

УДК 577.23

Ω-ГИДРОКСИПАЛЬМИТИНОВАЯ И α,Ω-ГЕКСАДЕКАНДИКАРБОНОВАЯ КИСЛОТЫ КАК АКТИВАТОРЫ СВОБОДНОГО ДЫХАНИЯ И ИНГИБИТОРЫ ГЕНЕРАЦИИ H₂O₂ В МИТОХОНДРИЯХ ПЕЧЕНИ

© 2019 г. А. А. Семенова^а, В. Н. Самарцев^а, С. И. Павлова^а, М. В. Дубинин^{а, *}

^аМарийский государственный университет, пл. Ленина, 1,
Республика Марий Эл, Йошкар-Ола, 424000, Россия

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

Поступила в редакцию 15.04.2019 г.

После доработки 06.06.2019 г.

Принята к публикации 06.06.2019 г.

На изолированных митохондриях печени, энергизованных путем окисления сукцината, исследовано действие пальмитиновой кислоты и продуктов ее ω-окисления – ω-гидроксипальмитиновой кислоты (ГПК) и α,ω-гексадекандикарбоновой кислоты (ГДК) – на активность дыхания в отсутствие синтеза АТР и на генерацию H₂O₂. Показано, что ГПК стимулирует дыхание и снижает разность электрических потенциалов (Δψ) в митохондриях в той же степени, как пальмитиновая кислота и классические протонифорные разобщители. В аналогичных условиях стимуляция дыхания митохондрий ГДК не сопровождается снижением Δψ и подавляется 10 мкМ циклоспорином А. Поэтому ГДК рассматривается как “десопрягающий” агент, переключающий комплексы дыхательной цепи митохондрий на холостой режим работы. Установлено, что в присутствии в сахарозной среде инкубации 20 мМ хлорида калия стимуляция дыхания ГПК (в отличие от пальмитиновой кислоты и ГДК) подавляется 3 мМ хлоридом магния на 60%. В этих условиях ГПК в концентрации 25 мкМ и выше эффективно индуцирует набухание митохондрий, которое полностью подавляется хлоридом магния. Отмечается, что ГПК как индуктор набухания митохондрий менее эффективна в отсутствие хлорида калия, чем в его присутствии. Предполагается, что в отличие от пальмитиновой кислоты и ГДК действие ГПК как активатора свободного дыхания митохондрий в сахарозной среде инкубации, содержащей ионы калия и Трис, обусловлено сочетанием протонифорного эффекта с содействием транспорту этих ионов в матрикс. Установлено, что пальмитиновая кислота, ГДК и ГПК в концентрациях, вызывающих приблизительно в равной степени стимуляцию дыхания митохондрий в состоянии 2, одинаково эффективно ингибируют генерацию H₂O₂. Сделано заключение, что эффекты указанных жирных кислот как ингибиторов генерации H₂O₂ в изолированных митохондриях печени обусловлены стимуляцией дыхания и могут быть не связаны со снижением Δψ.

Ключевые слова: митохондрии, разобщение, свободное дыхание, α,ω-гексадекандикарбонОВАЯ кислота, ω-гидроксипальмитиновая кислота, активные формы кислорода

DOI: 10.1134/S0233475519060082

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что свободные монокарбоновые жирные кислоты в зависимости от экспериментальных условий по-разному влияют на энергетические функции митохондрий [1–9]. Так, в отсутствие ионов кальция (в присутствии в среде инкубации EGTA) монокарбоновые жирные кислоты в микромолярной концентрации индуцируют разобщение окислительного фосфорилирования в митохондриях животных, главным образом, по протонифорному механизму [1, 3, 5–8]. В “мягких” условиях такое разобщающее действие жирных кислот сопровождается усилением так называемого свободного дыхания без существенного ингибирования окислительного синтеза АТР [1, 2].

В настоящее время “мягкое” разобщение окислительного фосфорилирования рассматривается как один из механизмов защиты клеток жизненно важных органов от образующихся в митохондриях токсичных активных форм кислорода (АФК) [1, 2, 9, 10]. Как хорошо установлено *in vitro*, генерация АФК (в частности H₂O₂) митохондриями сердца и печени, энергизованными путем окисления сукцината при высоком мембранном потенциале (Δψ), наиболее интенсивно осуществляется путем энергозависимого обратного переноса электронов комплексом I от сукцината. В этих условиях генерация H₂O₂ может быть снижена при стимуляции дыхания и снижения Δψ протонифорными разобщителями, в том числе и

монокарбоновыми жирными кислотами [1, 2, 5, 9–12]. При “прямом” транспорте электронов от сукцината до кислорода образование H_2O_2 митохондриями протекает менее интенсивно и частично подавляется протонфорными разобщителями [1, 2].

В митохондриях печени в протонфорном разобщающем действии монокарбоновых жирных кислот принимают участие белки-переносчики метаболитов внутренней мембраны митохондрий: осуществляющие обменный транспорт ADP на АТФ (ADP/АТФ- антипортер) и глутамата на аспарат (аспартат/глутаматный антипортер) [1, 3, 6–8]. Их участием обусловлено около 70–80% разобщающей активности пальмитиновой и других насыщенных жирных кислот [6–8, 13]. Другая часть разобщающей активности этих жирных кислот (20–30%), по-видимому, обусловлена участием особой системы, чувствительной к циклоспорину А в необычной для него высокой концентрации 10 мкМ, но не связанной с циклофилином D [8, 13].

В нормальных физиологических условиях основным путем метаболизма жирных кислот в клетках печени является их β -окисление в митохондриях и пероксисомах [14, 15]. Другой путь метаболизма жирных кислот – ω -окисление, при физиологических условиях не превышает и 10% от их общего метаболизма и рассматривается как минорный метаболический путь [15, 16]. На первом этапе ω -окисления в эндоплазматическом ретикулуме монокарбоновые жирные кислоты преобразуются в соответствующие ω -гидроксимонокарбоновые кислоты при участии микросомальных цитохромов Р-450 [15–18]. На следующем этапе ω -окисления путем последовательного воздействия цитозольных NAD-зависимых алкоголь- и альдегиддегидрогеназ образуются α,ω -дикарбоновые кислоты [15, 16, 18]. Так, в процессе ω -окисления одной из наиболее распространенных жирных кислот – пальмитиновой, на первом этапе образуется ω -гидроксипальмитиновая кислота (ГПК), на следующем этапе – α,ω -гексадекандикарбоновая кислота (ГДК).

Путь ω -окисления значительно усиливается под влиянием различных ксенобиотиков – индукторов ферментов гидроксилирования жирных кислот, при потреблении этанола, при некоторых состояниях, сопровождающихся увеличением содержания свободных монокарбоновых жирных кислот (ожирение, голодание, сахарный диабет, неалкогольная жировая болезнь печени и др.), а также при различных нарушениях их метаболизма [15, 16, 18–21]. Давно известно, что при этих и ряде других подобных патологических состояниях в крови и клетках пациентов наблюдается значительное увеличение содержания различных жирных кислот, в том числе ГПК и ГДК [20, 22, 23].

