

УДК 582.35:577.115.3+615.322

DOI: 10.36604/1998-5029-2022-86-91-101

## ДЕЙСТВИЕ ПРЕПАРАТОВ ГЛИЦЕРОЛИПИДОВ ИЗ ПАПОРОТНИКА И ХВОЩА НА МОНОНУКЛЕАРНЫЕ КЛЕТКИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ *EX VIVO*

Э.В.Некрасов<sup>1</sup>, Д.Е.Наумов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Амурский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанического сада-института Дальневосточного отделения Российской академии наук, 675000, г. Благовещенск, Игнатьевское шоссе, 2-й км

<sup>2</sup>Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания», 675000, г. Благовещенск, ул. Калинина, 22

**РЕЗЮМЕ. Введение.** Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека составляют пул иммунных клеток и могут служить моделью для исследования иммунных заболеваний. **Цель.** Тестирование биологической активности препаратов глицеролипидов из папоротников и хвощей, содержащих в своем составе длинноцепочечные полиненасыщенные жирные кислоты (ДЦПНЖК), в отношении МКПК без дополнительной стимуляции и после стимуляции форбол-12-мирикат-13-ацетатом (ФМА) и иономицином. **Материалы и методы.** Препараты глицеролипидов получали фракционированием общих липидов молодых вай папоротника *Matteuccia struthiopteris* и побегов хвоща *Equisetum arvense* на силикагеле. Для сравнения использовали фосфатидилхолин из яичного желтка. Состав жирных кислот препаратов анализировали методом газовой хроматографии. Мононуклеарные клетки выделяли из крови больных бронхиальной астмой. Параметры жизнеспособности и активации клеток оценивали методом проточной цитометрии. **Результаты.** Препараты глицеролипидов из папоротника и хвоща, в отличие от яичного фосфатидилхолина, проявляли цитотоксическое действие. Наибольший эффект имела фракция липидов из папоротника, элюированная метанолом, которая снижала жизнеспособность клеток на 64,6 (51,1–79,0)% в концентрации 2 мкг/мл и вызывала полную гибель клеток при 20 мкг/мл. При стимуляции клеток ФМА/иономицином цитотоксический эффект препарата усиливался, однако доля МКПК, экспрессирующих маркер CD69, не изменялась. Цитотоксическое действие других препаратов липидов наблюдали при более высоких концентрациях (20 и/или 80 мкг/мл), а эффект был слабее: жизнеспособность снижалась на 7,1 (6,7–9,4)% для липидов папоротника, элюированных смесью хлороформ – метанол – вода (3:5:2), на 39,8 (26,4–41,6)% и 12,0 (10,0–15,5)% для фракций липидов хвоща, элюированных метанолом и смесью хлороформ–метанол–вода, соответственно, при концентрации препаратов 80 мкг/мл. **Заключение.** Сравнение состава жирных кислот препаратов не подтвердило вклада ДЦПНЖК в наблюдаемые эффекты. Идентификация активного компонента позволит вести разработку лекарственного препарата при гипериммунном ответе или в модельных экспериментах.

**Ключевые слова:** мононуклеары периферической крови, липиды, папоротник, хвощ, биологическая активность.

## EFFECT OF GLYCEROLIPID PREPARATIONS FROM FERN AND HORSETAIL ON HUMAN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS UNDER *EX VIVO* CONDITIONS

E.V.Nekrasov<sup>1</sup>, D.E.Naumov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Amur Branch of Botanical Garden-Institute of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 2<sup>nd</sup> km Ignatyevskoe Rd., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

### Контактная информация

Эдуард Витальевич Некрасов, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Амурский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения Российской академии наук, 675000, Россия, г. Благовещенск, Игнатьевское шоссе, 2-й км. E-mail: ed\_nekrasov@mail.ru

### Correspondence should be addressed to

Eduard V. Nekrasov, PhD (Biol.), Senior Staff Scientist, Amur Branch of Botanical Garden-Institute of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 2 km Ignatyevskoe Rd., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation. E-mail: ed\_nekrasov@mail.ru

### Для цитирования:

Некрасов Э.В., Наумов Д.Е. Действие препаратов глицеролипидов из папоротника и хвоща на мононуклеарные клетки периферической крови человека в условиях *ex vivo* // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2022. Вып.86. С.91–101. DOI: 10.36604/1998-5029-2022-86-91-101

### For citation:

Nekrasov E.V., Naumov D.E. Effect of glycerolipid preparations from fern and horsetail on human peripheral blood mononuclear cells under *ex vivo* conditions. *Bulleten' fiziologii i patologii dyhaniâ* = *Bulletin Physiology and Pathology of Respiration* 2022; (86):91–101 (in Russian). DOI: 10.36604/1998-5029-2022-86-91-101

<sup>2</sup>Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration, 22 Kalinina Str., Blagoveshchensk, 675000, Russian Federation

**SUMMARY. Introduction.** Human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) are a pool of immune cells and they are also a convenient model system for studying immune pathologies. **Aim.** Testing for bioactivity of glycerolipid preparations from fern and horsetail species containing long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) towards PBMCs without exogenous stimulation and after phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) plus ionomycin stimulation. **Materials and methods.** Glycerolipid preparations were produced by fractionation of total lipids, isolated from young fronds of the fern *Matteuccia struthiopteris* and shoots of the horsetail *Equisetum arvense*, on silica. Egg phosphatidylcholine was used for comparison. Fatty acids were analyzed by gas chromatography. Mononuclear cells were isolated from blood of patients with asthma. Parameters of cell viability and activation were estimated by flow cytometry. **Results.** The glycerolipid preparations from the fern and horsetail were found to have a cytotoxic effect while egg phosphatidylcholine was not. The most active was the fraction of fern lipids eluted with methanol which reduced cell viability by 64.6 (51.1–79.0)% in the concentration 2 µg/ml and caused complete cell death in 20 µg/ml. After cell stimulation with PMA/ionomycin, the cytotoxic effect of the preparation increased although the level of PBMCs expressing the marker CD69 did not change. The cytotoxic effect of other glycerolipid preparations was observed in the higher concentrations (20 and/or 80 µg/ml) and it was less pronounced: the cell viability reduced by 7.1 (6.7–9.4)% for the fraction of fern lipids eluted by the mixture chloroform – methanol – water (3:5:2), by 39.8 (26.4–41.6)% and 12.0 (10.0–15.5)% for the fractions of the horsetail lipids eluted with methanol and the chloroform–methanol–water mixture, respectively, in the concentration 80 µg/ml. **Conclusion.** Comparison of fatty acid composition of the glycerolipid preparations did not confirm a contribution of LCPUFAs to the observed effects. Identification of an active component may allow development of a drug for the local application in a hyperimmune response or for model experiments.

*Key words:* peripheral blood mononuclear cells, lipids, fern, horsetail, biological activity.

Мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) человека представляют собой гетерогенный набор нескольких классов иммунных клеток, включающих Т-клетки, В-клетки, моноциты, дендритные клетки и естественные киллеры (НК-клетки). Эти клетки подвержены активации, пролиферации и дифференциации в ответ на различные стимулы и являются движущей силой иммунных ответов. В этой связи МКПК широко используются как модельная система для исследования метаболических и аутоиммунных заболеваний, в том числе бронхиальной астмы (БА) [1]. МКПК больных БА реагируют на воздействие аллергенов и других триггеров иммунного ответа, запуская каскад цитокинов, отличающийся по многим параметрам от реакции здоровых людей [2,3].

Липиды являются структурными компонентами всех клеточных мембран, а также выполняют сигнальную функцию. Так, в ходе воспалительной реакции запускается процесс перекисного окисления полиненасыщенных жирных кислот (ПНЖК), приводящий к образованию как провоспалительных, так и противовоспалительных сигнальных медиаторов-оксипинов: простагландинов, лейкотриенов, тромбоксанов, липоксанов, резолвинов и других [4, 5]. Основными предшественниками оксипинов у человека и животных являются арахидоновая (20:4n-6, АК) и эйкозапентаеновая (20:5n-3, ЭПК) жирные кислоты, продукты окисления которых обобщенно называют эйкозаноидами, а также докозагексаеновая кислота (22:6n-3, ДГК), чьи производные, соответственно, называют докозаноидами. Иммунные клетки участвуют как в синтезе определенных оксипинов в ответ на внешние стимулы [6], так и воспринимают эти соединения благодаря экспрессии на поверхности соответ-

ствующих рецепторов [7].

Папоротники характеризуются уникальным набором ПНЖК, которые, в отличие пищевых масел растительного происхождения, включают АК и ЭПК [8–10]. При этом основная часть этих жирных кислот связана с фракцией фосфолипидов [9]. У хвощей, напротив, отсутствуют АК и ЭПК, однако присутствуют так называемые Δ5-ненасыщенные полиметилен-разделенные жирные кислоты: сциадоновая (5,11,14-20:3, СЦК) и юнипероновая (5,11,14,17-20:4, ЮПК) кислоты [11], которые отличаются от АК и ЭПК отсутствием двойной связи в положении С8. Влияние экзогенных липидов на физиологическое состояние МКПК исследовали в основном с точки зрения диетологии и связанных с диетой метаболических расстройств [12–15]. Целью нашего исследования была сравнительная оценка биологической активности препаратов глицеролипидов из папоротника и хвоща как носителей ПНЖК различающегося состава. Исходной гипотезой было предположение, что липиды папоротников, несущие АК и ЭПК, будут усиливать реакцию МКПК в ответ на стимуляцию фобол-12-миристан-13-ацетатом (ФМА) и иономицином, тогда как липиды из хвощей, не содержащие этих жирных кислот, будут действовать на МКПК отличающимся образом. В работе использовали МКПК больных БА, для которых нарушения в работе эйкозаноидной системы связаны с патогенезом заболевания [5], поэтому препараты, нормализующие состояние этой системы, имеют перспективы терапевтического применения.

#### Материалы и методы исследования

Молодые растущие вайи папоротника *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. собирали с растений, растущих

в открытом грунте (Коллекция генетических ресурсов растений Амурского филиала Ботанического сада-института ДВО РАН), в мае 2017 года Побеги *Equisetum arvense* L. собирали в мае 2017 года в г. Благовещенске Амурской области. Свежесобранный растительный материал кипятили в воде 3 минуты для инактивации ферментов. Общие липиды экстрагировали смесью хлороформ – метанол как описано в работе [8]. Для получения препаратов глицеролипидов липиды фракционировали методом колоночной хроматографии на силикагеле (ДюраСил Н, 100-140 мкм, 2 г на колонку диаметром 1 см). Колонку предварительно промывали 30 мл хлороформа. Липиды (около 34 мг) наносили на колонку в виде раствора в хлороформе. Липиды элюировали растворителями в последовательности: 1) хлороформ – 30 мл; 2) хлороформ – ацетон (3:1, по объему) – 20 мл; 3) ацетон – 20 мл; 4) ацетон – метанол (9:1) – 20 мл; 5) метанол – 20 мл; 6) хлороформ – метанол – вода (3:5:2) – 20 мл. Фракции 1 и 2 объединяли вместе. Полученные фракции упаривали на ротаторном испарителе и растворяли в 1,5 мл смеси хлороформ – метанол (2:1). Состав глицеролипидов во фракциях оценивали методом тонкослойной хроматографии (пластинки 10×10 см, ПТСХ-П-В-УФ, Sorbfil, Россия, предварительно активированные при 105°C) как описано в работе [16]. Яичный фосфатидилхолин (ФХ) получали из желтка куриных яиц методом колоночной хроматографии на окиси алюминия. Жирные кислоты анализировали в виде метиловых эфиров методом газожидкостной хроматографии и газовой хроматографии – масс-спектрометрии в виде метиловых эфиров и 4,4-диметилкоксазолиновых производных как описано в работе [10].

Донорами крови были больные персистирующей БА (n=5). Все обследованные имели смешанную форму, среднюю тяжесть и неконтролируемое течение заболевания. Средний возраст пациентов составил 43,2±5,32 лет, 4 из 5 обследованных являлись лицами женского пола. Исследование проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» с поправками 2013 г. и нормативными документами «Правила надлежащей клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом №200н от 01.04.2016 МЗ РФ. Все лица подписывали информированное согласие на участие в исследовании в соответствии с протоколом, одобренным локальным Комитетом по биомедицинской этике Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания».

МКПК выделяли по стандартному протоколу [17]. Для этого, цельную венозную кровь, набранную в пробирку с антикоагулянтом ( $K_2EDTA$ ), в объеме 18 мл переносили в пробирку объемом 50 мл и добавляли равный объем фосфатно-солевого буфера, аккуратно

перемешивая. После этого разведенную кровь в полном объеме наслаивали поверх 6 мл раствора Фиколла (Биолот, Россия) с плотностью 1,077 г/мл и центрифугировали 40 мин при 400g и температуре 20°C. После центрифугирования отбирали большую часть плазмы, а затем, через оставшийся слой плазмы собирали МКПК пипеткой и переносили в новую стерильную пробирку. Выделенные клетки дважды промывали трехкратным объемом фосфатно-солевого буфера и осаждали центрифугированием при 200g 10 мин. После отмывки клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл среды RPMI-1640 и определяли концентрацию и жизнеспособность клеток на автоматическом счетчике Luna-II (Logos Biosystems, Республика Корея) согласно инструкции производителя. Концентрацию жизнеспособных клеток доводили до  $3 \times 10^6$  клеток/мл средой RPMI-1640, нагретой до 37°C. Культивирование МКПК проводили в 96-луночных планшетах с U-образным дном лунок, внося в каждую лунку  $0,2 \times 10^6$  клеток в 100 мкл среды RPMI-1640, содержащей 10% делипидированной эмбриональной бычьей сыворотки (Biowest, Франция), при 37°C в атмосфере с 5%  $CO_2$ .

