РЕГУЛЯЦИЯ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ ПАЛЬМИТОКСИАЦЕТОНОМ

Вергун О.Д., Лавор В.Д., Новицкий И.А., Семенкова Г.Н., Амаэгбери Н.В., Шадыро О.И.

Белорусский государственный университет, г. Минск
oliaria@mail.ru
науч. рук. – Амаэгбери Н.В., канд. биол. наук

В работе изучено влияние пальмитоксиацетона на функции клеток крови. Установлено, что этот кетон регулирует продукцию H2O2 нейтрофилами и мононуклеарами, в зависимости от концентрации способен вызывать деполяризацию митохондриальной мембраны клеток, является индуктором агрегации тромбоцитов и нейтрофилов.

Ключевые слова: агрегация; генерация H2O2; мононуклеары; нейтрофилы; пальмитоксиацетон; тромбоциты.

Пальмитоксиацетон (ПА) – жирный кетон, образующийся в организме в результате свободнорадикальной фрагментации лизофосфолипидов. Биологическая роль этого кетона не изучена. Ферментативные системы, приводящие к накоплению этого соединения не известны. Лизофосфолипиды образуются в результате катализируемого фосфолипазами A_2 гидролиза глицерофосфолипидов, локализованных в биологических мембранах и в липопротеинах.

Ранее на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий показано, что взаимодействие лизофосфатидилхолина с активными формами кислорода и хлора (АФК) сопровождается фрагментацией липидной молекулы с образованием ПА [1]. Основным источником АФК в организме являются нейтрофилы и моноциты. Эти клетки мигрируют в очаг воспаления, и уничтожают патогены, генерируя АФКХ [2]. Продукция АФКХ фагоцитами может приводить к фрагментации лизолипидов клеточных мембран с образованием ПА. Этот кетон может проявлять биологическую активность в отношении клеток, в первую очередь клеток крови, и модифицировать их свойства.

Цель работы: изучить механизмы влияния ПА на функции клеток крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы: декстран, гистопак-1077, иодида пропидиум (PI), 2′,7′-дихлородигидрофлуоресцеин диацетат (H_2DCF-DA), JC-1 (5,5′,6,6′-тетрахлоро-1,1′,3,3′-тетраэтил-бензамидозолокарбоцианин йодид), *Micrococcus lysodeikticus* («Sigma», США), компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного

солевого раствора Эрла (СБСРЭ) («Анализ Х, Беларусь»). ПА синтезирован на кафедре радиационной химии и химико-фармацевтических технологий.

Методы: нейтрофилы, мононуклеары и тромбоциты выделяли из крови здоровых людей по стандартной методике [3]. Выживаемость клеток оценивали флуоресцентным методом с использованием йодида пропидиума ($\lambda_{возб}$ = 530 нм, $\lambda_{рег}$ = 640 нм) [4]. Генерацию H_2O_2 нейтрофилами и мононукелеарами изучали с помощью флуоресцентного зонда H_2DCF-DA (λ_{ex} = 488 нм, λ_{em} = 530 нм) [5]. Секреторную дегрануляцию определяли по выходу лизоцима из клеток [6]. Активность лизоцима в супернатанте определяли по скорости лизиса клеточных стенок бактерий *Micrococcus lysodeikticus* спектрофотометрическим методом (λ=450 нм). Изменение митохондриального потенциала клеток ($\Delta\Psi_м$) оценивали с помощью флуоресцентного зонда JC-1 (λ_{ex}=490 нм, λ_{em}=530 нм, 590 нм) [7]. Агрегацию тромбоцитов измеряли оптическим методом по изменению светопропускания клеточной суспензии [8]. Агрегацию клеток индуцировали арахидоновой кислотой в случае нейтрофилов и АДФ либо тромбином в случае тромбоцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведена оценка токсичности ПА в отношении нейтрофилов и мононуклеаров. Установлено, что инкубирование клеток с исследуемым кетоном в течение 30 мин и 4 ч в широком диапазоне концентраций (0,1-100 мкмоль/л) не оказывает влияния на их выживаемость. Таким образом, ПА не вызывает гибель клеток по механизму некроза.

