

ВЛИЯНИЕ АМИЛОИДНЫХ ФИБРИЛЛ ИЗ ЛИЗОЦИМА НА СОСТОЯНИЕ ЛИПИДНОГО БИСЛОЯ ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА *IN VITRO*

Венская Е.И., Лукьяненко Л.М., Скоробогатова А.С.

ГНУ «Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси»

ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь; e-mail: e.i.rusina@mail.ru

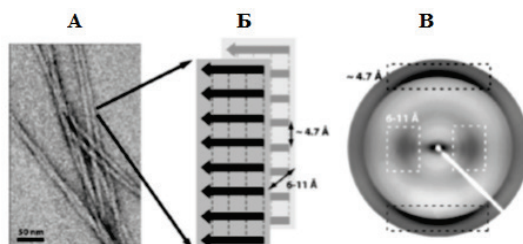
Поступила в редакцию: 10.07.20

Аннотация. В данной работе изучено влияние амилоидных фибрилл из лизоцима на физико-химическое состояние липидного бислоя мембран лимфоцитов человека в условиях окислительного стресса. Для моделирования окислительного стресса в клетках использовали трет-бутилгидроперекись (t-BHP) в конечной концентрации 1 мМ. Об изменении физико-химического состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов человека судили по параметрам флуоресценции липофильных зондов (ТМА-ДФГ, лаурдан и пирен) встраиваемых в липидный бислой мембран клеток на различной глубине. Генерацию АФК определяли с помощью флуоресцентного зонда CM-H₂DCFDA. О процессах перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах клеток судили по концентрации малонового диальдегида (МДА). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что образованные на основе лизоцима амилоидные фибриллы вызывают модификацию липидного бислоя мембран лимфоцитов человека, проявляющуюся в изменении параметров флуоресценции липофильных зондов, встроенных в мембрану клеток, и процесса ПОЛ в ней. С другой стороны, амилоидные фибриллы при краткосрочном воздействии на лимфоциты не приводят к генерации АФК в них, но способны усиливать окислительный стресс, вызванный t-BHP. Таким образом, окислительный стресс, вызванный воздействием t-BHP, усиливается в присутствии амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима.

Ключевые слова: амилоидные фибриллы, лизоцим, лимфоциты, микровязкость липидного бислоя, окислительный стресс.

Амилоидные фибриллы – это нерастворимые белковые молекулы, образующиеся в организме из нормальных белков при нарушении процессов фолдинга. Накопление амилоидов в различных органах связывают с определенными патологиями, такими как болезнь Альцгеймера и Паркинсона, сосудистая деменция, эпилепсия, синдром Дауна, прионовые болезни, сахарный диабет 2 типа и системные амилоидозы [1, 2]. Амилоиды представляют собой белковые образования диаметром 6-12 нм, состоящие из β -структур неопределенной длины. С помощью электронной микроскопии было показано, что они имеют вид неразветвленных нитей (рисунок 1, А), в которых повторяющиеся поперечные β -сшивки обеспечивают характерный рисунок при двумерной рентгеновской дифракции (рисунок 1Б, 1В).

Универсальной характеристикой всех амилоидных белков является формирование поперечных β -структур. Однако стоит отметить, что амилоидные структуры *in vivo* организованы сложнее, так как состоят не из одного, а из нескольких белковых полимерных тяжей, которые называются протофиламентами, связанными между собой водородными связями [4]. Помимо уникальной структуры, амилоидные фибриллы характеризуются также рядом уникальных физических свойств. Среди них наиболее важные – это способность связывать аффинный к β -слоям краситель конго-красный [5], устойчивость к ионным детергентам [6], а также способность связывать флуоресцентные красители тиофлавин Т и тиофлавин S [7]. На сегодняшний день уже не вызывает сомнений участие амилоидных структур в развитии некоторых патологий. Известно, что некоторые из амилоидов обладают инфекционными свойствами. Образованные при нарушении процесса фолдинга из различных белков амилоиды способны накапливаться в организме, приводя к нарушениям в органах и тканях, но до сих пор остается открытым вопрос о механизмах развития патологических процессов при действии амилоидных фибрилл. С одной стороны – показана цитотоксичность определенных амилоидных белков, а с другой – не раскрыты механизмы их



