

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ИНСТИТУТ БИОФИЗИКИ И КЛЕТОЧНОЙ ИНЖЕНЕРИИ
НАЦИОНАЛЬНОЙ АКАДЕМИИ НАУК БЕЛАРУСИ»

УДК 577.152.193:577.3:616.1

ГРИГОРЬЕВА
Дарья Владимировна

**МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ МИЕЛОПЕРОКСИДАЗОЙ
СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ КЛЕТОК КРОВИ**

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 03.01.02 – биофизика

Минск, 2016

Работа выполнена в Белорусском государственном университете

Научный руководитель

Горудко Ирина Владимировна

кандидат биологических наук, доцент,
ведущий научный сотрудник кафедры
биофизики физического факультета
Белорусского государственного
университета

Официальные оппоненты

Вересов Валерий Гаврилович

доктор биологических наук, ведущий
научный сотрудник ГНУ «Институт
биофизики и клеточной инженерии
НАН Беларуси»

Бизунок Наталья Анатольевна

доктор медицинских наук, доцент,
заведующий кафедрой фармакологии
УО «Белорусский государственный
медицинский университет»

Оппонирующая организация

УО «Гродненский государственный
университет им. Янки Купалы»

Защита состоится «31» октября 2016 г. в 14.30 на заседании Совета по защите диссертаций Д 01.37.01 в ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси» по адресу: 220072, г. Минск, ул. Академическая, 27. Телефон ученого секретаря: 332-16-04; факс 284-23-29; e-mail: pshybytko@ibp.org.by

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

Автореферат разослан «30» сентября 2016 года

Ученый секретарь Совета

по защите диссертаций Д 01.37.01,
кандидат биологических наук

Н.Л. Пшибытко

ВВЕДЕНИЕ

Нейтрофилы – клетки врожденного звена иммунной системы, обеспечивающие неспецифическую защиту организма от различного рода патогенов [Dupré-Crocher et al., 2013]. В последние годы значительно возрос интерес к исследованию роли миелопероксидазы (МПО) – фермента азурофильных гранул нейтрофилов – как фактора, способного регулировать функциональную активность клеток разнообразными способами [van der Veen et al., 2009].

Основная функция МПО заключается в том, что она катализирует образование активных форм галогенов (АФГ), необходимых для деструкции и уничтожения патогенов [Klebanoff et al., 2005]. В очагах воспаления, при чрезмерной секреции МПО во внеклеточное пространство, может проявляться патологическое действие фермента, выражающееся в модификации нуклеиновых кислот, белков, липидов и повреждении собственных тканей организма [Панасенко и др., 2013]. В последнее время стали появляться данные о том, что модифицированные биологические молекулы способны проявлять регуляторное действие. В работе [Witko-Sarsat et al., 2003] было показано, что сывороточный альбумин человека (ЧСА), модифицированный HOCl, инициирует продукцию нейтрофилами активных форм кислорода (АФК) и АФГ, регистрируемую методом хемилюминесценции. Учитывая, что ЧСА является основным белком крови, важной задачей представляется изучение механизмов регуляции функциональной активности нейтрофилов ЧСА, модифицированным гипогалоидными кислотами – HOCl и HOBr (ЧСА-Cl и ЧСА-Br, соответственно).

Данные последних лет свидетельствуют о том, что МПО способна связываться с поверхностью различных клеток [Haegens et al., 2008; Gorudko et al., 2013], тем самым регулируя их функции независимо от своей ферментативной активности. Известно, что МПО связывается с β_2 -интегринами нейтрофилов [Johansson et al., 1997], однако механизмы внутриклеточной сигнализации, вовлеченные в процессы активации нейтрофилов, остаются не до конца изученными. В работе [Adam et al., 2014] показано, что МПО может связываться с эритроцитами. Однако, как изменяются структурно-функциональные свойства эритроцитов при действии МПО – неизвестно. В этой связи, для установления механизмов МПО-зависимой регуляции функций нейтрофилов и эритроцитов, актуальным является исследование влияния МПО на Ca^{2+} -сигнализацию и структурную организацию цитоскелета нейтрофилов; устойчивость эритроцитов к гемолизу и деформируемость клеток.

К настоящему времени установлено, что МПО является важным фактором инициирования и развития множества заболеваний [Dominguez-Rodriguez et al., 2011; Горудко и др., 2012], ассоциированных с течением хронического или острого воспалительного процесса.

Учитывая вышесказанное, актуальным является изучение механизмов регуляции миелопероксидазой функциональной активности клеток, а также определение активности/концентрации МПО в плазме крови пациентов с развитием окислительного стресса и воспаления.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами (проектами), темами. Различные этапы диссертационной работы выполнены в рамках Государственной комплексной программы научных исследований «Фундаментальные основы биотехнологий», задание: «Разработка биофизических, биохимических, электрофизических методов диагностики и регуляции функционального состояния биосистем в норме и при развитии опухолевых, иммунных, воспалительных и нейродегенеративных заболеваний» (2011–2013 гг., № ГР 20115802); гранта БРФФИ Б12Р-036 «Механизмы регуляции миелопероксидазой функциональных ответов клеток крови при воспалении» (2012–2014 гг., № ГР 20122235); гранта Министерства образования Республики Беларусь «Механизмы влияния альбумина, модифицированного в условиях окислительного стресса, на структурно-функциональные свойства нейтрофилов» (2013 г., № ГР 20131051); гранта Министерства образования Республики Беларусь «Разработка методов коррекции галогенированными белками функционального отклика клеток крови в условиях окислительного стресса» (2014–2015 гг., № ГР 20142737); Государственной программы научных исследований «Биотехнологии», задание: «Механизмы регуляции катионными белками лейкоцитов и их комплексами воспалительных процессов» (2016–2020 гг., № ГР 20161702).

Тема работы соответствует перечням приоритетных направлений фундаментальных и прикладных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 гг. (п. 3.1 – Биохимия, биофизика и физиология растительной, животной и микробной клетки, ее надмолекулярных структур, биологических макромолекул и низкомолекулярных биорегуляторов, в том числе ферментов и гормонов).

Цель и задачи исследования. Цель работы – установить механизмы регуляции миелопероксидазой структурно-функциональных свойств нейтрофилов и эритроцитов человека в норме и при патологии.

Поставленная цель включала решение следующих задач:

- изучить влияние галогенированного ЧСА на функциональную активность нейтрофилов: продукцию АФК и дегрануляционную способность;
- исследовать организацию актинового цитоскелета нейтрофилов при действии модифицированного гипогалоидными кислотами ЧСА;
- изучить экзоцитоз содержимого азурофильных и специфических гранул нейтрофилов в ответ на МПО;
- исследовать влияние МПО на Ca^{2+} -сигнализацию в нейтрофилах;
- установить роль цитоскелета в механизмах регуляции функций нейтрофилов МПО;
- изучить изменение параметров кислотного и осмотического гемолиза и деформируемости эритроцитов при действии МПО;
- установить механизмы связывания МПО с плазматической мембраной эритроцитов;
- установить закономерности изменения активности МПО в плазме крови пациентов с острым коронарным синдромом (ОКС).

Объект исследования – нейтрофилы и эритроциты человека. *Предмет исследования* – механизмы регуляции Ca^{2+} -сигнализации, структурной организации цитоскелета, НАДФН-оксидазного комплекса, дегрануляции нейтрофилов; закономерности изменений параметров гемолиза и деформируемости эритроцитов при действии МПО.

Научная новизна. На основе ингибиторного анализа выявлены сигнальные пути, ведущие к дегрануляции нейтрофилов и генерации ими АФК при действии ЧСА, модифицированного гипогалоидными кислотами (НОСІ и НОВг). Установлено увеличение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в нейтрофилах при действии на клетки МПО, а также показано участие Ca^{2+} в МПО-индуцированной дегрануляции нейтрофилов. Установлено, что одним из механизмов МПО-зависимой регуляции функциональной активности нейтрофилов является реорганизация актинового цитоскелета клеток. Впервые выявлено усиление кислотного и осмотического гемолиза, а также снижение деформируемости эритроцитов после обработки клеток МПО. Показано, что МПО связывается с гликофорином А и В и белком полосы 3 эритроцитов. Впервые установлено увеличение активности МПО в плазме крови пациентов со стабильной стенокардией и пациентов с ОКС. Продемонстрировано, что у пациентов с ОКС и благоприятным исходом заболевания в процессе лечения активность МПО снижается.

Положения, выносимые на защиту:

1. Респираторный взрыв и дегрануляция азурофильных и специфических гранул нейтрофилов в ответ на модифицированный гипогалоидными кислотами сывороточный альбумин человека происходят

вследствие взаимодействия белка с CD18 (β -субъединицей β_2 -интегрина) нейтрофилов и последующей активации тирозинкиназ, фосфатидилинозитол-3-киназ, ERK1/2 и p38 митоген-активируемых протеинкиназ и реорганизации актинового цитоскелета клеток.