Изучено влияние ПА на способность лейкоцитов продуцировать H_2O_2 (рис.1). Основным источником АФК в нейтрофилах и моноцитах является 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 супероксид-дисмутазой, с образованием пероксида водорода. На рисунке 1 А представлены результаты влияния ПА в диапазоне концентраций 0,1-100 мкмоль/л на продукцию H_2O_2 нейтрофилами, стимулированными к фагоцитозу хемотаксическим пептидом fMLP. Видно, что предварительное инкубирование клеток с ПА в концентрации 0,1 мкмоль/л не влияет на продукцию H_2O_2 нейтрофилами. При увеличении концентрации этого кетона до 1 и 10 мкмоль/л наблюдается повышение генерации H_2O_2 на 28 и 31 % по сравнению с контрольным образцом. Инкубирование клеток с ПА в концентрации 100 мкмоль/л приводит к снижению продукции H_2O_2 на 29%.

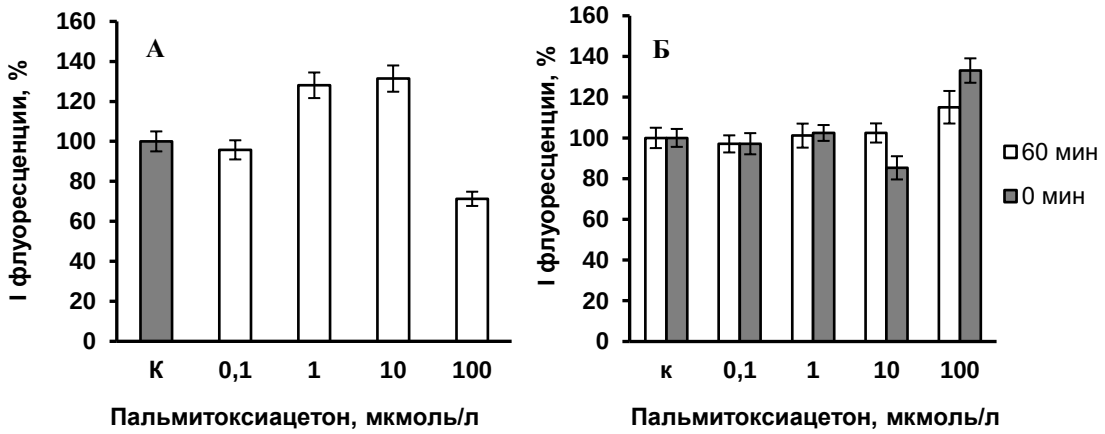

Рис.1 – Влияние пальмитоксиацетона на продукцию H_2O_2 нейтрофилами (А) и мононуклекарами (Б)

В случае мононуклеаров (рис.1 Б), генерацию H_2O_2 оценивали сразу после добавления ПА (0 мин) и после инкубирования с добавками в течение 1 ч (60 мин). Видно, что ПА в концентрации 0,1 мкмоль/л не влияет на генерацию H_2O_2 мононуклеарми. В отсутствие инкубирования добавление 10 мкмоль/л этого кетона приводит к снижению (на 15 %), 100 мкмоль/л – к увеличению продукции H_2O_2 клетками. Инкубирование мононуклеаров с ПА в концентрации 100 мкмоль/л в течение 60 мин приводит к росту продукции H_2O_2 клетками на 15 %.

Важным свойством нейтрофилов является секреторная дегрануляция – высвобождение во внеклеточное пространство гранул, содержащих антимикробные белки, в том числе миелопероксидазу. Установлено, что ПА в широком диапазоне концентраций не усиливает этот процесс.

Важным источником АФК в клетке являются митохондрии. Рост генерации АФК митохондриями может привести к окислительному повреждению митохондриальных белков и ДНК. Для того, чтобы определить влияние ПА на состояние митохондрий нейтрофилов и мононуклеаров нами была оценена величина митохондриального мембранного потенциала в этих клетках (рис. 2). Видно, что добавление ПА в концентрации 0,1 и 1 мкмоль/л к суспензии нейтрофилов не влияет, а в концентрациях 10 и 100 мкмоль/л приводит к снижению $\Delta\Psi_м$ на 14 и 23 % соответственно. В случае мононуклеаров снижение величины $\Delta\Psi_м$ происходит при добавлении ПА в изучаемом диапазоне концентраций.

