
КЛЕТОЧНАЯ БИОЛОГИЯ И ФИЗИОЛОГИЯ

CELL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

УДК 577.3;615.31;616-092

ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ И ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА РУТИНА С ДВУХВАЛЕНТНЫМ ЖЕЛЕЗОМ

А. И. ПОТАПОВИЧ¹⁾, Т. О. СУХАН¹⁾, О. А. АНТИПОВА²⁾, В. А. КОСТЮК¹⁾

¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт физиологии НАН Беларуси, ул. Академическая, 28, 220072, г. Минск, Беларусь

В экспериментах, выполненных в бесклеточных системах, показано, что хелатирование двухвалентного железа рутином приводит к появлению у образующегося комплекса (Рут – Fe) сайт-специфической псевдопероксидазной активности в отношении пероксида водорода, но не влияет на способность лиганда взаимодействовать с пероксинитритом. Противовоспалительные свойства рутина и комплекса Рут – Fe оценивали *in vitro* по степени ингибирования воспалительного ответа эндотелиальных клеток из пупочной вены человека (HUVEC), индуцированного

Образец цитирования:

Потапович АИ, Сухан ТО, Антипова ОА, Костюк ВА. Исследование антиоксидантной и противовоспалительной активности комплекса рутина с двухвалентным железом. *Журнал Белорусского государственного университета. Биология.* 2019;1:3–12.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-3-12>

For citation:

Potapovich AI, Suhan TO, Antipova OA, Kostyuk VA. Research of antioxidant and anti-inflammatory activity of rutine complex with bivalent iron. *Journal of the Belarusian State University. Biology.* 2019;1:3–12. Russian.
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2019-1-3-12>

Авторы:

Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Татьяна Олеговна Сухан – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Ольга Александровна Антипова – младший научный сотрудник лаборатории модуляции функций организма.

Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:

Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

pot-alla@rambler.ru

Tatyana O. Suhan, PhD (biology); senior researcher at the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

tanyasuhan@mail.ru

Olga A. Antipova, junior researcher at the laboratory of modulation of body functions.

mayuha@yandex.ru

Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), docent; head of the research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.

kostyuk@bsu.by

бактериальным липополисахаридом (ЛПС). Установлено, что комплекс Рут – Fe в дозе 50 мкмоль/л достоверно снижал уровень ЛПС-индуцированной экспрессии мРНК воспалительных медиаторов *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1* и *COX-2* и уровень секреции *IL-6* и *IL-8* в культуральную среду, тогда как Рут при той же концентрации был неэффективным. Эксперименты, выполненные *in vivo*, свидетельствуют, что предварительное введение комплекса Рут – Fe в дозе 12,5 мкмоль/кг существенно уменьшает ЛПС-индуцированную пирогенную реакцию у крыс линии Wistar. На основании полученных данных можно заключить, что связывание с двухвалентным железом усиливает антиоксидантные свойства рутина, приводит к появлению противовоспалительной активности и расширяет область его возможного фармакологического применения.

Ключевые слова: ЛПС; воспаление; цитокины; пероксинитрит; гипертермия; HUVEC; ROS.

RESEARCH OF ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF RUTINE COMPLEX WITH BIVALENT IRON

A. I. POTAPOVICH^a, T. O. SUHAN^a, O. A. ANTIPOVA^b, V. A. KOSTYUK^a

^aBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bInstitute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,
28 Akademičnaja Street, Minsk 220072, Belarus

Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

Studies using cell-free systems have shown that chelation of ferrous iron by rutin and formation of the complex (Rt – Fe) resulted in the appearance of site-specific pseudo-peroxidase activity against hydrogen peroxide, but does not affect the ligand's ability to interact with peroxynitrite. Anti-inflammatory properties of rutin (Rt) and its complex with ferrous iron were studied *in vitro* under conditions of bacterial lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in endothelial cells of the human umbilical vein (HUVEC). The Rt – Fe complex at a dose of 50 μmol/L was found to significantly reduce the level of LPS-induced mRNA expression of inflammatory mediators *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1* and *COX-2* and the level of secretion of *IL-6* and *IL-8* in the culture medium, while Rt under the same concentration was ineffective. Experiments performed *in vivo* indicate that prior administration of the Rt – Fe complex in a dose of 12.5 μmol/kg dramatically eliminated LPS-induced pyrogenic reaction of in Wistar rats. From the above data, it can be concluded that complexation with bivalent iron enhances of antioxidant properties of Rt, leads to appearance of anti-inflammatory activity and expands the area of its possible pharmacological use.

Key words: LPS; inflammation; cytokines; peroxynitrite; hyperthermia; HUVEC; ROS.

Введение

Септический шок, вызванный инфекционным агентом, представляет собой системный воспалительный ответ, который сопровождается массивным высвобождением медиаторов воспаления, может приводить к развитию синдрома полиорганной недостаточности и является одной из основных причин летальности в отделениях интенсивной терапии. Общепризнано, что повреждение сосудистого эндотелия при сепсисе – ключевой этап в развитии патологического процесса, поскольку именно эндотелий является связующим звеном между кровью и клетками паренхиматозных органов [1]. Под действием медиаторов воспаления эндотелиальные клетки активируются и продуцируют ряд биологически активных веществ, участвующих в реализации патологического процесса. Таким образом, повреждение эндотелия при сепсисе происходит не в результате прямого воздействия микроба и его токсинов, а вследствие гиперактивации систем макроорганизма, первоначально направленных против возбудителя. Окислительный стресс, развивающийся при дисбалансе между гиперобразованием оксидантов и возможностями антиоксидантной защитной системы, может рассматриваться в качестве возможной причины активации и дисфункции эндотелия. Как известно, активные формы кислорода (ROS) и азота (RNS) обладают множеством потенциально опасных эффектов, приводящих к гибели клеток, развитию воспаления и микроциркуляторной недостаточности [2]. По-видимому, при возникновении воспаления может быть эффективной антиоксидантная терапия, нормализующая функцию эндотелия в условиях сепсиса. С этой точки зрения природные полифенольные соединения (ППС) перспективны для противовоспалительной терапии, поскольку являются эффективными радикальными ловушками в отношении широкого спектра ROS и RNS [3]. Помимо прямого антирадикального действия, ППС