2. Дегрануляция азурофильных и специфических гранул нейтрофилов при действии миелопероксидазы происходит после взаимодействия фермента с CD11b (α -субъединицей β_2 -интегрина) нейтрофилов, активации тирозинкиназ, увеличения внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в цитозоле за счет высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных депо и депо-зависимого входа Ca^{2+} , перераспределения и полимеризации F-актина с образованием псевдоподий.

3. Взаимодействие миелопероксидазы с сиаловыми кислотами гликоконъюгатов плазматической мембраны эритроцитов является электростатическим. При связывании миелопероксидазы с эритроцитами увеличивается скорость кислотного и осмотического гемолиза, а также снижается деформируемость эритроцитов.

4. Пероксидазная активность миелопероксидазы является дополнительным критерием оценки риска развития осложнений и эффективности проводимой терапии при остром коронарном синдроме.

Личный вклад соискателя. Основной экспериментальный материал, представленный в диссертации, получен автором самостоятельно. Консультативно-методическая помощь в проведении лигандного Вестерн-блоттинга белков теней эритроцитов была оказана доктором биологических наук А.В. Соколовым (ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург). Постановка целей и задач исследования, интерпретация результатов, подготовка к публикации печатных работ проводились совместно с научным руководителем при решающем участии автора.

Апробация результатов диссертации. Результаты исследований апробированы на XVIII Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» (Ялта-Гурзуф, Украина, 2010 г.); VIII Международной конференции «Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология» (Ярославль, Россия, 2011 г.); IX Международной конференции «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» (Минск, Беларусь, 2011 г.); 10, 11 и 12 Международных научных конференциях «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем» (Минск, Беларусь, 2012, 2014 и 2016 гг.); 12 Харьковской конференции для молодых ученых по радиофизике, электронике, фотонике и биофизике (Харьков, Украина, 2012 г.); IV и V съездах биофизиков России (Нижний Новгород, Россия, 2012 г. и

Ростов-на-Дону, Россия, 2015 г.); Республиканской научной конференции «Микроциркуляция в кардиологии и клинике внутренних болезней» (Витебск, Беларусь, 2012 г.); Международной научной конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Минск, Беларусь, 2013 г.); 17 Международной Пущинской школе-конференции для молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, Россия, 2013 г.); международных конференциях «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пущино, Россия, 2013 г., 2015 г.); 8th International Human Peroxidase Meeting (Сидней, Австралия, 2013 г.); Международной научно-практической конференции «Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине» (Новосибирск, Россия, 2013 г.); 8 Национальной научно-практической конференции с международным участием «Reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants and human health» (Смоленск, Россия, 2014 г.); Международной конференции «Свободные радикалы в химии и жизни» (Минск, Беларусь, 2015 г.); I Белорусском биохимическом конгрессе (Гродно, Беларусь, 2016 г.).

Опубликованность результатов диссертации. По теме диссертации опубликованы: 8 статей в рецензируемых научных журналах (5,8 авторских листа), 14 статей в сборниках материалов конференций, 10 тезисов докладов научных конференций и описания 2 патентов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, обзора литературы (1 глава), описания материалов и методов исследования (1 глава), изложения экспериментальных исследований (4 главы), заключения, библиографического списка, состоящего из 306 источников (272 использованных источников и 34 публикаций соискателя), 5 приложений. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 45 рисунков и 3 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Венозную кровь практически здоровых доноров, стабилизированную цитратом натрия, получали из РНПЦ гематологии и биомедицинских технологий (Минск); образцы плазмы крови пациентов со стабильной стенокардией, а также с ОКС получали из РНПЦ «Кардиология» (Минск). *Нейтрофилы* выделяли из донорской крови путем центрифугирования в градиенте лимфопрепа [Timoshenko et al, 1995]. *Эритроциты* получали путем центрифугирования донорской крови [Заводник и др., 1997]. Для получения галогенированного ЧСА НОСІ/НОВг добавляли к раствору ЧСА (мольное соотношение ЧСА:НОСІ/НОВг – 1:100), модификацию проводили при комнатной температуре в течение 1,5–2 ч. МПО, выделенная из клеток линии

HL-60, была получена из ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (доктор биологических наук А.В. Соколов, Санкт-Петербург). Исследование морфологии нейтрофилов проводили *методом сканирующей электронной микроскопии* с помощью микроскопа Zeiss LEO 1455 (Carl Zeiss, Германия). Для изучения структурной организации актинового цитоскелета в нейтрофилах использовали *метод лазерной конфокальной микроскопии* с применением фаллоидина, конъюгированного с флуоресцеином (конфокальный микроскоп NanoFinder 30, Япония). *Внутриклеточную концентрацию свободных ионов кальция ($[Ca^{2+}]_i$)* в нейтрофилах определяли с применением флуоресцентного зонда фура 2-АМ (спектрофлуориметр SOLAR CM 2203, Беларусь), как описано в [Gryniewicz et al., 1985]. *Продукцию H_2O_2 нейтрофилами* оценивали флуоресцентным методом [Gorudko et al., 2011] с использованием скополетина в качестве субстрата пероксидазной реакции. *Продукцию $O_2^{\cdot-}$ нейтрофилами* определяли спектрофотометрическим методом по восстановлению цитохрома с [Тимошенко, 1998] (спектрофотометр SOLAR PB 2201, Беларусь). *Дегрануляцию нейтрофилов* оценивали по выходу из клеток МПО, эластазы, лизоцима и лактоферрина (ЛФ). *Активность лизоцима* определяли спектрофотометрическим методом по скорости лизиса бактериальных клеток *Micrococcus lysodeikticus* [Горудко, 2001]. *Концентрацию МПО и ЛФ* при дегрануляции нейтрофилов, а также в плазме крови определяли методом иммуноферментного анализа с использованием коммерческих наборов ELISA. *Активность эластазы* в суспензии активированных нейтрофилов оценивали флуоресцентным методом с использованием специфического субстрата – MeO-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-MCA [Coles et al., 2002]. *Гемолиз эритроцитов* исследовали с применением анализатора агрегации SOLAR AP 2110 (Беларусь) и оценивали по степени (G) и скорости гемолиза (v). *Деформируемость эритроцитов* была оценена с помощью фильтрационного метода, основанного на изучении особенностей протекания суспензии эритроцитов через фильтры с порами диаметром 3–5 мкм, на фильтрометре ИДА-01 (Россия). *Пероксидазная активность МПО ($PA_{МПО}$)* в плазме крови, а также в надосадочной жидкости активированных нейтрофилов была измерена спектрофотометрическим методом по окислению хромогенного субстрата *o*-дианизидина [Горудко и др., 2009]. Данные представлены как среднее плюс-минус стандартная ошибка среднего. Статистическую значимость между значениями среднего рассчитывали по критерию Стьюдента. Для определения параметров корреляции использовали критерий Пирсона. Кинетические кривые представлены как типичные для серии из 5–7 независимых экспериментов.

Механизмы действия модифицированного гипогалоидными кислотами ЧСА на нейтрофилы человека

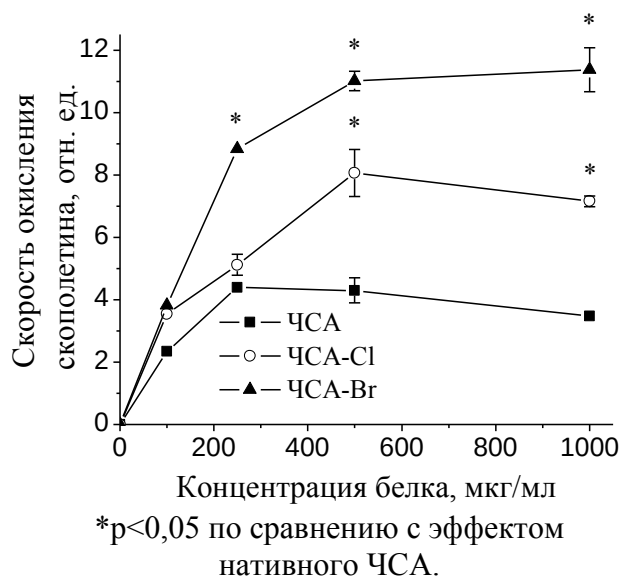


Рисунок 1. – Зависимость скорости окисления скополетина (1 мкмоль/л) H_2O_2 , образованным нейтрофилами (10^6 кл/мл), от концентрации нативного или галогенированного ЧСА

Влияние ЧСА-Cl/ЧСА-Br на активацию НАДФН-оксидазы и дегрануляцию нейтрофилов

Как видно из рисунка 1, при активации нейтрофилов ЧСА-Cl/ЧСА-Br скорость окисления скополетина увеличивалась дозозависимым образом и была выше по сравнению с эффектом нативного ЧСА. Также в присутствии ЧСА-Cl/ЧСА-Br (500 мкг/мл) экзоцитоз МПО (маркера азурофильных гранул) и ЛФ (маркера специфических гранул) увеличивался в 2–3,5 и 1,6–1,8 раза, соответственно, по сравнению с эффектом нативного ЧСА. Таким образом, галогенированный ЧСА стимулирует респираторный взрыв и дегрануляцию нейтрофилов.

