

БИООРГАНИЧЕСКАЯ, БИОФИЗИЧЕСКАЯ И МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ

BIOORGANIC, BIOPHYSICAL AND MEDICINAL CHEMISTRY

ЛИПИДНЫЙ СПЕКТР ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГОВ ПОСЛЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ИЗЛУЧЕНИЕМ ГАЗОРАЗРЯДНОЙ ПЛАЗМЫ

Архипова Е.В., Иванова И.П.

Нижегородская государственная медицинская академия
пл. Минина и Пожарского, 10/1, г. Нижний Новгород, 603005, РФ
e-mail: arhipova@nnovgorod.ru

Аннотация. Изучено влияние излучения плазмы искрового разряда на липидный состав перитонеальных макрофагов крыс в эксперименте *in vitro*. Установлены изменения в липидном спектре при разных режимах воздействия. При воздействии длительностью 60 секунд происходит увеличение фракции эфиров холестерина. Воздействие в течение 300 и 600 секунд приводят к снижению отдельных фракций фосфолипидов и возрастанию доли эфиров холестерина. При режиме воздействия длительностью 1200 секунд наблюдаются наиболее значимые изменения липидного спектра макрофагов. Происходит уменьшение доли легкоокисляемых фосфолипидов, снижение количества холестерина и увеличение фракции эфиров холестерина. Увеличивается соотношение холестерина к суммарному количеству фосфолипидов, что свидетельствует о перестройке компонентов клеточных мембран и изменению ее свойств, таких как вязкость и проницаемость.

Ключевые слова: излучение газоразрядной плазмы, перитонеальные макрофаги, фосфолипиды, холестерин, тонкослойная хроматография.

LIPID SPECTRUM OF PERITONEAL MACROPHAGES AFTER EXPOSURE OF THE GAS-DISCHARGE PLASMA RADIATION

Arkhipova E. V., Ivanova I. P.

Nizhny Novgorod State Medical Academy
Minin and Pozharsky Sq., 10/1, Nizhny Novgorod, 603005, Russia
e-mail: arhipova@nnovgorod.ru

Abstract. The objective of this study was investigation of the gas-discharge plasma radiation on the lipid composition of the peritoneal macrophages of rats in the experiment *in vitro*. It was shown changes in the lipid spectrum after different treatment. The fraction of cholesterol esters is increased after 60 seconds treatment. Exposure for 300 and 600 seconds resulted in decrease of individual fractions of phospholipids and increase the percentage of cholesterol esters. The most significant changes in lipid spectrum of macrophages are observed after 1200 seconds treatment. The fractions of easily oxidized phospholipids and cholesterol are decreased; fraction of cholesterol esters is increased. Moreover, the ratio of cholesterol to the total of phospholipids is increased, that indicating restructuring of cellular membrane components and change its properties such as fluidity and permeability.

Key words: gas-discharge plasma radiation, peritoneal macrophages, phospholipids, cholesterol, thin-layer chromatography.

В настоящее время ведется активный поиск физических факторов способных участвовать в процессах биорегуляции. Одним из таких факторов является излучение плазмы искрового разряда, которое образует активные частицы, определяющие его биологические эффекты [1]. В предыдущих работах было установлено, что излучение плазмы искрового разряда способно влиять на модификацию макромолекул [2].

Полноценное функционирование клеток зависит от состояния структурных единиц клеточных мембран, их взаимодействия и расположения. Основным образующим компонентом клеточных мембран являются липиды. Соотношение и содержания различных липидных фракций зависят биофизические свойства мембран, возможности рецепторного аппарата и целостность клеток [3, 4].

Макрофаги – звено иммунной системы организма, которые участвуют в выполнении множества функций. Внутриклеточные процессы макрофагов охватывают практически весь спектр метаболических реакций и отражают гомеостатическое состояние организма [5]. Таким образом, исследование влияния плазмы искрового разряда на структурное состояние мембран перитонеальных макрофагов представляет особый интерес.

