

А. Н. Вечорко, В. М. Масловская

ВЛИЯНИЕ ПРИРОДНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ IN VITRO

Научный руководитель: канд. мед. наук, доц. Е. А. Девина,

Кафедра биологической химии,

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

Резюме. В работе приведены данные, подтверждающие выраженное влияние кверцетина, эпигаллокатехин галлата, ресвератрола и куркумина на фагоцитарную активность альвеолярных макрофагов. Экспериментально доказано влияние данных полифенольных соединений на содержание пероксида водорода, нитрит ионов и активность каталазы в альвеолярных макрофагах.

Ключевые слова: альвеолярные макрофаги, полифенольные соединения, фагоцитарная активность, антиоксидантное действие.

Resume. The research contains data confirming the pronounced influence of quercetin, epigallocatechin gallate, resveratrol and curcumin on the phagocytic activity of alveolar macrophages. The influence of these polyphenolic compounds on the content of hydrogen peroxide, ion nitrite and catalase activity in alveolar macrophages has been experimentally proved.

Keywords: alveolar macrophages, polyphenolic compounds, phagocytic activity, antioxidative effect.

Актуальность. Альвеолярные макрофаги (АМ) относятся к клеточным факторам местной защиты дыхательной системы. Основная функция АМ – поглощение и обезвреживание чужеродного материала. АМ, действуя как фагоциты, продуцируют активные формы кислорода и азота, секретируют биологически активные соединения, которые участвуют в иммунных и воспалительных реакциях [8]. В настоящее время весьма актуален поиск и исследование соединений, способных воздействовать на функциональную активность клеток легких. Особым вниманием исследователей пользуются полифенольные соединения, обладающие выраженным фармакологическим действием [7]. Однако, механизмы действия полифенолов на клетки легких все еще остаются не до конца выясненными.

Цель: Изучить влияние кверцетина, эпигаллокатехин галлата (ЭГКГ), ресвератрола и куркумина на функциональную активность альвеолярных макрофагов in vitro.

Задачи:

1. Экспериментально оценить влияние кверцетина, ЭГКГ, ресвератрола и куркумина на фагоцитарную активность АМ in vitro.
2. Определить способность АМ к генерации активных форм кислорода и оксида азота при их инкубации с кверцетином, ЭГКГ, ресвератролом и куркумином.
3. Определить влияние кверцетина, ЭГКГ, ресвератрола и куркумина на активность каталазы в АМ.

Материал и методы. Альвеолярные макрофаги получали из бронхоальвеолярной лаважной жидкости крыс. Клеточную суспензию высевали на чашки Петри в концентрации $2,0 \times 10^6$ АМ. Для изучения влияния полифенолов на АМ, их инкубировали в течение 1 часа в питательной среде Игла с кверцетином, куркумином, ресвератролом, эпигаллокатехин галлатом (концентрация 10^{-5} моль/л) в CO_2 -инкубаторе (температура 37°C , увлажненная атмосфера, 5% CO_2) [5, 6, 7]. Активность фагоцитоза изучали путем добавления бактериальной суспензии *Staphylococcus aureus* ($500 \times$

10⁶/мл). Определяли фагоцитарный показатель (ФП) – процент фагоцитирующих клеток из общего количества АМ и фагоцитарное число (ФЧ) – среднее число микроорганизмов, поглощенных одним активным АМ. Генерацию активных форм кислорода и азота оценивали путем спектрофотометрического определения концентрации Н₂О₂ и нитрит-ионов в АМ и среде инкубации [1, 4]. Активность каталазы измеряли методом комплексообразования с солями молибдена. Статистический анализ проводили непараметрическими методами. Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. Различия между группами выявляли с помощью U-теста Манна-Уитни. Данные считались статистически достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Способность АМ поглощать чужеродный материал микробной и немикробной природы характеризует их фагоцитарную функцию. Установлено, что инкубация АМ с ЭГКГ достоверно увеличивала фагоцитарную активность АМ (рисунок 1). Еще более выраженное влияние на фагоцитарную активность АМ оказывал куркумин. ФП был выше контрольного значения на 22%. Степень увеличения не зависела от длительности инкубации клеток. Стимулирующее влияние куркумина на фагоцитарную активность АМ наблюдали и другие исследователи. Так, Fiala M. и соав. показали, что бисдиметоксикуркумин стимулировал фагоцитоз β -амилоида макрофагами у пациентов с болезнью Альцгеймера [3]. Напротив, при инкубации клеток с кверцетином или ресвератролом наблюдалось снижение фагоцитарной активности. ФП в обоих случаях был снижен, в среднем на 13%, по сравнению с клетками, которые инкубировались без кверцетина или ресвератрола.

