

**АРАХИДОНОВАЯ КИСЛОТА УСИЛИВАЕТ МИТОФАГИЮ И
СНИЖАЕТ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ В ПЕРВИЧНЫХ
МАКРОФАГАХ**

Журавлев А. Д.¹,
Никифоров Н. Г.^{1, 2, 3},
Верхова С. С.^{1, 4},
Егоров Е. Е.³,
Багери М. Е.⁴,
Орехов А. Н.¹

¹ ФГБНУ «Научно-Исследовательский Институт Общей Патологии и Патофизиологии», Москва, Россия.

² ФГБУН Института Биологии Гена РАН, Москва, Россия.

³ ФГБУН Институт Молекулярной Биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия.

⁴ Научно-Исследовательский Институт Морфологии Человека Имени Академика А.П. Авцына ФГБНУ «Российский Научный Центр Хирургии Имени Академика Б.В. Петровского», Москва, Россия.

**ARACHIDONIC ACID ENHANCES MITOPHAGY AND DECREASES
INFLAMMATORY RESPONSE IN PRIMARY MACROPHAGES**

Zhuravlev A. D. ^a,
Nikiforov N. G. ^{a, b, c},
Verkhova S. S. ^{a, d},
Yegorov Y. E. ^c,
Bagheri M. E. ^d,
Orekhov A. N. ^a,

^a Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia

^b Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^c Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia.

^d FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russian Federation.

Резюме

Макрофаги секретируют широкий спектр провоспалительных цитокинов, которые активируют другие клетки иммунной системы и способствуют развитию воспаления. Функциональное состояние макрофагов напрямую зависит от работы митохондрий — не только как источников энергии, но и как ключевых участников сигнальных путей, связанных с продукцией активных форм кислорода и регуляцией инфламмосомы. Нарушения в митохондриальной функции могут привести к чрезмерной активации макрофагов и развитию хронического воспаления, что характерно для многих патологий, включая атеросклероз и метаболические заболевания. При повреждении или дисфункции митохондрий, различные митохондриальные компоненты, такие как кардиолипид и мтДНК, могут высвобождаться в цитоплазму клетки-хозяина, потенциально вызывая аутоиммунную реакцию. Для предотвращения этого в организме существует механизм митофагия, с помощью которого дисфункциональные митохондрии разрушаются лизосомальным путем. Известно, что некоторые полиненасыщенные жирные кислоты участвуют в воспалительном ответе иммунных клеток и модулируют функции митохондрий, включая митофагию. Арахидоновая кислота является предшественником лейкотриенов и простагландинов, а ее добавление в культуру клеток модулирует воспалительную реакцию. Однако влияние арахидоновой кислоты на митофагию ранее не изучалось. Целью исследования было оценить способность арахидоновой кислоты влиять на митофагию макрофагов человека и их провоспалительный ответ. Мы выделяли первичные моноциты из цельной крови здоровых доноров и культивировали клетки в течение 5 д. Затем к макрофагам на 1 сутки добавляли 20 мкМ арахидоновой кислоты. После этого к культуре добавляли 1 мкг/мл ЛПС на 1 день. Секрецию цитокинов TNF, IL6, IL8, CCL2 в культуральной среде оценивали методом ИФА. Параллельно мы оценивали митофагию в макрофагах, обработанных арахидоновой кислотой. Для этого была оценена колокализация митохондриального и лизосомального красителей в макрофагах с помощью конфокальной микроскопии. В результате оказалось, что арахидоновая кислота повышала уровень митофагии в макрофагах и снижала секрецию цитокинов IL6, TNF и CCL2 в ответ на стимуляцию ЛПС. Можно предположить, что активация митофагии может быть одним из механизмов противовоспалительного действия арахидоновой кислоты.

Ключевые слова: макрофаги, арахидоновая кислота, митофагия, воспаление, цитокины, митохондрии.

