

Литература

1. Fioravante, D., Regehr, W.G. Short-term forms of presynaptic plasticity/ D. Fioravante, W.G. Regehr// Current opinion in neurobiology. – 2011. – Vol. 21(2). – P. 269-274.
2. Hliatsevich M.A. et. al. Design and Parametric Analysis of Deterministic Model of Signal Transduction between Neuronal Cells/ M.A. Hliatsevich, P.M. Bulai, T.N. Pitlik, S.N. Cherenkevich// Mathematical modelling and analysis. – 2015. – Vol. 20. – P. 76-93.
3. Глецевич М.А. и др. Параметры модели передачи сигнала в глутаматергических синаптических контактах гиппокампа, опосредованной рецепторами AMPA/ М.А. Глецевич, П.М. Булай, Т.Н. Питлик, А.А. Денисов, С.Н. Черенкевич // «Вестник БГУ. Серия 1. Физика. Математика. Информатика.» – 2015. – №1. – стр. 3-7.
4. Timofeeva, Y., Volynski, K. Calmodulin as a major calcium buffer shaping vesicular release and short-term synaptic plasticity: facilitation through buffer dislocation/ Y. Timofeeva, K. Volynski// Frontiers in Cellular Neuroscience. – 2015. – Vol. 9. – P. 1-13.

CA²⁺-СИГНАЛИЗАЦИЯ В НЕЙТРОФИЛАХ ПРИ ДЕЙСТВИИ РЕКОМБИНАНТНОГО ЛАКТОФЕРРИНА ЧЕЛОВЕКА

**Григорьева Д.В.¹, Горудко И.В.¹, Соколов А.В.^{2,3}, Терехова М.С.¹,
Костевич В.А.², Малюшкова Е.В.¹, Семак И.В.¹,
Черенкевич С.Н.¹, Васильев В.Б.^{2,3}**

¹Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

²ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

Лактоферрин (ЛФ) является железосвязывающим гликопротеином (молекулярный вес 78 кДа), относящимся к семейству трансферринов. В организме взрослого человека ген ЛФ экспрессируется эпителиальными клетками внутренних желез с последующей секрецией белка в различные биологические жидкости. В кровеносной системе ЛФ синтезируется в созревающих нейтрофилах на миелоцитарной стадии их развития и накапливается во вторичных гранулах этих клеток [1]. ЛФ относится к поли-

функциональным белкам: участвует в регуляции содержания железа, иммунного ответа организма, проявляет антиоксидантную, антимикробную, антигипоксическую, противораковую и противовоспалительную активности [2]. В ряде работ показано, что ЛФ, связываясь с поверхностью нейтрофилов [3], усиливает их адгезию к эндотелиальным клеткам и задерживает апоптоз. Описанные биологические эффекты ЛФ делают его перспективным соединением для фармацевтического применения, а также для использования в качестве пищевой добавки. Из-за сложности выделения большого количества ЛФ из грудного молока были разработаны различные методы получения рекомбинантного ЛФ человека (рЛФ) [2]. Биологические эффекты рекомбинантной формы ЛФ детально не изучены. Целью данной работы явилось исследование регуляции внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в нейтрофилах при действии рЛФ.

Донорскую кровь, стабилизированную 109 мМ цитратом натрия в соотношении 9:1, получали из Республиканского научно-практического центра гематологии и медицинских биотехнологий. Нейтрофилы выделяли согласно методу, описанному в работе [4], с использованием декстрана Т70 и гистобака. Концентрацию свободных ионов внутриклеточного кальция ($[Ca^{2+}]_i$) в нейтрофилах определяли с применением флуоресцентного зонда фура-2АМ (спектрофлуориметр SOLAR LSF 1211А, Минск, Беларусь) по методу, описанному в работе [5].

Ионы кальция являются универсальными вторичными мессенджерами, играющими ключевую роль во многих процессах трансдукции сигналов в клетке. В нейтрофилах Ca^{2+} -сигнализация вовлечена в активацию респираторного взрыва, секреторную дегрануляцию, фагоцитоз и пр. На рис. 1, а представлена типичная кинетическая кривая изменения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах при действии рЛФ, выделенного из молока трансгенных коз.

Видно, что добавление рЛФ к суспензии нейтрофилов приводило к дозозависимому увеличению $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле, максимальный эффект наблюдался при добавлении 250-500 мкг/мл белка.

В процессе функционирования ЛФ может подвергаться модификации со стороны активных форм кислорода (АФК) и галогенов, образующихся в избыточном количестве в очагах воспаления при активации нейтрофилов. При действии АФК происходит нарушение нативной структуры белка с образованием крупных белковых агрегатов или фрагментация белковой молекулы, что, как правило, ведет к изменению функциональной активности белка. Также в процессе функционирования при циркуляции по кровеносному руслу белки могут быть подвержены старению

и терять активность. Кроме того, в грудном молоке, а также в слезной жидкости выявлены комплексы ЛФ с медь-содержащим белком острой фазы воспаления церулоплазмином (ЦП) [6]. В связи с этим нами было изучено изменение способности состаренного рЛФ, рЛФ, модифицированного НОС1, а также рЛФ в комплексе с ЦП инициировать увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах.