А – Трансмиссионная электронная микроскопия, Б – Схематическое изображение поперечных β -сшивок в фибрилле; пунктиром обозначены водородные связи, В – типичная дифракционная картина фибрилл

Рисунок 1. Структура амилоидных фибрилл [3]

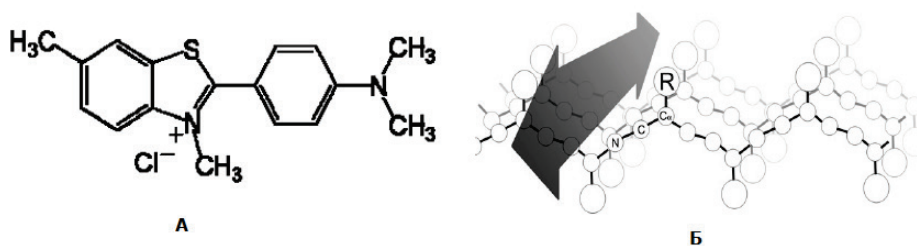


Рисунок 2. Химическая структура тиофлавина Т (А) и модель связывания с амилоидными структурами (Б) [9]

влияния на клетки. Считается, что одним из звеньев патологических процессов при нейродегенеративных заболеваниях является окислительный стресс. Цель данной работы – изучить влияние амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима, на состояние липидного бислоя мембран лимфоцитов человека в условиях окислительного стресса, вызванного t-BHP. В данной работе эксперименты были выполнены на лимфоцитах человека, так как они являются основными клетками иммунной системы, чутко реагируют на внешние агенты, уничтожают чужеродные и пораженные клетки собственного организма.

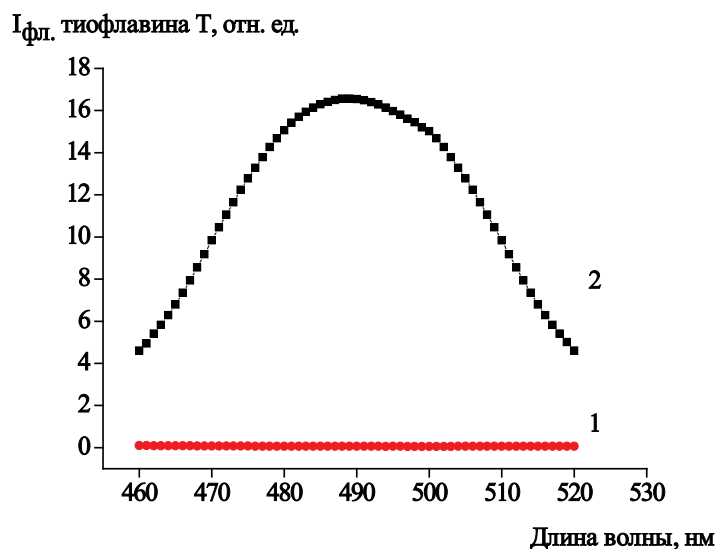
Лимфоциты выделяли в градиенте плотности гистобака при 1500 об/мин из периферической донорской крови, полученной в РНПЦ «Трансфузиологии и медицинских биотехнологий» МЗ РБ. Количество клеток и их жизнеспособность оценивали с помощью трипанового синего в камере Горяева в световом микроскопе. Клетки разводили в PBS-буфере до концентрации 1 млн/мл. Амилоидные фибриллы получали из лизоцима куриного яйца в растворе соляной кислоты при 62°C и непрерывном перемешивании. Процесс образования фибрилл контролировали спектрофлуориметрическим методом, используя краситель тиофлавин Т. Уровень АФК регистрировали флуоресцентным методом с помощью зонда 5-(6)-хлорметил-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата (CM-H₂DCFDA). Изменение физико-химического состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов человека изучали с помощью липофильных флуоресцентных зондов N,N,N-триметил-4-(6-фенил-1,3,5-гексатриен-1-ил) фениламмония p-толуолсульфоната (ТМА-ДФГ), 6-додеканоил-N,N-диметил-2-нафтиламина (лаурдана) и пирена. О процессах ПОЛ в мембранах клеток судили по концентрации МДА. Измерение параметров зондовой флуоресценции проводили на люминесцентном спектрофотометре CM2203 ("СОЛАР", Беларусь), концентрацию МДА определяли на спектрофлуориметре Specord M-40 (Германия).