Влияние ЧСА-Cl/ЧСА-Br на форму и организацию актинового цитоскелета нейтрофилов

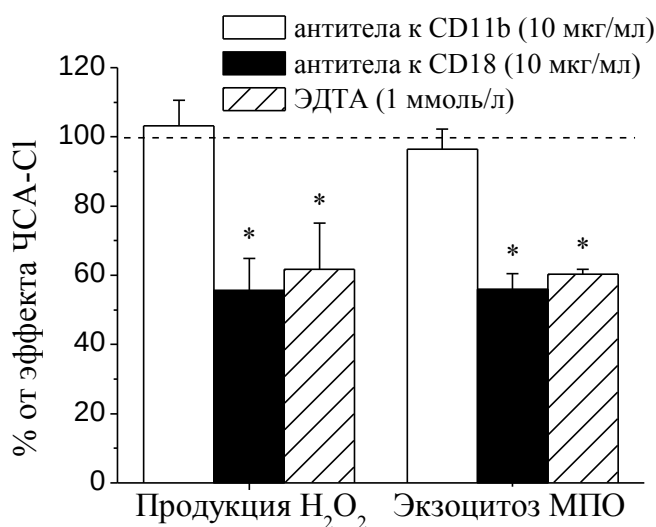
Поскольку активация нейтрофилов, как правило, сопровождается изменением формы и реорганизацией цитоскелета клеток [Mitchell et al., 2008], целесообразным явилось исследовать действие галогенированного ЧСА на морфологию и структурную организацию цитоскелета нейтрофилов. С помощью сканирующей электронной микроскопии показано, что интактные нейтрофилы и нейтрофилы, обработанные нативным ЧСА, имели округлую форму. Преинкубация нейтрофилов с ЧСА-Cl/ЧСА-Br (500 мкг/мл) приводила к изменению морфологии клеток за счет появления псевдоподий, что свидетельствует о реорганизации цитоскелета. С использованием метода лазерной конфокальной микроскопии выявлено, что в интактных нейтрофилах, а также в нейтрофилах, обработанных нативным ЧСА (500 мкг/мл), сеть актиновых филаментов распределена преимущественно вокруг ядер (цитозольный цитоскелет) и по краю клетки (кортикальный цитоскелет). В условиях преинкубации нейтрофилов с ЧСА-Cl/ЧСА-Br происходило перераспределение F-актина с образованием псевдоподий на периферии клеток.

Механизмы активации нейтрофилов при действии ЧСА-Cl/ЧСА-Br

Предполагается, что мишенью действия окисленного ЧСА являются белки семейства β_2 -интегринов [Körmöcsi et al., 2001]. В связи с этим далее было исследовано влияние моноклональных антител к CD11b (α -субъединице) и CD18 (β -субъединице) β_2 -интегрина и ЭДТА – хелатора двухвалентных катионов, необходимых для связывания интегринов с лигандами, на функциональные ответы нейтрофилов при действии ЧСА-Cl. Как видно из данных, представленных на рисунке 2, после предварительной инкубации клеток с антителами к CD18 было выявлено ингибирование продукции H_2O_2 и экзоцитоза МПО нейтрофилами при действии ЧСА-Cl на 45–50 %. Как и в других интегрин-опосредованных клеточных системах, ЭДТА снижал продукцию АФК и дегрануляцию нейтрофилов при действии ЧСА-Cl.

Для изучения механизмов, контролирующих функциональные отклики нейтрофилов при действии ЧСА-Cl, был использован ряд метаболических ингибиторов (таблица 1), мишенями действия которых являются ферментативные системы, регулирующие продукцию АФК и экзоцитоз содержимого гранул нейтрофилов [Lacy et al., 2008]. Как следует из данных, приведенных в таблице 1, частичное ингибирование продукции АФК и экзоцитоза МПО из нейтрофилов в ответ на ЧСА-Cl наблюдалось в присутствии генистеина, вортманнина, PD098056, SB203580 и NEM.

Таким образом, на основании полученных экспериментальных результатов можно предложить следующую схему активации нейтрофилов галогенированным ЧСА. ЧСА-Cl/ЧСА-Br запускает активационный сигнал в нейтрофилах, связываясь с CD18 нейтрофилов. Интегрин-зависимая стимуляция нейтрофилов ЧСА-Cl/ЧСА-Br сопровождается активацией тирозинкиназ, фосфатидилинозитол-3-киназ (ФИЗК), митоген-активируемых протеинкиназ (МАПК) и SH-содержащих белков и ферментов, а также



* $p < 0,05$ по сравнению с ответом клеток в присутствии только ЧСА-Cl (500 мкг/мл).

Рисунок 2. – Влияние моноклональных антител к CD11b и CD18 нейтрофилов, а также ЭДТА на продукцию H_2O_2 и дегрануляцию нейтрофилов при действии ЧСА-Cl

реорганизацией актинового цитоскелета клеток. Результатом такой активации является экзоцитоз дополнительного количества МПО и продукция АФК. Далее МПО, используя H_2O_2 , окисляет Cl^-/Br^- до $HOCl/HOBr$. Затем $HOCl/HOBr$ модифицирует ЧСА с образованием ЧСА- Cl /ЧСА- Br . Таким образом, галогенированный ЧСА по принципу положительной обратной связи способен активировать нейтрофилы, тем самым усиливая течение воспалительной реакции организма.

Таблица 1 – Влияние ингибиторов на продукцию нейтрофилами H_2O_2 и $O_2^{\cdot-}$, а также экзоцитоз МПО из нейтрофилов, активированных ЧСА- Cl (500 мкг/мл)

Ингибитор	Мишень действия	Используемая концентрация	Продукция H_2O_2 , %	Продукция $O_2^{\cdot-}$, %	Экзоцитоз МПО, %
Вортманнин	ФИЗК	100 нмоль/л	52,1±2,9*	16,9±3,6*	80,5±4,6*
Генистеин	Тирозинкиназы	100 мкмоль/л	65,3±7,3*	44,6±9,2*	64,4±6,0*
N-этил-малеимид (NEM)	SH-содержащие белки и ферменты	100 мкмоль/л	—	7,0±3,3*	42,9±2,1*
PD098056	ERK1/2 МАПК	10 мкмоль/л	—	59,2±4,3*	68,8±7,3*
SB203580	p38 МАПК	10 мкмоль/л	—	72,8±4,2*	80,8±2,7*

За 100 % принят эффект ЧСА- Cl на продукцию АФК нейтрофилами и экзоцитоз МПО из нейтрофилов. * $p<0,05$ по сравнению с ответом клеток в отсутствие ингибиторов.

Механизмы действия МПО на нейтрофилы человека

Дегрануляционная способность нейтрофилов при действии МПО

Как видно из данных, представленных в таблице 2, добавление МПО (100 нмоль/л) к нейтрофилам приводило к увеличению содержания эластазы, ЛФ и лизоцима во внеклеточной среде, что свидетельствует об иницировании ферментом дегрануляции азурофильных и специфических гранул. Гидразид 4-аминобензойной кислоты (4-АВАН, 50 мкмоль/л) – специфический ингибитор каталитической активности МПО и каталаза (300 ед./мл), элиминирующая основной субстрат МПО – H_2O_2 , не отменяли МПО-индуцированный экзоцитоз лизоцима из нейтрофилов (данные не приведены).

