

СТАТЬЯ

УДК 616.12-008.46:612.017.11:612.112.91

**АДРЕНОБЛОКАТОРЫ ПРОПРАНОЛОЛ И ФЕНТОЛАМИН
МОДУЛИРУЮТ LPS-ИНДУЦИРОВАННУЮ ВНУТРИКЛЕТОЧНУЮ
СИГНАЛИЗАЦИЮ НЕЙТРОФИЛОВ ЧЕЛОВЕКА**

^{1,2}Юринская М.М., ^{1,2}Винокуров М.Г., ²Сусликов А.В.

¹Институт биофизики клетки Российской академии наук – обособленное подразделение
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр “Пушчинский научный центр
биологических исследований Российской академии наук”», Пушчино, e-mail: mg-vinokurov@mail.ru;

²Федеральное государственное автономное учреждение здравоохранения Больница
Пушчинского научного центра Российской академии наук, Пушчино

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является актуальной проблемой здравоохранения и одной из основных причин смертности во всем мире. В публикации приведена оценка влияния адреноблокаторов фентоламина и пропранолола на апоптоз и продукцию активных форм кислорода (АФК) нейтрофилов у больных хронической сердечной недостаточностью при действии липополисахаридов. Измерение продуцируемых нейтрофилами АФК производили методом хемилюминесценции. Жизнеспособность и апоптоз нейтрофилов определяли методом флуоресцентной микроскопии. Участие отдельных сигнальных путей (p38MAPK, PI3K, ERK) в механизме действия адреноблокаторов изучали с использованием специфических ингибиторов. Установлено, что пропранолол в диапазоне концентраций от 10 мкМ до 400 мкМ увеличивает продукцию АФК нейтрофилами – как контрольных клеток, так и при действии LPS. Фентоламин в этом же диапазоне концентраций значительно снижает продукцию АФК нейтрофилами. Было выявлено, что среди использованных ингибиторов наиболее эффективно снижают пропранолол-индуцированную продукцию АФК нейтрофилами SB203580, Wortmannin и LY294002, в то время как PD98059 практически не ингибирует продукцию АФК клеток как с LPS, так и без него. Пропранолол и фентоламин ускоряют апоптоз нейтрофилов в присутствии и отсутствии LPS. Результаты, полученные с использованием ингибиторов сигнальных путей действия LPS на нейтрофилы, показали, что в механизме активации клеток пропранололом важную роль играют сигнальные пути с участием p38MAPK и PI3K. ERK не участвуют в активации клеток пропранололом. В механизме действия фентоламина значимая роль принадлежит p38MAPK, ERK, при этом действие PI3K менее выражено.

Ключевые слова: нейтрофилы человека, фентоламин, пропранолол, липополисахариды, внутриклеточная сигнализация

**ADRENOBLOCKERS PROPRANOLOL AND FENTOLAMINE
MODULATE LPS-INDUCED INTRACELLULAR SIGNALING
OF HUMAN NEUTROPHILS**

^{1,2}Yurinskaya M.M., ^{1,2}Vinokurov M.G., ²Suslikov A.V.

¹Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences, Pushchino, e-mail: mg-vinokurov@mail.ru;

²Hospital of the Pushchino Scientific Center of the Russian Academy of Sciences, Pushchino

