

Photoaging and biomarker of NETosis

Over the past few years, Raman spectroscopy has become a powerful diagnostic tool in the life sciences. The present research activities are devoted to the application of Raman microspectroscopy for distinction of neutrophils transformed during NETosis and the quantitative determination of the level of their transformation based on the analysis of the neutrophil Raman spectra.

Kinetic analysis with highly sensitive vibrational spectroscopy applied for this study at FLNP, revealed in the low-frequency range of the neutrophil cells Raman spectrum the growth of the citrulline peak within 30–40 minutes after the beginning of the inflammatory process, which can be

classified as an early diagnosis of NETosis (Fig.1) [1]. Because the peak with the Raman shift of $\sim 170 \text{ cm}^{-1}$ is practically absent in inactivated neutrophils and increases significantly after activation, one can assume that it is associated with the accumulation of citrulline in the cell, the spectrum of which also has a characteristic peak around 170 cm^{-1} . Normally, citrulline is practically absent in human cells because it is not one of the 20 basic amino acids from which the proteins of our body are built. However, it is known that during NETosis, citrulline could be produced by transformation of histones.

Neutrophils are the most common human blood leukocytes, which are the most important

part of the innate immunity and carry out a fast response to microbial invasion. NETosis is a process of the programmed neutrophil cell death which differs from apoptosis or necrosis. Apart from the role in the first line defense within the innate immune system, the dysregulation of NETosis appears to be involved in the pathology of various diseases such as rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, psoriasis, thrombosis, atherosclerosis, and cancer. The activation mechanisms and underlying cascades of NETosis depend highly on the particular stimulus. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) are produced by neutrophilic granulocytes and consist of decondensed chromatin decorated with antimicrobial peptides. They defend the organism against

intruders and are released upon various stimuli including pathogens, mediators of inflammation, chemical triggers, ultraviolet radiation (UV) radiation and others. As for the latter, it's well known that prolonged exposure of the skin to UV leads to its damage and loss of protective properties. Many cells of the immune system, including neutrophils, are involved in the photoaging process. The presence of neutrophils in the skin exposed to UV irradiation is known; however, the mechanism of neutrophil activity at these conditions remains unclear and currently poorly studied. Thus, this is another goal of this project currently being in a progress at FLNP by the use of immunofluorescent microscopy (Fig.2) combined with Raman microspectroscopy.

Fig. 1

Low-frequency region of Raman spectra of neutrophils: citrulline line evolution (growth) indicating the pre-activation of NETosis.

Рис. 1

Низкочастотная область КР спектра нейтрофилов: эволюция (рост) интенсивности линии цитрулина, указывающая на преактивацию НЕТОЗ-а.

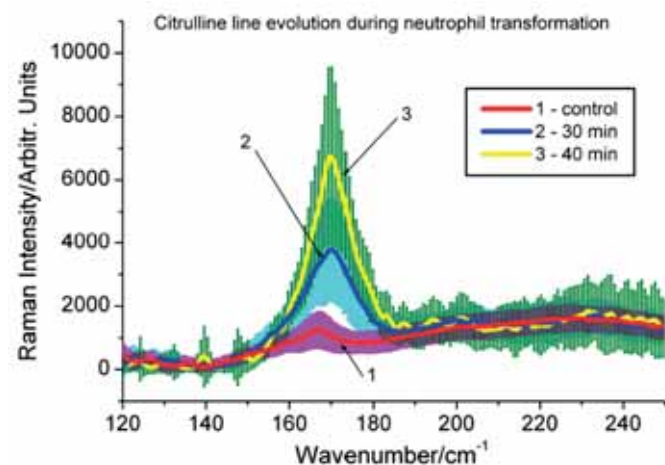
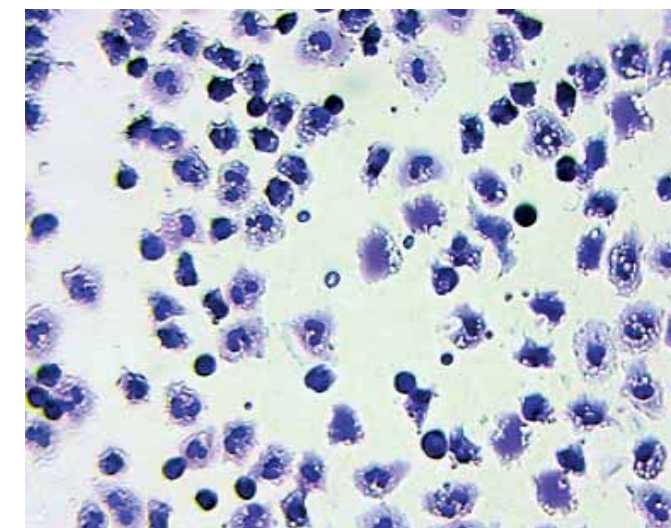


