

4. Hereditary and acquired diseases of acyl-coenzyme A metabolism / G.A. Mitchell [et al.] // Mol. Genet. Metab. – 2008. – Vol. 94. – P. 4–15.
5. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger / F. Pietroccola [et al.] // Cel. Metab. – 2015. – Vol. 21. – P. 805–821.

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В ЭРИТРОЦИТАХ ЧЕЛОВЕКА ПРИ СОЧЕТАННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ АМИЛОИДНЫХ СТРУКТУР И ИОНОВ СВИНЦА

**Скоробогатова А.С., Зубрицкая Г.П., Лукьяненко Л.М.,
Слобожанина Е.И.**

*ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»,
Минск, Беларусь*

Как известно, ряд веществ различной структуры, в том числе и металлы, могут вызывать генерацию активных форм кислорода (АФК) в клетках, в том числе и в эритроцитах. При этом в организме человека постоянно функционирует система антиоксидантной защиты, которая компенсирует активность процессов радикалообразования и поддерживает изначально низкий уровень АФК. При патологических состояниях или действии на клетки различных агентов (металлы, избыток кислорода и др.) возникает дисбаланс между активностью ферментов антиоксидантной защиты и генерацией АФК, что может привести к развитию окислительного стресса. На эритроцитах крыс было показано, что *in vitro* воздействие А β -амилоида приводит к снижению активности ферментов антиоксидантной системы [1]. С другой стороны, известно, что ионы свинца могут индуцировать образование АФК в эритроцитах путем взаимодействия с оксигемоглобином и последующим перекисным окислением мембран; свинец способен изменять активность ферментов антиоксидантной защиты, а также концентрацию в клетках низкомолекулярных антиоксидантов [2].

С целью выявления эффектов сочетанного воздействия амилоидных структур и ионов токсичных металлов на эритроциты в данной работе изучено образование АФК в суспензии эритроцитов человека при воздействии на них зрелых фибрилл лизоцима в сочетании с ацетатом свинца в концентрации 7,5 мкМ. Для моделирования развития окислительного стресса в эритроцитах была использована третбутилгидроперекись (ТВН).

Материалы и методы. В работе использована кровь здоровых доноров в гепарине, полученная из ГУ «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий».

Амилоидные структуры были получены по методу [3] из растворенного в 10 мМ НСl (рН 2,0) лизоцима куриного яйца (Fluka) и выдержанного при 65 °С в течение 7 суток при постоянном перемешивании. Для определения уровня внутриклеточного образования АФК нами был использован флуоресцентный зонд 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетат (СМ-Н₂DCFDA) [4]. Флуоресцентные измерения проведены на спектрофлуориметре СМ2203 («СОЛАР»)

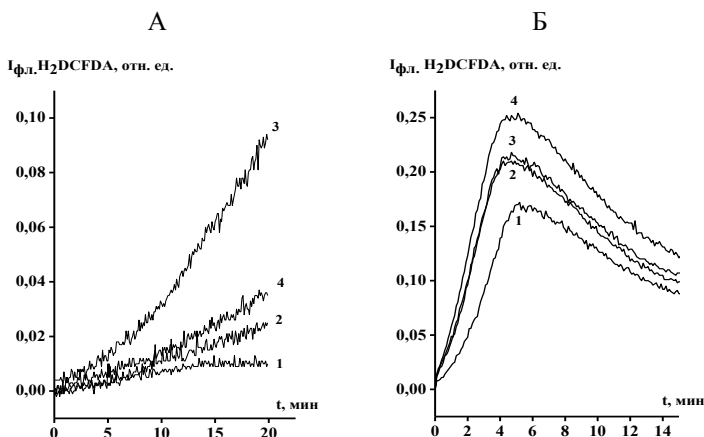


Рисунок 1 – Кинетика интенсивности флуоресценции СМ-Н₂DCFDA в эритроцитах в зависимости от воздействия на клетки различных факторов: А: 1 – эритроциты в PBS-буфере (контроль) и при добавлении в среду инкубации: 2 – амилоидных фибрилл на основе лизоцима; 3 – 7,5 мкМ Рb(СН₃СОО)₂; 4 – амилоидных фибриллы на основе лизоцима + 7,5 мкМ Рb(СН₃СОО)₂; Б: 1 – эритроциты в PBS-буфере (контроль) и при добавлении в среду инкубации: 2 – амилоидных фибрилл на основе лизоцима + 1 мМ ТВН; 3 – 7,5 мкМ Рb(СН₃СОО)₂ + 1 мМ; 4 – амилоидных фибрилл на основе лизоцима + 7,5 мкМ Рb(СН₃СОО)₂ + 1 мМ ТВН.

