

И.А. Новицкий, Н.В. Амаэбери, Г.Н. Семенкова, О.И. Шадыро

Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь, [ilya.nov42@gmail.com](mailto:iya.nov42@gmail.com)

Пальмитоксиацетон (ПА) – жирный кетон, образующийся в организме в результате свободно-радикальной фрагментации лизофосфолипидов. Биологическая роль этого кетона не изучена. Ферментативные системы, приводящие к накоплению этого соединения в организме, отсутствуют. Лизофосфолипиды образуются в результате катализируемого фосфолипазами A_2 (ФЛА $_2$) гидролиза глицерофосфолипидов, локализованных в биологических мембранах и в липопротеинах [1]. В организме человека преобладают глицерофосфолипиды, в sn-1 положении которых находятся преимущественно остатки пальмитиновой либо стеариновой кислот, причем содержание остатков пальмитиновой кислоты доминирует [2]. Таким образом, при гидролизе таких фосфолипидов и последующей фрагментации образовавшихся лизофосфолипидов, одним из основных продуктов является ПА.

Ранее на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий показано, что взаимодействие лизофосфатидилхолина с активными формами кислорода (АФК) сопровождается фрагментацией липидной молекулы с образованием ПА [3]. Такой АФК-индуцированный неферментативный путь позволяет рассматривать это соединение как потенциальный биомаркер воспаления.

Основным источником АФК в организме являются нейтрофилы и моноциты. Эти клетки мигрируют в очаг воспаления, и уничтожают патогены, генерируя АФК [4]. Продукция АФК фагоцитами может приводить к фрагментации лизолипидов клеточных мембран с образованием пальмитоксиацетона. Этот кетон может проявлять биологическую активность в отношении клеток, в первую очередь клеток крови, и модифицировать их свойства.

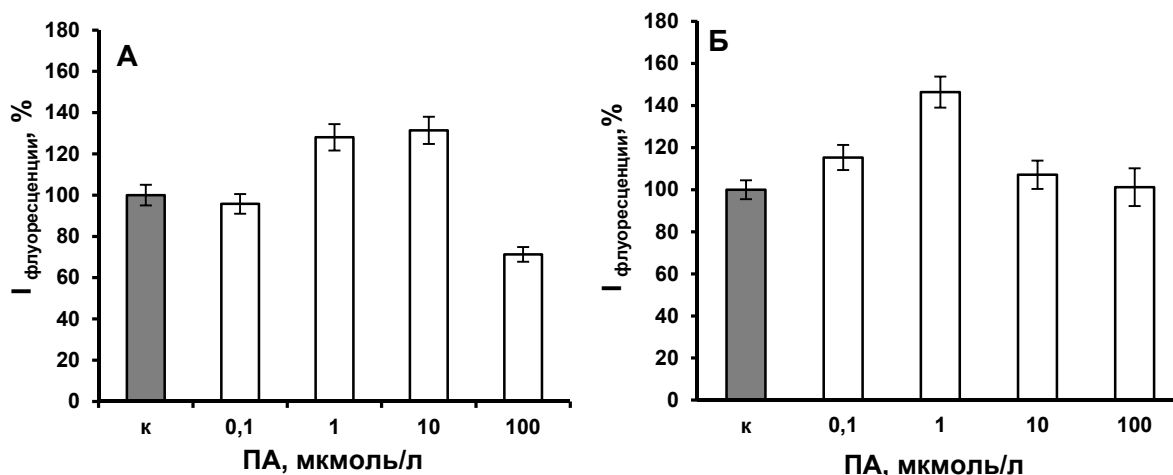
Цель работы: изучить влияние пальмитоксиацетона на функциональные свойства нейтрофилов и мононуклеаров крови здоровых людей.

Материалы и методы. В работе использовали декстран, гистопак-1077, питательную среду RPMI-1640, иодида пропициум (PI), бычий сывороточный альбумин (БСА), 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат ($H_2DCF-DA$), Triton X-100, JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтил-бензамидозолокарбоцианин йодид), FCCP (карбонилцианид р-трифторометоксифенилгидразон), *Micrococcus lysodeikticus* («Sigma», США), компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) («Анализ Х, Беларусь»). ПА был синтезирован на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий.

Нейтрофилы и мононуклеары выделяли из крови здоровых людей по стандартной методике [5]. Жизнеспособность клеток определяли флуоресцентным методом с использованием иодида пропициума (PI, $\lambda_{возб} = 530$ нм, $\lambda_{рег} = 640$ нм) на спектрофлуориметре (СМ 2203 «Солар», Беларусь) [6]. Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из нейтрофилов [7]. Активность лизоцима в супернатанте оценивали по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрическим методом ($\lambda = 450$ нм) на спектрофлуориметре СМ 2203 («Солар», Беларусь). Генерацию H_2O_2 изучали флуоресцентным методом с помощью зонда $H_2DCF-DA$ ($\lambda_{ex} = 488$ нм, $\lambda_{em} = 530$ нм) на спектрофлуориметре СМ2203 «Солар» (РБ). Продукцию H_2O_2 стимулировали добавлением 0,1 мкмоль/л хемотаксического пептида fMLP. Изменение митохондриального потенциала клеток ($\Delta\Psi_m$) оценивали с помощью флуоресцентного зонда JC-1 ($\lambda_{ex} = 490$ нм, $\lambda_{em} = 530$ нм, 590 нм) [8]. Отношение интенсивностей флуоресценции при 590 и 530 нм (I_{590}/I_{530}) пропорционально $\Delta\Psi_m$.