Ранее нами было установлено, что одна из длинноцепочечных α,ω -дикарбоновых кислот – α,ω -тетрадекандикарбоновая (ТДК), в отсутствие Ca^{2+} способна стимулировать дыхание митохондрий печени, окисляющих сукцинат, в отсутствие синтеза АТФ (состояние 2 по Чансу) без снижения $\Delta\psi$ [13, 24, 25]. Тем самым действие ТДК аналогично эффектам так называемых “десопрягающих” агентов (decouplers) – некоторых из общих и местных анестетиков [26, 27]. Однако в отличие от действия этих агентов стимулирующий эффект ТДК обратим и полностью устраняется циклоспорином А в высокой концентрации 10 мкМ [13, 25]. Предполагается, что стимулированное ТДК чувствительное к циклоспорину А- Ca^{2+} -независимое свободное дыхание в митохондриях печени может быть обусловлено переключением работы комплексов дыхательной цепи на холостой режим, т.е. без векторного перемещения H^+ из матрикса в межмембранное пространство [25]. ГДК отличается от ТДК только длиной ацильной цепи, большей на два атома углерода, что придает ей более высокую гидрофобность. Показано, что в отличие от этой более короткоцепочечной α,ω -дикарбоновой кислоты, ГДК способна перемещаться через фосфолипидную бислоюную мембрану по механизму флипплоп [28]. Однако не ясно, будет ли ГДК более эффективно, чем ТДК, стимулировать свободное дыхание в митохондриях печени по аналогичному механизму. Неизученным остается также механизм действия ГПК как индуктора свободного дыхания в митохондриях печени. Не известно, связано ли индуцируемое этими жирными кислотами свободное дыхание со снижением генерации АФК в митохондриях.

В настоящей работе с целью ответа на эти вопросы предполагалось исследовать: 1) эффекты ГДК и ГПК на дыхание и $\Delta\psi$ энергизованных путем окисления сукцината митохондрий печени, в том числе, в присутствии потенциальных модуляторов этих эффектов; 2) влияние ГДК и ГПК на генерацию H_2O_2 митохондриями печени, также энергизованных путем окисления сукцината, в условиях обратного и прямого транспорта электронов. Особое внимание уделено сравнению эффектов жирных кислот с действием на митохондрии пальмитиновой кислоты, как одной из хорошо изученных монокарбоновых жирных кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Митохондрии из печени белых половозрелых самцов крыс (весом 210–250 г) выделяли методом дифференциального центрифугирования с последующим освобождением от эндогенных жирных кислот с помощью бычьего сывороточного альбумина фракции V в соответствии с описан-

ной ранее методикой [6]. Среда выделения содержала 250 мМ сахарозы, 1 мМ EGTA, 5 мМ MOPS (рН до 7.4 доводили Трис). Концентрацию белка митохондрий определяли биуретовым методом, в качестве стандарта использовали раствор БСА. Во время проведения эксперимента суспензию митохондрий (60–70 мг митохондриального белка в 1 мл) хранили на льду.

Дыхание митохондрий регистрировали полярографическим методом при 25°C в термостабируемой ячейке объемом 1 мл с помощью кислородного электрода типа Кларк и установки Oxgraph Plus (Hansatech Instruments, Великобритания). Разность электрических потенциалов ($\Delta\psi$) на внутренней мембране митохондрий оценивали по распределению катиона тетрафенилфосфония (TFF^+) через внутреннюю мембрану, концентрацию которого регистрировали с помощью TFF^+ -чувствительного электрода и многоканальной электрометрической системы Record 4usb в кювете объемом 1.2 мл при 25°C и постоянной аэрации и перемешивании. Значение $\Delta\psi$ рассчитывали с учетом неэнергезависимого связывания TFF^+ с митохондриями по уравнению Нернста [29]. Объем матрикса был взят как 1 мкл/мг белка – среднее значение недоступного для сахарозы объема митохондрий печени [30]. В специальных опытах установлено, что в отсутствие митохондрий действие исследуемых агентов на показания TFF^+ -чувствительного электрода не превышало уровень “шума” (приблизительно $\pm 1\%$ от величины сигнала). Набухание митохондрий регистрировали по изменению оптической плотности суспензии митохондрий (А) при длине волны 540 нм на спектрометре КФК-3-01 (“ЗОМЗ”, Россия) в кювете объемом 4 мл и температуре 25°C. Амплитуду набухания митохондрий ($\Delta A_{540}/1$ мг белка) определяли как изменение оптической плотности суспензии митохондрий в течение 5 мин набухания. Образование H_2O_2 суспензией митохондрий измеряли с помощью флуоресцентного индикатора Amplex Red с использованием спектрофлуориметра Флюорат-02-Панорама (“Люмекс”, Россия) (длины волн возбуждения и флуоресценции – 560 и 590 нм соответственно) при 37°C и постоянном перемешивании. В начале измерений к инкубационной среде добавляли пероксидазу хрена (акт. 1 ед./мл) и 10 мкМ Amplex Red. Концентрация митохондриального белка составляла 0.2 мг/мл. Скорость образования H_2O_2 оценивали по скорости увеличения интенсивности светового потока (выраженного в относительных единицах). В специальных опытах установлено, что исследуемые агенты не влияли на изменение светового потока, вызванного добавлением к митохондриям стандартного раствора H_2O_2 .

В большинстве экспериментов использовали базовую среду инкубации (среда А), содержащую 200 мМ сахарозы, 20 мМ KCl, 5 мМ янтарной кислоты, 0.5 мМ EGTA, 10 мМ MOPS (рН до 7.4 доводили Трис). В некоторых экспериментах использовали среду инкубации, не содержащую KCl (среда Б), в этом случае концентрацию сахарозы увеличивали до 250 мМ. При проведении экспериментов в ячейку или в кювету сразу после митохондрий во всех случаях, кроме специально указанных, добавляли ротенон (2 мкМ) и, если необходимо, MgCl_2 (3 мМ) и TFF^+ (1.6 мкМ). Все другие добавки осуществляли, как указано в таблице и на рисунках. В контрольных пробах к митохондриям добавляли растворители в том же объеме, как в добавках с исследуемыми веществами. Во всех случаях растворители не влияли существенно на параметры митохондрий.

В работе использовали ГДК, ГПК, пальмитиновую кислоту, янтарную кислоту, очищенный от жирных кислот бычий сывороточный альбумин фракции V, MOPS, Трис, циклоспорин А, *n*-трифторометоксикарбонилцианидфенилгидразон (FCCP), 2,4-динитрофенол, карбоксилатрилат, глутамат калия, Amplex Red, пероксидазу хрена (Sigma, США); ротенон, EGTA (“Serva”, Германия); сахарозу, хлорид тетрафенилфосфония, KCl, MgCl_2 (“Fluka”, США). Использовали растворы ГДК (40 мМ), ГПК и пальмитиновой кислоты (по 20 мМ) в дважды перегнанном этаноле.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хорошо известно, что при увеличении концентрации протонофорных разобщителей в митохондриях печени наблюдается линейная зависимость между снижением $\Delta\psi$ и увеличением скорости дыхания в отсутствие синтеза АТР (состояние 2). Такая же зависимость между этими величинами наблюдается у пальмитиновой кислоты [31, 32]. Представляет интерес выяснить, как влияют ГДК и ГПК на $\Delta\psi$ на внутренней мембране при различной степени стимуляции дыхания митохондрий печени, энергизованных путем окисления сукцината. При проведении этих и последующих исследований использовали сахарозную среду инкубации, содержащую 20 мМ хлорида калия (среда А). Эффекты указанных жирных кислот сравнивали с действием пальмитиновой кислоты и одного из классических протонофорных разобщителей FCCP. Как видно из рис. 1, ГПК стимулирует дыхание митохондрий в состоянии 2 и снижает $\Delta\psi$ в той же степени, как и FCCP и пальмитиновая кислота. Исходя из этих данных, можно было бы предположить, что стимуляция дыхания митохондрий ГПК аналогична разобщающему действию протонофорных разобщителей. Однако, как хорошо известно, увеличе-