Результаты. Известно, что СМ-Н₂DCFDA не флуоресцирует в неизменном виде. Этот зонд свободно проникает через клеточную мембрану

и остается во внутриклеточном пространстве, где окисляется эстеразами до флуоресцентной формы (DCF).

Нами установлено, что воздействие амилоидных структур из лизоцима на эритроциты *in vitro*, а также их сочетание с ионами свинца не оказывает существенного влияния на параметры флуоресценции DCF в эритроцитах человека по сравнению с контрольными клетками (рисунок 1 А, кривые 2 и 4). При выдерживании эритроцитов в среде, содержащей только ионы свинца (7,5 мкМ), в течение 20 мин наблюдали значительное увеличение интенсивности флуоресценции используемого зонда по сравнению с контрольными клетками, а также с клетками, подверженными воздействию амилоидов и сочетанному воздействию амилоидов и ионов свинца.

Из рисунка 1 Б видно, что добавление 1 мМ ТВН приводит к возрастанию интенсивности флуоресценции DCF в контрольных клетках, что демонстрирует нарастание окислительных процессов в эритроцитах (кривая 1). После стимуляции клеток 1 мМ ТВН показано сокращение времени выхода на максимум кинетических кривых интенсивности флуоресценции DCF при воздействии на клетки амилоидных фибрилл и ацетата свинца. Особенно ярко это было выражено на суспензии эритроцитов, подвергшихся воздействию 7,5 мкМ ацетата свинца (рисунок 1 Б, кривая 4).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в эритроцитах человека, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл из лизоцима, а также сочетанному воздействию ионов свинца и амилоидов, значительных изменений уровня свободнорадикальных соединений по сравнению с контролем не происходит. Обнаружено, что воздействие на эритроциты человека *in vitro* 7,5 мкМ ацетата свинца стимулирует образование АФК. При этом совместное воздействие ионов свинца и амилоидных структур на эритроциты, подвергшиеся окислительному стрессу (инкубация с трет-бутилгидроперекисью), повышает уровень свободнорадикальных процессов в клетках.

Литература

1. Impact of amyloid β_{25-35} on membrane stability, energy metabolism, and antioxidant enzymes in erythrocytes / L.A. Tikhonova [et al.] // American journal of Alzheimer's disease and other dementias. – 2014. – Vol. 29, № 8. – P. 685-695.
2. Биоэлементный статус населения Беларуси: экологические, физиологические и патологические аспекты / Под редакцией Н.А. Гресь, А.В. Скального. – Минск, 2011. – 350 с.

3. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross – linking / B. Huang [et al.] // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – P. 5794-5800.
4. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry / A. Wojtala [et al.] // Methods in enzymology. – 2014. – P. 243-245.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КОМПЛЕКСА ЛАКТОФЕРРИНА И ОЛЕИНОВОЙ КИСЛОТЫ С ЦЕРУЛОПЛАЗМИНОМ

**Соколов А.В.¹, Власенко А.Ю.¹, Костевич В.А.¹, Луценко В.Е.²,
Старикова Э.А.¹, Васильев В.Б.¹**

¹ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
Санкт-Петербург, Россия

²Белорусский государственный университет, Минск, Беларусь

Ранее нами было показано, что катионный трансферрин экзокринных секретов и гранул нейтрофилов, лактоферрин (ЛФ), формирует специфический комплекс с медь-содержащим белком плазмы крови, церулоплазмином (ЦП), *in vivo* и *in vitro* [1]. Для многих белков молока, например альфа-лактальбумина, показано формирование комплексов с олеиновой кислотой (HAMLET) с выраженной активностью против раковых клеток [2]. Недавно цитотоксический комплекс с олеиновой кислотой был описан и для ЛФ из молока коров [3]. Целью нашей работы было сравнение возможности и специфичности образования *in vitro* и *in vivo* многокомпонентных комплексов, включающих ЛФ (человека и коровы), ЦП и олеиновую кислоту, а также функциональные последствия такого взаимодействия.

В течение 1-5 часов после внутрибрюшинной инъекции крысам ЛФ человека либо ЛФ коровы (100 мг/кг) мы обнаружили увеличение концентрации неэстерифицированных жирных кислот в 1,5-4,2 раза, а также образование гетерологичных комплексов ЦП крыс с ЛФ по данным Вестерн-блоттинга и специфической окраски активности ЦП *o*-дианизидином. В комплексе ЦП-ЛФ, выделенном из сыворотки крыс, была обнаружена олеиновая кислота, что подтверждает наше предположение о возможности образования комплекса между ними *in vivo*.