

УДК
ББК
С

Современные проблемы биохимии и молекулярной биологии : сборник статей II Белорусского биохимического конгресса (г. Гродно, 17-18 мая 2018 г.) / под общ. ред. доктора мед. наук, проф. И.Н. Семенени и доктора биол. наук, проф., члена-корр. НАН Беларуси А.Г. Мойсеенка. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 795 с.

В сборнике освещается круг вопросов, связанных с современными проблемами развития биохимии и молекулярной биологии, в частности, биохимии витаминов и коферментов, биохимии алкоголизма и наркомании, актуальным проблемам биохимии и молекулярной биологии злокачественного роста, различным аспектам регуляции метаболических процессов в норме и патологии, использования биологически активных природных соединений в целях лечения и профилактики некоторых заболеваний, биохимии питания, биотехнологий, другим вопросам. Опубликованы памятные материалы об ушедших из жизни ученых-биохимиках.

Сборник представляет интерес для студентов, аспирантов, научных и научно-педагогических работников, практических врачей, изучающих современные проблемы биохимии и молекулярной биологии.

УДК
ББК

ISBN

© Национальная академия наук Беларуси, 2018
© РНИУП “Институт биохимии биологически активных соединений Национальной академии наук Беларуси”, 2018
© Оформление. УП “ИВЦ Минфина”, 2018

и липидного обмена (ОХ, ЛПНП, ЛПВП) у студентов-медиков при дифференцированном потреблении пальмового масла в суточном рационе питания.

Список литературы.

1. Арутюнян, Н. С. Рафинация масел и жиров: теоретические основы, практика, технология, оборудование / Н. С. Арутюнян, Е. П. Корнена, Е. А. Нестерова. – СПб.: ГИОРД, 2004. – 288 с.
2. Ильина, С. В. Тенденции увеличения спроса на пальмовое масло в странах Европы и России / С. В. Ильина, Е. А. Радюк // Успехи соврем. естествознания. – 2012. – № 6. – С. 117-118.
3. Назаров, П. Е. Полиненасыщенные жирные кислоты как универсальные эндогенные биорегуляторы / П. Е. Назаров, Г. И. Мягкова, Н. В. Гроза // Вестн. МИТХТ им. М. В. Ломоносова. – 2009. – Т. 4, № 5. – С. 3-19.
4. Титов, В. Н. Высокое содержание пальмитиновой жирной кислоты в пище – основная причина повышения холестерина липопротеинов низкой плотности и атероматоза интимы артерий / В. Н. Титов // Клин.лаб. диагностика. – 2013. – № 2. – С. 3-10.
5. Титов, В. Н. Профилактика атеросклероза. Избыток в пище пальмитиновой кислоты – причина гиперхолестеринемии, синдрома воспаления, резистентности миоцитов к инсулину и апоптоза / В. Н. Титов, В. В. Крылин, Ю. К. Ширяева // Клин.лаб. диагностика. – 2011. – № 2. – С. 4-15.
6. The type of oil used for cooking is associated with the risk of nonfatal acute myocardial infarction in Costa Rica // Е. К. Kabagambe[et al.] // J. Nutr. – 2005. – Vol.135 (11). – P. 2674-2269.

УДК 53.097+ 576.5

МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ГЕНЕРАЦИИ АКТИВНЫХ КИСЛОРОДНЫХ МЕТАБОЛИТОВ НЕЙТРОФИЛАМИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ

Е.И.Коваленко, Е.А.Коваленко, А.М.Юшкевич

*Белорусский государственный университет, физический факультет,
кафедра биофизики,
Минск, Беларусь*

Резюме. Электрические поля контролируют заживление ран и стимулируют миграцию нейтрофилов к месту повреждения, однако регуляция кислород-активирующей способности этих клеток при действии электрического поля не исследована. Нами выявлено усиление активности НАДФН-оксидазы и миелопероксидазы в нейтрофилах под влиянием электрического поля *in vitro*, зависимое от путей передачи сигналов с участием

фосфатидилинозитол-3-киназы, протеинкиназы C и Ca^{2+} -кальмодулина, а также связанное с изменением динамики F-актина.