Препараты глицеролипидов упаривали досуха и суспендировали в культуральной среде RPMI-1640 до концентрации 2 мг/мл. Для этого инкубировали липиды в течение 1 ч, встряхивали на вортексе, а затем нагревали до 40°C и обрабатывали в ультразвуковой ванне Elmasonic S10H (Elma Schmidbauer GmbH, Германия) в течение 5 мин.

Анализ влияния препаратов глицеролипидов на жизнеспособность и активацию МКПК проводили, используя следующие концентрации для каждого препарата: 0, 0,2, 2, 20 и 80 мкг/мл. Эффект каждой концентрации анализировали в двойных повторях. Клетки выдерживали в среде RPMI-1640, содержащей 10% делипидированной сыворотки и исследуемый препарат в одной из концентраций, в течение 24 ч, после чего в лунки, предназначенные для оценки влияния липида на активацию МКПК, вносили ФМА и иономицин в концентрациях 10 нг/мл и 1 мкг/мл, соответственно, и инкубировали еще 16 ч. Клетки переносили из лунок в полистироловые пробирки объемом 5 мл. Прикрепившиеся к пластику клетки (преимущественно моноциты) дополнительно диссоциировали буфером, содержащим 0,1% коллагеназы (Биолот, Россия), 0,01%  $Na_2EDTA$  и 0,25% бычьего сывороточного альбумина, при 37°C в течение 5 мин. Полученные образцы клеток однократно отмывали 2 мл фосфатно-солевого буфера и окрашивали для анализа на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (BD, США). Для определения жизнеспособности клеток использовали флуоресцентный интеркалирующий краситель – йодид пропидия в концентрации 2,5 мкг/мл. Экспрессию маркера пролиферации и активации лимфоцитов белка CD69 определяли путем окрашивания клеток антителами mouse anti-human CD69, конъюгированными с аллофикоцианином и соответствующими

изотипическими антителами (BD Biosciences, США) согласно рекомендациям производителя. Клетки выдерживали в присутствии йодида пропидия и антител при комнатной температуре без доступа света в течение 30 мин, после чего однократно отмывали холодным фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1% бычьего сывороточного альбумина, и ресуспендировали в 200 мкл этого же буфера. Для анализа на цитофлуориметре считывали 10000 событий. Популяцию МКПК определяли на графике прямого и бокового светорассеяния (FCS-A/SSC-A). Кластеры клеток отсекали на графике FSC-H/FCS-A, после чего среди одиночных клеток определяли процент жизнеспособных, используя канал PerCP-Cy5.5. Среди жизнеспособных клеток на графике FITC/SSC-A определяли процент клеток, экспрессирующих CD69, путем сравнения с изотипическим контролем.

Статистические расчеты выполняли в программном пакете Statistica 12.0 (StatSoft, Inc., США). Все данные представлены в формате Me (Q1; Q3) – медиана и межквартильный интервал. Оценку значимости межгрупповых различий для количественных переменных выполняли с помощью критерия U Манна-Уитни. В качестве критического уровня значимости принимали значение 0,05.

### Результаты исследования и их обсуждение

Препараты, полученные фракционированием липидов папоротника *Matteuccia struthiopteris* (ЛП) и хвоща *Equisetum arvense* (ЛХ), не отличались по составу глицеролипидов при сравнении аналогичных фракций (табл. 1). Фракции, элюированные метанолом (далее препараты ЛП-М и ЛХ-М для папоротника и хвоща, соответственно), представляли смесь глицеролипидов, которые включали фосфолипиды – фосфатидилглицерин (ФГ), фосфатидилинозит (ФИ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), следы фосфатидилсерина (ФС)), гликолипиды (дигалактозилдиацилглицерин (ДГДГ) и сульфохинозилдиацилглицерин (СХДГ)), а также бетаиновый глицеролипид – диацилглицеро-N,N,N-триметилгосерин (ДГТС). Фракции, элюированные смесью хлороформ – метанол – вода (далее препараты ЛП-ХМВ и ЛХ-ХМВ) содержали фосфатидилхолин (ФХ), меньшую часть ДГТС, следы ФЭ и ФС.

Состав жирных кислот препаратов показан в таблице 1. Содержание длинноцепочечных ПНЖК (АК, ЭПК, 20:3n-6, СЦК, ЮПК, 20:2n-6, 20:3n-3) в препаратах из папоротника было очень близким. Различия между препаратами ЛП-М и ЛП-ХМВ были в концентрациях 3t-16:1, 18:1n-9, 18:2n-6 и 18:3n-6. СЦК и ЮПК составляли очень малую часть от суммы жирных кислот. Препараты из хвоща отличались от препаратов из папоротника очень высоким содержанием 18:3n-3, и

более низким 18:1n-9, в них на порядок было выше содержание ЮПК и СЦК, полностью отсутствовали АК и ЭПК. Между собой препараты из хвоща отличались мало за исключением кислот 3t-16:1, 18:1n-9, СЦК, ЮПК, 20:3n-3, 24:1 (табл. 1).

Для сравнения в биоиспытаниях использовали яичный ФХ. Этот глицерофосфолипид имел высокие уровни 18:0 и 18:1n-9, и отличался присутствием ПНЖК с 22 углеродными атомами как семейства омега-3, так и омега-6, в том числе ДГК (22:6n-3), которые, тем не менее, были минорными жирными кислотами. В яичном ФХ отсутствовали ЮПК и характерные для растений 3t-16:1 и 16:3n-3, также было крайне низкое содержание 18:3n-3 – эссенциальной жирной кислоты, присущей растениям (табл. 1).

Медианная жизнеспособность МКПК после инкубации в течение 40 часов составляла 95,0% (94,3; 95,1, здесь и далее показаны нижний и верхний квартили). Стимуляция ФМА и иономицином в отсутствие тестируемых препаратов глицеролипидов сопровождалась некоторым снижением доли жизнеспособных клеток (до 86,8% (72,2; 87,2), табл. 2), которое, однако, не было статистически значимым ( $p=0,13$ ). Базовая активация МКПК, которую оценивали по экспрессии CD69, составляла 2,5% (1,4; 4,0, табл. 3). Низкий уровень экспрессии CD69 в отсутствие дополнительной стимуляции сообщали для эозинофилов из периферической крови больных БА [18]. Стимуляция клеток ФМА/иономицином приводила к существенному увеличению доли активированных мононуклеаров (40,3% (32,4; 47,2),  $p=0,04$ , табл. 3).