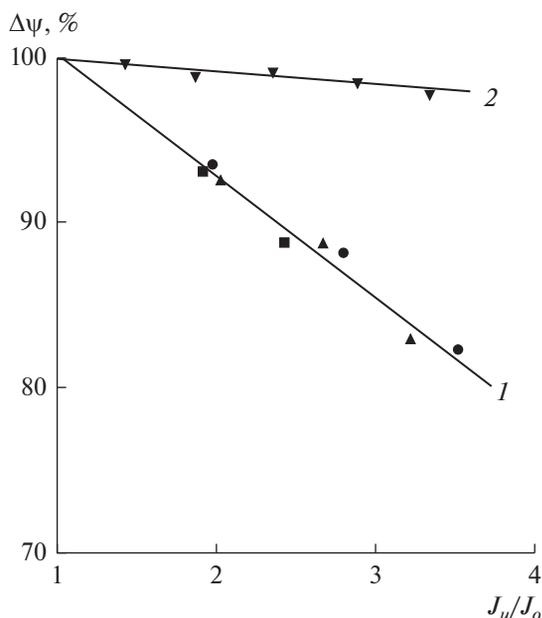


Рис. 1. Линейные зависимости между относительной величиной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$, %) на внутренней мембране митохондрий и относительной скоростью дыхания (J_u/J_0) в присутствии разобщителей: 1 – FCCP (20, 30 и 40 нМ, \blacktriangle), пальмитиновая кислота (20 и 30 мкМ, \blacksquare) и ГПК (20, 40 и 60 мкМ, \bullet); 2 – ГДК (40, 80, 120, 160 и 200 мкМ, \blacktriangledown). Без разобщителей значение $\Delta\psi$, принятое за 100%, составляет 187 ± 4 мВ ($n = 6$). Условия опыта и состав среды инкубации А описаны в разделе “Материалы и методы”. Концентрация митохондриального белка – 1.2 мг/мл.

ние скорости дыхания и снижение $\Delta\psi$ в митохондриях может наблюдаться и при транспорте катионов в матрикс [33].

ГДК вплоть до концентрации 200 мкМ, увеличивая скорость дыхания митохондрий, не влияет на $\Delta\psi$ (рис. 1, прямая 2). Как уже отмечалось во введении, способность ТДК и некоторых других так называемых “десопрягающих” агентов стимулировать дыхание митохондрий без снижения $\Delta\psi$ может быть обусловлена переключением комплексов дыхательной цепи на холостой режим, при котором транспорт электронов не сопровождается векторным переносом H^+ из матрикса в межмембранное пространство [13, 24–27]. Следовательно, способность ГДК стимулировать дыхание митохондрий печени также можно рассматривать как действие “десопрягающего” агента, переключающего комплексы дыхательной цепи на холостой режим работы.

В табл. 1 приведены данные сравнительного изучения влияния пальмитиновой кислоты, ГПК и ГДК, а также добавленных после этих жирных кислот карбоксиатрактилата, глутамата и циклоспорина А на дыхание митохондрий печени. Из табл. 1 видно, что в указанных концентрациях эти

жирные кислоты стимулируют дыхание митохондрий печени приблизительно в равной степени. Карбоксиатрактилат, глутамат и циклоспорин А, добавленные в указанных концентрациях после пальмитиновой кислоты, полностью устраняют ее способность стимулировать дыхание митохондрий (табл. 1). Это подтверждает полученные ранее данные, которые рассматриваются как свидетельство того, что в разобщающем действии пальмитиновой кислоты принимают участие ADP/ATP-антипортер, аспарат/глутаматный антипортер и особая система, чувствительная к циклоспорину А, но не связанная с циклофилином D [8, 13]. В то же время карбоксиатрактилат, глутамат и циклоспорин А в указанных концентрациях не влияют на стимулированное ГПК и ГДК дыхание митохондрий (табл. 1). Во всех случаях последующее добавление протонофорного разобщителя 2,4-ДНФ в оптимальной для него концентрации 50 мкМ вызывает дальнейшую стимуляцию дыхания (табл. 1). Следовательно, дыхание митохондрий в присутствии пальмитиновой кислоты, ГДК и ГПК не лимитируется транспортом электронов по дыхательной цепи.

Как уже отмечалось, стимуляция дыхания менее гидрофобной α,ω -дикарбоновой кислотой – ТДК, полностью подавляется циклоспорином А в концентрации 10 мкМ. В отличие от этой более короткоцепочечной α,ω -дикарбоновой кислоты ГДК способна перемещаться через фосфолипидную бислоюную мембрану по механизму флипплоп [28]. Можно было бы предположить, что в отличие от ТДК стимуляция дыхания митохондрий ГДК осуществляется по нечувствительному к циклоспорину А механизму. Нельзя также исключить и того, что ГДК, будучи более гидрофобной, чем ТДК, препятствует взаимодействию циклоспорина А с митохондриями. В следующих экспериментах циклоспорин А в концентрации 10 мкМ был добавлен к митохондриям за 2 мин до ГДК, и добавки этой жирной кислоты осуществлялись последовательно в пределах концентраций от 20 до 100 мкМ. Как видно из рис. 2а, в этих условиях циклоспорин А устраняет способность ГДК стимулировать дыхание митохондрий вплоть до ее концентрации 60 мкМ. В аналогичных условиях циклоспорин А не влияет на стимуляцию дыхания митохондрий ГПК (данные не приведены).

Полученные данные можно рассматривать как дополнительный довод в пользу того, что ГДК, как и ТДК, способна стимулировать дыхание митохондрий печени путем переключения комплексов дыхательной цепи на холостой режим работы. В более высоких концентрациях ГДК, более гидрофобная, чем ТДК, по-видимому, препятствует взаимодействию циклоспорина А с митохондриями. В отличие от ГДК, стимуляция дыха-

Таблица 1. Влияние жирных кислот (ЖК) – пальмитиновой кислоты (ПК), ГПК и ГДК – на дыхание митохондрий печени без добавок и при последующем добавлении 1 мкМ карбоксиатрактилата (Катр), 2 мМ глутамата (Глу), 10 мкМ циклоспорина А (ЦсА) и 50 мкМ 2,4-динитрофенола (ДНФ)

Добавки	Скорость дыхания, нмоль O ₂ /мин на 1 мг белка		
	ПК 25 мкМ (n = 3)	ГПК 35 мкМ (n = 3)	ГДК 100 мкМ (n = 4)
Без добавок	9.4 ± 0.3	9.6 ± 0.6	9.3 ± 0.3
ЖК	22.8 ± 0.8	21.1 ± 1.1	20.6 ± 0.7
ЖК + Катр	17.2 ± 0.9	21.1 ± 1.1	20.6 ± 0.7
ЖК + Катр + Глу	12.9 ± 0.8	20.8 ± 1.1	21.3 ± 0.6
ЖК + Катр + Глу + ЦсА	9.9 ± 0.4	20.3 ± 0.9	21.7 ± 0.6
ЖК + Катр + Глу + ЦсА + ДНФ	46.6 ± 4.1	60.5 ± 6.3	49.1 ± 5.2

Примечание. Условия опыта и состав среды инкубации А описаны в разделе “Материалы и методы”. Концентрация митохондриального белка – 1.2 мг/мл. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего.

ния митохондрий ГПК происходит с использованием другого механизма.