Таблица 2 – Влияние МПО на дегрануляцию нейтрофилов

	Концентрация лизоцима, нг/мл	Концентрация ЛФ, мкг/мл	Активность эластазы, усл. ед./мл
Базальный уровень	99,0±6,3	0,7±0,07	3,0±0,6
МПО (100 нмоль/л)	143,4±3,4*	1,0±0,04*	5,7±0,9*

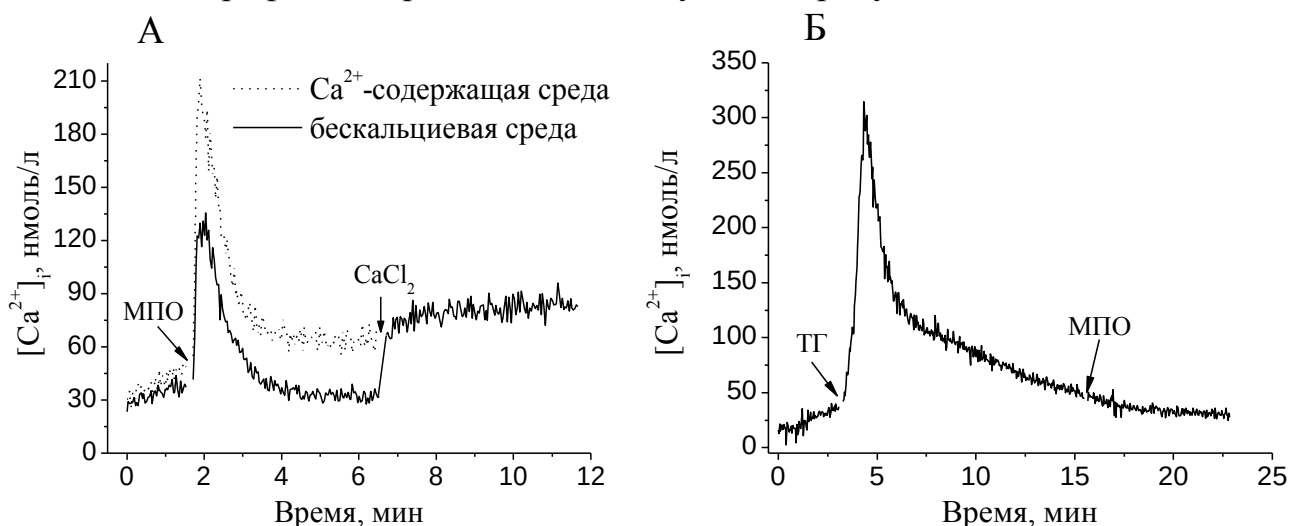
* $p<0,05$ по сравнению с базальным уровнем.

Ca^{2+} -сигнализация в нейтрофилах при действии МПО

Поскольку Ca^{2+} -сигнализация вовлечена в реализацию различных функциональных откликов нейтрофилов [Зинченко и др., 2003], было изучено влияние МПО на Ca^{2+} -ответ нейтрофилов. Добавление МПО (100 нмоль/л) к

суспензии нейтрофилов, находящихся в Ca^{2+} -содержащей среде, приводило к увеличению $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рисунок 3, А), которое не ингибировалось в присутствии 4-АВАН. С увеличением концентрации МПО в суспензии нейтрофилов наблюдалось увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, максимальный эффект регистрировался при добавлении 75–150 нмоль/л фермента (данные не приведены).

Поскольку увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ может быть обусловлено высвобождением Ca^{2+} из внутриклеточных депо (эндоплазматический ретикулум (ЭР), митохондрии) и/или входом Ca^{2+} извне через каналы плазматической мембраны, далее были идентифицированы механизмы МПО-индуцированного увеличения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейтрофилах. Добавление МПО к нейтрофилам в бескальциевой среде (1 ммоль/л ЭДТА) индуцировало значительно меньшее увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рисунок 3, А) по сравнению с эффектом, оказываемым МПО на нейтрофилы в Ca^{2+} -содержащей среде. При последующем добавлении CaCl_2 к суспензии МПО-активированных нейтрофилов наблюдалось повторное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$, свидетельствующее о депо-зависимом входе Ca^{2+} извне в цитозоль нейтрофилов через плазматическую мембрану.



Типичные кинетические кривые МПО-индуцированного изменения $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейтрофилах: А – в Ca^{2+} -содержащей среде, а также в бескальциевой среде, содержащей 1 ммоль/л ЭДТА, после последующего внесения CaCl_2 (2 ммоль/л); Б – в бескальциевой среде после предварительной обработки клеток ТГ (2 мкмоль/л). Концентрация МПО – 100 нмоль/л.

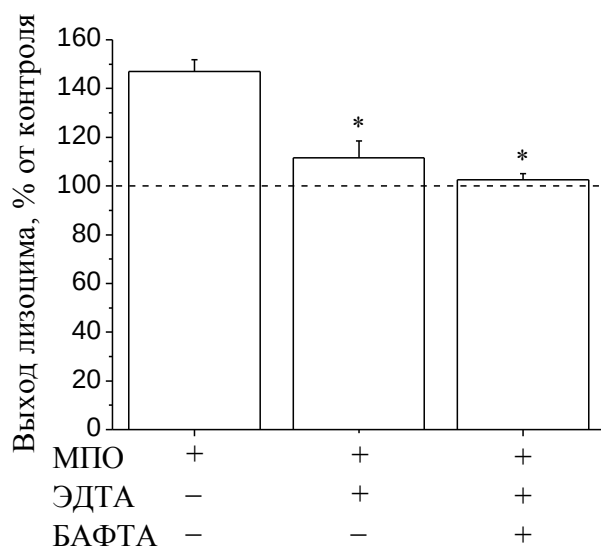
Рисунок 3. – Влияние МПО на вход Ca^{2+} через каналы плазматической мембраны (А) и высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (Б) нейтрофилов

МПО, добавленная к суспензии нейтрофилов в бескальциевой среде после обработки клеток тапсигаргином (ТГ) (2 мкмоль/л), являющимся специфическим ингибитором Ca^{2+} -АТФазы ЭР, не вызывала увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (рисунок 3, Б). Следовательно, МПО-индуцированное увеличение $[\text{Ca}^{2+}]_i$ в нейтрофилах, находящихся в бескальциевой среде, ассоциировано с высвобождением Ca^{2+} именно из ЭР. Таким образом, МПО, независимо от

своей каталитической активности, инициирует увеличение $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах, обусловленное высвобождением Ca^{2+} из ЭР и депо-зависимым входом Ca^{2+} извне через каналы плазматической мембраны клеток.

Роль Ca^{2+} в дегрануляции нейтрофилов при действии МПО

Для оценки роли Ca^{2+} в реализации дегрануляционного ответа нейтрофилов при действии МПО был исследован экзоцитоз лизоцима, содержащегося в специфических и азурофильных гранулах нейтрофилов, с использованием БАФТА и ЭДТА, хелатирующих ионы Ca^{2+} , содержащиеся внутри и вне клетки, соответственно. Как видно из данных, представленных на рисунке 4, после инкубации нейтрофилов с МПО (100 нмоль/л) в



бескальциевой среде, содержащей ЭДТА (1 ммоль/л), выход лизоцима снижался по сравнению с выходом белка из клеток, обработанных только МПО. В бескальциевой среде БАФТА (10 мкмоль/л) полностью блокировал экзоцитоз лизоцима из нейтрофилов, активированных МПО. Кроме того, было установлено, что верапамил – ингибитор потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов L-типа – ингибировал выход ЛФ и эластазы на 15–40 %, а $NiCl_2$ – блокатор Ca^{2+} -каналов T-типа – выход лизоцима и эластазы на 15–45 % из МПО-активированных нейтрофилов. Таким образом, полученные данные указывают на роль Ca^{2+} в реализации дегрануляции нейтрофилов при действии МПО.

За 100 % принят выход лизоцима в контроле.

* $p < 0,05$ по сравнению с эффектом МПО.

Рисунок 4. – Влияние ЭДТА (1 ммоль/л) и БАФТА (10 мкмоль/л) на экзоцитоз лизоцима из нейтрофилов, активированных МПО (100 нмоль/л)

Механизмы дегрануляции нейтрофилов при действии МПО

Известно, что основными рецепторами для МПО на поверхности нейтрофилов являются β_2 -интегрины [El Kebir et al., 2008]. В соответствии с этими данными, нами было показано снижение МПО-индуцированного увеличения $[Ca^{2+}]_i$ в нейтрофилах в присутствии моноклональных антител к CD11b (α -субъединице β_2 -интегрина) нейтрофилов на $(51 \pm 8) \%$ ($n=7$, $p < 0,05$).

Для определения вовлеченности цитоскелета в реализацию дегрануляции нейтрофилов при действии МПО методом лазерной конфокальной микроскопии было исследовано состояние актинового цитоскелета клеток. Интактные нейтрофилы имели округлую форму с четко выраженным

кортикальным актиновым цитоскелетом, в присутствии МПО (100 нмоль/л) происходило перераспределение и локальная полимеризация примембранного F-актина, а также образование псевдоподий.

Для выявления путей трансдукции сигналов, участвующих в дегрануляции нейтрофилов при действии МПО, был использован ряд метаболитических ингибиторов (см. таблицу 1). Было выявлено ингибирование МПО-стимулированного выхода лизоцима из нейтрофилов в присутствии генистеина, вортманнина и NEM (таблица 3), что свидетельствует о вовлеченности в процесс МПО-индуцированной дегрануляции нейтрофилов тирозинкиназ, ФИЗК, а также клеточных тиол-зависимых сигнальных систем.