Флуоресцентный зонд тиофлавин Т широко используются в качестве маркера образования амилоидных β-слоев, так как он позволяет определить формирование поперечных шнуров β-слоя в процессе сборки амилоидных фибрилл [8]. Молекула красителя состоит из бензтиазольного и аминобензольного колец, свободно вращающихся вокруг общей С–С связи. Причиной возрастания интенсивности флуоресценции тиофлавина Т при его связывании с амилоидными фибриллами является жесткость окружения, препятствующая повороту бензтиазольного и аминобензольного колец молекулы друг относительно друга в возбужденном состоянии [9]. Химическая структура тиофлавина Т (А) и модель его связывания с амилоидными фибриллами (Б) представлены на рисунке 2.

При взаимодействии тиофлавина Т с амилоидными фибриллами происходит увеличение интенсивности флуоресценции красителя. В таблице 1 представлены результаты измерения интенсивности флуоресценции тиофлавина Т в процессе инкубации раствора лизоцима в 10 mM HCl в концентрации 20 мг/мл при комнатной температуре (контроль) и раствором лизоцима при 62° С и постоянном перемешивании для получения амилоидных фибрилл. Как видно из таблицы 1, интенсивность флуоресценции зонда увеличивалась в течение первых 5 дней инкубации с выходом на плато к шестым суткам, что позволяло сделать вывод об образовании

Таблица 1. Зависимость интенсивности флуоресценции тиофлавина Т от времени инкубации лизоцима, характеризующая образование амилоидных фибрилл

Время инкубации, часы	I _{фл.} тиофлавина Т, отн. ед.	
	Контроль (раствор лизоцима в соляной кислоте при комнатной температуре)	Опыт (раствор лизоцима в соляной кислоте при 62°C и непрерывном перемешивании)
0	0,064 ± 0,0031	0,058 ± 0,0018
24	0,072 ± 0,0038	1,839 ± 0,13
48	0,075 ± 0,0041	1,755 ± 0,11
72	0,112 ± 0,0056	6,515 ± 0,37
96	0,108 ± 0,0061	10,230 ± 0,59
120	0,095 ± 0,0048	15,031 ± 0,88
144	0,090 ± 0,0057	15,827 ± 1,007



1 – контроль (нативный лизоцим)