способны связывать ионы металлов с переменной валентностью (переходные металлы), образуя стабильные хелатные комплексы, что приводит к ингибированию образования свободных радикалов в реакции Фентона [3]. Комплексообразование с переходными металлами усиливает антирадикальную активность полифенолов в отношении супероксида и повышает их способность защищать клетки от окислительного стресса [4]. Кроме того, характерной особенностью комплексов ППС с переходными металлами является их супероксиддисмутирующая активность [5]. В связи с этим в последнее десятилетие растет интерес к изучению фармакологических эффектов комплексов полифенолов с переходными металлами [6].

В предыдущих работах нами показано, что рутин (Рут) образует устойчивый комплекс с Fe^{2+} , который обладает более сильной цитопротекторной активностью, чем свободный лиганд, и снижает уровень окислительного повреждения и гибели клеток, вызванных тиацетамидом в печени крыс [7].

В данном исследовании изучено влияние комплексообразования с двухвалентным железом на антиоксидантные свойства Рут и его способность оказывать противовоспалительное действие в условиях индуцированного липополисахаридом (ЛПС) воспаления *in vitro* в клетках линии HUVEC и *in vivo* у крыс линии Wistar.

Материалы и методы исследования

Реактивы. В работе применяли ЛПС из *Escherichia coli* 055 : B5, Рут, дигидрородамин 123 (DHR), трипсин, соли и растворители фирмы *Sigma-Aldrich* (Италия), изотонический фосфатный буфер (ИФБ), рН 7,4 (*Lonza*, Бельгия), антибиотики (*Gibco*, США). Комплекс Рут – Fe готовили в ИФБ путем смешивания лиганда и $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (молярное соотношение 1 : 1) и стерилизовали фильтрованием через фильтры 0,2 мкм. Кинетику образования комплекса и его устойчивость в культуральной среде оценивали спектрофотометрически.

Определение псевдопероксидазной сайт-специфической активности комплекса Рут – Fe. Способность катализировать гомолитическое расщепление H_2O_2 (реакция Фентона) изучалась с использованием спектрофотометрического подхода и выражалась количественно рассчитанной величиной скорости окисления лиганда образующимся гидроксильным радикалом.

Синтез пероксинитрита и анализ эффективности его поглощения. Пероксинитрит синтезировали из нитрита натрия и H_2O_2 [8]. Концентрацию исходного раствора пероксинитрита в 1 моль/л NaOH определяли спектрофотометрически, измеряя поглощение при 302 нм ($\epsilon = 1670$ (моль/л) $^{-1} \cdot$ см $^{-1}$). Рабочие концентрации готовились в 0,1 моль/л NaOH непосредственно перед применением. Для исследования эффективности поглощения пероксинитрита тестируемыми соединениями (ТС) был разработан конкурентный подход с использованием триптофана в качестве детектора. Реакционная смесь содержала 25 мкмоль/л триптофана, 50 мкмоль/л пероксинитрита и различные концентрации Рут и комплекса Рут – Fe в ИФБ. Окисление триптофана пероксинитритом контролировалось спектрофлуориметрически путем измерения интенсивности флуоресценции (возбуждение 295 нм, эмиссия 350 нм). Процент ингибирования окисления триптофана ТС рассчитывали по формуле

$$\frac{(TFx - TFpx) - (TFx - TFxp)}{TFx - TFpx} \cdot 100,$$

где TFx – флуоресценция триптофана в присутствии ТС; $TFpx$ – флуоресценция триптофана после добавления пероксинитрита и ТС (последний добавляли через 1 мин после пероксинитрита); $TFxp$ – флуоресценция триптофана после добавления ТС и пероксинитрита (последний добавляли через 1 мин после ТС).

Эффективность поглощения пероксинитрита исследуемыми соединениями оценивалась рассчитанными значениями эффективной дозы ($ЭД_{50}$) ТС, ингибирующей на 50 % пероксинитрит-индуцируемое окисление триптофана.

Общая схема проведения экспериментов *in vitro*. Культивировали эндотелиальные клетки из пупочной вены человека (HUVEC) (*Lonza*, Бельгия) в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO_2) в полной ростовой среде ЭРС (EGM-2 Bullet Kit, *Lonza*, Бельгия). Эксперименты проводились в 6-луночных планшетах на клетках четвертого – седьмого пересева. Исследуемые соединения Рут и Рут – Fe в дозе 10 или 50 мкмоль/л добавляли к клеткам одновременно с ЛПС (1 мкг/мл). Через 6 ч образцы среды и адгезивные клетки (на планшетах) замораживали при –80 °С.