Таким образом, обобщив полученные в данном разделе результаты, можно предложить следующую схему активации дегрануляции нейтрофилов при действии МПО. Высвобождающаяся в результате дегрануляции азурофильных гранул нейтрофилов МПО связывается с CD11b (α -субъединицей β_2 -интегрина) нейтрофилов и, независимо от своей ферментативной активности, активирует тирозинкиназы, ФИЗК и SH-содержащие белки и ферменты. Активация клеток МПО сопровождается увеличением $[Ca^{2+}]_i$, обусловленным высвобождением Ca^{2+} из ЭР и депо-зависимым входом Ca^{2+} через каналы плазматической мембраны, а также реорганизацией актинового цитоскелета клеток. Вышеописанные механизмы, в конечном итоге, приводят к дегрануляции нейтрофилов с высвобождением дополнительного количества МПО во внеклеточное пространство, что оказывает прямое влияние на развитие окислительного стресса и воспаления.

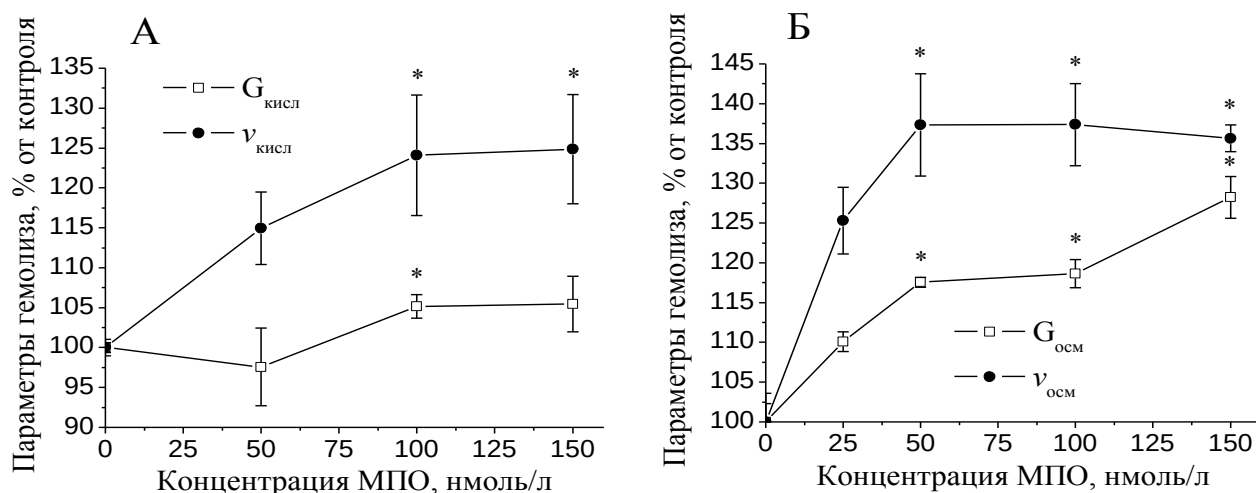
Механизмы действия МПО на эритроциты человека

Влияние МПО на структурную устойчивость эритроцитов оценивали по степени и скорости их кислотного и осмотического гемолиза [Сенькович, 1998]. Как видно из данных, представленных на рисунке 5, с увеличением концентрации МПО в суспензии эритроцитов наблюдалось увеличение скорости кислотного (А), а также степени и скорости осмотического (Б) лизиса клеток. С использованием 4-АВАН было показано, что усиление гемолиза эритроцитов в присутствии МПО не зависит от ее каталитической активности (данные не представлены).

Таблица 3 – Влияние ингибиторов на экзоцитоз лизоцима из нейтрофилов, активированных МПО (100 нмоль/л)

Ингибитор, концентрация	Концентрация лизоцима, нг/мл
без ингибитора	144,6±6,2
Генистеин, 100 мкмоль/л	90,9±15,2*
Вортманнин, 100 нмоль/л	108,1±20,0*
NEM, 100 мкмоль/л	85,0±4,7*

* $p < 0,05$ по сравнению с эффектом МПО.



Зависимость степени (G) и скорости (v) кислотного (А) (фосфат-цитратный буфер, содержащий 155 ммоль/л NaCl, pH 2,9) и осмотического (Б) (60 ммоль/л NaCl) гемолиза эритроцитов от концентрации МПО. За 100 % приняты параметры гемолиза в контроле.

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Рисунок 5. – Влияние МПО на кислотный и осмотический гемолиз эритроцитов

Далее было исследовано влияние МПО на деформируемость эритроцитов. С увеличением в среде инкубации концентрации МПО индекс ригидности (ИР), характеризующий способность клеток к деформации, увеличивался, свидетельствуя об уменьшении деформируемости эритроцитов. Так, при добавлении МПО (100 нмоль/л) к эритроцитам, ИР увеличивался практически в 2 раза (данные не приведены).

Для установления механизмов нарушения стабильности мембраны и упругих свойств эритроцитов при связывании с МПО целесообразным стало выяснить, является ли электростатическим взаимодействие катионной МПО ($pI \sim 10$) с клеточной поверхностью эритроцитов, которая заряжена отрицательно, преимущественно за счет сиаловых кислот. При добавлении к суспензии эритроцитов только нейраминидазы (16 мкг/мл), отщепляющей сиаловые кислоты, и, следовательно, снижающей отрицательный заряд клеточной поверхности, скорость кислотного гемолиза эритроцитов уменьшалась на $(16 \pm 3) \%$ ($n=4$, $p < 0,05$). Добавление МПО (100 нмоль/л) к эритроцитам, предварительно обработанным нейраминидазой, дополнительно уменьшало скорость кислотного лизиса эритроцитов на $(23 \pm 1) \%$ ($n=4$, $p < 0,05$), что свидетельствует о потере МПО способности усиливать гемолиз эритроцитов. С помощью метода лигандного Вестерн-блоттинга было показано, что МПО детектируется на участках, где выявляются белок полосы 3 и гликофорины А и В. После предварительной обработки теней эритроцитов нейраминидазой (100 мкг/мл) в течение 2 ч взаимодействие МПО с белком полосы 3 и гликофорины не выявлялось. Таким образом, можно заключить, что взаимодействие МПО с белком полосы 3 и гликофорины А и В

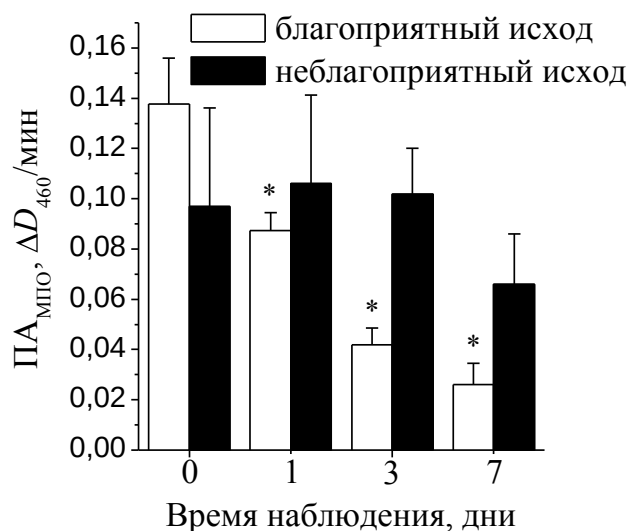
эритроцитов является электростатическим. В результате данного взаимодействия уменьшается деформируемость эритроцитов, а также увеличивается скорость кислотного и осмотического гемолиза клеток.

Активность МПО в плазме крови при различных патологиях, ассоциированных с воспалением

МПО вовлечена в развитие различных воспалительных заболеваний, среди которых особое место занимают сердечно-сосудистые патологии. Поскольку основным патогенетическим фактором, приводящим к инфаркту миокарда (ИМ), считается воспаление атеросклеротической бляшки, актуальным явилось изучение изменения пероксидазной активности (PA_{MPO}) и концентрации МПО в плазме крови пациентов с ОКС (нестабильная стенокардия и острый ИМ). В исследование было включено 114 пациентов, разделенных на 3 группы: группа I – 39 практически здоровых лиц, группа II – 20 пациентов со стабильной стенокардией и группа III – 55 пациентов с ОКС.

Было выявлено достоверное увеличение PA_{MPO} в плазме крови пациентов группы II ($(0,099 \pm 0,023) \Delta D_{460}/\text{мин}$) и группы III ($(0,128 \pm 0,016) \Delta D_{460}/\text{мин}$) по сравнению с контрольной группой I ($(0,051 \pm 0,009) \Delta D_{460}/\text{мин}$), а также достоверное увеличение концентрации МПО в плазме крови пациентов группы III по сравнению как с группой I, так и с группой II (данные не представлены).

Далее была исследована PA_{MPO} в плазме крови 24 пациентов с острым ИМ в процессе лечения. Эти пациенты изначально получали реперфузионную (медикаментозную) терапию, а затем, при отсутствии признаков восстановления кровотока, подвергались процедуре чрезкожной ангиопластики/стентирования коронарных артерий. В процессе лечения в зависимости от исхода заболевания больные с острым ИМ были разделены на 2 подгруппы: подгруппу I составили 15 пациентов с благоприятным исходом (успешная реперфузия), подгруппу II – 9 пациентов с



* $p < 0,05$ по сравнению с измеряемым показателем до проведения терапии.