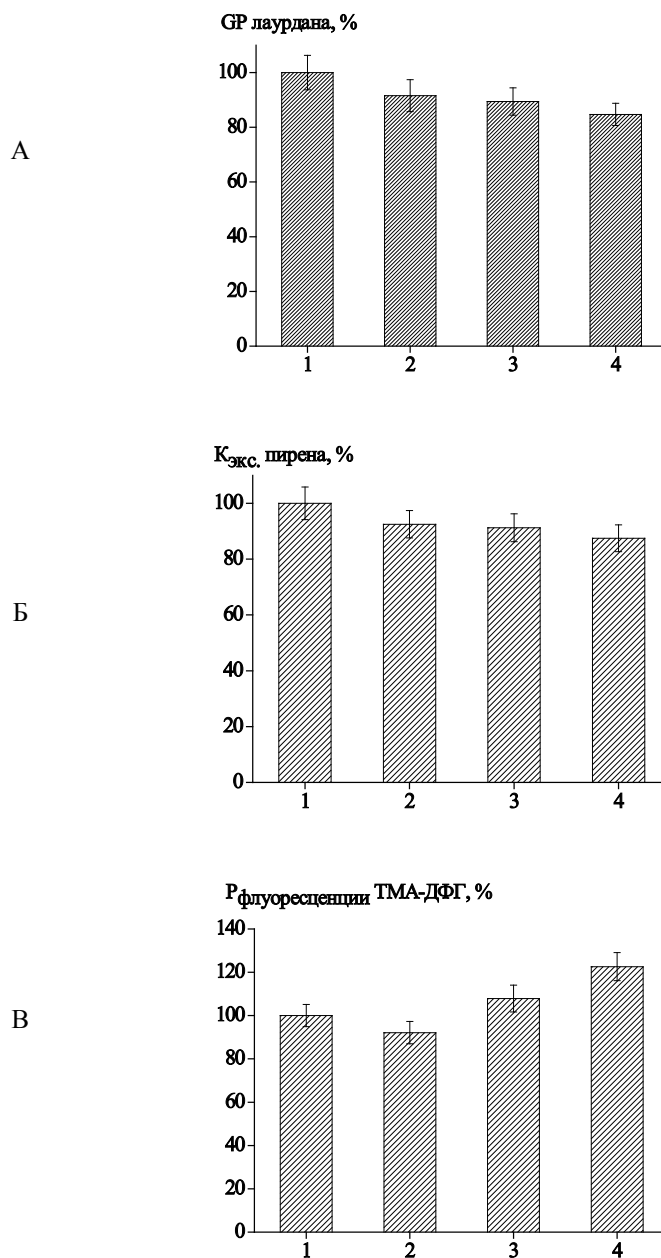
Рисунок 3. Спектр флуоресценции тιοфлавина Т, связанного с полученными из лизоцима амилоидными фибриллами (2) ($\lambda_{\text{возб.}} = 435 \text{ нм}$)

зрелых амилоидных фибрилл. Интенсивность флуоресценции зонда в контрольном образце не изменялась (табл. 1). На рисунке 3 представлен типичный спектр флуоресценции тιοфлавина Т в растворе амилоидных фибрилл из лизоцима (2) по сравнению с нативным лизоцимом (1).

Полученные в течение 5-6 суток инкубации зрелые амилоидные структуры из лизоцима были использованы для проведения экспериментов.