Chronic heart failure (CHF) is an urgent public health problem and one of the main causes of death worldwide. The publication provides an assessment of the effect of adreno blockers phentolamine and propranolol on apoptosis and the production of reactive oxygen species (ROS) of neutrophils in patients with chronic heart failure under the action of lipopolysaccharides. Measurement of ROS produced by neutrophils was performed by chemiluminescence. Viability and apoptosis of neutrophils were determined by fluorescence microscopy. The participation of individual signaling pathways (p38MAPK, PI3K, ERK) in the mechanism of action of adreno blockers was studied using specific inhibitors. It was found that propranolol in the concentration range from 10 μM to 400 μM increases the production of ROS by neutrophils, both in control cells and under the action of LPS. Phentolamine in the same range of concentrations significantly reduces the production of ROS by neutrophils. It was found that among the inhibitors used, the most effective decrease in propranolol-induced ROS production by neutrophils SB203580, Wortmannin, and LY294002, while PD98059 practically does not inhibit ROS production in cells with or without LPS. Propranolol and phentolamine accelerate neutrophil apoptosis in the presence and absence of LPS. The results obtained using inhibitors of LPS signaling pathways on neutrophils showed that signaling pathways involving p38MAPK and PI3K play an important role in the mechanism of cell activation by propranolol. ERKs are not involved in cell activation by propranolol. In the mechanism of action of phentolamine, a significant role belongs to p38MAPK, ERK, while the effect of PI3K is less pronounced.

Keywords: human neutrophils, phentolamine, propranolol, lipopolysaccharides, intracellular signaling

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является актуальной проблемой здравоохранения и одной из основных причин смертности во всем мире. Исследования последнего десятилетия показали, что патофизиология сердечной недостаточности (СН) в значительной степени свя-

зана с нарушением перфузии кишечника, что приводит к дисфункции кишечного эндотелиального барьера, который поддерживается несколькими механизмами хорошо сбалансированной кишечной микробиоты [1]. У пациентов с СН происходит снижение кровотока в кишечном эндотелии из-за сни-

жения сердечного выброса. Это, в свою очередь, приводит к ишемии кишечной стенки и увеличению проницаемости из-за структурного нарушения барьерной функции кишечного эпителия [2]. Кроме того, системный застой у пациентов с СН может вызвать отек кишечной стенки, что также приводит к повышению кишечной проницаемости, которая, в свою очередь, увеличивает транслокацию эндотоксинов (липополисахаридов (LPS)) и других компонентов, продуцируемых грамотрицательными бактериями, в системный кровоток, вызывая эндотоксемию [3]. Этот процесс может дополнительно активировать синтез цитокинов и вызвать системное воспаление, которое, в свою очередь, способствует прогрессированию сердечной недостаточности [4].

Действие LPS реализуется благодаря взаимодействию с Толл-подобными рецепторами 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) в клетках врожденного иммунитета (в том числе и нейтрофилах), клетках эндотелия, а также в кардиомиоцитах. В ответ на действие LPS клетки различных тканей организма продуцируют активные формы кислорода, цитокины. Под действием LPS происходит ингибирование апоптоза нейтрофилов [5]. Нейтрофилы традиционно рассматриваются как терминально дифференцированные короткоживущие фагоциты с довольно неконтролируемым образом действий. Однако в последнее время было выяснено, что эти клетки могут выступать в качестве регуляторов воспалительных процессов в сердечно-сосудистой системе. Показано, что после ишемического инсульта нейтрофилы усиливают дисфункцию клеток эндотелия за счет секреции нейтрофильной эластазы и активных форм кислорода (АФК). Нейтрофильные внеклеточные ловушки (Neutrophil Extracellular Traps (NET)) способствуют росту тромбов, NET ускоряют гибель нейтрофилов. В то же время установлено, что в местах повреждения артерий активированные нейтрофилы посредством пептида кателицидина, сосудистого эндотелиального фактора роста и эпидермального фактора роста способствуют восстановлению клеток эндотелия. Нейтрофилы также влияют на заживление сердца после инфаркта миокарда, стимулируя переход макрофагов в сторону репаративного фенотипа (который активно фагоцитирует поврежденные клетки). Кроме этого, нейтрофилы, циркулирующие в сердце, секретируют аннексин А1, который способствует дифференцировке макрофагов в макрофаги проангиогенного фенотипа, что, в свою очередь, способствует ангиогенезу в ишемизированном сердце [6].