Разобшающее действие монокарбонных жирных кислот частично подавляется ионами магния вследствие формирования неактивного комплекса катиона магния и аниона жирной кислоты, а также путем ингибирования индуцированного жирными кислотами трансмембранного транспорта ионов калия и Трис [32, 34]. Применяемая нами среда инкубации митохондрий содержала 20 мМ хлорида калия и как минимум 30 мМ Трис (добавлен при доведении pH среды до 7.4). В следующих экспериментах необходимо было выяснить, как влияют ионы магния на стимуляцию дыхания митохондрий печени указанными жирными кислотами. Как показано на рис. 2б и 2в, в отсутствие жирных кислот 3 мМ хлорид магния не влияет на дыхание митохондрий. В присутствии пальмитиновой кислоты хлорид магния в указанной концентрации ингибирует дыхание не более чем на 20% (рис. 2б), что согласуется с полученными ранее данными [35]. В аналогичных условиях ионы магния не влияют на стимулированное ГДК дыхание митохондрий (данные не приведены), но в то же время существенно подавляют способность ГПК стимулировать дыхание (рис. 2в).

Ранее для количественной оценки степени ингибирования карбоксиатрактилатом и глутаматом стимулированного пальмитиновой кислотой дыхания митохондрий были использованы величины их респондирующих эффектов [7, 8, 13]. По аналогии с этими респондирующими агентами способность ионов магния ингибировать разобшающее действие жирных кислот также была выражена количественно как респондирующий эффект. Так, в отсутствие ингибирующего действия Mg²⁺ на стимуляцию дыхания митохондрий ГДК респондирующий эффект этих ионов равен 0. В то время как при стимуляции дыхания митохондрий 30 мкМ пальмитиновой кислотой и 40 мкМ ГПК респондирующие эффекты Mg²⁺ составляют 23.5 ± 1.8% (n = 3) и 59.1 ± 4.0% (n = 4) соответственно.

В отсутствие ионов калия в сахарозной среде инкубации (среда Б) хлорид магния также ингибирует стимулированное ГПК дыхание митохондрий (данные не приведены). Однако при этих условиях респондирующий эффект хлорида магния составляет 31.4 ± 1.9% (n = 4), что существенно меньше, чем при инкубации митохондрий с хлоридом калия.

Транспорт K⁺ и других одновалентных катионов в матрикс энергизованных митохондрий сопровождается их набуханием и снижением Δψ [33, 36, 37]. Как показано на рис. 3а, ГПК в концентрациях 25 и 50 мкМ (50 и 100 нмоль на 1 мг белка) эффективно индуцирует снижение оптической плотности суспензии митохондрий, что свидетельствует о набухании этих органелл. Такой эффект ГПК полностью устраняется 3 мМ хлоридом магния (рис. 3а). В отсутствие ионов калия (среда Б) ГПК индуцирует набухание митохондрий в меньшей степени. Этот эффект жирной кислоты также полностью устраняется 3 мМ хлоридом магния (рис. 3б).

Следует отметить, что, как показано нами ранее [38], индуцированное ГПК набухание митохондрий выражено в значительно меньшей степени, чем при индукции Ca²⁺-зависимой неспецифической пермеабиллизации внутренней мембраны. Установлено, что при наличии K⁺ в среде инкубации амплитуда индуцированного ГПК (50 нмоль на 1 мг белка) набухания митохондрий в отсутствие и в присутствии 50 мкМ Ca²⁺ составляет соответственно 0.225 ± 0.013 и 1.408 ± 0.062 ΔА на 1 мг белка (n = 3). Полученные данные можно рассматривать как свидетельство того, что ГПК содействует транспорту K⁺ в матрикс. По-видимому, в отсутствие ионов калия индуцированное ГПК небольшое набухание митохондрий происходит в результате опосредованного ГПК увеличения транспорта катионов Трис в матрикс подобно тому, как это происходит в случае пальмитиновой кислоты [34]. Нечувствительная к ионам

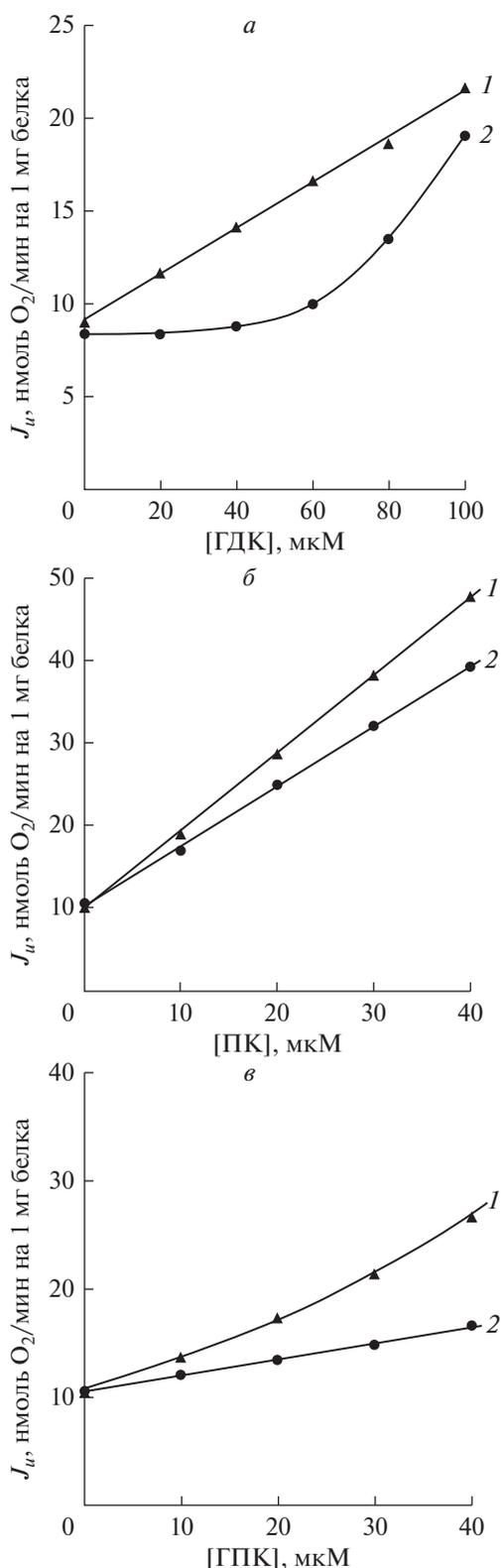


Рис. 2. Зависимость скорости дыхания митохондрий печени (J_u) от концентрации жирных кислот. *а* – ГДК в отсутствие (1, ▲) и в присутствии 10 мкМ циклоспорина А (2, ●); *б* – пальмитиновой кислоты (ПК) и *в* – ГПК в отсутствие (1, ▲) и в присутствии 3 мМ хлорида магния (2, ●). Условия опыта и состав среды инкубации А описаны в разделе “Материалы и методы”. Концентрация митохондриального белка – 1.2 мг/мл. На каждом рисунке (*а*, *б* и *в*) представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. Для каждого рисунка аналогичные результаты получены еще в двух независимых экспериментах.

В присутствии ионов калия пальмитиновая кислота в концентрации 15 мкМ (30 нмоль на 1 мг белка), стимулируя дыхание митохондрий в той же степени, как и 25 мкМ ГПК, индуцирует снижение оптической плотности суспензии митохондрий в меньшей степени. Этот небольшой эффект пальмитиновой кислоты полностью устраняется хлоридом магния (рис. 3в). Следовательно, в наших экспериментальных условиях пальмитиновая кислота обладает слабым ионофорным действием, что подтверждает полученные ранее данные [34]. Как уже отмечалось, разобщающее действие пальмитиновой кислоты осуществляется главным образом по протонному механизму при участии ADP/ATP- и аспаратат/глутаматного антипортеров [1, 3, 6–8]. По-видимому, ионофорный эффект пальмитиновой кислоты не вносит существенного вклада в полное разобщающее действие этой жирной кислоты. При аналогичных условиях ГДК в концентрации, вызывающей более чем двукратную стимуляцию дыхания, не влияет существенно на оптическую плотность суспензии митохондрий (рис. 3г). Эти данные можно рассматривать как свидетельство того, что ГДК не способна индуцировать энергозависимый транспорт ионов калия и (или) Трис в матрикс митохондрий.