Определение внутриклеточной продукции пероксинитрита. Внутриклеточную продукцию пероксинитрита определяли, используя флуоресцентный зонд DHR [9]. Высевали HUVEC в 96-луночные планшеты и после достижения полного монослоя к клеткам добавляли ЛПС (1 мкг/мл), DHR (10 мкмоль/л) и инкубировали в CO_2 -инкубаторе (37 °С, 5 % CO_2) в течение 60 мин. Взаимодействуя с пероксинитритом, DHR превращается во флуоресцентный продукт родамин 123 [10]. Флуоресценцию клеточного слоя (возбуждение 485 нм, эмиссия 535 нм) измеряли планшетным флуориметром.

Анализ экспрессии мРНК. Общая РНК была выделена из замороженных образцов HUVEC с помощью набора GenElute Mammalian Total RNA Kit (*Sigma-Aldrich*, Италия) в соответствии с инструкциями. Количество РНК в образцах определяли по поглощению при 260 нм. Реакция обратной транскрипции, в результате которой происходит перевод последовательности РНК в комплементарную ДНК (кДНК), проведена с использованием набора iScript cDNA Synthesis Kit (*Bio-Rad*, США) при 42 °С в течение 30 мин. Анализ экспрессии мРНК выполняли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени детектором Real-Time PCR Detector Chromo4 Four-Color (*Bio-Rad*, США). Реакционная смесь включала в себя интеркалирующий краситель SYBR Green (*Fermentas*, Литва), пассивный краситель ROX, термостабильную реакционную смесь Riality™, содержащую Taq-полимеразу, дНТФ, MgCl₂, ПЦР-буфер, праймеры и кДНК в количестве, эквивалентном 100 нг общей РНК. Реакции проводили в объеме 25 мкл в стандартных 96-луночных оптических планшетах (*Sarstedt AG*, Германия). Температурный профиль реакции: 95 °С – 15 с, 60 °С – 1 мин; 36 циклов. Специфичность амплификации определяли по кривой плавления. Результаты ПЦР оценивали с помощью сравнительного Ct-метода ($\Delta\Delta C_t$) согласно [11]. Экспрессию генов-мишеней нормализовали по стабильным генам β -актину и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназе (GAPDH) и представляли как относительное увеличение экспрессии в опытных клетках по сравнению с контрольными. Все праймеры были разработаны при помощи интернет-ресурса Primer-BLAST (NCBI): <http://ncbi.nlm.nih.gov> и синтезированы в Eurofins MWG Operon (Германия).

Анализ уровня секреции цитокинов. Уровень секреции цитокинов ИЛ-6, ИЛ-8 и MCP1 оценивали методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с помощью коммерческих наборов фирмы SABiosciences – Qiagen SpA (Италия) в соответствии с инструкцией. Для анализа использовали культуральную среду, которая была собрана через 6 ч после добавления ЛПС и хранилась при –80 °С.

Влияние комплекса Рут – Fe на ЛПС-индуцированную лихорадку у крыс *in vivo*. Эксперименты проведены на половозрелых крысах-самцах линии Wistar массой 210–250 г. В течение недели животных приучали к условиям эксперимента во избежание изменений температуры, вызванных стрессом. В ходе эксперимента боксы с животными помещали в температурную камеру Heater Scanner LE 5650 (*Panlab*, Испания) с поддерживаемой температурой 29–30 °С, что соответствует диапазону термонейтральности для крыс. Для измерения глубокой температуры в толстой кишке животных использовали медьконстантановые термодатчики (*World Precision Instruments, Inc.*, США). Рабочий спай одной термодатчики, смазанный вазелиновым маслом, через прямую кишку вводили в толстый кишечник на глубину 7 см от ануса [12]. Регистрацию глубокой температуры тела проводили с помощью аппаратно-программного комплекса Pico (Англия). Для моделирования лихорадочного ответа в эксперименте использовали ЛПС, который вводили внутривенно (в хвостовую вену) в дозе 100 мкг/кг в стерильном ИФБ. Для тестирования влияния Рут – Fe на ЛПС-индуцированную лихорадку у крыс за 20 мин до введения пирогена животным внутрибрюшинно вводили исследуемый комплекс в дозе 12,5 мкмоль/кг (7,6 мг/кг). Контрольным крысам вводили эквивалентные объемы стерильного ИФБ вместо исследуемого комплекса и ЛПС. Каждая экспериментальная группа состояла из 6 животных. Все эксперименты с крысами проводились в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных.

Статистическая обработка результатов. Полученные результаты обрабатывали с помощью стандартной компьютерной программы Excel. Статистические данные представлены в виде $M \pm SD$, где M – среднее арифметическое; SD – стандартное отклонение. Для оценки разницы между экспериментальными группами применяли t -критерий Стьюдента, значения $P < 0,05$ считались достоверными.

Результаты исследования

Способность комплекса Рут – Fe сайт-специфически катализировать разложение пероксида водорода, проявляя псевдопероксидазную активность. В настоящее время установлено, что комплексы двухвалентного железа с рядом низкомолекулярных лигандов, например ЭДТА, или нуклеотидами, катализируют реакцию Хабера – Вейса более эффективно, чем свободное железо. Образующиеся в результате данной реакции чрезвычайно реакционно-способные гидроксильные радикалы способны окислять практически все органические молекулы. Когда ионы металла связаны с лигандом, последний может стать ловушкой гидроксильных радикалов, т. е. имеет место биологически незначительная, сайт-специфическая реакция. В этом случае лиганд можно использовать как молекулу-индикатор для определения образующихся гидроксильных радикалов. Путем такого подхода было установлено, что ионы Fe²⁺ в комплексе с рутином катализируют гомолитическое разложение H₂O₂ (реакция Фентона) с образованием \cdot ОН, которые, в свою очередь, окисляют молекулу рутина (рис. 1, а). Кинетика изменения спектров поглощения Рут при 385 нм приведена на рис. 1, б. На основании линейного участка кинетической кривой и дифференциального коэффициента экстинкции между восстановленной и окисленной формами ($\epsilon = 7,2 \cdot 10^3$ (моль/л)⁻¹ · см⁻¹) [13] рассчитана скорость окисления Рут, равная (7,2 ± 0,3) мкмоль/л · мин в условиях эксперимента, описанных в табл. 1.