При сердечно-сосудистых патологиях важную роль играют адренорецепторы. В лечебной практике достаточно широко используются неселективные блокаторы адренорецепторов – пропранолол (блокирует β_1 - и β_2 -адренорецепторы) и фентоламин (блокирует α_1 - и α_2 -адренорецепторы). Пропранолол эффективно применяется при лечении СН у детей [7]. Кроме того, пропранолол снижает LPS- индуцированную секрецию TNF α моноцитами человека [8]; снижает экспрессию матриксной металлопротеазы 9 (играет важную роль в патогенезе атеросклероза), экспрессия которой увеличивается при действии норадреналина и LPS [9]. Фентоламин, как и пропранолол, эффективно используется при лечении СН в педиатрии [10]. Однако механизмы действия пропранолола и фентоламина на генерацию АФК и апоптоз нейтрофилов при действии LPS остаются недостаточно исследованными.

Целью исследования явилось изучение влияния адреноблокаторов фентоламина и пропранолола на апоптоз и продукцию АФК нейтрофилами больных хронической сердечной недостаточностью при действии липополисахаридов.

Материалы и методы исследования

Нейтрофилы выделяли из крови больных, которые принимали участие в исследовании, в которое были включены согласно критериям включения (возраст ≥ 35 лет, III функциональный класс ХСН по классификации New York Heart Association Functional Classification, фракция выброса $\leq 40\%$). Кровь из локтевой вены забирали в пробирки системы «Vacutainer» с Na-гепарином и затем получали фракцию нейтрофилов с использованием фиколла, как описано в [11]. Изолированные нейтрофилы ресуспендировали в полной культуральной среде DMEM, содержащей 10% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, а также пенициллин (100 ЕД/мл), сульфат стрептомицина (100 мг/мл) и глутамин 2,0 мМ. Чистота нейтрофилов составила 98%, жизнеспособность – 99%.

Образование АФК нейтрофилами измеряли методом хемилюминесценции [11].

Для выявления путей внутриклеточной сигнализации, участвующих в механизмах действия исследуемых адреноблокаторов, клетки инкубировали с ингибиторами фосфатидил инозитол 3 киназы (PI3K) (LY294002 и Wortmannin), экстраклеточных регуляторных киназ (ERK) (PD98059), митогенактивируемой р38 киназы (p38MAPK) 30 минут. Затем к клеткам добавляли адреноблокаторы и в конце – LPS. Апоптотическую

гибель нейтрофилов определяли, как описано ранее [12]. Статистическую обработку данных проводили в программе SigmaPlot.

Результаты исследования и их обсуждение

Первоначально было изучено воздействие пропранолола и фентоламина на уровень АФК, генерируемых нейтрофилами (рис. 1). Полученные результаты показали, что пропранолол в диапазоне концентраций от 25 до 400 мкМ дозозависимо увеличивал продукцию АФК (начиная с концентрации 50 мкМ). При концентрации пропранолола 200–400 мкМ продукция АФК нейтрофилами достигала максимальных значений (300%) (рис. 1а), в то время как активация продукции АФК нейтрофилами при действии LPS составляла 250% (рис. 1б). В присутствии LPS с ростом концентрации пропранолола происходило еще большее увеличение генерации АФК (~3,5 раза при концентрации от 100 до 400 мкМ) нейтрофилами, начиная с концентрации 50 мкМ пропранолола (рис. 1б). Однако отношение величины ХЛ в присутствии LPS к величине ХЛ без LPS с ростом концентрации пропранолола уменьшалось, достигая величины 1,17 (по сравнению с соотношением в отсутствие пропранолола, равным 2,5) (рис. 1а, 1б).

В отличие от пропранолола, фентоламин в диапазоне концентраций от 0,1 до 400 мкМ дозозависимо снижал продукцию АФК нейтрофилами, начиная с концентрации 20 мкМ, достигая минимальных значений при концентрации фентоламина 200–400 мкМ

(рис. 1в). В присутствии LPS с ростом концентрации фентоламина происходило уменьшение генерации АФК нейтрофилами, начиная с концентрации 10 мкМ фентоламина (рис. 1г). Однако отношение величины ХЛ в присутствии LPS к величине ХЛ в отсутствие LPS с ростом концентрации фентоламина сохранялось (2,27 раза при концентрации 400 мкМ фентоламина) (рис. 1в, 1г).