Рисунок 6. – Изменение PA_{MPO} в плазме крови пациентов с острым ИМ в подгруппе I (благоприятный исход) и подгруппе II (неблагоприятный исход) на протяжении периода терапии

неблагоприятным исходом (реперфузия не состоялась). В плазме крови пациентов подгруппы I выявлено достоверное снижение PA_{MPO} на 1-ые сутки после проведения терапии (рисунок 6). PA_{MPO} в плазме крови пациентов подгруппы II была увеличена и достоверно не уменьшалась на протяжении всего периода лечения. Достоверное уменьшение концентрации МПО в плазме крови пациентов подгруппы I выявлялось на 3-и сутки после проведения терапии, при этом концентрация МПО в плазме крови пациентов подгруппы II не изменялась на протяжении всего периода лечения (данные не представлены).

Таким образом, определение PA_{MPO} в плазме крови является информативным показателем для диагностики (стабильная/нестабильная стенокардия) и оценки риска развития последующих осложнений (ОКС) сердечно-сосудистых заболеваний. Выявление в плазме крови PA_{MPO} является адекватным прогностическим показателем, характеризующим эффективность проводимой терапии у пациентов с ОКС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Установлено, что модифицированный гипогалоидными кислотами ЧСА связывается с CD18 (β -субъединицей β_2 -интегрина) нейтрофилов и стимулирует дегрануляцию специфических и азурофильных гранул и активацию НАДФН-оксидазы. Выявлено, что дегрануляция и продукция АФК нейтрофилами в ответ на галогенированный ЧСА ингибируются в присутствии генистеина, вортманнина, PD098056 и SB203580, что свидетельствует об активации сигнальных путей с участием тирозинкиназ, фосфатидилинозитол-3-киназ, а также митоген-активируемых протеинкиназ [3, 4, 12, 16, 17, 19, 26, 27, 30].

2. Показано, что МПО взаимодействует с CD11b (α -субъединицей β_2 -интегрина) нейтрофилов и индуцирует дегрануляцию азурофильных и специфических гранул нейтрофилов с высвобождением эластазы, лизоцима и лактоферрина. Данный процесс не блокируется ингибитором ферментативной активности МПО – гидразидом 4-аминобензойной кислоты и каталазой, элиминирующей субстрат МПО – H_2O_2 . С помощью ингибиторного анализа показано участие тирозинкиназ и фосфатидилинозитол-3-киназ в МПО-индуцированной дегрануляции нейтрофилов [7, 20, 28, 32].

3. Выявлено, что хелаторы ионов Ca^{2+} , содержащихся вне и внутри клетки (ЭДТА и БАФТА, соответственно), а также блокаторы Ca^{2+} -каналов L- и T-типа ингибируют МПО-индуцированную дегрануляцию нейтрофилов. Установлено, что МПО вызывает увеличение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция в нейтрофилах за счет их высвобождения из

эндоплазматического ретикулума и депо-зависимого входа из внеклеточной среды [5, 18, 32].

4. Механизмы активации нейтрофилов миелопероксидазой, а также модифицированным гипогалоидными кислотами альбумином включают реорганизацию актиновых филаментов цитоскелета с образованием псевдоподий [4, 16, 17, 19, 29, 30, 32].

5. Установлено, что взаимодействие МПО с сialовыми кислотами плазматической мембраны эритроцитов является электростатическим. Показано, что МПО связывается с белком полосы 3 и гликофорином А и В эритроцитов. При связывании МПО с эритроцитами уменьшается их способность к деформации, а также увеличивается скорость осмотического и кислотного гемолиза [1, 6, 13, 14, 22, 23, 25, 28, 31].

6. Выявлено увеличение активности МПО в плазме крови пациентов как со стабильной стенокардией, так и с острым коронарным синдромом по сравнению с контрольной группой здоровых доноров. Установлена прогностическая роль мониторинга активности МПО для оценки эффективности проводимой терапии при сердечно-сосудистых заболеваниях [2, 8–11, 15, 21, 24, 33, 34].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Разработан метод определения пероксидазной активности МПО, внедренный в научный процесс НИЛ биофизики и биотехнологии кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета (Акт внедрения от 04.12.2015 г.), а также способ определения пероксидазной активности гемоглобина в плазме крови (патент 2458992 Российской Федерации и патент 17950 Республики Беларусь).

Результаты исследований внедрены в учебный процесс кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета и используются при чтении лекционного курса по дисциплине «Основы биохимии» (Акт внедрения от 09.11.2012 г.) и «Основы молекулярной и наномедицины» (Акт внедрения от 13.11.2015 г.).

Данные о способности МПО регулировать функциональную активность клеток иммунной системы, а также изменять структурно-функциональные свойства эритроцитов могут быть использованы для разработки методов коррекции функций данных клеток при патологических процессах, ассоциированных с развитием окислительного стресса и воспаления, а также с нарушениями микроциркуляции.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в рецензируемых научных изданиях

1. Григорьева, Д.В. Механизмы действия миелопероксидазы на гемолиз эритроцитов / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, Е.В. Шамова, В.Б. Васильев, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // Докл. НАН Беларуси. – 2012. – Т. 56, № 6. – С. 47–50.

2. Григорьева, Д.В. Определение пероксидазной активности плазмы крови / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, О.В. Космачевская, А.Ф. Топунов, И.В. Буко, Е.Э. Константинова, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2013. – Т. 155, № 9. – С. 129–132.

3. Михальчик, Е.В. Альбумин сыворотки крови, модифицированный в условиях окислительного/галогенирующего стресса, усиливает люминол-зависимую хемилюминисценцию нейтрофилов человека / Е.В. Михальчик, Н.В. Смолина, Т.С. Астамирова, И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, В.А. Иванов, А.В. Соколов, В.А. Костевич, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Биофизика. – 2013. – Т. 53, № 4. – С. 681–689.

4. Gorudko, I.V. Hypohalous acid-modified human serum albumin induces neutrophil NADPH oxidase activation, degranulation, and shape change / I.V. Gorudko, D.V. Grigorieva, E.V. Shamova, V.A. Kostevich, A.V. Sokolov, E.V. Mikhaltchik, S.N. Cherenkevich, J. Arnhold, O.M. Panasencko // Free Radic. Biol. Med. – 2014. – Vol. 68. – P. 326–334.

5. Григорьева, Д.В. Регуляция миелопероксидазой Ca^{2+} -сигналикации в нейтрофилах / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, Е.В. Шамова, В.Б. Васильев, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // Докл. НАН Беларуси. – 2014. – Т. 58, № 4. – С. 55–60.

6. Gorudko, I.V. Binding of human myeloperoxidase to red blood cells: molecular targets and biophysical consequences at the plasma membrane level / I.V. Gorudko, A.V. Sokolov, E.V. Shamova, D.V. Grigorieva, E.V. Mironova, I.V. Kudryavtsev, S.A. Gusev, A.A. Gusev, A.V. Chekanov, V.B. Vasilyev, S.N. Cherenkevich, O.M. Panasencko, A.V. Timoshenko // Arch. Biochem. Biophys. – 2016. – Vol. 591. – P. 87–97.

7. Григорьева, Д.В. Миелопероксидаза стимулирует дегрануляцию нейтрофилов / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, В.А. Костевич, В.Б. Васильев, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. – 2016. – Т. 161, № 4. – С. 483–488.

8. Григорьева, Д.В. Активность миелопероксидазы в плазме крови как критерий эффективности лечения пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, В.А. Костевич, А.В. Соколов,

И.В. Буко, В.Б. Васильев, Л.З. Полонецкий, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // Биомед. химия. – 2016. – Т. 62, вып. 3. – С. 318–324.

Статьи в сборниках материалов научных конференций

9. Горудко, И.В. Пероксидазная активность плазмы крови / И.В. Горудко, А.В. Соколов, Д.В. Григорьева, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии : труды XVIII междунар. конф. и дискуссион. науч. клуба. IT + M&Ec`2010 (Ялта-Гурзуф, с 31 мая по 10 июня 2010 г.) : в 2 т. Т. 1. – Ялта-Гурзуф, 2010. – С. 81–82.

10. Григорьева, Д.В. Определение пероксидазной активности гемоглобина в плазме крови / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы : материалы IX междунар. конф., 1–2 апр. 2011 г., Минск / редкол. : В.А. Прокашевич (отв. ред.) [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2011. – С. 109–111.