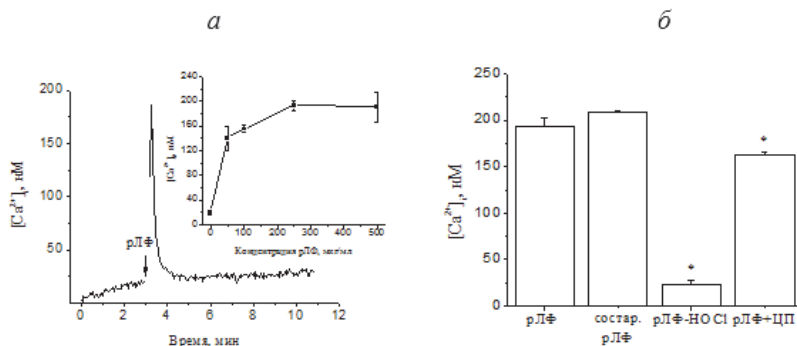


Рис. 1 – Влияние рЛФ на Ca^{2+} -ответ нейтрофилов: *а* – типичная кинетическая кривая изменения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах при действии 250 мкг/мл рЛФ, а также зависимость $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах от концентрации рЛФ; *б* – влияние нативного рЛФ, состаренного рЛФ, рЛФ, модифицированного НОС1 в мольном соотношении рЛФ:НОС1 = 1:100, в концентрации 250 мкг/мл, а также комплекса рЛФ (250 мкг/мл) с ЦП (500 мкг/мл) на изменение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах. * $p < 0,05$ по сравнению с эффектом нативного рЛФ.

Как видно из данных, представленных на рис. 1, б, состаренный рЛФ сохранял свою способность инициировать значительное увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в клетках. рЛФ, модифицированный хлорноватистой кислотой (в мольном соотношении белок:НОС1 = 1:100), образование которой катализирует фермент азурофильных гранул нейтрофилов – миелопероксидаза, терял способность вызывать изменение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах. Для гарантированного образования комплекса между рЛФ и ЦП, рЛФ смешивали с ЦП в мольном соотношении 1:2. При этом незначительно, однако статистически достоверно ($p < 0,05$) снижалась способность рЛФ активировать увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в цитозоле клеток. Необходимо отметить, что сам ЦП в используемой нами концентрации не влиял на Ca^{2+} -сигнализацию в нейтрофилах.

Таким образом, полученные нами экспериментальные данные свидетельствуют о способности рЛФ инициировать увеличение концентрации кальция в цитозоле нейтрофилов с последующей активацией Ca^{2+} -зависимых функциональных ответов нейтрофилов.

Работа поддержана грантом президента РФ МК-5074.2016.4.

Литература

1. Ward, P.P. Multifunctional roles of lactoferrin: a critical overview / P.P. Ward, E. Paz, O.M. Conneely // Cell Mol. Life Sci. – 2005. – Vol. 62, № 22. – P. 2540-2548.
2. Lactoferrin a multiple bioactive protein: an overview / I.A. García-Montoya [et al.] // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1820. – P. 226-236.
3. Expression of lactoferrin on human granulocytes: analysis with polyclonal and monoclonal antibodies / A. Afeltra [et al.] // Clin. Exp. Immunol. – 1997. – Vol. 109, № 2. – P. 279-285.
4. Timoshenko, A.V. Lectin-triggered superoxide/ H_2O_2 and granule enzyme release from cells / A.V. Timoshenko, K. Kayser, H.J. Gabius // Methods Mol. Med. – 1998. – Vol. 9. – P. 441-451.
5. Grynkiewicz, G. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties / G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien // J. Biol. Chem. – 1985. – Vol. 260, № 6. – P. 3440-3450.
6. Studies of the ceruloplasmin-lactoferrin complex / M.O. Pulina [et al.] // Biochem. Cell. Biol. – 2002. – Vol. 80, № 1. – P. 35-39.

МЕТАБОЛИЧЕСКАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ СИНАПСОВ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ

Гриневич С.В., Федорович С.В., Васим Т.В.

Институт биофизики и клеточной инженерии НАНБ, Минск, Беларусь

Головной мозг является очень затратным органом с точки зрения биоэнергетики. У человека, он, составляя 2 % от веса, потребляет около 20 % всех калорий, поступающих с пищей. Энергия тратится на активный ионный транспорт. Это, прежде всего, поддержание потенциала покоя, проведение потенциала действия и восстановление потенциала покоя после потенциала действия. Значительная часть энергетических затрат приходится на синаптическую трансмиссию.