Препараты глицеролипидов существенно различались по воздействию на МКПК, которое имело цитотоксический характер. Наиболее сильный цитотоксический эффект оказывала фракция липидов из папоротника *M. struthiopteris*, элюированная метанолом (ЛП-М). Этот препарат вызывал значимое снижение жизнеспособности клеток, начиная с концентрации 2 мкг/мл, а концентрации 20 и 80 мкг/мл вызывали полную гибель клеток (табл. 2). Значение концентрации полумаксимального ингибирования ( $IC_{50}$ ) для ЛП-М составило 1,46 мкг/мл. В условиях стимуляции ФМА/иономицином концентрация, при которой происходило значимое снижение числа жизнеспособных клеток, оставалась прежней (2 мкг/мл), однако значение  $IC_{50}$  снижалось до 0,41 мкг/мл. Аналогичный препарат из хвоща *E. arvense* (ЛХ-М), также полученный элюированием метанолом, существенно снижал жизнеспособность МКПК только при концентрации 80 мкг/мл (табл. 2), тогда как при стимулировании ФМА и иономицином цитотоксическое действие было статистически значимым уже при концентрации 20 мкг/мл (табл. 2).



Таблица 1

Состав препаратов глицеролипидов, использованных в биоиспытаниях на МКПК

Препарат	<i>Matteuccia struthiopteris</i>		<i>Equisetum arvense</i>		яичный ФХ
	ЛП-М	ЛП-ХМВ	ЛХ-М	ЛХ-ХМВ	
Состав глицеролипидов	СХДГ, ФЭ, ФГ, ФИ, ДГДГ, ДГТС	ФХ, ДГТС, ФС, ФЭ	СХДГ, ФЭ, ФГ, ФИ, ДГДГ, ДГТС	ФХ, ДГТС, ФС, ФЭ	ФХ
Жирные кислоты, % от суммы					
16:0	28,8	23,2	25,6	25,2	31,2
16:1n-9	0,4	0,9	0,2	0,2	0,2
16:1n-7	0,2	0,4	0,3	0,3	1,1
3t-16:1	5,1	0,2	2,0	0,1	0
16:3n-3	0,4	0,2	0,6	0,3	0
18:0	0,8	2,2	1,1	3,5	16,6
18:1n-9	15,6	7,1	5,6	2,1	27,9
18:1n-7	0,3	0,3	1,0	1,3	1,2
18:2n-6	15,1	31,9	11,0	14,5	14,6
18:3n-6	1,9	4,1	0	0	0,1
18:3n-3	9,6	7,1	40,8	46,2	0,1
20:1n-9	0,3	0,2	0,6	0,9	0,1
20:2n-6	0,2	0,1	0,5	0,2	0,2
СЦК	0,1	0,1	1,7	0,7	0,2
20:3n-6	2,5	2,2	0	0	0,3
АК	9,3	10,4	0	0	3,3
20:3n-3	0,1	0,1	1,0	0,3	сл.
ЮПК	0,3	0,2	4,8	2,3	0
ЭПК	5,2	5,5	0	0	сл.
22:0	0,9	0,8	0,7	0,5	сл.
22:4n-6	0	0	0	0	0,2
22:5n-6	0	0	0	0	0,5
22:5n-3	0	0	0	0	0,1
22:6n-3	0	0	0	0	1,6
24:0	1,5	1,4	1,0	0,6	0
24:1	0,2	сл.	1,4	0,3	0
Другие <sup>1</sup>	1,15	1,3	0,5	0,3	0,75

Примечание. <sup>1</sup>Другие жирные кислоты включают 14:0, 15:0, 16:1n-5, 16:2n-6, 17:0, 18:1n-5, 18:4n-3, 19:0, 20:0, 20:4n-3, чье содержание не превышало 0,2% от суммы жирных кислот. Сокращения здесь и далее: АК – арахидоновая кислота (20:4n-6); ДГДГ – дигалактозилдиацилглицерин; ДГТС – диацилглицеро-N,N,N-триметилгомосерин; ЛП-М – липиды папоротника, элюированные метанолом; ЛП-ХМВ – липиды папоротника, элюированные смесью хлороформ – метанол – вода (3:5:2); ЛХ-М – липиды хвоща, элюированные метанолом; ЛХ-ХМВ – липиды хвоща, элюированные смесью хлороформ – метанол – вода (3:5:2); СЦК – сциадоновая кислота (5,11,14-20:3); СХДГ – сульфохиновозилдиацилглицерин; ФГ – фосфатидилглицерин; ФИ – фосфатидилинозит; ФС – фосфатидилсерин; ФХ – фосфатидилхолин; ФЭ – фосфатидилэтанолламин; ЭПК – эйкозапентаеновая кислота (20:5n-3); ЮПК – юнипероновая кислота (5,11,14,17-20:4).

Таблица 2

Влияние препаратов глицеролипидов на жизнеспособность МКПК (%) без стимуляции (-) и после стимуляции (+) ФМА и иономицином

Препарат	Стимуляция	Концентрация препарата, мкг/мл				
		0,0	0,2	2,0	20,0	80,0
ЛП-М	-	95,0 (94,3–95,1)	93,0 (88,8–93,2) p=0,40	33,4 (19,9–47,1) p=0,01	0,6 (0,0–1,4) p=0,01	0,0 (0,0–0,0) p=0,008
	+	86,8 (72,2–87,2)	69,2 (47,9–87,1) p=0,29	4,1 (0,2–4,7) p=0,01	0,0 (0,0–0,0) p=0,01	0,0 (0,0–0,0) p=0,008
ЛП-ХМВ	-	95,0 (94,3–95,1)	95,3 (94,3–95,5) p=0,60	95,6 (94,1–96,2) p=0,67	92,7 (92,5–94,3) p=0,29	88,0 (86,0–88,4) p=0,15
	+	86,8 (72,2–87,2)	80,2 (54,3–89,9) p=0,83	71,6 (62,1–88,1) p=0,60	66,2 (59,8–84,4) p=0,21	61,4 (45,8–62,7) p=0,008
ЛХ-М	-	95,0 (94,3–95,1)	94,2 (92,2–95,1) p=0,75	96,0 (90,8–96,5) p=0,53	88,2 (86,6–90,2) p=0,14	58,0 (55,1–69,9) p=0,008
	+	86,8 (72,2–87,2)	80,4 (87,3–85,0) p=0,68	73,6 (64,2–78,5) p=0,21	64,5 (54,2–69,6) p=0,04	50,1 (48,5–53,2) p=0,008
ЛХ-ХМВ	-	95,0 (94,3–95,1)	95,9 (93,5–96,5) p=0,53	95,9 (94,7–96,8) p=0,40	93,3 (91,0–93,6) p=0,40	83,6 (79,7–85,6) p=0,06
	+	86,8 (72,2–87,2)	69,1 (65,0–82,3) p=0,09	75,2 (74,5–78,3) p=0,99	76,2 (69,4–86,7) p=0,40	45,6 (44,1–46,6) p=0,03
ФХ	-	95,0 (94,3–95,1)	94,3 (94,1–96,1) p=0,83	95,8 (93,0–97,0) p=0,53	96,2 (94,4–96,2) p=0,53	95,5 (94,9–95,9) p=0,69
	+	86,8 (72,2–87,2)	82,4 (75,2–88,7) p=0,68	78,9 (74,8–84,2) p=0,68	84,6 (81,1–90,9) p=0,99	82,9 (80,7–91,3) p=0,99

*Примечание.* Показаны медианные значения и межквартильный интервал (в скобках); критерий уровня значимости (p) показывает различия между исходным уровнем в отсутствие препарата (0,0) и в его присутствии.