Полученные результаты можно рассматривать как свидетельство того, что в отличие от пальмитиновой кислоты и ГДК разобщающее действие ГПК, связанное с содействием переносу ионов калия и, возможно, Трис в матрикс митохондрий, формально можно рассматривать как ионофорное разобщение. Однако ионофорное разобщение митохондрий – это кратковременный процесс. Для компенсации переноса положительного заряда в матрикс при энергозависимом транспорте (как в нашем случае) происходит перемещение протона дыхательной цепью в противоположном направлении, а это приводит к быстрому защелачиванию матрикса и к прекращению транспорта [33, 34]. Для пролонгирования ионофорного разобщения необходимо, чтобы одновременно с катионом в матрикс переносился и протон. Следовательно, полное разобщающее действие ГПК в сахарозной среде инкубации, со-

магния часть стимулированного ГПК дыхания митохондрий, по-видимому, связана с протонно-ионофорным действием этой жирной кислоты.

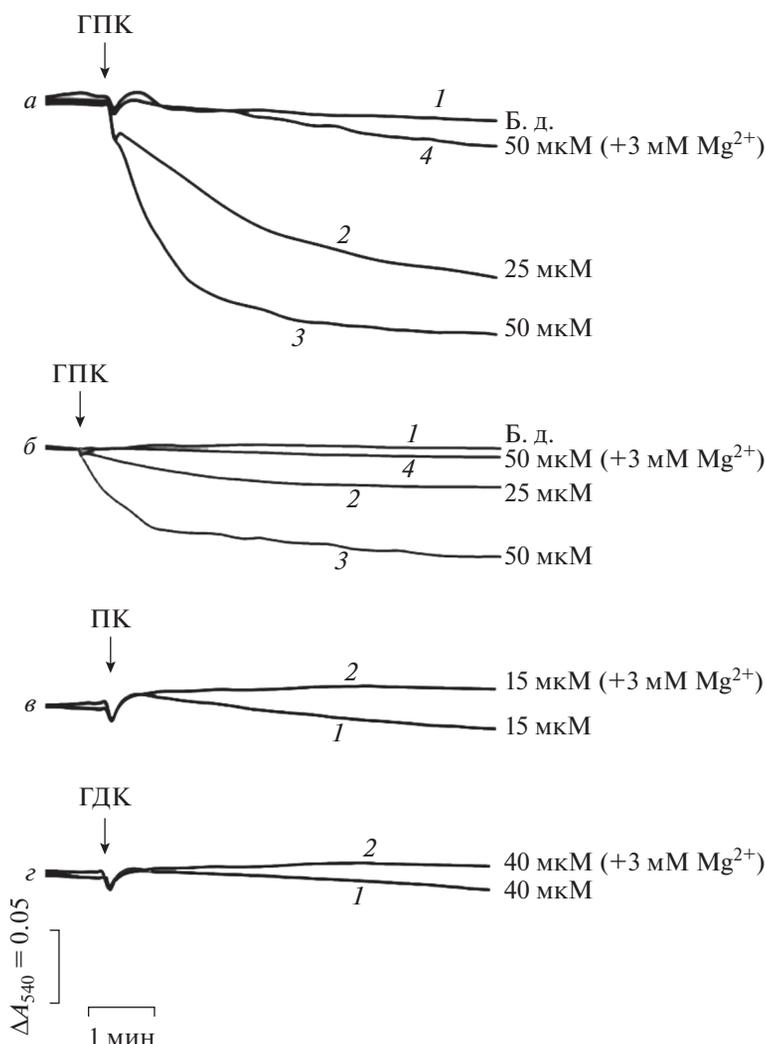


Рис. 3. Влияние ионов магния на индуцированные ГПК (*a* и *б*), пальмитиновой кислотой (*в*) и ГДК (*г*) изменения оптической плотности суспензии митохондрий печени в среде инкубации А (*a*, *в* и *г*) и Б (*б*). Кривые на *a* и *б*: 1 – без добавок, 2 – 25 мкМ ГПК, 3 – 50 мкМ ГПК, 4 – 3 мМ MgCl₂ + 50 мкМ ГПК. Кривые на *в*: 1 – 15 мкМ пальмитиновой кислоты, 2 – 3 мМ MgCl₂ + 15 мкМ пальмитиновой кислоты. Кривые на *г*: 1 – 40 мкМ ГДК, 2 – 3 мМ MgCl₂ + 40 мкМ ГДК. Условия опыта и состав сред инкубации А и Б описаны в разделе “Материалы и методы”. Концентрация митохондриального белка в кювете – 0.5 мг/мл. MgCl₂ был добавлен в кювету сразу после внесения митохондрий (не показано). На каждом из рисунков представлены данные типичного эксперимента, полученные на одном препарате митохондрий. В каждом случае аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах.

державшей ионы калия и Трис, можно рассматривать как результат протонного эффекта ГПК в сочетании с усилением транспорта K⁺ и, возможно, катионов Трис в матрикс. Следует отметить, что ГПК, как и пальмитиновая кислота, способна перемещаться через фосфолипидную бислоюную мембрану по механизму флип-флоп [28]. Можно предположить, что рассматриваемые эффекты ГПК обусловлены циклическим транспортом этой жирной кислоты из межмембранного пространства в матрикс в виде нейтрального комплекса аниона с K⁺ или H⁺ и в обратном направлении в виде свободного аниона. Выявление способствующих этому процессу переносчиков

внутренней мембраны митохондрий – задача последующих исследований.

В следующих опытах изучено влияние ГДК и ГПК на генерацию H₂O₂ митохондриями печени. Эффекты этих жирных кислот сравнивали с действием пальмитиновой кислоты – известного ингибитора образования H₂O₂ [5, 9]. Как уже отмечалось, митохондрии сердца, энергизованные путем окисления сукцината, наиболее интенсивно генерируют H₂O₂ в условиях обратного транспорта электронов, и скорость этого процесса существенно снижается ротеноном [1, 2, 5, 9–12]. В наших условиях скорость генерации H₂O₂ митохондриями печени, энергизованными путем