Во второй серии экспериментов для выявления определяющих механизмов действия адrenoблокаторов было изучено влияние специфических ингибиторов сигнальных путей активации клеток при действии липополисахаридов на генерацию АФК нейтрофилами в присутствии пропранолола и фентоламина. Было установлено, что SB203580 (в присутствии и отсутствие LPS) редуцировал уровень АФК нейтрофилов почти до уровня АФК контроля (рис. 2, SB). PD98059 ~ на 10% редуцировал уровень АФК нейтрофилов в присутствии пропранолола и LPS (рис. 2, PD). Ингибиторы фосфатидил инозитол 3 киназы (Wortmannin и LY294002) снижали уровень АФК контрольных и активированных LPS нейтрофилов (рис. 2, LY, W, а, б). При этом отношение величины уровней АФК в присутствии LPS к величине уровней АФК без LPS для Wortmannin и LY294002 было меньше 2. Причем у Wortmannin эта величина была меньше, чем у LY294002, и составляла ~ 1,5. В присутствии пропранолола также происходило значительное снижение продукции АФК (рис. 2, W, в, г) при действии этих ингибиторов.

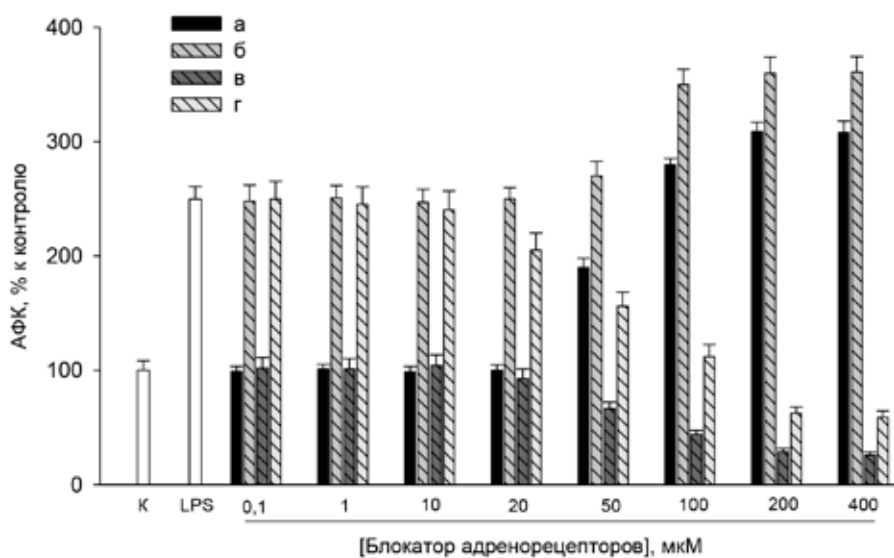


Рис. 1. Воздействие блокаторов адrenoрецепторов на уровень АФК, продуцируемых нейтрофилами при действии LPS. а, б – пропранолол; в, г – фентоламин; а, в – нейтрофилы без LPS; б, г – нейтрофилы вместе с LPS (20 нг/мл LPS). n=12, p<0,005