Таблица 1

Влияние маннитола на скорость v окисления лиганда (Рут, 50 мкмоль/л) в результате разложения H_2O_2 связанными с рутином ионами Fe^{2+}

Table 1

The effect of mannitol on the rate v of ligand (Rt, 50 $\mu\text{mol/L}$) oxidation as a result of H_2O_2 decomposition by bound Fe^{2+} ions

Концентрация маннитола, ммоль/л	0,0	0,2	1,0	5,0
v , мкмоль/л · мин	$7,20 \pm 0,3$	$6,85 \pm 0,2$	$4,46 \pm 0,3$	$3,11 \pm 0,3$

Примечание. Начальная концентрация H_2O_2 равна 40 ммоль/л.

Маннитол, являющийся классической ловушкой $\cdot\text{OH}$, в концентрации, в 100 раз превышающей концентрацию Рут, ингибировал окисление последнего только в два раза (см. табл. 1). Эти данные свидетельствуют, что окисление лиганда, возникающее в результате разложения H_2O_2 связанными с рутином ионами Fe^{2+} , является сайт-специфической реакцией.

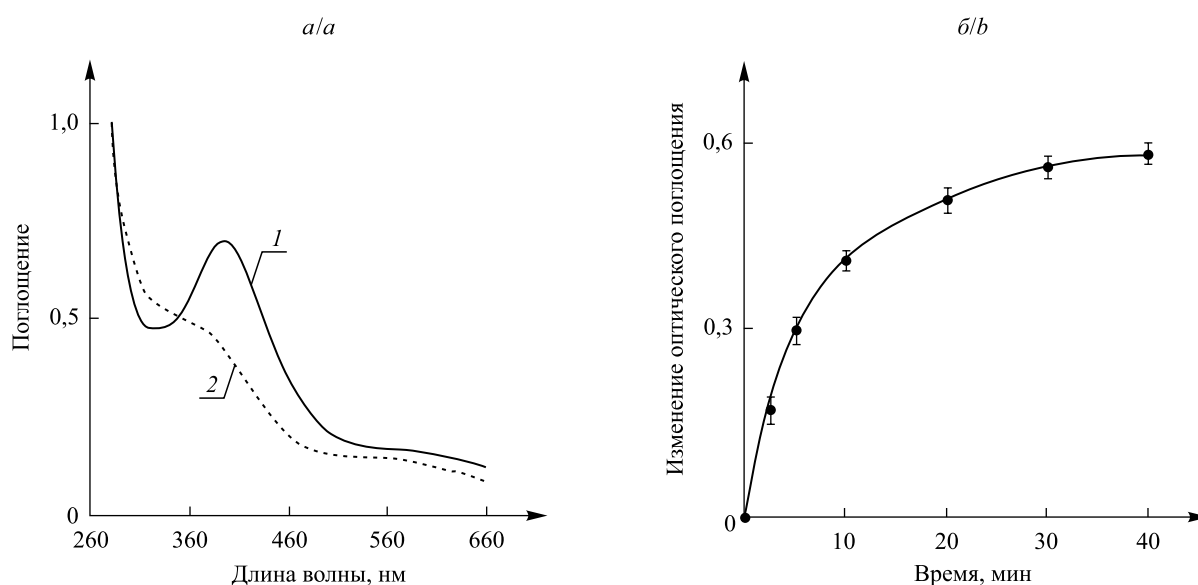


Рис. 1. Псевдопероксидазная активность комплекса Рут – Fe:
а – спектры поглощения Рут – Fe (40 мкмоль/л) до (1) и через 5 мин после (2) добавления H_2O_2 (40 ммоль/л); б – кинетика изменения поглощения при 385 нм в ходе инкубации 40 мкмоль/л Рут – Fe с 40 ммоль/л H_2O_2 ($M \pm SD$)

Fig. 1. Pseudo-peroxidase activity of Rt – Fe complex:
а – absorption spectra of Rt – Fe (40 $\mu\text{mol/L}$) recorded prior to (1) and 5 min after (2) addition of H_2O_2 (40 mmol/L); б – time course of absorption changes at 385 nm during incubation 40 $\mu\text{mol/L}$ Rt – Fe with 40 mmol/L H_2O_2 (Mean $\pm SD$)

Способность комплекса Рут – Fe взаимодействовать с пероксинитритом. Спектральными методами изучено окисление Рут и комплекса Рут – Fe пероксинитритом. Регистрировали спектры поглощения анализируемых соединений в УФ и видимой области (250–600 нм) до и через 2 мин после добавления пероксинитрита. Полученные спектральные изменения свидетельствуют, что при указанном добавлении как в молекуле Рут (рис. 2, б), так и в комплексе Рут – Fe (рис. 2, а) происходило практически полное разрушение хромофора с максимумом поглощения при 385 нм.