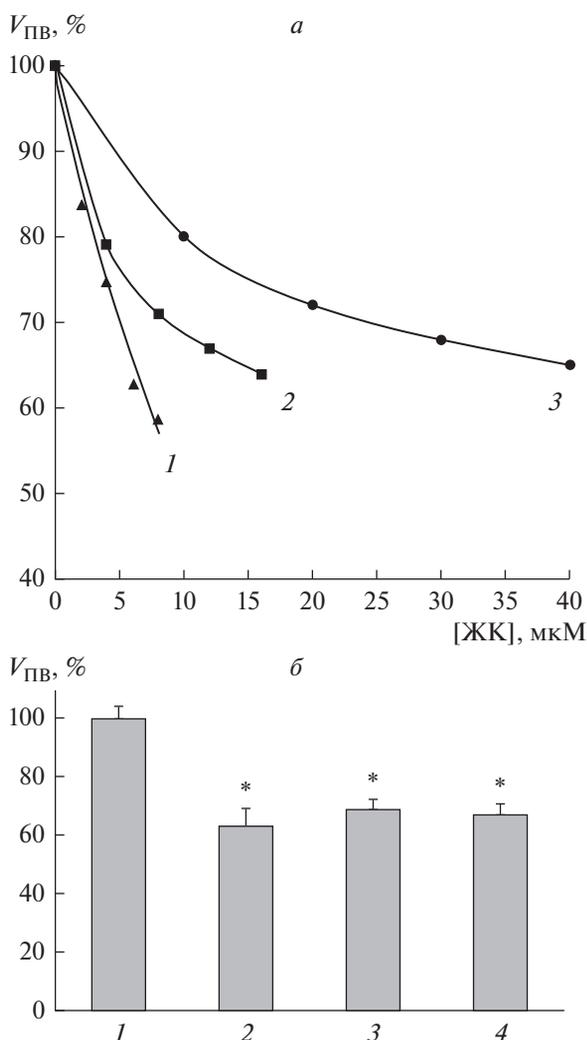


Рис. 4. а – Зависимость относительной скорости генерации пероксида водорода ($V_{\text{ПВ}}$, %) в митохондриях печени, инкубируемых без ротенона, от концентрации жирной кислоты (ЖК): пальмитиновой (1, ▲), ГПК (2, ■) и ГДК (3, ●). Представлены данные типичных экспериментов, полученные на одном препарате митохондрий. Для каждой ЖК аналогичные результаты были получены еще в двух независимых экспериментах. б – Относительная скорость генерации пероксида водорода ($V_{\text{ПВ}}$, %) в митохондриях печени, инкубируемых с ротеноном, в отсутствие (1) и в присутствии: 8 мкМ пальмитиновой кислоты (2), 16 мкМ ГПК (3) и 40 мкМ ГДК (4). Условия опыта и состав среды инкубации А описаны в разделе “Материалы и методы”. На диаграммах приведены средние значения \pm стандартная ошибка среднего ($n = 3-5$). * – различия между данными опытов (присутствие жирных кислот) и контролем (их отсутствие) статистически значимы, $p < 0.01$ (критерий Стьюдента).

окисления сукцината, без ротенона и в его присутствии (6 нмоль на 1 мг белка) составляет, соответственно, 622 ± 41 ($n = 5$) и 310 ± 14 ($n = 7$) пмоль H_2O_2 /мин на 1 мг белка. Следовательно, ингибирование обратного транспорта электронов ротеноном в митохондриях печени приводит к умень-

шению скорости генерации H_2O_2 в 2 раза, что соответствует опубликованным данным [39].

В отсутствие ротенона, т.е. в условиях обратного транспорта электронов, пальмитиновая кислота уже в концентрациях 6 и 8 мкМ (30 и 40 нмоль на 1 мг белка) ингибирует генерацию H_2O_2 митохондриями печени на 40% (рис. 4а, кривая 1). ГПК приблизительно в той же степени ингибирует генерацию H_2O_2 митохондриями при более высоких концентрациях – 12 и 16 мкМ (60 и 80 нмоль на 1 мг белка) (рис. 4а, кривая 2). Аналогичный эффект ГДК наблюдается при концентрациях 30 и 40 мкМ (150 и 200 нмоль на 1 мг белка) (рис. 4а, кривая 3). В присутствии ротенона, т.е. при ингибировании обратного транспорта электронов, пальмитиновая кислота, ГПК и ГДК в концентрациях 8, 16 и 40 мкМ, соответственно, также снижают генерацию H_2O_2 митохондриями печени (рис. 4б).

Как показано выше (рис. 1), пальмитиновая кислота уже в концентрации 30 мкМ (25 нмоль на 1 мг белка) эффективно стимулирует дыхание митохондрий (в 2.4 раза) и снижает $\Delta\psi$; ГПК в концентрации 60 мкМ (50 нмоль на 1 мг белка) также эффективно стимулирует дыхание митохондрий (в 3.5 раза) и снижает $\Delta\psi$. В отличие от этого стимуляция дыхания митохондрий ГДК даже в концентрации 200 мкМ (167 нмоль на 1 мг белка) в 3.4 раза не сопровождается снижением $\Delta\psi$ (рис. 1). Как уже отмечалось, такое действие ГДК как “десопрягающего” агента может быть обусловлено переключением комплексов дыхательной цепи на холостой режим работы, при котором транспорт электронов не сопровождается векторным переносом H^+ из матрикса в межмембранное пространство [13, 24–27]. Наши представления о действии ГПК и ГДК как ингибиторов генерации АФК в митохондриях иллюстрирует рис. 5. В целом, результаты проведенных исследований позволяют предположить, что ингибирование генерации H_2O_2 в митохондриях печени может быть обусловлено стимуляцией дыхания как протонофорными и ионофорными разобщителями, так и “десопрягающими” агентами, и, следовательно, может быть не связано со снижением $\Delta\psi$.

Суммируя полученные данные, можно сделать следующие выводы.

1. Продукты ω -окисления пальмитиновой кислоты – ГПК и ГДК, стимулируют дыхание изолированных митохондрий печени в состоянии 2 различными путями. ГПК стимулирует дыхание и снижает $\Delta\psi$ в митохондриях в той же степени, как пальмитиновая кислота и классические протонофорные разобщители. Такое ее действие обусловлено сочетанием протонофорного эффекта с усилением транспорта K^+ и, возможно, катионов Трис в матрикс. В отличие от этого эффекта, стимуляция дыхания митохондрий ГДК не сопро-