MECHANISMS OF REGULATION OF ACTIVE OXYGEN METABOLITES GENERATION BY NEUTROPHILS ON EXPOSURE TO ELECTRIC FIELD

Ye.I.Kovalenko, Ye.A.Kovalenko, F.V.Yushkevich

*Belarusian State University, Physical Faculty, Department of Physics,
Minsk, Belarus*

Summary. Electric fields are known to control wound healing and to lead to directed migration of neutrophils to injured site, but regulation of oxygen-activating capacity of these cells under the action of electric field has not been investigated. In the present study, an increase in NADPH oxidase and myeloperoxidase activity in neutrophils under the influence of electric field *in vitro* has been revealed. This effect depends on signaling pathways involving phosphatidyl inositol 3-kinase, protein kinase C and Ca^{2+} -calmodulin and is also related to changes in F-actin dynamics.

Введение. Заживление ран необходимо для поддержания структурной целостности многоклеточного организма и включает протекание сложных процессов репаративной регенерации с вовлечением мезенхимальных, камбиальных (зародышевых) клеток, фибробластов и лейкоцитов [6, 11, 14, 15]. Репаративная регенерация при травмах, стерильном воспалении и инфекциях отличается от физиологического обновления тканей значительно большей интенсивностью, в частности, благодаря активирующему действию провоспалительных молекул классов DAMP и PAMP [6, 11, 14, 15]. Помимо того, при повреждении эпителиальных слоев и кожи обнаружено возникновение электрических токов и эндогенных электрических полей, которые также важны для стимуляции направленной миграции, позиционирования, ориентации, пролиферации и дифференцировки клеток, ответственных за восстановление тканей [5, 8, 12, 15]. Значения напряженности таких эндогенных электрических полей не превышают 2 В/см [5, 8, 12, 15], что на три порядка ниже напряженности импульсных полей, применяемых *in vitro* для перфорации клеточных мембран [13].

Нейтрофилы являются наиболее быстро мобилизуемыми клетками иммунной системы и первыми из лейкоцитов накапливаются в местах повреждения [6]. В ряде работ, *in vitro* выявлен гальванотаксис нейтрофилов – усиление направленной миграции при воздействии электрических полей, соответствующих по характеристикам эндогенным полям [4, 10, 15]. Известно, что при активации рецепторов нейтрофилов провоспалительными медиаторами, одновременно индуцируются хемотаксис клеток и «респираторный взрыв» с генерацией активных кислородных метаболитов (АКМ) НАДФН-оксидазой и другими ферментными системами [14]. Однако, открытым остается вопрос имеет ли место усиление генерации АКМ в

нейтрофилах при гальванотаксисе и являются ли схожими механизмы активации клеток при действии электрических полей и хемоаттрактантов. В связи с этим, целью работы явилось изучение влияния электрического поля низкой напряженности на процессы формирования АКМ в нейтрофилах и выявление вовлеченных в эти процессы путей внутриклеточной трансдукции сигналов.

Материалы и методы исследования. Нейтрофилы изолировали из периферической крови здоровых доноров по методу описанному ранее [9]. Процедура фракционирования крови включала седиментацию эритроцитов в присутствии декстрана, центрифугирование плазмы с лейкоцитами в градиенте плотности фиколла-урографина ($1,077 \text{ г/см}^3$), удаление остатка эритроцитов из фракции гранулоцитов путем гипотонического лизиса. Полученные гранулоциты дважды отмывали в изотоничном растворе NaCl и ресуспензировали в сбалансированном солевом буферном растворе Эрла при pH 7,3. В конечной фракции клеток нейтрофилы составляли не менее 96 %.