Препараты глицеролипидов, полученные из папоротника и хвоща элюированием смесью хлороформ – метанол – вода (3:5:2) (ЛП-ХМВ и ЛХ-ХМВ, соответственно), снижали жизнеспособность МКПК в слабой степени и только при высокой концентрации (80 мкг/мл) и это снижение не было значимым (p=0,15 для папоротника и p=0,06 для хвоща, табл. 2). После стимуляции клеток ФМА и иономицином статистически значимое снижение жизнеспособности также наблюдали при концентрации 80 мкг/мл (табл. 2). Яичный ФХ не оказывал существенного влияния на жизнеспособность клеток ни в одной из проанализированных концентраций, как в базовых условиях, так и при проведении стимуляции ФМА и иономицином (табл. 2).

Компонент, ответственный за цитотоксический эффект

препаратов глицеролипидов в отношении МКПК, еще предстоит идентифицировать. Препарат ЛП-М, проявляющий наибольшую токсичность, представляет собой смесь компонентов, отличающихся как по структуре полярной части, так и остаткам жирных кислот. Например, в этом препарате, в отличие от ЛП-ХМВ, присутствует СХДГ. Известно, что СХДГ индуцирует апоптоз и некроз клеток рака желудка человека [20], СХДГ различного происхождения, в том числе из папоротника, ингибирует ДНК-полимеразы  $\alpha$  и  $\beta$  [21, 22]. С другой стороны, СХДГ присутствует в аналогичном препарате из хвоща (ЛХ-М), однако цитотоксичность этого препарата существенно ниже. Можно предположить, что причина в разном эффекте препаратов из папоротника и хвоща заключается в составе жирных

кислот, как следует из таблицы 1. Между тем, препараты из одного источника (папоротника или хвоща) близки по составу жирных кислот, в том числе длинноцепочечных ПНЖК (АК, ЭПК, 20:3n-6), чье присутствие у папоротников и отсутствие у хвощей было положено в основу гипотезы, проверяемой в этом исследовании. Существенные различия в цитотоксичности препаратов ЛП-М и ЛП-ХМВ из папоротника не подтверждают цитотоксического эффекта этих длинноцепочечных ПНЖК. С другой стороны, обращает на себя внимание наличие в препаратах ЛП-М и ЛХ-М транс-3-гексадеценовой кислоты (3t-16:1) в заметных

количествах (табл. 1), которой больше в препарате ЛП-М с более токсичным эффектом. Дифференциальное действие различных жирных кислот на экспрессию провоспалительных и противовоспалительных генов МКПК человека было показано ранее [12, 15]. Более того, действие жирных кислот зависело от статуса (нормальный или избыточный вес) доноров МКПК [12], а вариации состава жирных кислот, входящих в состав фосфолипидов МКПК, коррелировали с некоторыми различиями иммунных функций этих клеток [19].

Таблица 3

**Влияние препаратов глицеролипидов на активацию МКПК (доля клеток, экспрессирующих CD69, %) без стимуляции (-) и после стимуляции (+) ФМА и иономицином**

Препарат	Стимуляция	Концентрация препарата, мкг/мл				
		0,0	0,2	2,0	20,0	80,0
ЛП-М	-	2,5 (1,4–4,0)	1,1 (0,9–1,7) p=0,30	1,5 (0,8–1,5) p=0,30	0,0 (0,0–0,0) p=0,13	0,0 (0,0–0,0) p=0,008
	+	40,3 (32,4–47,2)	37,8 (37,3–53,3) p=0,83	50,0 (47,5–56,0) p=0,30	0,0 (0,0–0,0) p=0,01	0,0 (0,0–0,0) p=0,008
ЛП-ХМВ	-	2,5 (1,4–4,0)	1,6 (1,5–1,7) p=0,60	0,8 (0,6–1,3) p=0,06	0,5 (0,3–0,7) p=0,02	0,8 (0,3–0,8) p=0,02
	+	40,3 (32,4–47,2)	36,5 (34,9–50,4) p=0,99	46,1 (27,8–52,8) p=0,99	35,2 (33,3–44,7) p=0,99	31,2 (29,7–35,6) p=0,54
ЛХ-М	-	2,5 (1,4–4,0)	1,3 (0,8–1,8) p=0,21	0,8 (0,7–1,3) p=0,06	0,3 (0,3–0,6) p=0,01	0,3 (0,3–0,5) p=0,008
	+	40,3 (32,4–47,2)	30,3 (29,5–44,6) p=0,53	33,1 (29,7–37,2) p=0,40	33,8 (28,9–40,2) p=0,68	21,6 (12,2–24,0) p=0,22
ЛХ-ХМВ	-	2,5 (1,4–4,0)	1,5 (0,5–1,7) p=0,21	0,6 (0,4–1,4) p=0,14	0,4 (0,2–0,9) p=0,06	0,2 (0,1–0,3) p=0,008
	+	40,3 (32,4–47,2)	38,6 (34,6–51,6) p=0,99	40,0 (33,0–44,2) p=0,99	36,9 (33,2–46,1) p=0,99	48,2 (37,0–52,0) p=0,54
ФХ	-	2,5 (1,4–4,0)	2,3 (0,6–3,3) p=0,40	2,2 (0,9–3,5) p=0,53	1,3 (0,5–1,4) p=0,25	1,5 (0,3–1,7) p=0,22
	+	40,3 (32,4–47,2)	44,3 (42,8–64,6) p=0,40	51,5 (45,8–59,1) p=0,25	50,0 (48,1–67,6) p=0,30	37,7 (32,9–48,6) p=0,99

Другими факторами, определяющими цитотоксичность тестируемых препаратов глицеролипидов, могут быть окисленные остатки жирных кислот и физико-химические характеристики липосом, формирующихся в экспериментальных условиях. Так, окисленные формы липидов могут быть губительными для клеток [23], а

по некоторым данным на цитотоксичность может влиять не только состав фосфолипидов, но также размер и тип липосом [24]. И если в текущем эксперименте контроль окисленности липидов не проводили, то эффект физического состояния липосом является маловероятным, поскольку препараты различались по

цитотоксичности при одних и тех же концентрациях, а яичный ФХ не проявлял токсичности при таком же диапазоне концентраций от 0,2 до 80 мкг/мл (табл. 2). Обнаруженная в исследовании [24] токсичность липосом, содержащих ФГ и ФС, в отношении культивируемых клеток человека проявлялась при концентрациях выше (более 98 мкг/мл), чем верхний предел используемой нами концентрации (80 мкг/мл).