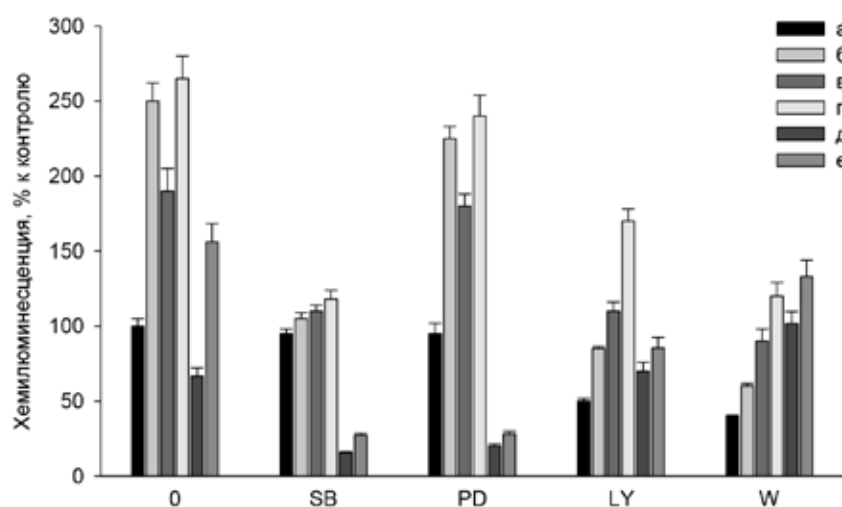


Рис. 2. Действие ингибиторов сигнальных путей на уровень АФК, генерируемых нейтрофилами, при добавлении к клеткам 50 мкМ пропранолола (Pro), 50 мкМ фентоламина (Phe) и LPS; а – пробы без Pro, Phe и LPS; б – пробы с 20 нг/мл LPS; в – пробы с Pro; г – пробы с Pro и 20 нг/мл LPS; д – пробы с Phe; е – пробы с Phe и 20 нг/мл LPS; 0 – пробы без ингибиторов. SB – 0,5 мкМ SB203580; PD – 10 мкМ PD98059; LY – 1 мкМ LY 294002; W – 10 нМ Wortmannin. $n=12$, $p<0,005$

Ингибиторы p38MAPK и ERK значительно редуцируют уровень АФК нейтрофилов в отсутствие LPS (~ в 3–4 раза) и в присутствии LPS (~ в 5–6 раз) (рис. 2, SB, PD, д, е). Ингибиторы PI3K не ингибируют действие фентоламина на контрольные клетки и незначительно снижают уровень АФК нейтрофилов в присутствии LPS (рис. 2, LY, W, д, е).

Таким образом, полученные результаты показали, что среди исследованных ингибиторов сигнальных путей наиболее значимо уровень АФК нейтрофилов в присутствии пропранолола снижают ингибиторы p38MAPK и PI3K. Ингибитор ERK не снижает уровень АФК нейтрофилов как в присутствии, так и в отсутствие LPS (рис. 2, PD, в, г сравнить с рис. 2, 0, в, г). В присутствии фентоламина наиболее значимо уровень АФК нейтрофилов снижают ингибиторы p38MAPK ERK. Ингибиторы PI3K действуют менее эффективно.

В третьей серии экспериментов было исследовано действие адrenoблокаторов на апоптоз нейтрофилов. Полученные результаты показали, что пропранолол вызывает значительное увеличение процента апоптотических нейтрофилов по сравнению с контролем. Пропранолол уменьшает ингибирование апоптоза нейтрофилов, индуцированное LPS. Фентоламин незначительно увеличивает апоптоз нейтрофилов (рис. 3).

Ответ нейтрофилов на эндотоксины можно условно разделить на три стадии. На начальной стадии вслед за активацией TLR4 –

сигнального пути происходит активация НАДФН-оксидазы, затем в течение нескольких часов развивается секреция цитокинов, в более поздней стадии проявляются изменения в регуляции апоптоза клеток. Наши результаты показали, что фентоламин значительно снижает уровень АФК, генерируемых нейтрофилами в присутствии LPS (рис. 1в, 1г). Первым из цитокинов обычно секретруется TNF α . В экспериментах на мышинных макрофагах пропранолол и фентоламин не снижали LPS-индуцированную продукцию TNF α , но несколько снижали продукцию этого цитокина при совместном действии норадреналина и LPS. Показано, что ингибиторы JNK, ERK, p38MAPK могут частично снижать секрецию TNF α , индуцированную норадреналином [13].