11. Бичан, О.Д. Содержание церулоплазмينا в сыворотке крови пациентов с острым коронарным синдромом / О.Д. Бичан, Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, И.В. Буко, О.П. Жолнерик, Л.З. Полонецкий, А.В. Соколов // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф. ; Десятый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 19–21 июня 2012 г., Минск, Беларусь : сб. ст. В 2 ч. Ч. 1 / редкол. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2012. – С. 250–252.

12. Панасенко, О.М. Опосредованная миелопероксидазой регуляция дегрануляции нейтрофилов в условиях окислительного стресса / О.М. Панасенко, И.В. Горудко, А.В. Соколов, В.А. Костевич, Д.В. Григорьева, В.А. Иванов, С.Н. Черенкевич // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф. ; Десятый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 19–21 июня 2012 г., Минск, Беларусь : сб. ст. В 2 ч. Ч. 1 / редкол. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2012. – С. 194–197.

13. Григорьева, Д.В. Влияние миелопероксидазы на осмотический и кислотный гемолиз эритроцитов / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, Е.В. Шамова, О.М. Панасенко // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф. ; Десятый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 19–21 июня 2012 г., Минск, Беларусь : сб. ст. В 2 ч. Ч. 1 / редкол. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2012. – С. 259–261.

14. Григорьева, Д.В. Влияние миелопероксидазы на деформируемость эритроцитов больных сахарным диабетом и ишемической болезнью сердца / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, В.А. Костевич, М.А. Миронова, Е.Э. Константинова, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Микроциркуляция в кардиологии и клинике внутренних болезней : материалы республик. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Витебск, 23 нояб. 2012 г. / редкол.: В.П. Дейкало. – Витебск : ВГМУ, 2012. – С. 53–55.

15. Горудко, И.В. Биохимические маркеры сердечно-сосудистых заболеваний: определение активности миелопероксидазы / И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, А.В. Соколов, И.В. Буко, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // Фундаментальные науки – медицине : материалы Междунар. науч. конф. (Минск, 17 мая 2013 г.). В 2 ч. Ч. 1 / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т физиологии ; редкол.: И.В. Залуцкий [и др.]. – Минск : Беларус. навука, 2013. – С. 191–194.

16. Горудко, И.В. Интегрин-зависимая регуляция функциональной активности нейтрофилов альбумином плазмы крови человека, модифицированным в условиях окислительного/галогенирующего стресса / И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, А.В. Соколов, В.А. Костевич, Е.В. Шамова, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 2. / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – М.: ООО «ИД В. Ема», 2013. – С. 523–528.

17. Горудко, И.В. Функциональный отклик нейтрофилов на альбумин плазмы крови, модифицированный в реакциях с участием миелопероксидазы / И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, Е.В. Шамова, А.В. Соколов, Е.В. Михальчик, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине: материалы Международной научно-практической конференции (Новосибирск, 1–4 октября 2013 г.): в 2 частях. – Новосибирск: НГПУ, 2013. – Часть 1. – С. 64–65.

18. Григорьева, Д.В. Механизмы кальциевой сигнализации в нейтрофилах при действии миелопероксидазы / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, Е.В. Шамова // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф. ; Одиннадцатый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 17–20 июня 2014 г., Минск, Беларусь : сб. ст. в 2 ч. Ч. 1 / редкол. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2014. – С. 54–56.

19. Горудко, И.В. Галогенированные белки как активаторы нейтрофилов и медиаторы воспаления / И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, Е.В. Шамова, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем : Междунар. науч. конф. ; Одиннадцатый съезд Белорус. обществ. об-ния фотобиологов и биофизиков, 17–20 июня 2014

г., Минск, Беларусь : сб. ст. в 2 ч. Ч. 2 / редкол. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2014. – С. 170–172.

20. Григорьева, Д.В. Влияние миелопероксидазы на дегрануляцию нейтрофилов в условиях окислительного стресса / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, В.А. Костевич, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Рецепторы и внутриклеточная сигнализация. Сборник статей. Том 2. / Под редакцией В.П. Зинченко, А.В. Бережнова – Пущино: цифровая типография Fix-Print, 2015. – С. 543–547.

21. Соколов, А.В. Исследование показателей галогенирующего стресса у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями с помощью методов иммуноферментного анализа / А.В. Соколов, В.А. Костевич, Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, С.Н. Черенкевич, В.Б. Васильев, О.М. Панасенко // Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем: Междунар. науч. конф. ; Двенадцатый съезд Белорус. обществ. объединения фотобиологов и биофизиков, Минск, 28–30 июня 2016 г. : сб. ст. : в 2 ч. Ч. 1 / редкол. : И.Д. Волотовский [и др.]. – Минск : Изд. центр БГУ, 2016. – С. 365–368.

22. Горудко, И.В. Связывание миелопероксидазы с эритроцитами в условиях окислительного/галогенирующего стресса / И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, А.В. Соколов, Е.В. Шамова, Н.С. Кужель, Е.Э. Константинова, В.Б. Васильев, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // Современные проблемы биохимии : сб. науч. ст. / НАН Беларуси [и др.]; редкол.: Л.И. Надольник (гл. ред.) [и др.]. – Гродно : ЮрСаПринт, 2016. – Ч. 1. – С. 67–72.

Тезисы докладов научных конференций

23. Горудко, И.В. Пероксидазная активность плазмы крови у больных сахарным диабетом 2 типа / И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, А.В. Соколов, И.В. Буко, Е.Э. Константинова, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Системное кровообращение, микроциркуляция и гемореология (от ангиогенеза до центрального кровообращения) : материалы международной научной конференции / под науч. ред. А.В. Муравьева. Ярославль : Изд-во ЯГПУ им. К.Д. Ушинского, 2011. – С. 116.

24. Григорьева, Д.В. Активность миелопероксидазы в плазме крови больных ишемической болезнью сердца / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, В.А. Костевич, О.Д. Бичан, И.В. Буко, Л.З. Полонецкий, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // IV съезд биофизиков России. Симпозиум III «Физика – медицине и экологии». Материалы докладов. – Нижний Новгород, 2012. – С. 58.

25. Grigorieva, D.V. Reduced resistance of erythrocytes to hemolysis in the presence of myeloperoxidase / D.V. Grigorieva, I.V. Gorudko, A.V. Sokolov, S.N. Cherenkevich, O.M. Panasenko // 12th Kharkiv Young Scientists Conference on Radiophysics, Electronics, Photonics and Biophysics : Conf. book, Kharkiv, Dec. 4–7, 2012.

26. Григорьева, Д.В. Влияние альбумина, модифицированного гипогалоидными кислотами, на активацию НАДФН-оксидазы нейтрофилов / Д.В. Григорьева // БИОЛОГИЯ – НАУКА XXI века: 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 21–26 апреля 2013 г.). Сборник тезисов. – Пущино, 2013. – С. 266–267.

27. Panasenko, O.M. Halogenated forms of phospholipids and proteins as a novel class of signaling molecules priming neutrophils / O.M. Panasenko, I.V. Gorudko, D.V. Grigorieva, A.V. Sokolov, E.V. Shamova, T.V. Vakhrusheva, V.A. Kostevich, S.N. Cherenkevich // 8th International Human Peroxidase Meeting : Conf. book, Sydney, Sep. 9–12, 2013. – Mercure Sydney, 2013. – P. 41.

28. Gorudko, I.V. Effect of native and modified under oxidative/halogenating stress myeloperoxidase on erythrocyte hemolysis / I.V. Gorudko, D.V. Grigorieva, A.V. Sokolov, E.V. Shamova, S.N. Cherenkevich, O.M. Panasenko // 8th National scientific practical conference with international participation «Reactive oxygen species, nitric oxide, antioxidants and human health» : conf. book, Smolensk, May 25–29, 2014 / Smolensk CNTI ; edited by V.G. Podoprigorova. – Smolensk, 2014. – P. 61.

29. Григорьева, Д.В. Роль цитоскелета в индуцированной миелопероксидазой дегрануляции нейтрофилов при воспалении / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, Е.В. Шамова, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // Свободные радикалы в химии и жизни : сб. тез. докл. Междунар. конф., Минск, 25–26 июня 2015 г. – Минск : Изд. центр БГУ, 2015. – С. 81–82.

30. Горудко, И.В. Трансдукция сигнала в нейтрофилах при действии галогенированного альбумина / И.В. Горудко, Д.В. Григорьева, Е.В. Шамова, А.В. Соколов, В.А. Костевич, О.М. Панасенко, С.Н. Черенкевич // Свободные радикалы в химии и жизни : сб. тез. докл. Междунар. конф., Минск, 25–26 июня 2015 г. – Минск : Изд. центр БГУ, 2015. – С. 79–80.

31. Горудко, И.В. Взаимодействие миелопероксидазы с эритроцитами и регуляция их структурно-функциональных свойств / И.В. Горудко, Е.В. Шамова, Д.В. Григорьева, А.В. Соколов, В.Б. Васильев, С.Н. Черенкевич, О.М. Панасенко // V съезд биофизиков России. Материалы докладов : в 2 т. – Ростов-на-Дону : Издательство Южного федерального университета, 2015. – Т. 2. – С. 221.