В многочисленных исследованиях показано, что амилоидные фибриллы в организме человека в первую очередь взаимодействуют с клеточными мембранами. В результате такого взаимодействия изменяются структура и свойства мембран, и запускается каскад событий, приводящих к гибели клеток, однако механизм ее не изучен. Изменение структуры мембран под действием амилоидных фибрилл включает несколько процессов, таких как образование каналов или пор, повышение проницаемости, активация рецепторов, окисление мембранных липидов и белков. [10]. Известно, что отложения β -амилоидного белка нарушают целостность плазматических мембран [11]. Важным показателем состояния клеток является микровязкость их липидного бислоя. Группой итальянских ученых с помощью флуоресцентных зондов ТМА-ДФГ и ДФГ было показано, что у пациентов на ранних стадиях болезни Альцгеймера изменяется микровязкость липидных рафтов в различных областях головного мозга, при этом, изменения зависят от тяжести заболевания и области головного мозга [12]. Для того, чтобы оценить влияние амилоидных фибрилл на микровязкость липидного бислоя мембран лимфоцитов мы изучали показатели флуоресценции липофильных зондов, встроенных в мембраны лимфоцитов, после предварительной их инкубации в течение 60 мин при 37°C в PBS-буфере, содержащем амилоидные фибриллы и/или t-BHP. Лаурдан позволяет оценить упорядоченность фосфолипидов мембраны, так как он взаимодействует с фосфолипидами на границе гидрофильно-гидрофобной области липидного бислоя и чувствителен к наличию и подвижности растворенных диполей [13]. Было обнаружено, что инкубация лимфоцитов человека в течение 60 минут в среде, содержащей амилоидные фибриллы из лизоцима (концентрация белка 5 мкг/мл), а также t-BHP (1 мМ) приводит к снижению генерализованной поляризации лаурдана. Наиболее выражено данный эффект наблюдался в клетках, проинкубированных с амилоидными фибриллами совместно с t-BHP, и достигал в среднем 14% по сравнению с контрольными значениями (рис. 4, А). Для оценки состояния липидного бислоя мембран лимфоцитов также используется метод, основанный на образовании эксимеров пирена. В наших экспериментах коэффициент эксимеризации пирена, встроенного в мембраны лимфоцитов, снижался при воздействии на них амилоидных фибрилл и t-BHP на 12,5% (рис. 4, Б). С помощью флуоресцентного зонда ТМА-ДФГ мы оценивали изменение микровязкости наружной области липидного бислоя мембран лимфоцитов, подвергшихся воздействию амилоидных фибрилл и t-BHP. Показано, что в присутствии амилоидных фибрилл поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны лимфоцитов, незначительно снижалась, при воздействии t-BHP – повышалась на 8%, а при сочетанном воздействии амилоидных фибрилл и t-BHP данный показатель повышался в среднем на 23% по сравнению с контрольными клетками (рис. 4, В).

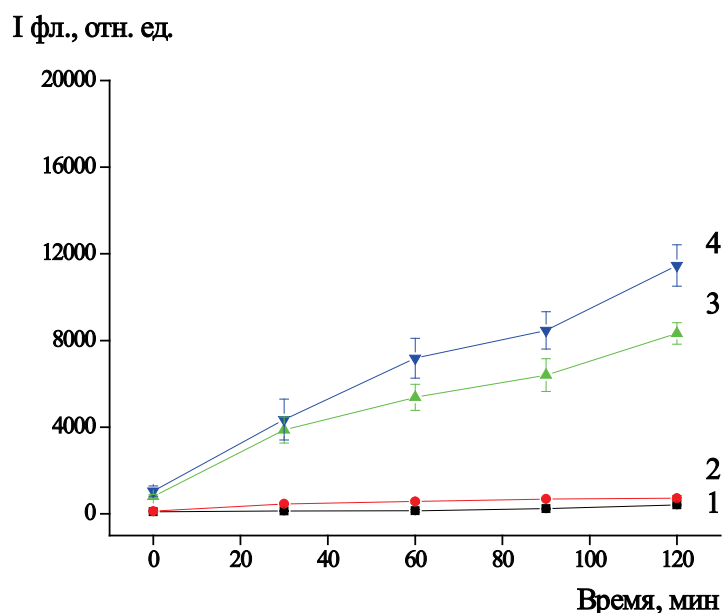
Одним из возможных механизмов токсического воздействия амилоидов на клетки считают развитие окислительного стресса. Для того, чтобы изучить влияние амилоидных фибрилл на процесс генерации АФК в лимфоцитах человека, мы использовали флуоресцентный зонд CM-H₂DCFDA. Известно, что данный зонд проникает в клетки и там гидролизуется до неактивной формы DCFH, которая окисляется в присутствии внутриклеточных АФК и флуоресцирует. Измеряя кинетику флуоресценции данного зонда, можно изучать



- 1 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4 (контроль);
 2 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима;
 3 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем 1 мМ t-BHP;
 4 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы и t-BHP

Рисунок 4. А – генерализованная поляризация флуоресценции лаурдана, встроенного в мембраны лимфоцитов человека после воздействия на них амилоидных фибрилл и t-BHP; Б – коэффициент эксимеризации пирена, встроенного в мембраны лимфоцитов человека после воздействия на них амилоидных фибрилл и t-BHP; В – поляризация флуоресценции ТМА-ДФГ, встроенного в мембраны лимфоцитов человека после воздействия на них амилоидных фибрилл и t-BHP