Abstract

Macrophages are actively involved in recognizing, capturing, and destroying pathogens, as well as removing cellular debris. The most important role of macrophages is to initiate and regulate the inflammatory response: they synthesize and secrete a wide range of proinflammatory cytokines that activate other cells of the immune system and promote the development of inflammation. The functional state of macrophages directly depends on the work of mitochondria - not only as energy sources, but also as key participants in signaling pathways associated with the production of reactive oxygen species and regulation of the inflammasome. Their functional state depends on mitochondria, which are not only energy producers but also regulators of signaling pathways, including reactive oxygen species generation and inflammasome activation. Mitochondrial dysfunction can lead to excessive macrophage activation and chronic inflammation, typical of diseases like atherosclerosis and metabolic disorders. Damaged mitochondria release components such as mtDNA and cardiolipin, potentially triggering autoimmune responses. To prevent this, cells utilize mitophagy, a selective autophagy process that removes dysfunctional mitochondria via the lysosomal pathway. Polyunsaturated fatty acids are known to influence inflammation and mitochondrial function, including mitophagy. Arachidonic acid, a precursor of prostaglandins and leukotrienes, modulates immune responses, but its role in mitophagy remains unclear. The aim of this study was to investigate whether arachidonic acid affects mitophagy and the proinflammatory response of human macrophages. Primary monocytes were isolated from whole blood of healthy donors and differentiated into macrophages over 5 days. Cells were treated with 20 μ M arachidonic acid for 24 hours, followed by 1 μ g/ml LPS stimulation for another 24 hours. Cytokine secretion (TNF, IL6, IL8, CCL2) was measured by ELISA. Mitophagy was assessed using confocal microscopy by evaluating colocalization of mitochondrial and lysosomal dyes. The results showed that arachidonic acid enhanced mitophagy and reduced secretion of TNF, IL6, and CCL2 in response to LPS. These findings suggest that activation of mitophagy may contribute to the anti-inflammatory effects of arachidonic acid in macrophages.

Keywords: macrophage, arachidonic acid, mitophagy, inflammation, cytokines, mitochondria.

1 Введение

При повреждении или дисфункции митохондрий в цитоплазму клетки-хозяина могут попадать митохондриальные компоненты (кардиолипид, мтДНК и др.), что может приводить к аутоиммунной реакции. Для того чтобы этого не происходило, существует митофагия – механизм, при котором дисфункциональные митохондрии подвергаются лизосомальной деградации [1,2].

Известно, что некоторые полиненасыщенные жирные кислоты, в том числе и арахидоновая кислота (АК), оказывают влияние на воспалительный ответ иммунных клеток [3]. Более того, некоторые из них способны оказывать влияние на митофагию [4]. Однако, влияние АК на митофагию не исследовалось.

Целью настоящей работы был ответ на вопрос, способна ли АК модулировать митофагию и воспалительный ответ макрофагов.

2 Материалы и методы

Первичные моноциты были выделены из цельной крови здоровых доноров методом адгезии. Сначала цельную кровь центрифугировали 20 мин при 800 g (без торможения). Затем отбирали 2/3 плазмы и добавляли PBS до первоначального объема, перемешивали и наслаивали на фиколл. Центрифугировали 20 мин при 800 g (без торможения). Переносили клетки интерфазного кольца в новые пробирки и дважды промывали PBS. Далее клеткам добавляли среду RPMI-1640 с L-глутамином и 10% FBS L-glutamine 10% FBS и инкубировали 2 часа в CO₂-инкубаторе при 37 °C, 5% CO₂ для прикрепления моноцитов. Далее, снимали клетки при помощи трипсин-версена, для инактивации трипсина использовали FBS. После чего клетки центрифугировали 10 мин при 300 g, добавляли в клеточному осадку X-Vivo и культивировали в концентрации 1 млн клеток/мл в течение 5 д.

После инкубации 5 д к культуре макрофагов добавляли 20 мкМ АК на 1 день. Затем клетки промывали PBS и заменяли культуральную среду. После этого к культуре добавляли 1 мкг/мл ЛПС еще на 24 часа. Полученный супернатант отбирали для анализа уровней секреции цитокинов после стимуляции LPS. Наконец, концентрацию IL6, IL8, CCL2 и TNF в образцах культуральной среды оценивали методом ИФА.