Результаты и обсуждение. На начальном этапе работы была проведена оценка токсичности пальмитоксиацетона в отношении нейтрофилов и мононуклеаров. Исследование проводили с использованием флуоресцентного зонда PI. При нарушении целостности мембраны этот краситель проникает в клетку и связывается с ДНК путем интеркаляции между азотистыми основаниями, что сопровождается усилением флуоресценции [9]. Установлено, что инкубирование клеток в течение 30 мин и 4 ч. с ПА в диапазоне концентраций 0,1-100 мкмоль/л не влияет на их выживаемость. Таким образом, пальмитоксиацетон не вызывает гибель клеток по механизму некроза.

Далее нами изучено влияние ПА на способность лейкоцитов продуцировать H_2O_2 . Основным источником АФК в нейтрофилах и моноцитах является фермент НАДФН-оксидаза. При активации этих клеток к фагоцитозу происходит сборка мультиферментного НАДФН-оксидазного комплекса в плазматической мембране и генерация $O_2^{\cdot-}$. Образующиеся супероксидные анион-радикалы подвергаются реакции дисмутации, катализируемой ферментом супероксиддисмутазой, с образованием пероксида водорода. На рисунке 1 представлены данные об изменении флуоресценции нейтрофилов и мононуклеаров, нагруженных зондом $H_2DCF-DA$ и стимулированных к фагоцитозу хемотаксическим пептидом fMLP, в отсутствие и присутствии 0,1-100 мкмоль/л ПА. Видно, что предварительное инкубирование клеток с ПА в концентрации 0,1 мкмоль/л не оказывает влияния на продукцию H_2O_2 нейтрофилами. При увеличении концентрации этого кетона до 1 и 10 мкмоль/л наблюдается рост генерации H_2O_2 на 28 и 31 % по сравнению с контрольными образцами соответственно. Инкубирование клеток с ПА в концентрации 100 мкмоль/л приводит к снижению продукции H_2O_2 на 29 % (рисунок 1 А). В случае мононуклеаров, инкубирование клеток с 0,1 и 1 мкмоль/л ПА приводит к росту продукции H_2O_2 на 15 и 46 % соответственно. Дальнейшее увеличение концентрации исследуемого кетона практически не оказывает влияния на генерацию H_2O_2 мононуклеарами (рисунок 1 Б).



Время инкубирования клеток с ПА – 30 мин
[fMLP] = 0,1 мкмоль/л

Рисунок 1. – Влияние пальмитоксиацетона на продукцию H_2O_2 нейтрофилами (А) и мононуклеарами (Б)

При активации нейтрофилов генерация АФК может сопровождаться секреторной дегрануляцией. Нейтрофилы высвобождают во внеклеточное пространство гранулы, содержащие антимикробные белки, в том числе фермент миелопероксидазу. Усиление секреторной дегрануляции нейтрофилов характерно для ряда патологических состояний, сопровождающихся воспалением, таких как астма, острое повреждение легких, ревматоидный артрит, сепсис и др. [9]. Нами установлено, что инкубирование нейтрофилов с ПА в диапазоне концентраций 1-100 мкмоль/л в течение 30 мин не оказывает влияния на процесс секреторной дегрануляции нейтрофилов.

Важным источником АФК в клетке являются митохондрии [10]. Рост генерации АФК митохондриями может привести к окислительному повреждению митохондриальных белков и ДНК. Кроме того, окислительное повреждение митохондрий приводит к усилению высвобождения белков межмембранного пространства, таких как цитохром с, в цитозоль за счет изменения мембранного потенциала и проницаемости внешней митохондриальной мембраны, и тем самым, индуцирует апоптоз. Величина митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) является важным парамет-

ром, используемым для оценки состояния клетки. Длительная деполяризация или гиперполяризация приводит к нарушению функциональной активности клеток (снижению жизнеспособности), что может стать причиной различных патологий [11]. Мы изучили влияние ПА на величину митохондриального мембранного потенциала в нейтрофилах и мононуклеарах (рисунок 2).