общий уровень окислительных процессов в живой клетке [14]. При исследовании влияния амилоидных фибрилл, полученных из лизоцима, на процесс генерации АФК в лимфоцитах человека нами было обнаружено, что после 120 мин инкубации клеток в PBS-буфере, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима (5 мкг/мл) интенсивность флуоресценции окисленной формы зонда не увеличивалась по сравнению с контрольными значениями клеток, проинкубированными при тех же условиях без белковых примесей. При воздействии на клетки t-BHP наблюдалось увеличение генерации АФК, однако максимальное увеличение флуоресценции зонда обнаружено в образцах, проинкубированных с амилоидными фибриллами и t-BHP на 33-38% (рис. 5).



- 1 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4 (контроль);
 2 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы из лизоцима;
 3 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем 1 мМ t-BHP;
 4 – суспензия лимфоцитов предварительно выдержана в PBS-буфере, pH 7,4, содержащем амилоидные фибриллы и t-BHP

Рисунок 5. Интенсивность флуоресценции окисленной формы CM-H₂DCFDA в лимфоцитах при воздействии на них амилоидных фибрилл и t-BHP в зависимости от времени инкубации

Аналогичный эффект наблюдался при исследовании процесса ПОЛ в мембранах лимфоцитов: после инкубации клеток 60 мин при 37°C при сочетанном воздействии амилоидных фибрилл и t-BHP наблюдалось увеличение уровня МДА в среднем на 35% по сравнению с контрольными клетками. Таким образом, амилоидные фибриллы способны усиливать окислительный стресс, вызванный t-BHP.

Полученные нами данные позволяют сделать вывод, что при воздействии на лимфоциты человека амилоидных фибрилл из лизоцима *in vitro* не происходит образования АФК в клетках, но в присутствии амилоидов усиливается окислительный стресс, вызванный t-BHP. В дальнейшем, на фоне окислительного стресса происходит изменение физико-химического состояния липидного бислоя мембран клеток. Наблюдается изменение микровязкости липидного бислоя, происходит увеличение степени упорядоченности фосфолипидных цепей и ускорение процесса ПОЛ. Полученные результаты позволяют предположить, что в механизмах токсического действия амилоидных фибрилл на клетки задействованы процессы генерации активных форм кислорода, инициированные ксенобиотиками.

Список литературы / References:

1. Chiti F., Dobson C.M. Protein Misfolding, Amyloid Formation, and Human Disease: A Summary of Progress Over the Last Decade. *Annu. Rev. Biochem.*, 2017, vol. 86, no. 35, pp. 1-35.42
2. Мальцев А.В., Галзитская О.В. Образование и участие нано-амилоидов в патогенезе болезни Альцгеймера и других амилоидогенных заболеваний. *Биомедицинская химия*, 2010, т. 56, вып. 6, с. 624-638. [Mal'cev A.V., Galzitskaya O.V. Obrazovanie i uchastie nano-amiloidov v patogeneze bolezni Al'cgejmerna i drugih amiloidogennyh zabolevanij. *Biomedicinskaya himiya*, 2010, vol. 56, iss. 6, pp. 624-638. (In Russ.)]
3. Tycko R., Wickner R.B. Amyloid structure: conformational diversity and consequences. *Acc. Chem. Res.*, 2013, vol. 46, pp. 1487-1496.
4. Fitzpatrick A.W., et al. Atomic structure and hierarchical assembly of a cross- β amyloid fibril. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, vol. 110, pp. 5468-5473.
5. Steensma D.P. "Congo" red. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2001, vol. 125, pp. 250-252.
6. Alberti S., et al. A systematic survey identifies prions and illuminates sequence features of prionogenic proteins. *Cell*, 2009, vol. 137, pp. 146-158.
7. Нижников А.А., Антонец К.С., Инге-Вечтомов С.Г. Амилоиды: от патогенеза к функции. *Биохимия*, 2015, т. 80, вып. 9, с. 1356-1375. [Nizhnikov A.A., Antonec K.S., Inge-Vechtomo S.G. Amiloidy: ot patogeneza k funkcii. *Biokhimiya*, 2015, vol. 80, iss. 9, pp. 1356-1375. (In Russ.)]