Митохондриальный краситель MitoTracker Green (100 нМ) добавляли к макрофагам спустя 5 д на 30 мин. Далее клетки промывали PBS и добавляли 20 мкМ АК на 1 д. После чего лизосомальный краситель LysoTracker Deep Red (50 нМ) добавляли в культуру на 30 минут. Наконец, получали изображения при помощи конфокального микроскопа Leica DMI8 STELLARIS 5.

Митофагию определяли как колокализацию митохондриального и лизосомального красителя с помощью программного обеспечения CellProfiler 4.2.4.

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics. Данные представлены как среднее значение

± стандартное отклонение среднего значения. Индивидуальные парные сравнения проводились с использованием t-критерия Стьюдента.

3 Результаты и обсуждение

Оказалось, что АК повышала уровень митофагии в макрофагах (Рис. 1).

Для оценки влияния АК на воспалительную реакцию в клеточной культуре добавляли 20 мкМ АК на 24 часа с последующей сменой среды и добавлением 1 мкг/мл ЛПС еще на один день. Секрецию цитокинов IL6, IL8, CCL2 и TNF в культуральной среде оценивали с помощью ИФА (Рис. 2А).

Оказалось, что АК снижала секрецию цитокинов IL6, TNF и CCL2 макрофагами в ответ на стимуляцию LPS (Рис. 2В). При этом секреция хемокина IL8 не менялась.

Известно, что АК участвует в воспалительном ответе, поскольку является предшественником для липидных модуляторов воспаления [5]. Ранее, было продемонстрировано, что АК снижала секрецию цитокинов IL6, TNF, IL-1 β линиями клеток THP-1 и RAW264.7 при стимуляции LPS [5,6]. При использовании АК в качестве пищевой добавки также наблюдались противовоспалительные эффекты [3]. В настоящем исследовании АК приводила к снижению секреции цитокинов IL6, TNF и CCL2 LPS-стимулированными макрофагами человека.

Однако, насколько нам известно, результат о том, что АК способна активировать митофагию, был получен впервые. Ранее, было продемонстрировано, что линолевая кислота, которая является метаболическим предшественником АК, упр-регулировала сигнальные пути, связанные с аутофагией, в гепатоцитах [4].

Некоторые активаторы митофагии, такие как уролитин А, аллиин, бергаптен, обладают противовоспалительными свойствами [7,8,9]. Интересно, что провоспалительная стимуляция макрофагов с помощью ЛПС снижает митофагию в клетках [10,11,12]. Вполне вероятно, что воспалительная реакция макрофагов и митофагия являются тесно связанными процессами. Можно предположить, что активация митофагии может быть одним из механизмов противовоспалительного действия АК. Однако остается неизвестным, ответственна ли митофагия, индуцированная АК, за снижение воспалительного ответа в клетках.

В заключении, мы продемонстрировали, что АК способна активировать митофагию в макрофагах, что сопровождается снижением воспалительного ответа клеток.

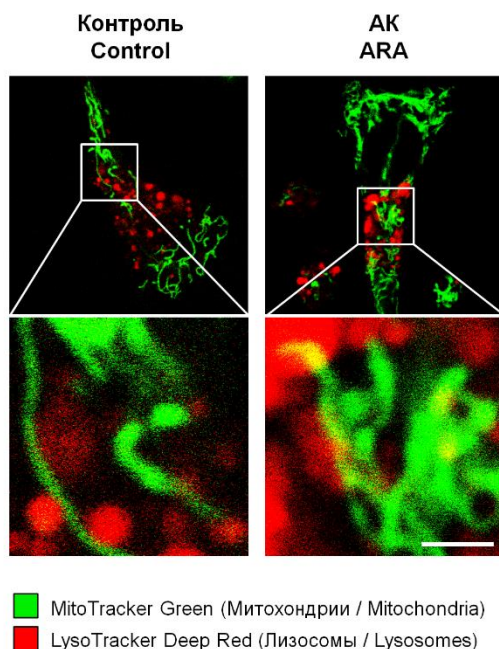
Работа выполнена при поддержке Российского Научного Фонда (Грант № 22-15-00273-П).