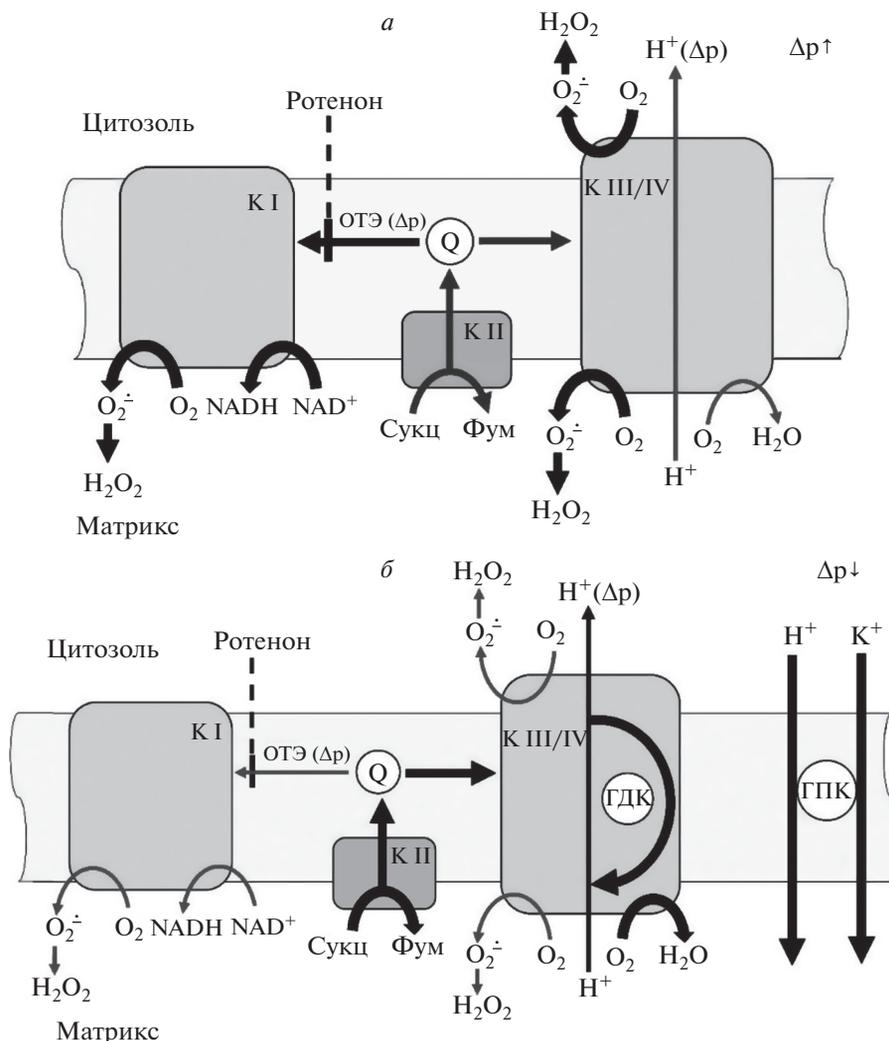


Рис. 5. Гипотетическая схема, иллюстрирующая ингибирование ГПК и ГДК генерации H_2O_2 в митохондриях печени. *а* – При окислении сукцината (Сукц) в fumarат (Фум) в дыхательной цепи митохондрий электроны передаются на кофермент Q и далее на комплексы III и IV (КIII/IV) с последующим восстановлением O_2 до H_2O . С этим процессом сопряжен векторный перенос H^+ приводящий к генерации протондвижущей силы (Δp). В отсутствие синтеза АТФ и небольшой утечки H^+ Δp -зависимый обратный транспорт электронов (ОТЭ) от кофермента Q к комплексу I (КИ) приводит к восстановлению NAD^+ до NADH . Этот процесс блокируется ротеноном. Вследствие гипервосстановленности переносчиков электронов комплексов I и III происходит одноэлектронное восстановление O_2 до $\text{O}_2^{\cdot-}$. Известно, что $\text{O}_2^{\cdot-}$, образующийся в комплексе I, освобождается в матрикс, а в комплексе III – в матрикс и в межмембранное пространство и быстро превращается в H_2O_2 при участии соответствующих супероксиддисмутаз [9, 10]. *б* – ГПК, действуя как протонфорный разобщитель, а также содействуя транспорту K^+ и, возможно, tris^+ в матрикс, вызывает снижение Δp , что сопровождается увеличением скорости транспорта электронов от кофермента Q до O_2 и уменьшением скорости ОТЭ. Это, как известно [9, 10, 12], приводит к снижению восстановленности переносчиков электронов и, вследствие этого, к ингибированию генерации $\text{O}_2^{\cdot-}$. ГДК, не вызывая снижения Δp , переключает комплексы III и IV на холостой режим работы (на КIII/IV петля обратного транспорта H^+). Это сопровождается увеличением скорости транспорта электронов от кофермента Q до O_2 и уменьшением скорости ОТЭ, а также снижением восстановленности переносчиков электронов и ингибированием генерации $\text{O}_2^{\cdot-}$.

вождается снижением $\Delta\psi$ и подавляется 10 мкМ циклоспорином А. ГДК рассматривается как “де-сопрягающий” агент, переключающий комплексы дыхательной цепи митохондрий на холостой режим работы.

2. Пальмитиновая кислота, ГДК и ГПК в концентрациях, приблизительно в равной степени стимулирующих дыхание митохондрий в состоянии 2, одинаково эффективно ингибируют образование H_2O_2 . Ингибирующие эффекты этих

жирных наблюдаются как в отсутствие ротенона (при наличии энергозависимого обратного переноса электронов комплексом I от сукцината), так и в присутствии его (при условии транспорта электронов только от сукцината до кислорода). Предполагается, что эффекты указанных жирных кислот как ингибиторов генерации H₂O₂ в митохондриях печени обусловлены стимуляцией дыхания различными путями и могут быть не связаны со снижением Δψ.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации (№ МК-61.2019.4) и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (№ 17.4999.2017/8.9).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Skulachev V.P. 1998. Uncoupling: New approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta.* **1363**, 100–124.
2. Скулачев В.П., Богачев А.В., Каспаринский Ф.О. 2010. *Мембранная биоэнергетика*. М.: Изд-во Московского университета. 368 с.
3. Мохова Е.Н., Хайлова Л.С. 2005. Участие анионных переносчиков внутренней мембраны митохондрий в разобщающем действии жирных кислот. *Биохимия.* **70**, 197–202.
4. Egnatchik R.A., Leamy A.K., Noguchi Y., Shiota M., Young J.D. 2014. Palmitate-induced activation of mitochondrial metabolism promotes oxidative stress and apoptosis in H4ПЕС3 rat hepatocytes. *Metabolism.* **63**, 283–295.
5. Severin F.F., Severina I.I., Antonenko Y.N., Rokitskaya T.I., Cherepanov D.A., Mokhova E.N., Vysokikh M.Y., Pustovidko A.V., Markova O.V., Yaguzhinsky L.S., Korshunova G.A., Sumbatyan N.V., Skulachev M.V., Skulachev V.P. 2010. Penetrating cation/fatty acid anion pair as a mitochondria-targeted protonophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 663–668.
6. Samartsev V.N., Smirnov A.V., Zeldi I.P., Markova O.V., Mokhova E.N., Skulachev V.P. 1997. Involved of aspartate/glutamate antiporter in fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **1339**, 251–257.
7. Самарцев В.Н., Марчик Е.И., Шамагулова Л.В. 2011. Свободные жирные кислоты как индукторы и регуляторы разобщения окислительного фосфорилирования в митохондриях печени при участии АDP/АТФ- и аспаргат/глутаматного антипортеров. *Биохимия.* **76**, 264–273.
8. Самарцев В.Н., Дубинин М.В., Адакеева С.И., Рыбакова С.Р., Марчик Е.И. 2014. Кальций-независимая разобщающая активность пальмитиновой кислоты в митохондриях печени регулируется потоками ионов, вызывающими взаимопревращение ΔΨ и ΔpH на внутренней мембране. *Биол. мембраны.* **31**, 252–262.
9. Schönfeld P., Wojtczak L. 2008. Fatty acids as modulators of the cellular production of reactive oxygen species. *Free Rad. Biol. Med.* **45**, 231–241.
10. Cadenas S. 2018. Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta. Bioenerg.* **1859**, 940–950.
11. Korshunov S.S., Korkina O.V., Ruuge E.K., Skulachev V.P., Starkov A.A. 1998. Fatty acids as natural uncouplers preventing generation of O₂^{•-} and H₂O₂ by mitochondria in the resting state. *FEBS Lett.* **435**, 215–218.
12. Андреев А.Ю., Кушнарева Ю.Е., Мерфи А.Н., Старков А.А. 2015. Митохондриальный метаболизм активных форм кислорода: десять лет спустя. *Биохимия.* **80**, 612–630.
13. Адакеева С.И., Дубинин М.В., Самарцев В.Н. 2015. Малонат как ингибитор индуцированного жирными кислотами циклоспорин А-чувствительного кальций-независимого свободного окисления в митохондриях печени. *Биол. мембраны.* **32**, 41–51.
14. Knottnerus S.J.G., Bleeker J.C., Wüst R.C.I., Ferdinandusse S., IJlst L., Wijburg F.A., Wanders R.J.A., Visser G., Houtkooper R.H. 2018. Disorders of mitochondrial long-chain fatty acid oxidation and the carnitine shuttle. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **19**, 93–106.
15. Longo N., Frigeni M., Pasquali M. 2016. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim. Biophys. Acta.* **1863**, 2422–2435.
16. Wanders R.J., Komen J., Kemp S. 2011. Fatty acid omega-oxidation as a rescue pathway for fatty acid oxidation disorders in humans. *FEBS J.* **278**, 182–194.
17. Kim D., Cha G.S., Nagy L.D., Yun C.H., Guengerich F.P. 2014. Kinetic analysis of lauric acid hydroxylation by human cytochrome P450 4A11. *Biochemistry.* **53**, 6161–6172.
18. Hardwick J.P. 2008. Cytochrome P450 omega hydroxylase (CYP4) function in fatty acid metabolism and metabolic diseases. *Biochem. Pharmacol.* **75**, 2263–2275.
19. Ribel-Madsen A., Ribel-Madsen R., Brøns C., Newgard C.B., Vaag A.A., Hellgren L.I. 2016. Plasma acylcarnitine profiling indicates increased fatty acid oxidation relative to tricarboxylic acid cycle capacity in young, healthy low birth weight men. *Physiol. Rep.* **4**, e12977.
20. Orellana M., Rodrigo R., Valdes E. 1998. Peroxisomal and microsomal fatty acid oxidation in liver of rats after chronic ethanol consumption. *Gen. Pharmacol.* **31**, 817–820.
21. Reddy J.K. 2001. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. III. Peroxisomal beta-oxidation, PPAR alpha, and steatohepatitis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **281**, 1333–1339.
22. Glasgow J.F., Middleton B. 2001. Reye syndrome—insights on causation and prognosis. *Arch. Dis. Child.* **85**, 351–353.
23. Tonsgard J.H. 1986. Serum dicarboxylic acids in patients with Reye syndrome. *J. Pediatr.* **109**, 440–445.
24. Маркова О.В., Бондаренко Д.И., Самарцев В.Н. 1999. Опосредованное анионными переносчиками разобщающее действие дикарбоновых жирных кислот зависит от расположения второй карбоксильной группы. *Биохимия.* **64**, 679–685.
25. Рыбакова С.Р., Дубинин М.В., Самарцев В.Н. 2013. Особенности активации свободного окисления в митохондриях печени α, ω-тетрадекандиоловой кислотой. *Биол. мембраны.* **30**, 30–39.
26. Terada H., Shima O., Yoshida K., and Shinohara Y. 1990. Effects of the local anesthetic bupivacaine on oxidative phosphorylation in mitochondria. Change from