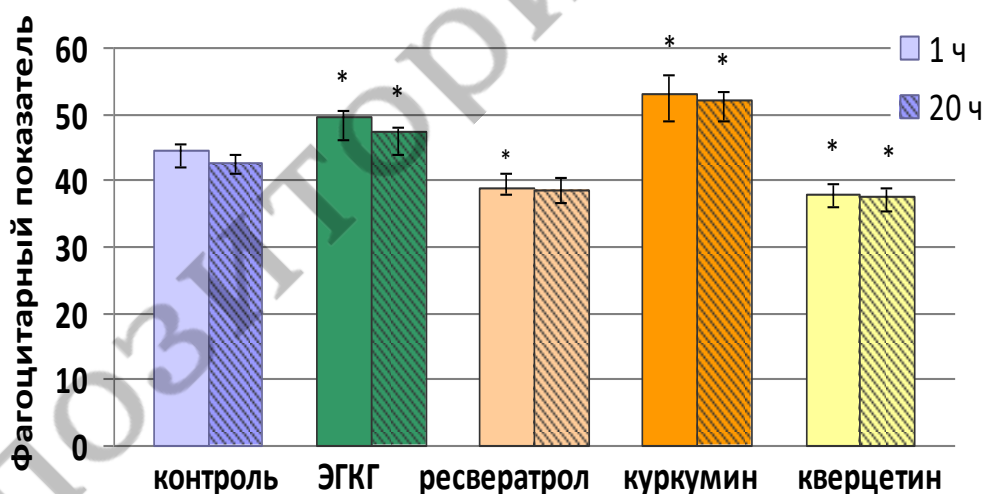


Рисунок 1 – Диаграмма влияния полифенольных соединений на фагоцитарный показатель

Количество поглощенных микроорганизмов достоверно увеличивалось только при кратковременной инкубации АМ с ЭГКГ. В то время как в присутствии куркумина ФЧ было выше контрольного значения и при кратковременной, и при длительной инкубации. В присутствии ресвератрола и кверцетина количество поглощенных микроорганизмов уменьшилось в 1,5 раза, при этом степень снижения не зависла от длительности инкубации.

Фагоцитирующие клетки продуцируют активные формы кислорода (АФК) и оксид азота (NO). В АМ оксид азота синтезируется из L-аргинина под влиянием 2

изоформ NO-синтаз (NOS), эндотелиальной – eNOS и индуцибельной – iNOS. Оксид азота играет важную роль в поддержании местного иммунного гомеостаза респираторного тракта. NO участвует в неспецифической защите от патогенных факторов, торможении агрегации тромбоцитов, улучшении местного кровообращения [2]. Нами установлено, что исследуемые полифенолы оказывали влияние на концентрацию нитрит-ионов (конечный окисленный продукт метаболизма NO). В макрофагах, которые инкубировались с кверцетином, ЭГКГ, ресвератролом и куркумином уровень нитрит-ионов был существенно ниже контрольного значения не зависимо от продолжительности инкубации (таблица 1).

Таблица 1. Влияние полифенольных соединений на концентрацию нитрит-ионов в АМ

Условия инкубации 1 час					
Показатель	Контроль	ЭГКГ	Ресвератрол	Куркумин	Кверцетин
NO ₂ ⁻ , нмоль/10 ⁶ клеток	4,26 3,76–4,61	3,24* 2,89–3,53	3,35* 2,95–3,61	3,28* 3,00–3,56	3,33* 3,05–3,65
Условия инкубации 20 час					
NO ₂ ⁻ , нмоль/10 ⁶ клеток	8,84 8,66–9,12	6,38* 5,54–6,72	5,78* 5,38–6,14	6,12 5,88–6,50	7,14 6,84–7,38

Примечание: * – $p \leq 0,05$.