Известно, что в активации секреции TNF α моноцитами человека при действии LPS ключевую роль играет путь PI3K→Akt (RAC-alpha serine/threonine-protein kinase, Protein kinase B alpha), который может инактивировать сигнальные пути с участием p38MAPK, JNK и ERK [5]. В наших экспериментах основное различие в сигнальных путях пропранолола и фентоламина приходится на ERK. Для фентоламина ингибиторы LY и Wortmannin значительно слабее ингибируют пробы (рис. 3, LY294002, д, е; рис. 3, W, д, е) по сравнению с аналогичными пробами при действии SB (рис. 3, SB, д, е). Это может говорить о некоторой отрицательной регуляции для фентоламина по этим сигнальным путям.

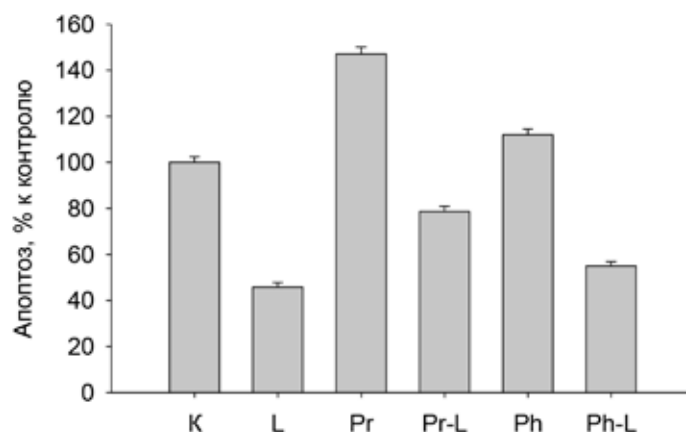


Рис. 3. Влияние пропранолола, фентоламина и LPS на апоптоз нейтрофилов.

K – контроль, L – 100 нг/мл LPS, Pr – 200 мкМ пропранолола,

Pr-L – последовательное добавление к клеткам пропранолола и LPS, Ph – 200 мкМ фентоламин, Ph-L последовательное добавление к клеткам фентоламина и LPS. n=12, p<0,005

Кроме того, LY294002 ингибирует только PI3K, а Wortmannin – PI3K и Akt. В экспериментах на фибробластах животных было показано, что фентоламин эффективно снижает секрецию цитокинов: IL-1β, IL-6 и IL-8 [14], индуцированную LPS.

Одним из механизмов активации апоптоза нейтрофилов являются АФК. Наши эксперименты показали, что пропранолол увеличивает продукцию АФК нейтрофилами, что, возможно, является одной из причин увеличения апоптоза этих клеток в наших экспериментах. Также пропранолол, увеличивая апоптотическую гибель нейтрофилов в присутствии LPS, будет способствовать снижению времени циркуляции этих клеток при воспалительных патологиях. Фентоламин оказывает на апоптоз менее выраженное действие, чем пропранолол, однако он эффективно снижает продукцию АФК этими клетками в присутствии LPS. Вероятно, фентоламин активировал апоптоз путем снижения мембранного потенциала митохондрий с последующей активацией каспаз, как это было показано в некоторых типах клеток [15].

Заключение

Полученные результаты показали, что пропранолол увеличивает уровень АФК в диапазоне концентраций от 50 мкМ до 400 мкМ. В присутствии ингибиторов р38МАРК и PI3K происходит значительное снижение пропранолол-индуцированной продукции АФК нейтрофилами, что указывает на участие этих ферментов в активации клеток под действием пропранолола. В отличие от пропранолола, фен-

толамин значительно снижает продукцию АФК клетками в диапазоне концентраций от 20 мкМ до 400 мкМ. В механизме действия пропранолола большое значение имеют р38МАРК и PI3K. В механизме действия фентоламина значимая роль принадлежит р38МАРК, ERK, при этом действие PI3K менее выражено.

Работа выполнялась в рамках госзадания по теме 0576-2020-0005, одобрена ЛЭК БИПЦ РАН, протокол № 14 от 04.09.2018 г.