Мы благодарим Центр коллективного пользования ИБГ РАН за возможность использования оборудования.

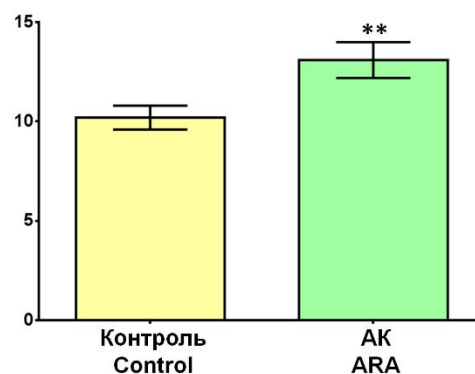
РИСУНКИ

Рисунок 1. Влияние арахидоновой кислоты (АК) на митофагию в макрофагах.
Figure 1. Effect of arachidonic acid (AA) on mitophagy in macrophages.

А. Конфокальная микроскопия митофагии в макрофагах
Confocal microscopy of mitophagy in macrophages



В. Эффективность митофагии в макрофагах
Efficiency of mitophagy in macrophages

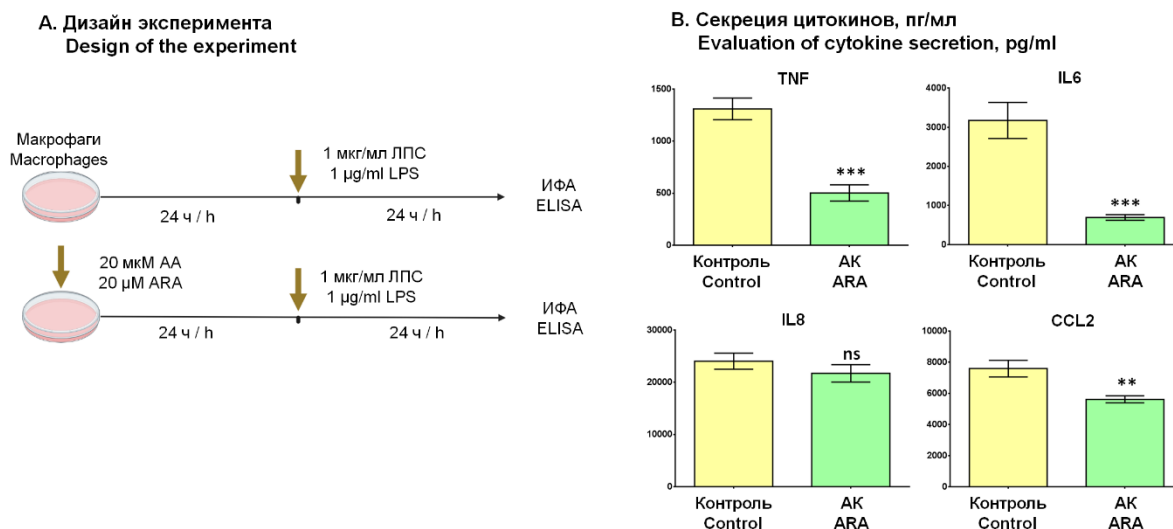


(A) Confocal images of macrophages, scale bar – 3 μm . (B) Quantification of the proportion of mitochondria localized in lysosomes. ** - $p < 0.01$ by t-test

(А) Конфокальные изображения макрофагов, масштаб – 3 мкм. (В) Количественная оценка доли митохондрий локализованных в лизосомах. ** - $p < 0,01$ по результатам t-теста

Рисунок 2. Провоспалительный ответ и способность формировать толерантность гибридными линиями.

Figure 2. Effect of arachidonic acid (AA) on the proinflammatory response of macrophages.