Нами изучено влияние ПА на агрегацию нейтрофилов и тромбоцитов. Установлено, что ПА в концентрации 10 мкмоль/л усиливает агрегацию тромбоцитов в ОТП при инкубировании с добавками в течение 10 и 20 мин. При добавлении ПА к тромбоцитам, выделенным из плазмы, агрегация клеток не изменяется.

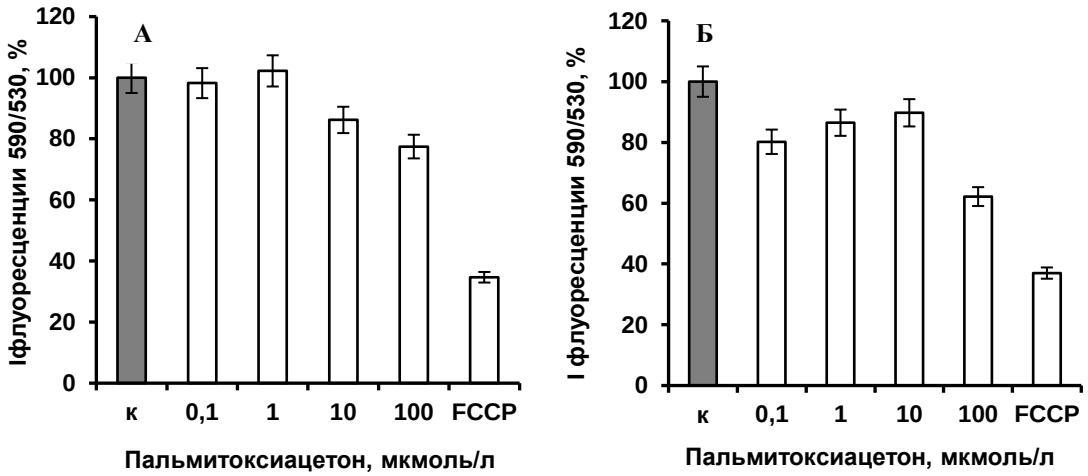

Рис. 2 – Влияние пальмитоксиацетона на величину митохондриального мембранного потенциала в нейтрофилах (А) и мононуклеаров (Б)

Инкубирование нейтрофилов с ПА в течение 10 мин приводит к усилению агрегации клеток, индуцированной арахидоновой кислотой.

Можно заключить, что ПА, в зависимости от концентрации, является регулятором функциональной активности клеток крови.

Библиографические ссылки

1. *Shadyro O., Samovich S., Edimecheva I.* Free-radical and biochemical reactions involving polar part of glycerophospholipids // Free Rad. Biol. Med. 2019. Vol. 144. P. 6–15
2. *Kolaczkowska E., Kubes P.* Neutrophil recruitment and function in health and inflammation // Nat. Rev. Immunol. 2013. Vol. 13(3). P. 159–175.
3. *Böyum A.* Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages // Scand. J. Immunol. 1976. Vol. 5. P. 9–15.
4. *Kato F., Tanaka M., Nakamura K.* Rapid fluorometric assay for cell viabilityand cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents // Toxicol. in Vitro. 1999. Vol. 13. P. 923–929.
5. *Grisham M.B.* Methods to detect hydrogen peroxide in living cells: Possibilities and pitfalls // Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2013. Vol. 165(4). P. 429–438.
6. *Shugar D.* The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme // Biochim. Biophys. Acta. 1952. Vol. 8. P. 302–309
7. *Sivandzade F., Bhalerao A., Cucullo L.* Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe [Electronic resource] // Bio Protoc. 2019. Vol. 9 (1).
8. *Козловский, В.И.* Методы исследования и клиническое значение агрегации тромбоцитов. Фокус на спонтанную агрегацию // Вестник ВГМУ. 2013. Том 12, №4. С. 79–91.