Fig. 2

UVA light-induced formation of NETs.

Рис. 2

Образование нейтрофильных внеклеточных ловушек (ВНЛ) под воздействием УФ(А) излучения.



Фотостарение и биомаркер НЕТОЗ-а

За последние несколько лет спектроскопия комбинационного/рамановского рассеяния стала мощным диагностическим инструментом в науках о жизни. Настоящие научно-исследовательские работы посвящены применению Рамановской микроспектроскопии для распознавания нейтрофилов, трансформированных при НЕТОЗ-е, а также количественному определению уровня их трансформации на основе анализа спектров комбинационного рассеяния (КР) нейтрофилов.

Кинетический анализ с использованием высокочувствительной колебательной спектроскопии, применяемый для данного исследования в ЛНФ, позволил выявить в низкочастотном диапазоне спектра комбинационного рассеяния нейтрофильных клеток рост пика цитрулина в течение 30–40 минут после начала воспалитель-

ного процесса, который можно классифицировать как раннюю диагностику НЕТОЗ-а (рис.1) [1]. Поскольку пик с рамановским сдвигом $\sim 170 \text{ cm}^{-1}$ практически отсутствует у инактивированных нейтрофилов и значительно увеличивается после активации, можно предположить, что он связан с накоплением цитрулина в клетке, в спектре которой также присутствует характерный пик около 170 cm^{-1} . Цитруллин отсутствует в клетках человека, поскольку он не входит в число 20 основных аминокислот из которых построены белки нашего организма. Однако известно, что во время процесса НЕТОЗ-а цитруллин может вырабатываться путем трансформации гистонов.

Нейтрофилы являются наиболее распространенными лейкоцитами крови человека и важной частью врожденного иммунитета, обес-

печивая быструю реакцию на микробную инвазию. НЕТОЗ — это процесс запрограммированной гибели нейтрофильных клеток, отличающийся от апоптоза или некроза. Кроме роли первой линии защиты во врожденной иммунной системе, нарушение регуляции НЕТОЗ-а, по-видимому, связано с патологией различных заболеваний, таких как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, псориаз, тромбоз, атеросклероз и рак. Механизмы активации и лежащие в основе каскадные процессы НЕТОЗ-а сильно зависят от конкретного стимула. Нейтрофильные внеклеточные ловушки (ВНЛ, NETs) вырабатываются нейтрофильными гранулоцитами и состоят из деконденсированного хроматина, декорированного антимикробными пептидами. Они защищают организм от чужеродных тел и высвобождаются в

присутствии различных возбудителей, включая патогены, медиаторы воспаления, химические триггеры, ультрафиолетовое излучение (УФ) и другие. Что касается последнего, то хорошо известно, что длительное воздействие УФ-излучения на кожу приводит к ее повреждению и потере защитных свойств. Многие клетки иммунной системы, включая нейтрофилы, участвуют в процессе фотостарения. Известно о наличии в коже нейтрофилов, подвергшихся УФ-облучению; однако, механизм их активации в таких условиях остается неясным и в настоящее время малоизученным. Тем самым, это еще одна цель данного проекта, который в настоящее время реализуется в ЛНФ с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии (рис. 2) в сочетании с рамановской микроспектроскопией.