Как известно, полифенолы могут взаимодействовать с NO или ингибировать индуцибельную NO-синтазу. В частности, было показано, что полифенольные соединения уменьшают в макрофагах экспрессию iNOS, индуцированную липополисахаридами, посредством торможения связывания фактора транскрипции NF-κB, который контролирует индукцию экспрессии генов iNOS [9]. Видимо, поэтому мы наблюдали снижение концентрации нитрит-ионов в АМ. Это снижение можно рассматривать как неблагоприятный фактор, способствующий развитию воспалительного процесса в легочной ткани.

Также установлено, что куркумин, ресвератрол, эпигаллокатехин галлат и кверцетин в концентрации 10⁻⁵ моль/л оказывали выраженное антиоксидантное действие, которое проявлялось в снижении концентрации H₂O₂ в АМ и среде инкубации, по сравнению с интактными клетками (рисунок 2). Наблюдаемое нами уменьшение концентрации H₂O₂, по всей вероятности, связано с потенциальной способностью полифенольных соединений улавливать свободные радикалы. Показано, например, что в присутствии ресвератрола снижается продукция супероксидных анион радикалов (O₂⁻) и H₂O₂ в перитонеальных макрофагах, стимулированных липополисахаридом. Аналогичное явление имело место и в наших экспериментах.

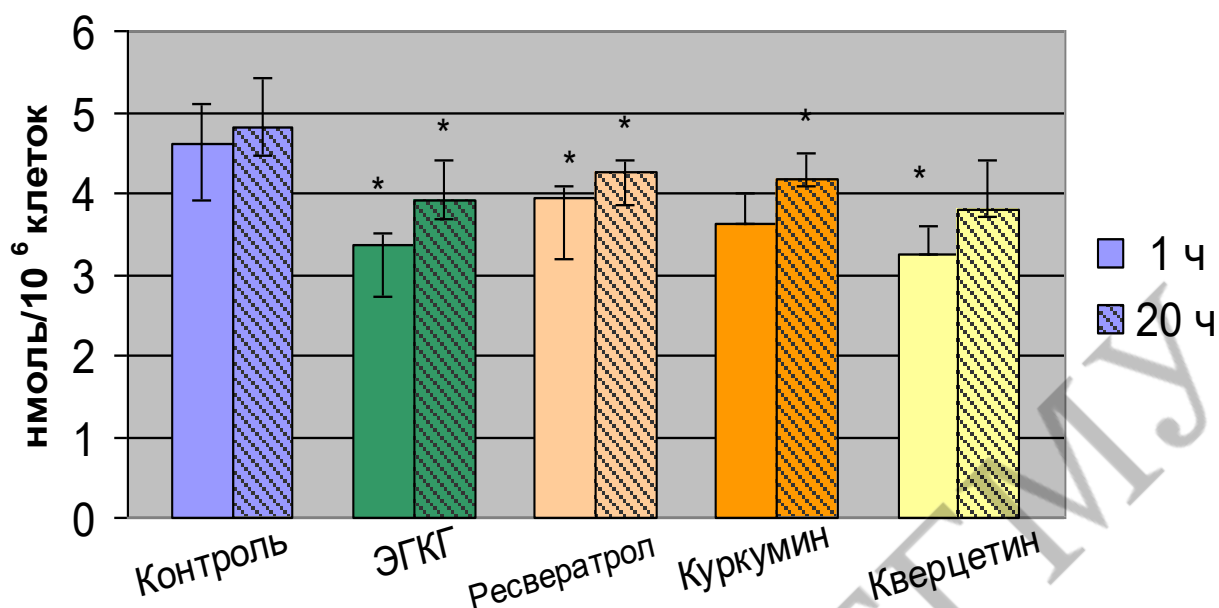


Рисунок 2 – Диаграмма влияния полифенольных соединений на концентрацию H₂O₂ в АМ

Полученные нами результаты, показали как при кратковременной (1ч), так и длительной инкубации (20ч) АМ с ЭГКГ и куркумином увеличение активности каталазы - фермента, который катализирует разложение пероксида водорода на воду и молекулярный кислород (таблица 2). В то же время ресвератрол увеличивал активность каталазы только при кратковременной инкубации с АМ.