Низкая исходная экспрессия клетками маркера CD69 (2,5%) и негативное влияние препаратов глицеролипидов на их жизнеспособность затрудняла оценку влияния препаратов на активацию МКПК в отсутствие дополнительной стимуляции ФМА и иономицином. В целом, для всех исследованных препаратов глицеролипидов наблюдали тенденцию к дозозависимому подавлению экспрессии CD69, которое проявлялось при концентрациях ниже тех, при которых они заметно снижали жизнеспособность МКПК: до 1,1% для препарата ЛП-М при концентрации 0,2 мкг/мл; до 0,8% для препарата ЛП-ХМВ при концентрации 2 мкг/мл; до 0,8% для препарата ЛХ-М при концентрации 2 мкг/мл; до 0,4% для препарата ЛХ-ХМВ при концентрации 20 мкг/мл (табл. 3). Однако критерии уровня значимости при этом были выше  $p=0,05$ , установленного как критическое значение: от 0,06 до 0,30 (табл. 3). Яичный ФХ, характеризующийся отсутствием влияния на жизнеспособность клеток, также обладал и наименее выраженным эффектом на экспрессию CD69, снижая в наименьшей степени число активированных МКПК только при максимальной концентрации 80 мкг/мл до 1,5%, что также не было статистически значимым ( $p=0,22$ , табл. 3). В целом, возможно, что морфологическим изменениям, сопровождающимся нарушением целостности клеточной мембраны и последующей гибели клеток, предшествуют функциональные изменения, препятствующие активации лимфоцитов.

Действие глицеролипидов на активацию МКПК не подтвердилось после их стимуляции ФМА и иономицином: при концентрациях, эффективных в отсутствие стимуляции, доля клеток, экспрессирующих CD69, оставалась на исходном уровне, понижалась или даже повышалась (табл. 3). В любом случае, статистически значимого влияния препаратов на активацию МКПК под действием ФМА/иономицина не было. В некоторой степени это связано с заметным влиянием липидов на жизнеспособность клеток в условиях стимуляции (табл. 2), таким образом, подход, использованный для оценки влияния на базальную активацию, в данном случае был неприменим.

### Выводы

Проведенные эксперименты не подтвердили выдви-

нутую гипотезу, что липиды папоротника, имеющие в своем составе длинноцепочечные ПНЖК (АК, ЭПК и другие), усиливают реакцию МКПК в ответ на стимуляцию ФМА и иономицином. Напротив, липидные фракции, полученные из папоротника и хвоща, в отличие от одного из главных глицеролипидов клеточных мембран животных и человека, ФХ, обладают различной степенью цитотоксичности в отношении МКПК и ограниченно влияют на экспрессию маркера активации CD69 этими клетками. Такой характер действия, в целом, способствует иммуносупрессии. Полученные результаты позволяют вести целенаправленную работу по выделению активных компонентов липидных фракций и установлению их структуры и механизма действия. Хотя системное использование цитотоксического эффекта глицеролипидов маловероятно, их локальное применение при гипериммунном ответе может быть вполне оправданным. Особый интерес представляют возможности дифференцированного и специфического уничтожения или подавления определенного типа иммунных клеток такими компонентами, что можно использовать в модельных экспериментах.

### Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных интересов, связанных с публикацией настоящей статьи

### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest

### Источники финансирования

Исследование выполнено при финансовой поддержке программы «Дальний Восток» 2018–2020 (проект №18-3-019) и Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (тема госзадания №122040800086-1)

### Funding Sources

This work was supported by the Program of Fundamental Research of the Far Eastern Branch of Russian Academy of Sciences “Far East” 2018–2020 [project number 18-3-019] and the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation [project number 122040800086-1]

### Благодарности

Авторы признательны д.б.н. В.И.Светашеву (Национальный научный центр морской биологии имени А.В.Жирмунского, г. Владивосток) за помощь в анализе жирных кислот препаратов липидов

### Acknowledgements

The authors are grateful to ScD V.I.Svetashev (A.V.Zhirumsky National Scientific Center of Marine Biology, Vladivostok) for his help in the analysis of fatty acids in the lipid preparations

## ЛИТЕРАТУРА

1. Sen P., Kemppainen E., Orešič M. Perspectives on systems modeling of human peripheral blood mononuclear cells // Front. Mol. Biosci. 2018. Vol.4. Article number: 96. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00096>