Список литературы

1. Tang W.H., Kitai T., Hazen S.L. Gut Microbiota in Cardiovascular Health and Disease. *Circ Res.* 2017. Vol. 120. No. 7. P. 1183-1196.
2. Di Tommaso N., Gasbarrini A., Ponziani F.R. Intestinal Barrier in Human Health and Disease. *Int J Environ Res Public Health.* 2021. Vol. 18. No. 23. P. 12836-12858.
3. Ghosh S.S., Wang J., Yannie P.J., Ghosh S. Intestinal Barrier Dysfunction, LPS Translocation, and Disease Development. *J Endocr Soc.* 2020. Vol. 4. No. P. bvz039.
4. Hanna A., Frangogiannis N.G. Inflammatory Cytokines and Chemokines as Therapeutic Targets in Heart Failure. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2020. Vol. 34. No. 6. P. 849-863.
5. Ciesielska A., Matyjek M., Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cell Mol Life Sci.* 2021. Vol. 78. No. 4. P. 1233-1261.
6. Silvestre-Roig C., Braster Q., Ortega-Gomez A., Soehnlein O. Neutrophils as regulators of cardiovascular inflammation. *Nat Rev Cardiol.* 2020. Vol. 17. No. 6. P. 327-340.
7. Alabed S., Sabouni A., Al Dakhoul S., Bdaiwi Y. Beta-blockers for congestive heart failure in children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2020. Vol 7. No. 7. P. CD007037.
8. Ng T.M., Toews M.L. Impaired norepinephrine regulation of monocyte inflammatory cytokine balance in heart failure. *World J Cardiol.* 2016. Vol. 8. No. 10. P. 584-589.
9. Yin X., Zhou L., Han F., Han J., Zhang Y., Sun Z., Zhao W., Wang Z., Zheng L. Beta-adrenoceptor Activation by Norepinephrine Enhances Lipopolysaccharide-induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression Through the ERK/JNK-c-Fos

Pathway in Human THP-1 Cells. *J Atheroscler Thromb.* 2017. Vol. 24. No. 1. P. 55-67.

10. Hatt A. Phentolamine continuous infusion in a pediatric patient with uncontrolled hypertension. *Am J Health Syst Pharm.* 2021. Vol. 78. No. 13. P. 1195-1199.

11. Rozhkova E., Yurinskaya M., Zatsepina O., Garbuz D., Karpov V., Surkov S., Murashev A., Ostrov V., Margulis B., Evgen'ev M., Vinokurov M. Exogenous mammalian extracellular HSP70 reduces endotoxin manifestations at the cellular and organism levels. *Ann N Y Acad Sci.* 2010. Vol. 1197. P. 94-107.

12. Yurinskaya M.M., Mitkevich V.A., Kozin S.A., Evgen'ev M.B., Makarov A.A., Vinokurov M.G. HSP70 protects human neuroblastoma cells from apoptosis and oxidative stress induced by amyloid peptide isoAsp7-A β (1-42). *Cell Death Dis.* 2015. Vol. 6. No. 11. P. e1977.

13. Huang J.L., Zhang Y.L., Wang C.C., Zhou J.R., Ma Q., Wang X., Shen X.H., Jiang C.L. Enhanced phosphorylation of MAPKs by NE promotes TNF- α production by macrophage through α adrenergic receptor. *Inflammation.* 2012. Vol. 35. No. 2. P. 527-534.

14. Lu H., Xu M., Wang F., Liu S., Gu J., Lin S. Chronic stress enhances progression of periodontitis via α 1-adrenergic signaling: a potential target for periodontal disease therapy. *Exp Mol Med.* 2014. Vol. 46. P. e118.

15. Ho C.H., Hsu J.L., Liu S.P., Hsu L.C., Chang W.L., Chao C.C., Guh J.H. Repurposing of phentolamine as a potential anticancer agent against human castration-resistant prostate cancer: A central role on microtubule stabilization and mitochondrial apoptosis pathway. *Prostate.* 2015. Vol. 75. No. 13. P. 1454-1466.