Материалы и методы. Эксперименты проведены *in vitro*. Объектом исследования являлись перитонеальные макрофаги белых беспородных крыс. Животные содержались в стандартных условиях вивария. Излучение низкотемпературной плазмы искрового разряда генерировалось с помощью экспериментального устройства ПИЛИМИН серии ИР-10 (разработано в НИИ ядерной физики им. Д.В. Скобельцына МГУ им.

М.В. Ломоносова (Россия) в 2011 г.) с заданными параметрами: длительность импульса – 100 мкс, длительность переднего фронта – 50 нс, напряжение источника питания – 11 кВ, емкость импульсного конденсатора – 3,3 нФ, энергия импульса – $5,9 \cdot 10^{-2}$ Дж, частота – 10 Гц, балластное сопротивление – 10 МОм. Суспензию перитонеальных макрофагов обрабатывали в течение 30, 60, 300, 600 и 1200 секунд. Контролем служили клетки, не подвергавшиеся воздействию. Рабочая концентрация клеток $4 \cdot 10^6$.

Анализ липидного состава проводили методом тонкослойной хроматографии при последовательном применении двух систем растворителей. Экстракцию липидов проводили по методу Folch [6]. Пробы наносили микрошприцом на предварительно активированные пластины (15x10 см) марки Sorbfil (Краснодар, Россия). Разделение липидов проводили в двух системах растворителей. Для полярных липидов применяли систему хлороформ : метанол : вода : гептан – 65 : 25 : 4 : 9; хроматографию останавливали при подъеме фронта растворителя на 10 см от нижнего края пластины. После высыхания пластины помещали во вторую систему гептан : диэтиловый эфир : уксусная кислота – 95 : 4 : 1, для разделения нейтральных липидов [7, 8]. Для визуализации зон липидов пластины обрабатывали 10 % раствором фосфорно-молибденовой кислоты в этаноле с последующим инкубированием при 120 °С в течение 10 мин. Пример хроматограммы представлен на рисунке 1. Анализ и количественную обработку полученных хроматограмм проводили с использованием программы GelAnalyzer 2010a. Сумму липидных фракций принимали за 100% и выражали процентное содержание каждого класса липидов. Дополнительно рассчитывали соотношение фракции холестерина к суммарному количеству фосфолипидов (ХС\ФЛ).

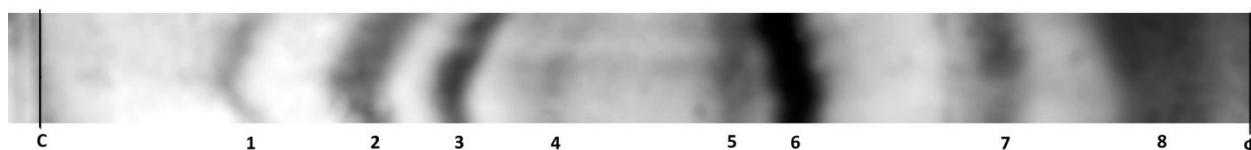


Рисунок 1 – Липидный спектр, полученный с применением двух систем растворителей.

С – старт, Ф – фронт растворителя, 1 – лизофосфатидилхолин (ЛЗФХ), 2 – сфингомиелин (СМ), 3 – фосфатидилхолин (ФХ), 4 – фосфатидилэтаноламин (ФЭ), 5 – свободные жирные кислоты (СЖК), 6 – холестерин (ХС), 7 – триглицериды (ТГ), 8 – эфиры холестерина (ЭФХС)

Таблица 1 – Содержание липидов различных фракций (%) в перитонеальных макрофагах после воздействия плазмой искрового разряда