В суспензию нейтрофилов в стеклянной ячейке погружали электроды из нержавеющей стали, расположенные на расстоянии 1 см друг от друга и подключенные к генератору сигналов с помощью экранированной витой пары, для устранения воздействия электромагнитных помех. Генератор ГТС-1 («Новые аналитические системы», РБ) использовали для поддержания постоянного напряжения между электродами 100, 250, 500 или 1000 мВ в экспериментальных образцах. В контрольных образцах напряжение на электродах устанавливали 0 мВ.

Процессы формирования нейтрофилами АКМ изучали хемилюминесцентным методом с использованием люминола, способного химически взаимодействовать с различными АКМ такими как $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 , $\cdot\text{OH}$, OCl^- , ONOO^- и в результате испускать излучение [9]. С помощью биохемилюминометра БХЛ-1 (БГУ, РБ) и системы получения и обработки данных «Unichrom» («Новые аналитические системы», РБ) регистрировали кинетические зависимости интенсивности опосредованной люминолом хемилюминесценции $I(t)$, отражающие изменение скорости генерации АКМ нейтрофилами при активации в ходе адгезии на стекло и при фагоцитозе латекса. При этом измерительная ячейка с суспензией клеток и погруженными в нее электродами находилась внутри полностью затемненного металлического кюветного отделения. Концентрация клеток в среде составляла $1 \cdot 10^6$ /мл, люминола – 50 мкМ, измерения проводили при 37 °С. Анализируя кривые $I(t)$, определяли ΣI и ΣI_k , характеризующие суммарную генерацию АКМ в экспериментальных (ΣI) и контрольных (ΣI_k) образцах. Значения ΣI и ΣI_k рассчитывали как площади под кривыми $I(t)$ за выбранный интервал времени.

Участие различных ферментов исследовали с использованием ингибиторов DPI, NaN_3 , LY294002, Go6983, PD 98059, W-7, цитохалазина В, колхицина, верапамила, нифедипина, АЕТ, перехватчика NO РТЮ («Sigma-Aldrich»). Клетки инкубировали с добавлением ингибиторов в течение 30 мин до стимуляции. Определяли величину ингибирования генерации АКМ в % в

отсутствие и при действии электрического поля, затем находили разность этих величин $\Delta I_{\text{инг}}$.

Статистический анализ полученных данных выполняли в программе Excel. На рисунках представлены средние значения и стандартные отклонения величин. Уровни значимости различий p по отношению к контролю определяли по парному критерию Стьюдента, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$ (помечено *).

Результаты исследования и их обсуждение. Для изучения влияния на клетки слабых электрических полей, соответствующих по характеристикам эндогенным полям в очагах повреждения тканей в организме, исследованы процессы формирования АКМ нейтрофилами при воздействии электрического поля, создаваемого с помощью электродов, на которых поддерживалось постоянное напряжение 100, 250, 500 или 1000 мВ. В покоящихся нейтрофилах компоненты ферментных систем, способных генерировать АКМ, пространственно разобщены и не активны [9, 14], в связи с чем, наблюдения проводились при активации клеток в ходе адгезии на стеклянное дно кюветы и добавлении частиц латекса, подвергаемых клетками фагоцитозу.

На рисунке 1 показано изменение интенсивности генерации АКМ клетками, индуцируемое электрическим полем при длительности экспозиции 20 мин. Эффективность действия электрического поля оценивали в % как отношение ΣI в образце, подвергнутом воздействию поля, к среднему значению в контрольных образцах $\langle \Sigma I_k \rangle$, которое принимали за 100 %. Установлено, что под влиянием электрического поля наблюдается повышение продукции АКМ в активируемых нейтрофилах, более выраженное при фагоцитозе латекса [рис. 1, Б], чем в ходе клеточной адгезии [рис. 1, А]. Эффективность электрической стимуляции нейтрофилов к генерации АКМ зависит от разности потенциалов между электродами и наиболее значительна при 250 и 500 мВ [рис. 1].