В последующих экспериментах для количественной оценки способности Рут и Рут – Fe взаимодействовать с пероксинитритом использовалась реакция пероксинитрит-инициируемого окисления триптофана (вещество-детектор). Как известно, данная аминокислота легко вовлекается в пероксинитрит-инициируемое окисление (гидроксилирование, нитрирование), что приводит к снижению при ней флуоресценции [14]. Установлено, что степень ингибирования Рут и комплексом Рут – Fe пероксинитрит-инициируемого окисления триптофана находится в прямой зависимости от концентрации исследуемых соединений. На основании полученных данных были построены графики зависимости степени ингибирования окислительной модификации свободного триптофана (25 мкмоль/л)

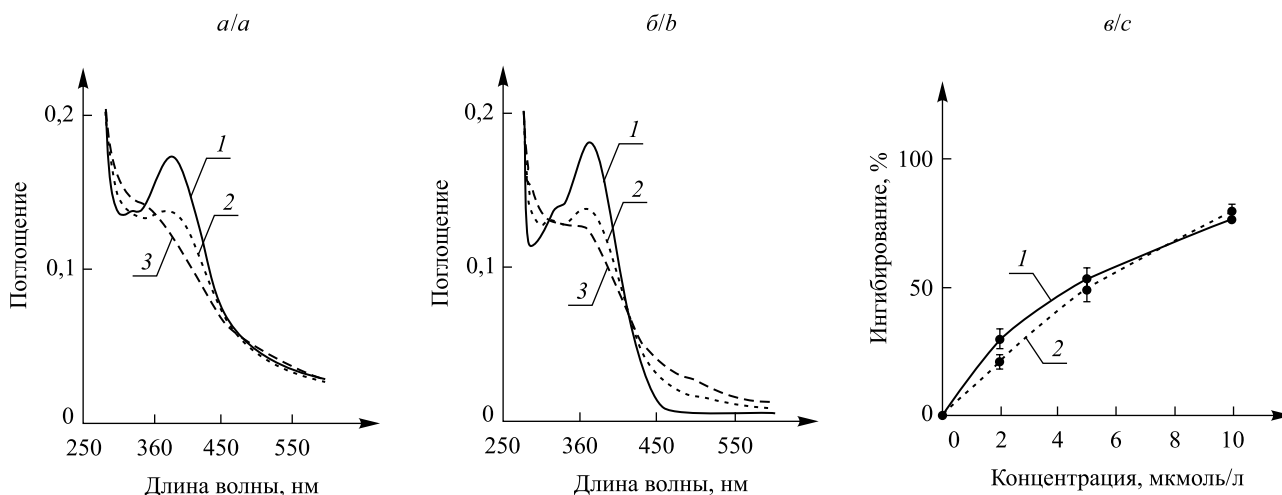


Рис. 2. Рут и комплекс Рут – Fe – scavенджеры пероксинитрита:
а, б – спектры поглощения 10 мкмоль/л Рут – Fe и Рут соответственно до (1) и через 2 мин после добавления 50 мкмоль/л (2) и 100 мкмоль/л (3) пероксинитрита;
в – концентрационные зависимости ингибирования Рут (1) и Рут – Fe (2) окисления триптофана (25 мкмоль/л) пероксинитритом (50 мкмоль/л) ($M \pm SD$)

Fig. 2. Rt and Rt – Fe complex are scavengers of peroxynitrite:
а, б – absorption spectra of 10 $\mu\text{mol/L}$ Rt – Fe and Rt respectively recorded prior to (1) and 2 min after addition 50 $\mu\text{mol/L}$ (2) and 100 $\mu\text{mol/L}$ (3) peroxynitrite;
с – concentration dependences of Rt (1) and Rt – Fe (2) inhibition of tryptophan (25 $\mu\text{mol/L}$) oxidation by peroxynitrite (50 $\mu\text{mol/L}$) (Mean $\pm SD$)

пероксинитритом (50 мкмоль/л) от концентрации Рут и его комплекса с железом (рис. 2, в) и рассчитаны значения ЭД₅₀ (эффективная доза, ингибирующая реакцию на 50 %), равные ($4,7 \pm 0,2$) мкмоль/л и ($5,0 \pm 0,2$) мкмоль/л соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что Рут является эффективной ловушкой пероксинитрита, а образование комплекса Рут – Fe не влияет на его способность связывать пероксинитрит.

Влияние Рут и Рут – Fe на ЛПС-индуцированную продукцию внутриклеточного пероксинитрита в клетках линии HUVEC. Для определения внутриклеточного уровня пероксинитрита использовался флуоресцентный зонд DHR (10 мкмоль/л). Рост уровня флуоресценции клеток после добавления ЛПС указывает на увеличение внутриклеточного содержания пероксинитрита. Последнее определяли в условных единицах и выражали в процентах по отношению к уровню в контрольных клетках, принятому за 100 %. Как видно из рис. 3, инкубация HUVEC с ЛПС в течение 1 ч приводит к небольшому, но статистически значимому увеличению уровня внутриклеточного пероксинитрита. Рут и комплекс Рут – Fe в концентрации 10 мкмоль/л, добавленные одновременно с ЛПС, полностью отменяют эффект ЛПС, снижая флуоресцентный сигнал, связанный с пероксинитритом, ниже базального уровня.