Таблица 2. Влияние полифенольных соединений на активность каталазы в АМ

Условия инкубации 1 час					
Показатель	Контроль	ЭГКГ	Ресвератрол	Куркумин	Кверцетин
Каталаза, мЕ/мг белка	112,0 108,0–125,4	129,7* 128,4–134,1	139,5* 128,9–148,5	137,0* 122,3–145,0	109,3* 98,9–127,2
Условия инкубации 20 час					
Каталаза, мЕ/мг белка	114,0 104,0–123,0	133,5* 126,0–142,0	101,5* 99,8–114,5	137,0* 134,0–140,0	81,4* 76,5–99,1

Примечание: * – $p \leq 0,05$.

Напротив, кверцетин не оказывал влияние на активность каталазы при кратковременной инкубации, а при инкубации в течение 20ч вообще снижал каталазную активность.

Полученные данные заставили обратить внимание на различия эффектов исследуемых полифенольных соединений и позволили сформулировать выводы.

Выводы:

1 Фагоцитарная активность альвеолярных макрофагов повышается при инкубации с куркумином и эпигаллокатехин галлатом, тогда как ресвератрол и кверцетин угнетают эту функцию.

2 Влияние куркумина, ресвератрола, эпигаллокатехин галлата и кверцетина в концентрации 10^{-5} моль/л проявляется в антиоксидантном действии: снижении концентрации пероксида водорода и нитрит-ионов в среде инкубации и в альвеолярных макрофагах.

3 Активность каталазы в альвеолярных макрофагах повышается при инкубации с куркумином, ресвератролом и ЭГКГ, в то время как кверцетин снижает ее.

A. N. Vechorko, V. M. Maslovskaya

INFLUENCE OF NATURAL POLYPHENOLS ON FUNCTIONAL ACTIVITY OF ALVEOLAR MACROPHAGES IN VITRO

Tutor: assistant professor E. A. Devina,

*Department of Biological Chemistry,
Belarusian State Medical University, Minsk*

Литература

1. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids / L.C. Green [et al] // *Anal. Biochem.*, 1982. – Vol. 126. – P. 131–138.
2. Connelly, L. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression / **L. Connelly** // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. **278**. – P. 26480–26487.
3. Fiala, M. Innate immunity and transcription of MGAT-III and Toll-like receptors in Alzheimer's disease patients are improved by bisdemethoxycurcumin / M. Fiala, P. Liu // *PNAS*. – 2007. – Vol. 104, № 31. – P. 12849–12854.
4. Gallati, H. Horseradish peroxidase: kinetic studies and optimization of peroxidase activity determination using the substrates H_2O_2 and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine / H. Gallati, I. Pracht // *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* – 1985. – Vol. 23, № 8. – P. 453–460.
5. Gao, X. Immunomodulatory activity of curcumin: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production in vitro / X. Gao, J. Kuo, H. Jiang // *Biochem. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 68, № 1. – P. 51–61.
6. Kunwar, A. Curcumin mediates time and concentration dependent regulation of redox homeostasis leading to cytotoxicity in macrophage cells / A. Kunwar, K. Santosh // *Evr. J. of Pharmacol.* – 2009. – Vol. 611. – P. 8–16.
7. Rahman, I. Dietary polyphenols mediated regulation of oxidative stress and chromatin remodeling in inflammation / I. Rahman // *Nutr. Rev.* – 2008. – Vol. 66. – P. S42–S45.
8. Reactive oxygen species and the lung / C.E. Cross [et al.] // *The Lancet*. – 1994. – Vol. 344. – P. 930–933.
9. Wadsworth, T.L. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages / T.L. Wadsworth, D.R. Koop // *Biochem. Pharmacol.* – 1999. – Vol. 57, № 8. – P. 941–949.