Зависимость эффективности стимуляции клеток от напряженности электрического поля ранее изучена в работах [1, 2] для линий опухолевых клеток HeLa и С6, где предполагается, что определяющими эту зависимость факторами могут быть размеры клеток и поверхностные потенциалы. Хотя для опухолевых клеток исследовано влияние электрической стимуляции на пролиферацию, а для нейтрофилов – на генерацию АКМ, прослеживается корреляция между напряженностью эффективно действующего электрического поля и размерами трех типов клеток. Для самых мелких клеток – нейтрофилов, для эффективной стимуляции требуется наибольшая разность потенциалов на электродах 250-500 мВ, для клеток HeLa – 200 мВ, для самых крупных клеток С6 – 66 мВ (при межэлектродном расстоянии 1 см). При действии электрического поля первичной может быть поляризация, и клетки большего размера поляризуются сильнее.

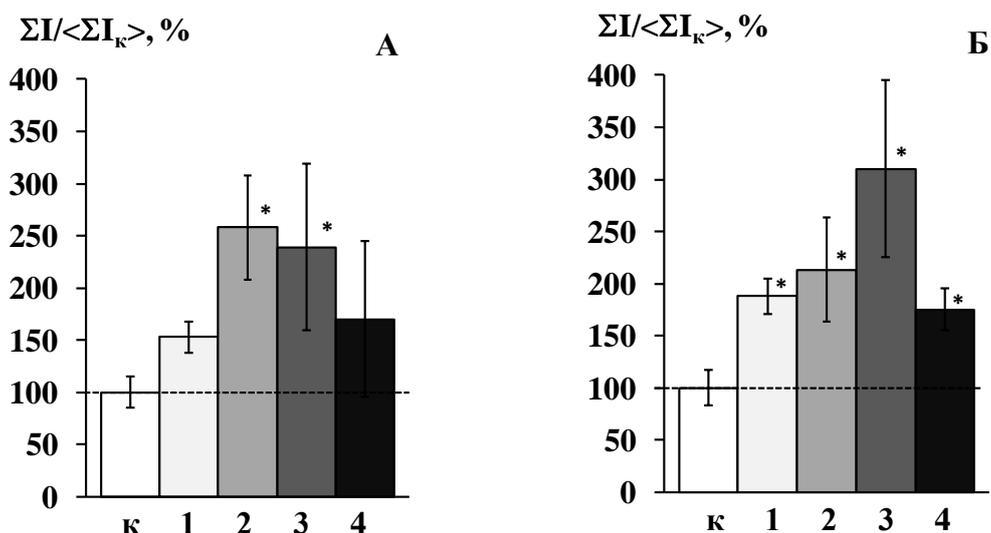


Рис. 1 – Усиление генерации АКМ в нейтрофилах при адгезии клеток к стеклу и при фагоцитозе латекса, индуцированное действием электрического поля в течение 20 мин; А – при адгезии клеток к стеклу, Б – при фагоцитозе латекса; Напряжение на электродах: 1 – 100 мВ, 2 – 250 мВ, 3 – 500 мВ, 4 – 1000 мВ, к – 0 мВ (контроль), * – различия по сравнению с контролем достоверны ($p \leq 0,05$)