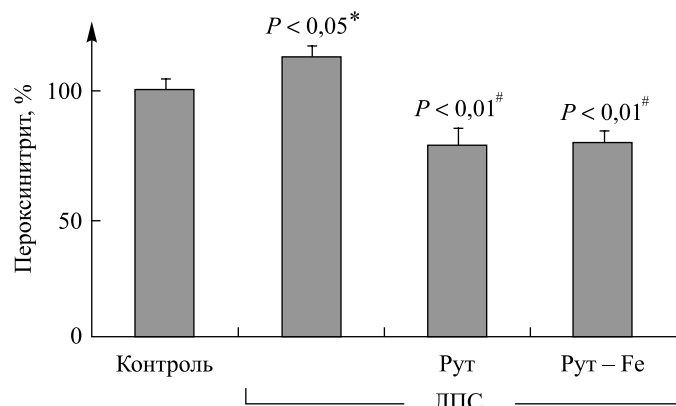


Рис. 3. Влияние 10 мкмоль/л Рут и комплекса Рут – Fe на ЛПС-индуцированную (1 мкг/мл) внутриклеточную продукцию пероксинитрита в HUVEC через 1 ч после добавления ($M \pm SD$):
* – относительно контрольной группы; # – относительно группы животных с ЛПС

Fig. 3. The effect 10 $\mu\text{mol/L}$ of Rt and Rt – Fe complex on LPS-induced intracellular peroxynitrite production in HUVEC at 1 h after addition (Mean $\pm SD$):
* – relative to the control group; # – regarding a group of animals with LPS

Способность Рут и комплекса Рут – Fe ингибировать ЛПС-индуцированные воспалительные ответы эндотелиальных клеток. Инкубация HUVEC с ЛПС (1 мкг/мл среды) в течение 6 ч приводит к существенному (до 450 раз) увеличению экспрессии мРНК (воспалительный ответ) таких провоспалительных медиаторов, как интерлейкины *TNF α* , *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1*, белки адгезии сосудистого эндотелия (*ICAM-1*, *VCAM-1*), а также мРНК индуцибельного фермента циклооксигеназы-2 (*COX2*), катализирующего образование простагландина E2 (*PGE2*) – важнейшего медиатора воспаления (табл. 2).

Установлено, что Рут в дозах 10 и 50 мкмоль/л не оказывал противовоспалительного эффекта на ЛПС-индуцированное увеличение экспрессии мРНК большинства воспалительных генов, за исключением экспрессии мРНК *TNF α* (снижение на 23,6 %). В то же время при добавлении комплекса Рут – Fe в дозе 50 мкмоль/л к ЛПС-активированным HUVEC был выявлен достоверный противовоспалительный эффект препарата в отношении экспрессии генов *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1*, *COX-2* и отмечено незначительное увеличение экспрессии мРНК *TNF α* . Установлено, что как Рут, так и комплекс Рут – Fe не оказывают влияния на ЛПС-индуцированную экспрессию мРНК белков адгезии (см. табл. 2).

Таблица 2

Влияние Рут и комплекса Рут – Fe в дозах 50 мкмоль/л на ЛПС-индуцированную (1 мкг/мл) экспрессию мРНК воспалительных медиаторов в HUVEC через 6 ч после воздействия

Table 2

Effects of Rt and Rut – Fe in doses of 50 μ mol/L on LPS-induced (1 μ g/mL) expression of inflammatory gene (mRNA) in HUVEC in 6 h after addition

мРНК	Контроль	Рут – Fe	ЛПС	ЛПС + Рут	ЛПС + Рут – Fe
<i>TNFα</i>	1,0 \pm 0,04	1,3 \pm 0,04*	21,5 \pm 0,9*	16,5 \pm 2,3 ^π	26,6 \pm 0,9 ^π
<i>IL-6</i>	1,0 \pm 0,10	0,7 \pm 0,11 ^ε	47,6 \pm 2,2*	43,5 \pm 5,6	28,7 \pm 1,9 [#]
<i>IL-1B</i>	1,0 \pm 0,10	1,0 \pm 0,15	571,6 \pm 30,4*	494,6 \pm 68,7	367,2 \pm 39,9 [#]
<i>IL-8</i>	1,0 \pm 0,001	0,6 \pm 0,04*	457,6 \pm 19,4*	434,6 \pm 56,4	380,9 \pm 15,8 [#]
<i>MCP1</i>	1,0 \pm 0,001	0,7 \pm 0,03*	82,1 \pm 4,4*	79,0 \pm 10,3	73,9 \pm 2,4 ^π
<i>ICAM-1</i>	1,0 \pm 0,04	0,8 \pm 0,08	49,1 \pm 3,1*	54,1 \pm 7,0	53,0 \pm 5,1
<i>VCAM-1</i>	1,0 \pm 0,01	0,4 \pm 0,01*	241,9 \pm 11,8*	260,1 \pm 39,4	252,9 \pm 7,9
<i>COX2</i>	1,0 \pm 0,002	0,9 \pm 0,06 ^ε	8,2 \pm 0,7*	8,7 \pm 1,2	4,9 \pm 0,3 [#]
<i>eNOS</i>	1,0 \pm 0,001	1,5 \pm 0,07*	0,29 \pm 0,1 ^ψ	0,44 \pm 0,06 [§]	0,40 \pm 0,01 [#]
<i>NOX1</i>	1,0 \pm 0,001	1,0 \pm 0,08	0,8 \pm 0,15*	1,1 \pm 0,18	1,1 \pm 0,24

^ψ – $P < 0,05$, ^ε – $P < 0,01$, * – $P < 0,001$ относительно контрольной группы; ^π – $P < 0,05$, [§] – $P < 0,01$, [#] – $P < 0,001$ относительно группы с ЛПС.