Время воздействия	Без воздействия	30 сек	60 сек	300 сек	600 сек	1200 сек
ЛЗФХ	2,05±0,48	1,96±0,33	1,61±0,35	1,29±0,41* (p = 0,018)	1,75±0,46	0,81±0,47* (p = 0,008)
СМ	7,39±0,66	8,37±1,60	7,37±3,01	6,44±1,30	7,21±1,38	6,12±1,14
ФХ	3,65±0,96	4,09±1,22	3,76±0,98	1,94±0,62* (p = 0,012)	2,19±0,71* (p = 0,020)	1,94±0,59* (p = 0,014)
ФЭ	2,06±0,77	1,63±0,53	1,69±0,44	1,27±0,56	1,42±0,49	1,05±0,24* (p = 0,013)
СЖК	13,74±3,53	13,33±1,93	11,29±1,12	11,22±2,23	13,62±3,81	13,17±3,73
ХС	26,79±2,14	25,55±3,09	25,00±2,85	23,46±3,88	24,65±3,53	22,84±1,95* (p = 0,036)
ТГ	5,32±1,50	4,83±0,86	4,76±1,48	5,51±1,54	5,65±1,34	4,68±0,91
ЭФХС	35,66±7,49	43,16±4,93	44,13±2,65* (p = 0,032)	49,01±4,61* (p = 0,007)	45,87±5,50* (p = 0,038)	47,82±8,14* (p = 0,027)
ХС\ФЛ	1,84±0,26	1,49±0,42	1,99±0,97	2,25±0,54	2,19±0,31	2,58±0,46* (p = 0,025)

* – различия статистически значимы по сравнению с группой без воздействия

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Excel и Statistica 10.0 согласно рекомендациям по проведению медико-биологической статистики [9]. Результаты представлялись в виде $M \pm G$, где M – среднее арифметическое; G – среднеквадратичное отклонение. Достоверность различий определяли по критерию Манна-Уитни. Две выборки считались принадлежащими к разным генеральным совокупностям при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Анализ липидного состава перитонеальных макрофагов при воздействии плазмы искрового разряда в течение 30 секунд не выявил значимых изменений по сравнению с контрольной группой. Обработка суспензии клеток в течение 60 секунд приводила к статистически значимому увеличению фракции ЭФХС на 23,7 %. ХС играет важнейшую роль в организации клеточных мембран, а ЭФХС являются

основной формой запаса ХС в клетке. При воздействии длительностью 300 секунд наблюдается увеличение фракции ЭфХс на 37,4 %, а также снижение фракции ЛЗФХ и ФХ на 37% и 46,8 % соответственно. Установлено, что режим воздействия в течение 600 секунд способствует увеличению фракции ЭфХС на 28,6 % и снижению уровня ФХ на 40 %. Известно, что увеличение в клетках суммарного холестерина (ХС+ЭфХС) является защитной реакцией клетки, обеспечивающей стабильность клеточным структурам и предохраняющей от продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ). Об активации процессов ПОЛ свидетельствует и снижение доли фосфолипидов за счет легкоокисляемых фракций [9, 10].

Наибольший эффект в изменение липидного спектра по сравнению с контрольной группой оказывает режим воздействия длительностью 1200 секунд. Происходит возрастание фракции ЭфХС на 34 % и снижение количества ХС на 14,7 %. Наблюдается изменение количественного содержания групп фосфолипидов, уровень ЛЗФХ и ФХ снижается на 60,4 % и 46,8 % соответственно, также установлено снижение количества ФЭ на 49 %. Изменения липидного спектра при данном режиме воздействия свидетельствуют об интенсификации процессов ПОЛ и включением защитных реакций в клетке. Кроме того, при воздействии в течение 1200 секунд статистически значимо изменяется соотношение ХС/ФЛ, возрастание составляет 40,2 %, что указывает на перераспределение соотношения основных структурных компонентов мембран. Подобные изменения характеризуются повышением жесткости клеточных мембран и снижением их проницаемости [11].

Таким образом, излучение плазмы искрового разряда оказывает влияние на липидный состав перитонеальных макрофагов при выбранных режимах воздействия. Наблюдаются изменения липидного спектра макрофагов характерные для активации процессов ПОЛ. Параллельно этому срабатывают защитные реакции клетки, направленные на защиту структурных компонентов от деградации, о чем свидетельствует изменение соотношения фракции фосфолипидов и суммарного холестерина.