2. Falcai A., Soeiro-Pereira P.V., Kubo C.A., Aranda C.S., Solé D., Condino-Neto A. Peripheral blood mononuclear cells from severe asthmatic children release lower amounts of IL-12 and IL-4 after LPS stimulation // *Allergol. Immunopathol. (Madr.)*. 2015. Vol.43, Iss.5. P.482–486. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2014.10.005>
3. Zambalde E.P., Teixeira M.M., Favarin D.C., de Oliveira J.R., Magalhaes M.L., Cunha M.M., Silva W.C., Okuma C.H., Rodrigues V., Levy B.D., de Paula Rogerio A. The anti-inflammatory and pro-resolution effects of aspirin-triggered RvD1 (AT-RvD1) on peripheral blood mononuclear cells from patients with severe asthma // *Int. Immunopharmacol.* 2016. Vol.35. P.142–148. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.014>
4. Kytikova O., Novgorodtseva T., Denisenko Y., Antonyuk M., Gvozdenko T. Pro-resolving lipid mediators in the pathophysiology of asthma // *Medicina (Kaunas)*. 2019. Vol.55, Iss.6. Article number: 284. <https://doi.org/10.3390/medicina55060284>
5. Sokolowska M., Rovati G.E., Diamant Z., Untersmayr E., Schwarze J., Lukasik Z., Sava F., Angelina A., Palomares O., Akdis C.A., O'Mahony L., Sanak M., Dahlen S.-E., Wozczek G. Current perspective on eicosanoids in asthma and allergic diseases: EAACI Task Force consensus report, part I // *Allergy*. 2021. Vol.76, Iss.1. P.114–130. <https://doi.org/10.1111/all.14295>
6. Capra V., Rovati G.E., Mangano P., Buccellati C., Murphy R.C., Sala A. Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators // *Biochim. Biophys. Acta*. 2015. Vol.1851, Iss.4. P.377–382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.002>
7. Powell W.S. Eicosanoid receptors as therapeutic targets for asthma // *Clin. Sci. (Lond.)*. 2021. Vol.135, №16. P.1945–1980. <http://dx.doi.org/10.1042/CS20190657>
8. Nekrasov E.V., Svetashev V.I., Khrapko O.V., Vyssotski M.V. Variability of fatty acid profiles in ferns: Relation to fern taxonomy and seasonal development // *Phytochemistry*. 2019. Vol.162. P.47–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.015>
9. Nekrasov E.V., Shelikhan L.A., Svetashev V.I. Fatty acid composition of gametophytes of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. (Onocleaceae, Polypodiophyta) // *Botanica Pacifica*. 2019. Vol.8, №1. P.63–66. <http://dx.doi.org/10.17581/bp.2019.08104>
10. Nekrasov E.V., Svetashev V.I. Edible Far Eastern ferns as a dietary source of long-chain polyunsaturated fatty acids // *Foods*. 2021. Vol.10, Iss.6. Article number: 1220. <http://dx.doi.org/10.3390/foods10061220>
11. Schlenk H., Gellerman J.L. Arachidonic, 5, 11, 14, 17-eicosatetraenoic and related acids in plants – identification of unsaturated fatty acids // *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1965. Vol.42. P.504–511. <https://doi.org/10.1007/BF02540092>
12. Cifre M., Diaz-Rua R., Varela-Calvino R., Reynes B., Pericas-Beltran J., Palou A., Oliver P., Human peripheral blood mononuclear cell in vitro system to test the efficacy of food bioactive compounds: Effects of polyunsaturated fatty acids and their relation with BMI // *Mol. Nutr. Food Res.* 2017. Vol.61, Iss.4. Article number: 1600353. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600353>
13. Ameer F., Munir R., Usman H., Rashid R., Shahjahan M., Hasnain S., Zaidi N. Lipid-load in peripheral blood mononuclear cells: Impact of food-consumption, dietary-macronutrients, extracellular lipid availability and demographic factors // *Biochimie*. 2017. Vol.135. P.104–110. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.015>
14. Rundblad A., Holven K., Bruheim I., Myhrstad M., Ulven S. Effects of fish and krill oil on gene expression in peripheral blood mononuclear cells and circulating markers of inflammation: A randomised controlled trial // *J. Nutr. Sci.* 2018. Vol.7. Article number: e10. <https://doi.org/10.1017/jns.2018.2>
15. Sureda A., Martorell M., Bibiloni M.d.M., Bouzas C., Gallardo-Alfaro L., Mateos D., Capo X., Tur J.A., Pons A. Effect of free fatty acids on inflammatory gene expression and hydrogen peroxide production by ex vivo blood mononuclear cells // *Nutrients*. 2020. Vol.12, Iss.1. Article number: 146. <https://doi.org/10.3390/nu12010146>
16. Nekrasov E.V., Tallon S.J., Vyssotski M.V., Catchpole O.J. Extraction of lipids from New Zealand fern fronds using near-critical dimethyl ether and dimethyl ether–water–ethanol mixtures // *J. Supercrit. Fluids*. 2021. Vol.170. Article number: 105137. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105137>
17. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction // *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968. Vol.97. P.7. PMID: 5707208
18. Hartnell A., Robinson D.S., Kay A.B., Wardlaw A.J. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines // *Immunology*. 1993. Vol.80, Iss.2. P.281–286. PMID: 8262555; PMCID: PMC1422202.
19. Kew S., Banerjee T., Minihane A.M., Finnegan Y.E., Williams C.M., Calder P.C. Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25–72 y // *Am. J. Clin. Nutr.* 2003. Vol.77, Iss.5. P.1278–1286. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1278>
20. Quasney M.E., Carter L.C., Oxford C., Watkins S.M., Gershwin M.E., German J.B. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells by the plant sulfolipid, sulfoquinovosyldiacylglycerol // *J. Nutr. Biochem.* 2001. Vol.12, Iss.5. P.310–315. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00146-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00146-2)
21. Mizushima Y., Watanabe I., Ohta K., Takemura M., Sahara H., Takahashi N., Gasa S., Sugawara F., Matsukage A., Yoshida S., Sakaguchi K. Studies on inhibitors of mammalian DNA polymerase  $\alpha$  and  $\beta$ : Sulfolipids from a pteridophyte, *Athyrium niponicum* // *Biochem. Pharm.* 1998. Vol.55, Iss.4. P.537–541. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00536-](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00536-)

4

22. Murakami C., Kumagai T., Hada T., Kanekazu U., Nakazawa S., Kamisuki S., Maeda N., Xu X., Yoshida H., Sugawara F., Sakaguchi K., Mizushima Y. Effects of glycolipids from spinach on mammalian DNA polymerases // *Biochem. Pharm.* 2003. Vol.65, Iss.2. P.259–267. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)01483-1](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)01483-1)

23. Stemmer U., Dunai Z.A., Koller D., Purstinger G., Zenzmaier E., Deigner H.P., Aflaki E., Kratky D., Hermetter A. Toxicity of oxidized phospholipids in cultured macrophages // *Lipids Health Dis.* 2012. Vol.11. Article number:110. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-110>

24. Mayhew E., Ito M., Lazo R. Toxicity of non-drug-containing liposomes for cultured human cells // *Exp. Cell Res.* 1987. Vol.171. Iss.1. P.195–202. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(87\)90262-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90262-X)

## REFERENCES

1. Sen P., Kemppainen E., Orešič M. Perspectives on systems modeling of human peripheral blood mononuclear cells. *Front. Mol. Biosci.* 2018; 4:96. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2017.00096>

2. Falcai A., Soeiro-Pereira P.V., Kubo C.A., Aranda C.S., Solé D., Condino-Neto A. Peripheral blood mononuclear cells from severe asthmatic children release lower amounts of IL-12 and IL-4 after LPS stimulation. *Allergol. Immunopathol. (Madr.)* 2015; 43(5):482–486. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2014.10.005>

3. Zambalde E.P., Teixeira M.M., Favarin D.C., de Oliveira J.R., Magalhaes M.L., Cunha M.M., Silva W.C., Okuma C.H., Rodrigues V., Levy B.D., de Paula Rogerio A. The anti-inflammatory and pro-resolution effects of aspirin-triggered RvD1 (AT-RvD1) on peripheral blood mononuclear cells from patients with severe asthma. *Int. Immunopharmacol.* 2016; 35:142–148. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.03.014>

4. Kytikova O., Novgorodtseva T., Denisenko Y., Antonyuk M., Gvozdenko T. Pro-resolving lipid mediators in the pathophysiology of asthma. *Medicina (Kaunas)* 2019; 55(6):284. <https://doi.org/10.3390/medicina55060284>

5. Sokolowska M., Rovati G.E., Diamant Z., Untersmayr E., Schwarze J., Lukasik Z., Sava F., Angelina A., Palomares O., Akdis C.A., O'Mahony L., Sanak M., Dahlen S.-E., Wozczek G. Current perspective on eicosanoids in asthma and allergic diseases: EAACI Task Force consensus report, part I. *Allergy* 2021; 76(1):114–130. <https://doi.org/10.1111/all.14295>