(А) Дизайн эксперимента. (В) Влияние АК на секрецию цитокинов IL6, CXCL8, CCL2, TNF первичными макрофагами в ответ на LPS. ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ по результатам t-теста. Ns – нет достоверной значимости

(В) (А) Experimental design. (В) Effect of AA on the secretion of cytokines IL6, IL8, CCL2, TNF by primary macrophages in response to LPS. ** – $p < 0.01$, *** – $p < 0.001$ according to the results of t-test. Ns – not significant

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Журавлев Александр Дмитриевич – младший научный сотрудник, Лаборатория Ангипатологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»;

адрес: 125315, ул. Балтийская, дом 8, Москва, Россия;

телефон: +79857917198;

факс: +7-495-601-2366;

e-mail: Zhuravel17@yandex.ru

Zhuravlev Alexander Dmitrievich – Junior Researcher Fellow, Laboratory of Angiopathology, Institute of General Pathology and Pathophysiology;

telephone: +79857917198;

fax: +7-495-601-2366;

e-mail: Zhuravel17@yandex.ru

Блок 2. Информация об авторах

Никифоров Н.Г. – к.б.н., ведущий научный ФГБНУ НИИОПП; старший научный сотрудник ФГБУН ИБГ РАН, старший инженер, ФГБУН ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН;

Nikiforov N.G. – PhD, Leading Researcher of Institute of General Pathology and Pathophysiology; Senior Researcher of Institute of Gene Biology of Russian Academy of Science; Senior Engineer of Engelhardt Institute of Molecular Biology;

Верхова С.С. – старший лаборант ФГБНУ НИИОПП; аспирант ФГБНУ РНЦХ им. академика Б.В. Петровского;

Verkhova S.S. – Senior Assistant of Institute of General Pathology and Pathophysiology; PhD student of Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery", Moscow, Russian Federation;

Егоров Е.Е. – д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН;

Yegorov Y.E. – PhD, Prof., Leading Researcher of Engelhardt Institute of Molecular Biology;

Багери М. – младший научный сотрудник, аспирант ФГБНУ РНЦХ им. академика Б.В. Петровского;

Bagheri M. – Junior Researcher, PhD Student of Avtsyn Research Institute of Human Morphology of FSBSI "Petrovsky National Research Centre of Surgery";

Орехов А.Н. – д.б.н., профессор, заведующий лабораторией ангиопатологии
ФГБНУ НИИОПП;

Orekhov A.N. – PhD, Prof., The Head of Laboratory of Angiopathology, Institute
of General Pathology and Pathophysiology.

Блок 3. Метаданные статьи

АРАХИДОНОВАЯ КИСЛОТА УСИЛИВАЕТ МИТОФАГИЮ И СНИЖАЕТ
ВОСПАЛИТЕЛЬНЫЙ ОТВЕТ В ПЕРВИЧНЫХ МАКРОФАГАХ
ARACHIDONIC ACID ENHANCES MITOPHAGY AND DECREASES
INFLAMMATORY RESPONSE IN PRIMARY MACROPHAGES

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:
ВЛИЯНИЕ АРАХИДОНОВОЙ КИСЛОТЫ
EFFECT OF ARACHIDONIC ACID

Ключевые слова: макрофаги, арахидоновая кислота, митофагия, воспаление,
цитокины, митохондрии.

Keywords: macrophage, arachidonic acid, mitophagy, inflammation, cytokines,
mitochondria.

Краткие сообщения.

Количество страниц текста – 4,

Количество таблиц – 0,

Количество рисунков – 2.