Далее, нами проведено выявление ферментных систем генерации АКМ в нейтрофилах, активируемых в результате воздействия электрического поля (при значении напряжения на электродах 500 мВ) [рис. 2]. Формирование АКМ в нейтрофилах может происходить с участием НАДФН-оксидазы, генерирующей $\cdot O_2^-$ радикалы, при дисмутации которых образуется H_2O_2 [9, 14]. При действии ряда индукторов в нейтрофилах может активироваться NO-синтаза (iNOS), синтезирующая NO, взаимодействующий с $\cdot O_2^-$ с образованием ONOO $^-$. С использованием H_2O_2 , $\cdot O_2^-$ и NO миелопероксидаза (МПО) из азурофильных гранул нейтрофилов способна катализировать окисление ряда субстратов, приводить к образованию OCl $^-$ и прочих АКМ. В работе изучено участие НАДФН-оксидазы, МПО и iNOS в генерации АКМ с применением ингибиторов DPI (1,5 мкМ), NaN_3 (1,25 мМ), АЕТ (2,7 мкМ) и перехватчика NO РТЮ (0,1 мкМ). Выявлено, что под действием электрического поля, продукция АКМ возрастает за счет повышения активности НАДФН-оксидазы и МПО, но не iNOS [рис. 2].

МПО и компоненты НАДФН-оксидазы $gp91^{phox}$ и $p22^{phox}$ депонированы в различных гранулах нейтрофилов, и их вовлечение в генерацию АКМ требует активации процессов дегрануляции (транслокации гранул и слияния мембран), контролируемых, в частности, белками цитоскелета. Нами исследовано влияние ингибиторов полимеризации актиновых филаментов цитохалазина В (ЦВ, 0,01 мг/мл) и тубулиновых микротрубочек колхицина (0,1 мг/мл) на индуцируемое электрическим полем увеличение выхода АКМ. Установлено, что колхицин не влияет на генерацию АКМ, а цитохалазин В приводит к значительным изменениям кинетики формирования АКМ нейтрофилами в ходе адгезии и сильному ингибированию отклика клеток на добавление латекса. В образцах нейтрофилов, экспонированных воздействию электрического поля,

ингибирующее действие цитохалазина В было сильнее, чем в контрольных, что свидетельствует о необходимости полимеризации актиновых микрофиламентов для активации систем генерации АКМ при электрической стимуляции [рис. 2]. Влияние слабого электрического поля на уровень НАДФН и локализацию МПО в нейтрофилах было обнаружено авторами работы [10].

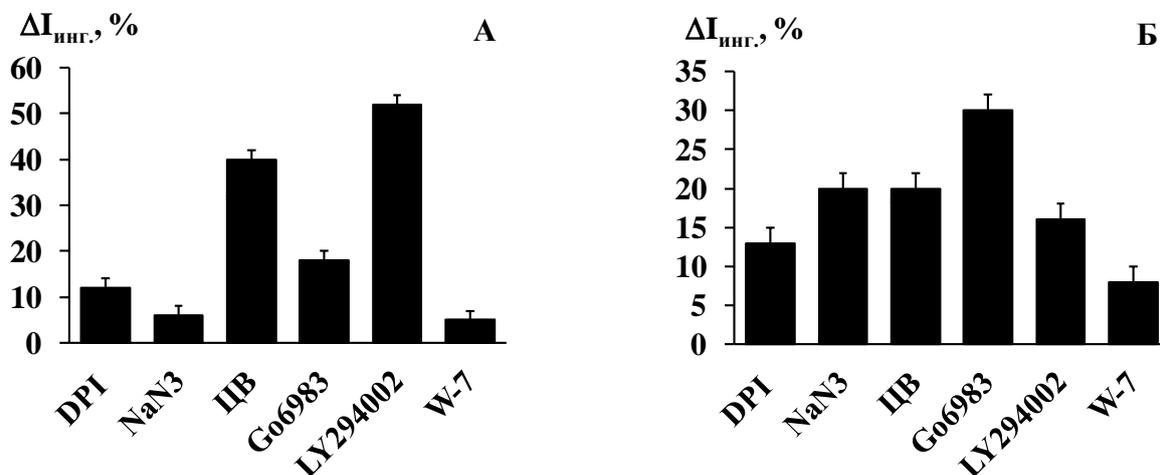


Рис. 2 – Изменение влияния ингибиторов на генерацию АКМ в нейтрофилах при действии электрического поля в течение 20 мин; А – при адгезии клеток к стеклу, Б – при фагоцитозе латекса