6. Capra V., Rovati G.E., Mangano P., Buccellati C., Murphy R.C., Sala A. Transcellular biosynthesis of eicosanoid lipid mediators. *Biochim. Biophys. Acta* 2015; 1851(4):377–382. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2014.09.002>

7. Powell W.S. Eicosanoid receptors as therapeutic targets for asthma. *Clin. Sci. (Lond.)* 2021; 135(16):1945–1980. <http://dx.doi.org/10.1042/CS20190657>

8. Nekrasov E.V., Svetashev V.I., Khrapko O.V., Vyssotski M.V. Variability of fatty acid profiles in ferns: Relation to fern taxonomy and seasonal development. *Phytochemistry* 2019; 162:47–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.02.015>

9. Nekrasov E.V., Shelikhan L.A., Svetashev V.I. Fatty acid composition of gametophytes of *Matteuccia struthiopteris* (L.) Tod. (Onocleaceae, Polypodiophyta). *Botanica Pacifica* 2019; 8(1):63–66. <http://dx.doi.org/10.17581/bp.2019.08104>

10. Nekrasov E.V., Svetashev V.I. Edible Far Eastern ferns as a dietary source of long-chain polyunsaturated fatty acids. *Foods* 2021; 10(6):1220. <http://dx.doi.org/10.3390/foods10061220>

11. Schlenk H., Gellerman J.L. Arachidonic, 5, 11, 14, 17-eicosatetraenoic and related acids in plants – identification of unsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 1965; 42:504–511. <https://doi.org/10.1007/BF02540092>

12. Cifre M., Diaz-Rua R., Varela-Calvino R., Reynes B., Pericas-Beltran J., Palou A., Oliver P., Human peripheral blood mononuclear cell in vitro system to test the efficacy of food bioactive compounds: Effects of polyunsaturated fatty acids and their relation with BMI. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017; 61(4):1600353. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201600353>

13. Ameer F., Munir R., Usman H., Rashid R., Shahjahan M., Hasnain S., Zaidi N. Lipid-load in peripheral blood mononuclear cells: Impact of food-consumption, dietary-macronutrients, extracellular lipid availability and demographic factors. *Biochimie* 2017; 135:104–110. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.01.015>

14. Rundblad A., Holven K., Bruheim I., Myhrstad M., Ulven S. Effects of fish and krill oil on gene expression in peripheral blood mononuclear cells and circulating markers of inflammation: A randomised controlled trial. *J. Nutr. Sci.* 2018; 7:e10. <https://doi.org/10.1017/jns.2018.2>

15. Sureda A., Martorell M., Bibiloni M.d.M., Bouzas C., Gallardo-Alfaro L., Mateos D., Capo X., Tur J.A., Pons A. Effect of free fatty acids on inflammatory gene expression and hydrogen peroxide production by ex vivo blood mononuclear cells. *Nutrients* 2020; 12(1):146. <https://doi.org/10.3390/nu12010146>

16. Nekrasov E.V., Tallon S.J., Vyssotski M.V., Catchpole O.J. Extraction of lipids from New Zealand fern fronds using near-critical dimethyl ether and dimethyl ether–water–ethanol mixtures. *J. Supercrit. Fluids* 2021; 170:105137. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105137>

17. Böyum A. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* 1968; 97:7. PMID: 5707208

18. Hartnell A., Robinson D.S., Kay A.B., Wardlaw A.J. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in

asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 1993; 80(2):281–286. PMID: 8262555; PMCID: PMC1422202.

19. Kew S., Banerjee T., Minihane A.M., Finnegan Y.E., Williams C.M., Calder P.C. Relation between the fatty acid composition of peripheral blood mononuclear cells and measures of immune cell function in healthy, free-living subjects aged 25–72 y. *Am. J. Clin. Nutr.* 2003; 77(5):1278–1286. <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.5.1278>

20. Quasney M.E., Carter L.C., Oxford C., Watkins S.M., Gershwin M.E., German J.B. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis in SNU-1 human gastric cancer cells by the plant sulfolipid, sulfoquinovosyldiacylglycerol. *J. Nutr. Biochem.* 2001; 12(5):310–315. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(01\)00146-2](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(01)00146-2)

21. Mizushima Y., Watanabe I., Ohta K., Takemura M., Sahara H., Takahashi N., Gasa S., Sugawara F., Matsukage A., Yoshida S., Sakaguchi K. Studies on inhibitors of mammalian DNA polymerase  $\alpha$  and  $\beta$ : Sulfolipids from a pteridophyte, *Athyrium niponicum*. *Biochem. Pharm.* 1998; 55(4):537–541. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(97\)00536-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(97)00536-4)

22. Murakami C., Kumagai T., Hada T., Kanekazu U., Nakazawa S., Kamisuki S., Maeda N., Xu X., Yoshida H., Sugawara F., Sakaguchi K., Mizushima Y. Effects of glycolipids from spinach on mammalian DNA polymerases. *Biochem. Pharm.* 2003; 65(2):259–267. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(02\)01483-1](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(02)01483-1)

23. Stemmer U., Dunai Z.A., Koller D., Purstinger G., Zenzmaier E., Deigner H.P., Aflaki E., Kratky D., Hermetter A. Toxicity of oxidized phospholipids in cultured macrophages. *Lipids Health Dis.* 2012; 11:110. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-11-110>

24. Mayhew E., Ito M., Lazo R. Toxicity of non-drug-containing liposomes for cultured human cells. *Exp. Cell Res.* 1987; 171(1):195–202. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(87\)90262-X](https://doi.org/10.1016/0014-4827(87)90262-X)

---

**Информация об авторах:**

**Эдуард Витальевич Некрасов**, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, Амурский филиал Федерального государственного бюджетного учреждения науки Ботанический сад-институт Дальневосточного отделения Российской академии наук; e-mail: [ed\\_nekrasov@mail.ru](mailto:ed_nekrasov@mail.ru)

**Денис Евгеньевич Наумов**, канд. мед. наук, зав. лабораторией, лаборатория молекулярных и трансляционных исследований, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания»; e-mail: [denn1985@bk.ru](mailto:denn1985@bk.ru)

---

**Author information:**

**Eduard V. Nekrasov**, PhD (Biol.), Senior Staff Scientist, Amur Branch of Botanical Garden-Institute of the Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences; e-mail: [ed\\_nekrasov@mail.ru](mailto:ed_nekrasov@mail.ru)

**Denis E. Naumov**, PhD (Med.), Head of Laboratory of Molecular and Translational Research, Far Eastern Scientific Center of Physiology and Pathology of Respiration; e-mail: [denn1985@bk.ru](mailto:denn1985@bk.ru)

---

Поступила 24.10.2022  
Принята к печати 14.11.2022

---

Received October 24, 2022  
Accepted November 14, 2022