Список литературы / References:

1. Пискарев И.М., Иванова И.П., Трофимова С.В., Аристова Н.А. Образование активных частиц при искровом электрическом разряде и их возможное использование. *Химия высоких энергий*, 2012, № 5, с. 406-411. [Piskaryov I.M., Ivanova I.P., Trofimova S.V., Aristova N.A. Formation of active particles in spark discharge and their possible application. *Khimiya vysokikh energiy*, 2012, no. 5, pp. 406-411. (In Russ.)]
2. Трофимова С.В., Бурхина О.Е., Пискарев И.М., Ичеткина А.А., Соловьева Т.И., Астафьева К.Е., Пугина Е.С., Иванова И.П. Влияние излучения газоразрядной плазмы на модификацию белков эритроцитов. *Соврем. технол. мед.*, 2014, № 3, с. 14-21. [Trofimova S.V., Burkhina O.E., Piskaryov I.M., Ichetkina A.A., Solovyova T.I., Astafieva K.A., Pugina E.S., Ivanova I.P. The effect of gas-discharge plasma radiation on erythrocyte protein modification. *Sovrem Tehnol Med.*, 2014, no. 3, pp. 14-21. (In Russ.)]
3. Булыгин Г.В., Кишиневский М.В., Большакова Т.Ю., Шкиль Л.М. Липидный спектр лимфоцитов крови больных ревматоидным артритом. *Сибирский медицинский журнал*, 2001, № 5, с. 28-32. [Buligin G.V., Kishinevskij M.V., Bolshakova T.U., Shilj L.M. Lipid spectrum of lymphocytes in blood of the patients with rheumatoid arthrititis. *Sibirskiy Medicinskiy Zhurnal*, 2001, no. 5, pp. 28-32. (In Russ.)]
4. Köberlin M.S., Heinz L.X., Superti-Furga G. Functional crosstalk between membrane lipids and TLR biology. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2016, vol. 39, pp. 28-36.
5. Пинегин Б.В., Краснова М.И. Макрофаги: свойства и функции. *Иммунология*. 2009, № 4, с. 241-249. [Pinegin B.V., Krasnova M.I. Macrophages: characteristics and functions. *Immunologiya*, 2009, no. 4, pp. 241-249. (In Russ.)]
6. Folch P.J., Lees M., Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biol Chem.*, 1957, vol. 226, pp. 497-509.
7. Творогова М.Г., Исаева Е.Л., Проказова Н.В., Рожкова Т.А., Кухарчук В.В., Титов В.Н. Определение липидного состава липопротеидов высокой плотности методом тонкослойной хроматографии на силикагеле. *Клин. лаб. диагност.*, 1998, № 4, с. 13-16. [Tvorogova M.G., Isaeva E.L., Prokazova N.V., Rozhkova T.A., Kukharchuk V.V., Titov V.N. Assessment of the lipid composition of high-density lipoproteins by thin-layer chromatography in silica gel. *Klin. lab. diagnost.*, 1998, no. 4, pp. 13-16. (In Russ.)]
8. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. *Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии. Ч. 2*. М: МИР, 1980, с. 536-540. [Sharshunova M., Shvarc V., Mihalec Ch. *Thin layer chromatography in pharmacy and clinical biochemistry. Part 2*. Moscow: MIR, 1980, pp. 536-540. (In Russ.)]
9. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М: ПРАКТИКА, 1998, с. 459. [Glants S. *Biomedical statistics*. Moscow: PRAKTIKA, 1998, p. 459. (In Russ.)]
10. Bulger E.M., Maier R.V. Lipid mediators in the Pathophysiology of critical illness. *Crit. Care. Med.*, 2000, vol. 4, pp. 27-36.
11. Kamp D., Sieberg T., Flaest C.W., Inhibition and stimulation of phospholipid scrambling activity. Consequences for lipid asymmetry, echinocytosis, and microvesiculation of erythrocytes. *Biochemistry*, 2001, vol. 31, pp. 9438-9446.