Для сборки НАДФН-оксидазы необходима активация и стыковка ее компонентов, при этом фосфорилирование цитозольных белков p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox} является ключевым этапом для экспонирования сайтов связывания их друг с другом и мембранными белками gp91^{phox} и p22^{phox} в НАДФН-оксидазный комплекс. Анализ с использованием Go6983 (0,75 мкМ), LY294002 (50 мкМ), PD 98059 (2,5 мкМ), ингибирующих протеинкиназу С (ПКС), фосфотидилинозитол-3-киназу (ФИ-3К) и митогенактивирующие протеинкиназы (МАПК), позволил выявить изменение участия ПКС и ФИ-3К, но не МАПК в стимулирующем действии электрического поля на процессы генерации АКМ в клетках [рис. 2].

Важную роль в трансдукции сигналов в нейтрофилах играют ионы Ca²⁺, которые при активации клеток могут высвобождаются из внутриклеточных депо или поступать в цитозоль из внеклеточной среды через различные Ca²⁺-каналы в плазматической мембране [3, 14]. Белок кальмодулин связывает Ca²⁺ и далее может активировать ряд белков, в том числе контролирующих процессы активации НАДФН-оксидазы и дегрануляции. С применением ингибиторов потенциал-управляемые Ca²⁺-каналов L-типа веропамила (1 мкМ) и нифедипина (1 мкМ), а также ингибитора кальмодулина W-7 (25 мкМ) [рис. 2] нами выявлена зависимость стимулирующего действия электрического поля на процессы образования АКМ в нейтрофилах от Ca²⁺-кальмодулина, но не от транспорта Ca²⁺ из внеклеточной среды. Следует отметить, что усиление зависимости процессов генерации АКМ в нейтрофилах от внеклеточного Ca²⁺ и его транспорта через каналы мембраны клетки выявляется при повышении продолжительности активации, тогда как в данном исследовании

рассматриваются ранние эффекты воздействия электрического поля при времени экспозиции 20 мин.

Таким образом, анализ механизмов активации клеток к генерации АКМ при стимулирующем действии электрического поля, позволил выявить ряд общих черт со стимулирующим действием хемоаттрактантов на кислородоактивирующие процессы в нейтрофилах: усиление активации НАДФН-оксидазы, зависимость от ПКС, ФИ-3-К, Ca^{2+} -кальмодулина и полимеризации актиновых филаментов. Различные изоформы ПКС и ФИ-3К являются доминирующими киназами в передаче сигналов хемоаттрактантами и вовлекаются в трансдукцию сигналов в нейтрофилах при активации рецепторов, связанных с G-белками, Fc-рецепторов, связывании белков адгезии и трансэпителиальной миграции [14]. Показано, что актиновые филаменты и ФИ-3К – ключевые участники активации нейтрофилов, как при хемотаксисе, так и гальванотаксисе [8, 15]. Механизмы действия электрических полей на биологические мишени и проявления активности клеток могут представлять практический интерес в связи со все более расширяющимся применением электрических полей в регенеративной медицине [7].

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о стимулирующем действии электрического поля на активацию НАДФН-оксидазы и МПО в нейтрофилах, что зависит от эффекторных белков передачи сигналов ПКС, ФИ-3-К и кальмодулина и полимеризации актиновых филаментов.

Список литературы.