Выявлено сильное снижение экспрессии мРНК *eNOS* в HUVEC, инкубируемых с ЛПС (1 мкг/мл) в течение 6 ч (см. табл. 2). Рут и комплекс Рут – Fe в дозах 50 мкмоль/л, добавленные к HUVEC одновременно с ЛПС, частично, но статистически достоверно восстанавливают экспрессию *eNOS*. Однако этот эффект был практически одинаков для обоих исследуемых препаратов.

Представляет интерес влияние ЛПС и изучаемых препаратов не только на уровень экспрессии мРНК воспалительных медиаторов, но и на их секрецию клеткой. Установлено, что инкубация HUVEC с ЛПС значительно повышала секрецию белков IL-6, IL-8 и MCP-1 в культуральную среду. Рут оказывал слабый эффект на ЛПС-индуцированную секрецию воспалительных цитокинов, тогда как комплекс Рут – Fe статистически достоверно снижал секрецию IL-6 и IL-8 (табл. 3).

Таким образом, комплекс Рут – Fe эффективно подавляет ЛПС-индуцированный воспалительный ответ эндотелиальных клеток, воздействуя на клеточные процессы, которые ведут к повышению продукции и секреции медиаторов воспаления.

Влияние комплекса Рут – Fe на ЛПС-индуцированную гипертермию у крыс *in vivo*. Проведена термометрия в первые 120 мин после введения крысам пирогена. Как видно из рис. 4, внутривенное введение ЛПС в дозе 100 мкг/кг вызвало значительное повышение ректальной температуры тела у крыс сразу после инъекции. В ответ на введение ЛПС зарегистрировано развитие характерного двухфазного лихорадочного ответа: пик гипертермии приходится на 30 и 90 мин наблюдения. Гипертермия,

развивающаяся при пирогенном воздействии, не является следствием стрессования животного самой процедурой инъекции, так как введение физиологического раствора не влияло на ректальную температуру тела у крыс. Предварительное (за 20 мин до введения ЛПС) внутрибрюшинное введение комплекса Рут – Fe в дозе 12,5 мкмоль/кг полностью исключало низкоамплитудную пирогенную реакцию первой фазы и сильно понижало ЛПС-индуцированное увеличение глубокой температуры тела у крыс во время второй фазы (см. рис. 4).

Таблица 3

Влияние Рут и комплекса Рут – Fe (50 мкмоль/л) на ЛПС-индуцированную (1 мкг/мл) секрецию HUVEC воспалительных медиаторов через 6 ч после воздействия

Table 3

Effects of Rt and Rut – Fe (50 $\mu\text{mol/L}$) on the LPS-induced (1 $\mu\text{g/mL}$) secretion of inflammatory cytokines by HUVEC in 6 h after addition

Цитокин, нг/мл	Контроль	Рут – Fe	ЛПС	ЛПС + Рут	ЛПС + Рут – Fe
IL-6	0,01 \pm 0,01	0,02 \pm 0,003	2,0 \pm 0,3*	1,7 \pm 0,1	1,3 \pm 0,3 [§]
IL-8	0,06 \pm 0,01	0,01 \pm 0,01 [¥]	11,8 \pm 1,1*	10,7 \pm 0,7	8,2 \pm 0,9 [§]
МСР1	0,2 \pm 0,03	0,11 \pm 0,02 [¥]	7,8 \pm 0,4*	6,4 \pm 0,2	6,6 \pm 0,6

[¥] – $P < 0,05$, * – $P < 0,001$ относительно контрольной группы; [§] – $P < 0,01$ относительно группы с ЛПС.

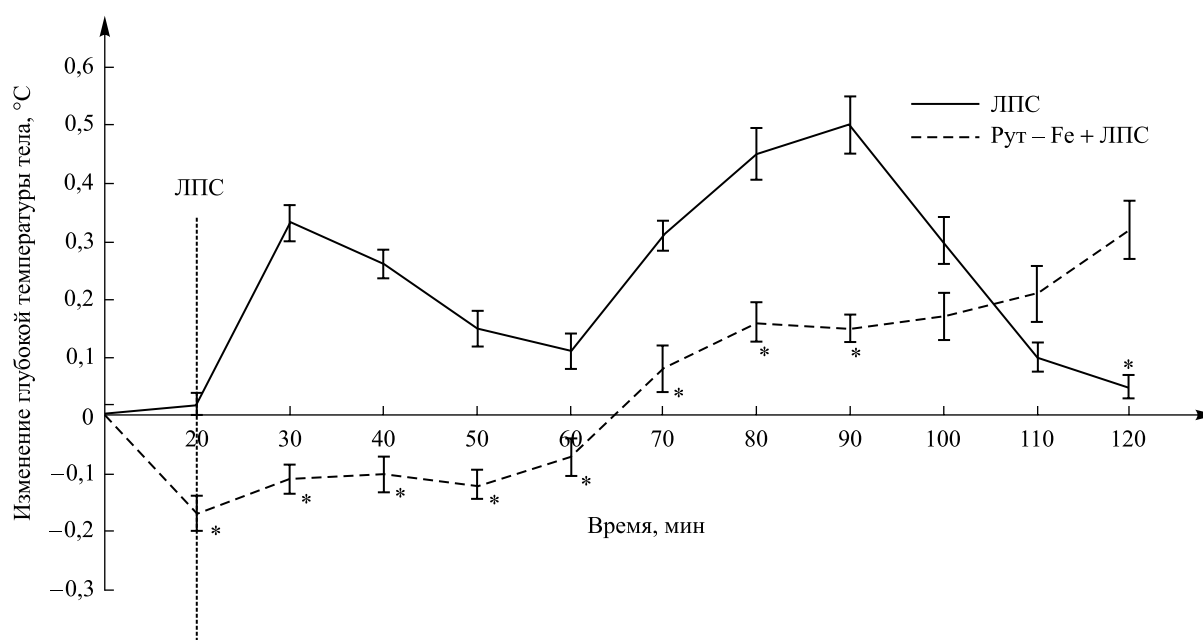


Рис. 4. Влияние предварительного введения комплекса Рут – Fe на ЛПС-индуцированную (100 мкг/кг, внутривенно) гипертермию у крыс. Рут – Fe вводили внутрибрюшинно за 20 мин до ЛПС; $n = 6$ (животных в каждой группе); * – $P < 0,05$ относительно группы животных с ЛПС