26.06.2025

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Dabravolski S.A., Nikiforov N.G., Zhuravlev A.D., Orekhov N.A., Grechko A.V., Orekhov A.N. Role of the mtDNA Mutations and Mitophagy in Inflammaging. Int. J. Mol. Sci. 2022. V. 23. P. 1323.	-	10.3390/ijms23031323
2	Orekhov A.N., Nikiforov N.G., Omelchenko A.V., Sinyov V.V., Sobenin I.A., Vinokurov A.Y., Orekhova V.A. The Role of Mitochondrial Mutations in Chronification of Inflammation: Hypothesis and Overview of Own Data. Life (Basel). 2022. V. 12. P. 1153.	-	10.3390/life12081153
3	Djuricic I., Calder P.C. Beneficial Outcomes of Omega-6 and Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Human Health: An Update for 2021. Nutrients. 2021. V. 13. P. 2421.	-	10.3390/nu13072421
4	Yang B., Zhou Y., Wu M., Li X., Mai K., Ai Q. ω -6 Polyunsaturated fatty acids (linoleic acid) activate both autophagy and antioxidation in a synergistic feedback loop via TOR-dependent and TOR-independent signaling pathways. Cell. Death. Dis. 2020. V. 11. P. 607.	-	10.1038/s41419-020-02750-0
5	Zhang Y., Chen H., Zhang W., Cai Y., Shan P., Wu D., Zhang B., Liu H., Khan Z.A., Liang G. Arachidonic acid	-	10.1016/j.bbadis.2020.165683

	inhibits inflammatory responses by binding to myeloid differentiation factor-2 (MD2) and preventing MD2/toll-like receptor 4 signaling activation. <i>Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.</i> 2020. V. 1866. P. 165683.		
6	Hung H.C., Tsai S.F., Chou H.W., Tsai M.J., Hsu P.L., Kuo Y.M. Dietary fatty acids differentially affect secretion of pro-inflammatory cytokines in human THP-1 monocytes. <i>Sci. Rep.</i> 2023. V. 13. P. 5511.	-	10.1038/s41598-023-32710-5
7	Jayatunga D.P.W., Hone E., Khaira H., Lunelli T., Singh H., Guillemin G.J., Fernando B., Garg M.L., Verdile G., Martins R.N. Therapeutic Potential of Mitophagy-Inducing Microflora Metabolite, Urolithin A for Alzheimer's Disease. <i>Nutrients.</i> 2021. V. 13. P. 3744.	-	10.3390/nu13113744
8	Liu M., Lu J., Yang S., Chen Y., Yu J., Guan S. Alliin alleviates LPS-induced pyroptosis via promoting mitophagy in THP-1 macrophages and mice. <i>Food. Chem. Toxicol.</i> 2022. V. 160. P. 112811.	-	10.1016/j.fct.2022.112811
9	Luo T., Jia X., Feng W.D., Wang J.Y., Xie F., Kong L.D., Wang X.J., Lian R., Liu X., Chu Y.J., Wang Y., Xu A.L. Bergapten inhibits NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis via promoting mitophagy. <i>Acta. Pharmacol. Sin.</i> 2023. V. 44. P. 1867-1878.	-	10.1038/s41401-023-01094-7
10	Patoli D., Mignotte F., Deckert V., Dusuel A., Dumont A., Rieu A., Jalil A., Van Dongen K., Bourgeois T., Gautier T., et al. Inhibition of mitophagy drives macrophage activation and antibacterial defense during sepsis. <i>J. Clin. Invest.</i> 2020. V. 130. P. 5858-5874.	-	10.1172/JCI130996

11	Wasner K., Smajic S., Ghelfi J., Delcambre S., Prada-Medina C.A., Knappe E., Arena G., Mulica P., Agyeah G., et al. Parkin Deficiency Impairs Mitochondrial DNA Dynamics and Propagates Inflammation. Mov. Disord. 2022. V. 37. P. 1405-1415.	-	10.1002/mds.29025
12	Nikiforov N.G., Chegodaev Y.S., Zhuravlev A.D., Vysokikh M., Marey M., Grechko A.V., Popov M.A., Bagheri Ekta M., Orekhov A.N. Inflammatory stimulation of monocyte-macrophages inhibits mitophagy. Minerva Biotechnol. Biomol. Res. 2023. V. 35 № 3. P. 145-50.		10.23736/S2724-542X.23.02954-1