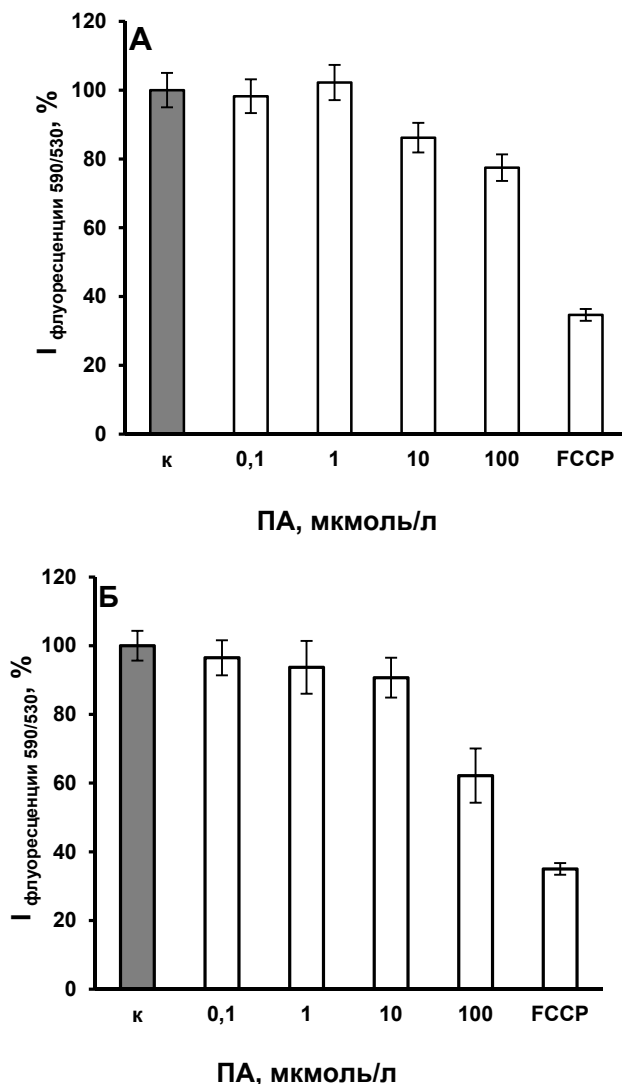


Рисунок 2. – Влияние пальмитоксиацетона на величину митохондриального мембранного потенциала в нейтрофилах (А) и мононуклеарах (Б)

Видно, что добавление ПА в концентрации 0,1 и 1 мкмоль/л к суспензии нейтрофилов не оказывает влияния на величину митохондриального мембранного потенциала. При увеличении концентрации этого кетона до 10 и 100 мкмоль/л наблюдается снижение Ψ_m на 14 и 23 % соответственно. В случае мононуклеаров снижение величины Ψ_m происходит только при добавлении ПА в концентрации 100 мкмоль/л и составляет 38 %.

Таким образом, ПА, в зависимости от концентрации, способен регулировать продукцию АФК, а также вызывать деполяризацию митохондриальных мембран нейтрофилов и мононуклеаров, что может указывать на активацию процессов клеточной гибели. Поскольку действие ПА на лейкоциты не приводит к некрозу клеток, можно предположить, что это соединение способно индуцировать апоптоз.

Список использованных источников

1. Филькин С.Ю. Суперсемейство фосфолипаз: структура, функции и применение в биотехнологии / С.Ю. Филькин, А.В. Липкин, А. Н. Федоров // Успехи биологической химии. – 2020. – Т. 60 – С. 369-410.

2. Gordon, M.H. Fats Classification / M.H. Gordon // Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition) / ed. B. Caballero. – Oxford: Academic Press, 2003. – P. 2287-2292.
3. Shadyro, O. Free-radical and biochemical reactions involving polar part of glycerophospholipids / O. Shadyro, S. Samovich, I. Edimecheva // Free Radic Biol Med. – 2019. – Vol. 144 – P. 6-15.
4. Dupré-Crochet, S. ROS production in phagocytes: why, when, and where? / S. Dupré-Crochet, M. Erard, O. Nüße // J. Leukoc. Biol. – 2013. – Vol. 94(4). – P. 657–670.
5. Böyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Böyum // Scand. J. Immunol. – 1976. – Vol. 5. – P. 9–15.
6. Kato, F. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents / F. Kato, M. Tanaka, K. Nakamura // Toxicol. in Vitro. – 1999. – Vol. 13. – P. 923–929.
7. Shugar, D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme / D. Shugar // Biochim. Biophys. Acta. – 1952. – Vol. 8. – P. 302–309.
8. Sivandzade, F. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe [Electronic resource] / F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo // Bio Protoc. – 2019. – Vol. 9 (1). – Mode of access: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6343665/pdf/nihms-1005181.pdf>. – Date of access: 21.05.2021.
9. Lacy, P. Mechanisms of degranulation in neutrophils / P. Lacy // Allergy Asthma Clin Immunol. – 2006. – Vol. 2, № 3. – P. 98-108.
10. Murphy, M.P. How mitochondria produce reactive oxygen species / M.P. Murphy // Biochem J. – 2009. – Vol. 417, № 1. – P. 1-13.
11. Mitochondrial membrane potential / L.D. Zorova [et al.] // Anal Biochem. – 2018. – Vol. 552 – P. 50-59.