keywords: neutrophilic inflammation, neutrophil, adhesion, secretion, hydroxylysine, metalloproteinase, lysyl hydroxylase, reactive oxygen species, nitric oxide