1. Коваленко, Е.А. Специфичность влияния импульсного электрического поля на пролиферативную активность опухолевых клеток различного типа / Е.А. Коваленко, Ю.Н. Куницкая, Т.А. Кочеткова // Матер. XXV межд. научн.-практ. конф. асп., маг. и студ. «ФКС – XXV», 20 апр. 2017. Гродно, 2017. – С. 50-52.
2. Пролиферативная активность и мембранный потенциал клеток линий С6 и HeLa при культивировании в условиях электрической стимуляции / Ю.Н. Куницкая, и [др.] // Весці НАН Беларусі. Сер. біял. навук. – 2017. – №2. – С. 7-13.
3. Чиркин, А.А. Влияние блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа на активность нейтрофилов / А.А. Чиркин, Е.И. Коваленко, В.М. Ершик // Веснік ВДУ. – 2012. Т.71 (5). – С. 23-29.
4. Franke, K. Galvanotaxis of human granulocytes: electric field jump studies / K. Franke, H. Gruler // Eur. Biophys. J. – 1990. – Vol. 18 (6). – P. 334–346.
5. Funk, R.H.W. Endogenous electric fields as guiding cue for cell migration / R.H.W. Funk // Front. Physiol. – 2015. – Vol. 6. – Art. ID 143. – P. 1-8.
6. Hind, L.E. Leading from the back: the role of the uropod in neutrophil polarization and migration / L.E. Hind, W.J.B. Vincent, A. Huttenlocher // Dev. Cell. – 2016. – Vol. 38 (2). – P. 161–169.
7. Hunckler, J. A current affair: electrotherapy in wound healing / J. Hunckler, A. de Mel // J. Multidiscip. Healthc. – 2017. – Vol. 10. – P. 179-194.

8. Iwasa, S.N. Environmental factors that influence stem cell migration: an "Electric field"/ S.N. Iwasa, R. Babona-Pilipos, C.M. Morshead // *Stem Cells Int.* – 2017. – Art. ID 4276927. – P. 1-9.
 9. Kavalenka, A.I. Effects of hydrogen peroxide on neutrophil ability to generate reactive oxygen and chlorine species and to secrete myeloperoxidase in vitro / A.I. Kavalenka, G.N. Semenкова, S.N. Cherenkevich / *Cell Tiss. Biol.* – 2007. – Vol. 1 (6). – P. 551-559.
 10. Kindzelskii, A.L. Ion channel clustering enhances weak electric field detection by neutrophils: apparent roles of SKF96365-sensitive cation channels and myeloperoxidase trafficking in cellular responses / A.L. Kindzelskii, H.R. Petty // *Eur. Biophys. J.* – 2005. – Vol. 35. – P. 1–26.
 11. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation / B. McDonald, [et al.] // *Science.* – 2010. – Vol. 330 (6002). – P. 362-366
 12. Imaging the electric field associated with mouse and human skin wounds / R. Nuccitelli, [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 2008. – Vol. 16 (3). – P. 432–441.
 13. Oxidative effects of nanosecond pulsed electric field exposure in cells and cell-free media / O. Pakhomova, [et al.] // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2012. – Vol. 527. – P. 55–64.
 14. The neutrophil Btk signalosome regulates integrin activation during sterile inflammation / S. Volmering, [et al.] // *Immunity.* – 2016. – Vol. 44 (1). – P. 73-87.
 15. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase- γ and PTEN / M. Zhao, [et al.] // *Nature.* – 2006. – Vol. 442. – P. 457-460.
- УДК 613.2 : 577.

ОБЕСПЕЧЕННОСТЬ ВИТАМИНАМИ ВЗРОСЛОГО НАСЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, СПОСОБЫ ЕЕ КОРРЕКЦИИ И ПРЕИМУЩЕСТВА ПОЛИВИТАМИННЫХ КОМПЛЕКСОВ

В.М.Коденцова

*ФГБУН "Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии
и безопасности пищи",
Москва, Российская Федерация*

Резюме. В 2015-2017 гг. проведено обследование витаминного статуса 1200 взрослых россиян. В среднем всеми витаминами были обеспечены 14% взрослых; полигиповитаминоз имели 22% обследованных. Приоритетными массовыми дефицитами являются витамины D, B₂ и бета-каротин. Для ликвидации сочетанного дефицита витаминов необходим прием не моновитаминов, а мультивитаминных комплексов, причем в дозах, превышающих физиологическую потребность организма, в течение длительного времени.