- decoupling to uncoupling by formation of a leakage type ion pathway specific for H⁺ in cooperation with hydrophobic anions. *J. Biol. Chem.* **265**, 7837–7842.
27. Papa S., Lorusso M., Di Paola M. 2006. Cooperativity and flexibility of the protonmotive activity of mitochondrial respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta.* **1757**, 428–436.
 28. Jezek P., Modriansky M., Garlid K.D. 1997. Inactive fatty acids are unable to flip-flop across the lipid bilayer. *FEBS Lett.*, **408**, 161–165.
 29. Kamo N., Muratsugu M., Hondoh R., Kobatake Y. 1979. Membrane potential of mitochondria measured with an electrode sensitive to tetraphenylphosphonium and relationship between proton electrochemical potential and phosphorylation potential in steady state. *J. Membr. Biol.* **49**, 105–121.
 30. Brown G.C., Brand M.D. 1988. Proton/electron stoichiometry of mitochondrial complex I estimated from the equilibrium thermodynamic force ratio. *Biochem. J.* **252**, 473–479.
 31. Schönfeld P., Schild L., Kunz W. 1989. Long-chain fatty acids act as protonophoric uncouplers of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* **977**, 266–272.
 32. Shinohara Ya., Unami A., Teshima M., Nishida H., van Dam K., Terada H. 1995. Inhibitory effect of Mg²⁺ on the protonophoric activity of palmitic acid. *Biochim. Biophys. Acta.* **1228**, 229–234.
 33. Bernardi P. 1999. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* **79**, 1127–1155.
 34. Самарцев В.Н., Пайдыганов А.П., Полищук Л.С., Зельди И.П. 2004. Изучение разобщающего действия жирных кислот в митохондриях печени при различных рН среды инкубации. *Биол. мембраны.* **21**, 39–45.
 35. Samartsev V.N., Mokhova E.N. 1997. ADP/ATP antiporter- and aspartate/glutamate antiporter-mediated fatty acid-induced uncoupling of liver mitochondria. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **42**, 29–34.
 36. Миронова Г.Д., Качаева Е.В., Копылов А.Т. 2007. Митохондриальный АТФ-зависимый калиевый канал. I. Структура канала, механизмы его функционирования и регуляции. *Вестник РАМН.* **2**, 34–43.
 37. Szabo I., Zoratti M. 2014. Mitochondrial channels: Ion fluxes and more. *Physiol. Rev.* **94**, 519–608.
 38. Dubinin M.V., Samartsev V.N., Stepanova A.E., Khoroshavina E.I., Penkov N.V., Yashin V.A., Starinets V.S., Mikheeva I.B., Gudkov S.V., Belosludtsev K.N. 2018. Membranotropic effects of ω-hydroxypalmitic acid and Ca²⁺ on rat liver mitochondria and lecithin liposomes. Aggregation and membrane permeabilization. *J. Bioenerg. Biomembr.* **50**, 391–401.
 39. Schönfeld P., Wojtczak L. 2007. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse electron transport but increase it at the forward transport. *Biochim Biophys Acta.* **1767**, 1032–1040.

ω-Hydroxypalmitic and α,ω-Hexadecanedioic Acids As Activators of Free Respiration and Inhibitors of H₂O₂ Generation in Liver Mitochondria

A. A. Semenova¹, V. N. Samartsev¹, S. I. Pavlova¹, M. V. Dubinin^{1,*}

¹Mari State University, pl. Lenina, 1, Yoshkar-Ola, 424001 Russia

*e-mail: dubinin1989@gmail.com

The effects of palmitic acid (PA) and the products of its ω-oxidation – ω-hydroxypalmitic acid (HPA) and α, ω-hexadecanedioic acid (HDA) – on respiration in the absence of ATP synthesis and on the H₂O₂ generation were studied on isolated liver mitochondria energized by oxidation of succinate. It was shown that HPA stimulates respiration and reduces the difference in electrical potentials (Δψ) in mitochondria to the same extent as is typical for PA and classical protonophore uncouplers. Under similar conditions, the stimulation of mitochondrial respiration by HDA is not accompanied by a decrease in Δψ and is suppressed by 10 μM cyclosporin A. In this regard, HDA is considered as a “decoupling” agent that switches the complexes of the mitochondrial respiratory chain to the idle mode. It was established that in the presence of 20 mM potassium chloride in the sucrose incubation medium, stimulation of respiration by HPA (in contrast to PA and HDA) is suppressed by 60% in the case of pre-incubation with 3 mM magnesium chloride. We found that under these conditions, HPA at a concentration of 25 μM and above induces mitochondrial swelling, which is completely suppressed by magnesium chloride. HPA as an inducer of mitochondrial swelling is less efficient in the absence of potassium chloride than in its presence. We assume that, in contrast to PA and HDA, HPA produces its activating influence on free respiration in mitochondria owing to a combination of its ionophore and protonophore effects. It was established that PA, HDA, and HPA in concentrations equally stimulating respiration of mitochondria in state 2 are equally efficient in inhibiting the H₂O₂ generation. We conclude that the effects of these fatty acids as inhibitors of H₂O₂ generation in isolated liver mitochondria are due to stimulation of respiration in various ways and are not associated with a decrease in Δψ.

Keywords: mitochondria, uncoupling, free respiration, α,ω-hexadecanedioic acid, ω-hydroxypalmitic acid, reactive oxygen species