32. Григорьева, Д.В. Механизмы регуляции миелопероксидазой дегрануляции нейтрофилов / Д.В. Григорьева, И.В. Горудко, А.В. Соколов, В.А. Костевич, О.М. Панасенко // V съезд биофизиков России. Материалы докладов : в 2 т. – Ростов-на-Дону : Издательство Южного федерального университета, 2015. – Т. 2. – С. 222.

Патенты на изобретения

33. Способ определения пероксидазной активности гемоглобина в плазме крови : пат. 2458992 Российская Федерация, МПК C12Q1/28, G01N33/72 / И.В. Горудко, О.М. Панасенко, Д.В. Григорьева, А.В. Соколов, С.Н. Черенкевич, В.И. Сергиенко ; заявитель Бел. гос. ун-т, ФГБУН НИИ физ.-хим. медицины ФМБА России. – 2011118091/15 ; заявл. 04.05.2011 ; опубл. 20.08.12 // Бюл. № 23.

34. Способ определения пероксидазной активности гемоглобина в плазме крови : пат. 17950 Респ. Беларусь, МПК G01N33/72, C12Q1/28 / И.В. Горудко, О.М. Панасенко, Д.В. Григорьева, А.В. Соколов, С.Н. Черенкевич, В.И. Сергиенко ; заявитель Бел. гос. ун-т, ФГБУН НИИ физ.-хим. медицины ФМБА России. – № а 20110459 ; заявл. 04.11.11; опубл. 28.02.14 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2014. – № 1. – С. 123.

РЭЗІЮМЭ

Грыгор'ева Дар'я Ўладзіміраўна

Механізмы рэгуляцыі міелапераксідазай структурна-функцыянальных уласцівасцей клетак крыві

Ключавыя словы: міелапераксідаза, нейтрафілы, галагеніраваны сываратачны альбумін чалавека, дэгрануляцыя, НАДФН-аксідаза, β_2 -інтэгрыны, цыташкілет, іоны кальцыю, эрытрацыты, дэфармаванасць, гемоліз, пераксідазная актыўнасць, востры каранарны сіндром.

Мэта работы: вызначэнне механізмаў рэгуляцыі міелапераксідазай (МПА) структурна-функцыянальных уласцівасцей нейтрафілаў і эрытрацытаў чалавека ў норме і пры паталогіі.

Метады даследвання: спектрафотаметрычныя, флюарэсцэнтныя, мікраскапічныя.

Атрыманыя рэзультаты і іх навізна: упершыню выяўлена, што сываратачны альбумін чалавека, мадыфікаваны гіпагалоіднымі кіслотамі, утварэнне якіх каталізуе МПА, інтэгрын-залежным чынам стымулюе рэспіраторны выбух і дэгрануляцыю нейтрафілаў, праз актывацыю тыразінкіназ, фосфатыдыліназітол-3-кіназ, мітаген-актывуемых пратэінкіназ і рэарганізацыю цыташкілета. Вызначана, што МПА, звязваючыся з α -субадзінкай β_2 -інтэгрына нейтрафілаў, павялічвае ўнутрыклеткавую канцэнтрацыю свабодных іонаў кальцыю і ініцыіруе рэарганізацыю актынавага цыташкілета клетак, якая прыводзіць да дэгрануляцыі азурафільных і спецыфічных гранул нейтрафілаў. Паказана, што МПА звязваецца з бялком паласы 3 і глікафарынамі А і В эрытрацытаў, паніжае ўстойлівасць клетак да гемолізу і здольнасць эрытрацытаў да дэфармацыі. Упершыню выяўлена павелічэнне актыўнасці МПА ў плазме крыві хворых са стабільнай і нестабільнай стэнакардыяй. Паказана, што вызначэнне актыўнасці МПА ў плазме крыві можа выкарыстоўвацца для ацэнкі наяўнасці запалення ў арганізме, а таксама ў якасці паказчыка, які характарызуе эфектыўнасць тэрапіі, якая праводзіцца ў пацыентаў з сардэчна-сасудзістымі паталогіямі.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: вынікі даследванняў укаранёныя ў навуковы і навучальны працэсы кафедры біяфізікі фізічнага факультэта Беларускага дзяржаўнага ўніверсітэта. Атрыманыя рэзультаты могуць выкарыстоўвацца для распрацоўкі метадаў дыягностыкі і карэкцыі функцый клетак пры паталагічных працэсах, асацыіраваных з развіццём акісляльнага стрэсу і запалення.

Вобласць прымянення: біяфізіка, клетачная біялогія, медыцына.

РЕЗЮМЕ

Григорьева Дарья Владимировна

Механизмы регуляции миелопероксидазой структурно-функциональных свойств клеток крови

Ключевые слова: миелопероксидаза, нейтрофилы, галогенированный сывороточный альбумин человека, дегрануляция, НАДФН-оксидаза, β_2 -интегрины, цитоскелет, ионы кальция, эритроциты, деформируемость, гемолиз, пероксидазная активность, острый коронарный синдром.

Цель работы: установление механизмов регуляции миелопероксидазой (МПО) структурно-функциональных свойств нейтрофилов и эритроцитов человека в норме и при патологии.

Методы исследования: спектрофотометрические, флуоресцентные, микроскопические.

Полученные результаты и их новизна: впервые выявлено, что сывороточный альбумин человека, модифицированный гипогалоидными кислотами, образование которых катализирует МПО, интегрин-зависимым образом стимулирует респираторный взрыв и дегрануляцию нейтрофилов, вследствие активации тирозинкиназ, фосфатидилинозитол-3-киназ, митоген-активируемых протеинкиназ и реорганизации цитоскелета. Установлено, что МПО, связываясь с α -субъединицей β_2 -интегрина нейтрофилов, увеличивает внутриклеточную концентрацию свободных ионов кальция и инициирует реорганизацию актинового цитоскелета клеток, что приводит к дегрануляции азурофильных и специфических гранул нейтрофилов. Показано, что МПО, связывается с белком полосы 3 и гликофоринами А и В эритроцитов, снижает устойчивость клеток к гемолизу и способность эритроцитов к деформации. Впервые выявлено увеличение активности МПО в плазме крови пациентов со стабильной и нестабильной стенокардией. Показано, что определение активности МПО в плазме крови может использоваться для оценки наличия воспаления в организме, а также в качестве показателя, характеризующего эффективность проводимой терапии у пациентов с сердечно-сосудистыми патологиями.

Рекомендации по использованию: результаты исследований внедрены в научный и учебный процессы кафедры биофизики физического факультета Белорусского государственного университета. Полученные данные могут быть использованы для разработки методов диагностики и коррекции функций клеток при патологических процессах, ассоциированных с развитием окислительного стресса и воспаления.

Область применения: биофизика, клеточная биология, медицина.

SUMMARY

Grigorieva Daria

Mechanisms of regulation of structural and functional properties of blood cells by myeloperoxidase

Keywords: myeloperoxidase, neutrophils, halogenated human serum albumin, degranulation, NADPH oxidase, β_2 integrins, cytoskeleton, calcium ions, red blood cells, deformability, hemolysis, peroxidase activity, acute coronary syndrome.

Aim of research: to establish the mechanisms of regulation of structural and functional properties of neutrophils and red blood cells by myeloperoxidase (MPO) in normal and pathological conditions.

Methods of research: spectrophotometric, fluorescent and microscopic methods.

The results obtained and their novelty: it is for the first time found that human serum albumin modified by hypohalous acids, formed in reactions with MPO, in integrin-dependent manner stimulates respiratory burst and degranulation of neutrophils due to the activation of tyrosine kinases, phosphatidylinositol-3-kinases, mitogen-activated protein kinases and the cytoskeleton reorganization. It is established, that MPO binding to α subunit of β_2 neutrophil integrins increases the concentration of intracellular free Ca^{2+} , initiates the reorganization of the cell actin cytoskeleton, that leads to degranulation of the azurophilic and specific granules of neutrophils. It is shown that MPO binds to the protein band 3 and glycophorin A and B of erythrocytes, reduces the resistance of cells to hemolysis and erythrocyte deformability. The increase of MPO activity is revealed in blood plasma of patients with stable and unstable angina. It is shown that the determination of MPO activity in blood plasma can be used both to assess the availability of inflammation in organism and as indicator of the effectiveness of therapy in patients with cardiovascular disease.

Recommendation for practical use: the results of this research are implemented in the scientific and educational processes of the Department of Biophysics, Physical Faculty of Belarusian State University. The obtained data can be used for the development of new methods of diagnostic and correction of cell functions in pathological processes, associated with oxidative stress and inflammation.

Field of application: biophysics, cell biology, medicine.