8. LeVine H. 3rd Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease beta-amyloid peptides: detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci.*, 1993, vol. 2, no. 3, pp. 404-410.
9. Krebs M.R., Bromley E.N., Donald A.M. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J. Struct Biol.*, 2005, no. 149 (1), p. 30-7.
10. Huang B., He J., Ren J., Yan X.Y., Zeng C.M. Cellular membrane disruption by amyloid fibrils involved intermolecular disulfide cross-linking. *Biochemistry*, 2009, vol. 48 (25), pp. 5794-800. DOI: 10.1021/bi900219.
11. Kubánková M., López-Duarte I. Kiryushko D., Kuimova M.K. Molecular rotors report on changes in live cell plasma membrane microviscosity upon interaction with beta-amyloid aggregates. *Soft Matter*, 2018, vol. 14 (46), pp. 9466-9474. DOI: 10.1039/c8sm01633j.
12. Díaz M., Fabelo N., Martín V., Ferrer I., Gómez T., Marín R. Biophysical alterations in lipid rafts from human cerebral cortex associate with increased BACE1/A β PP interaction in early stages of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.*, 2015, vol. 43 (4), pp. 1185-98. DOI: 10.3233/JAD-141146.PMID: 25147112.
13. Harris F.M., Best K.B., Bell J.D. Use of laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochim Biophys Acta.*, 2002, vol. 1565 (1), pp. 123-128.
14. Wojtala A., Bonora M., Malinska D., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M.R. Methods to Monitor ROS Production by Fluorescence Microscopy and Fluorometry. *Methods in enzymology*, 2014, vol. 542, pp. 243-262. DOI: 10.1016/B978-0-12-416618-9.00013-3.

THE EFFECT OF AMYLOID FIBRILS FROM LYSOZYME ON THE LIPID BILAYER OF HUMAN LYMPHOCYTES UNDER THE CONDITIONS OF OXIDATIVE STRESS *IN VITRO*

Venskaia E., Lukyanenko L., Skarabhatava A.

Institute of Biophysics and Cell Engineering of NAS of Belarus

Academicheskaya str., 27, Minsk, 220072, Republic of Belarus; e-mail: e.i.rusina@mail.ru

Abstract. The aim of this work is the investigation of the effect of amyloid fibrils on the physical and chemical state of the lipid bilayer of human lymphocytes membrane under the conditions of oxidative stress. Also, the process of reactive oxygen species (ROS) in human lymphocytes after amyloid fibril influence was studied. Tert-butyl hydroperoxide (t-TBH) in the final concentration 1 mM was used for oxidative stress modeling. Changes of lipid bilayer were studied using lipophilic fluorescent probes (TMA-DPH, laurdan, pyrene) which incorporated into the membrane lipid bilayer at different depths. ROS generation was measured with the help of the fluorescent probe CM-H₂DCFDA. Process of lipid peroxidation (LP) in the cell membrane judged by the concentration of the malondialdehyde (MDA). Obtained results indicate that lysozyme based amyloid fibrils lead to the lipid bilayer modification which manifested as changes of fluorescent parameters of lipophilic probes incorporated into the cells membrane and process of LP. At the same time, short term exposure of amyloid fibrils does not stimulate ROS generation in the lymphocytes but intensify oxidative stress generated by t-TBH. Consequently, amyloid fibrils from lysozyme increase oxidative stress generated by t-TBH.

Key words: amyloid fibrils, lysozyme, lymphocytes, microviscosity of lipid bilayer, oxidative stress.