Fig. 4. Effect of previously injection of Rt – Fe complex on the rise in deep body temperature of the rats induced by LPS (100 $\mu\text{g/kg}$, intravenously). Rt – Fe was injected intraperitoneally 20 min before treatment with LPS; $n = 6$ (animals in each group); * – $P < 0.05$ regarding a group of animals with LPS

Результаты и их обсуждение

В предыдущих исследованиях показано, что рутин с Fe^{2+} образует устойчивый комплекс, обладающий более сильным цитопротекторным действием, чем исходный лиганд [7]. Эти данные послужили основанием для изучения влияния комплексообразования с Fe^{2+} на противовоспалительные свойства рутина. В качестве клеточной модели воспаления использовали ЛПС-индуцированный воспалительный ответ

HUVEC, который характеризовался существенным (до 450 раз) увеличением экспрессии мРНК провоспалительных медиаторов. В ходе исследования выявлено, что Рут не оказывал противовоспалительного эффекта на ЛПС-индуцированное увеличение экспрессии мРНК большинства провоспалительных генов, тогда как комплекс Рут – Fe достоверно снижал экспрессию генов *IL-6*, *IL-1B*, *IL-8*, *MCP1*, *COX-2*. Рядом авторов показано, что IL-6 подавляет продукцию TNF- α мононуклеарными клетками крови человека [15]. Исходя из этого, можно предположить, что увеличение экспрессии мРНК *TNF α* в HUVEC, инкубируемых совместно с ЛПС и Рут – Fe, по сравнению с клетками, обработанными только ЛПС, обусловлено наличием обратной отрицательной связи между IL-6 и TNF α .

Согласно данным работы [16], ЛПС-индуцированная секреция воспалительных медиаторов может быть опосредована ROS и RNS. Наша оценка антирадикальных и антиоксидантных свойств комплекса Рут – Fe свидетельствует, что он обладает псевдопероксидазной активностью и может сайт-специфически разлагать H₂O₂: лиганд служит ловушкой образующихся гидроксильных радикалов. Кроме того, как следует из предыдущих исследований [4], комплекс Рут – Fe является гораздо более эффективной ловушкой супероксиданион-радикала, чем исходное соединение. Поэтому можно предположить, что Рут – Fe способен снижать ЛПС-индуцированную экспрессию провоспалительных генов в результате антирадикальной и антиоксидантной активности в отношении ROS. Повышение внутриклеточного уровня NO ведет к образованию целого ряда токсичных интермедиатов, одним из которых является пероксинитрит, образующийся в результате взаимодействия монооксида азота и анион-радикала кислорода. Полученные результаты свидетельствуют, что добавление ЛПС вызывало достоверное снижение экспрессии мРНК *eNOS* в HUVEC, что согласуется с данными [17]. Принимая во внимание, что ЛПС-индуцируемое снижение экспрессии мРНК *eNOS*, по-видимому, опосредовано пероксинитритом, мы предполагаем, что частичное восстановление экспрессии *eNOS* в HUVEC при добавлении Рут и комплекса Рут – Fe может быть связано с их способностью удалять внутриклеточный пероксинитрит.

В экспериментах *in vivo* изучены антипиретические эффекты Рут – Fe на фоне внутривенного введения крысам линии Wistar бактериального эндотоксина ЛПС. В ответ на такое введение зарегистрировано развитие характерного двухфазного лихорадочного ответа, что совпадает с результатами других авторов [12]. Как свидетельствуют полученные данные, предварительное введение Рут – Fe в дозе 12,5 мкмоль/кг оказывало существенное антипиретическое действие на ЛПС-индуцированную лихорадку у крыс.

Заключение

На основании данных, полученных на моделях ЛПС-индуцированного воспаления *in vitro* и *in vivo*, можно заключить, что комплекс Рут – Fe, но несвободный лиганд обладает выраженными противовоспалительными свойствами, которые могут быть обусловлены высокой антирадикальной и сайт-специфической псевдопероксидазной активностью комплекса в отношении ROS. Таким образом, комплексообразование с двухвалентным железом расширяет область возможного фармакологического применения рутина.

Библиографические ссылки / References

1. Ince C, Mayeux PR, Nguyen T, Gomez H, Kellum JA, Ospina-Tascón GA, et al. The endothelium in sepsis. *Shock*. 2016;45(3): 259–270. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000473.
2. Huet O, Dupic L, Harrois A, Duranteau J. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. *Frontiers in Bioscience*. 2011;16(5):1986–1995. DOI: 10.2741/3835.
3. Afanas'ev IB, Dorozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*. 1989;38(11):1763–1769. DOI: 10.1016/0006-2952(89)90410-3.
4. Kostyuk VA, Potapovich AI, Vladykovskaya EN, Korkina LG, Afanas'ev IBA. Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 2001;385(1):129–137. DOI: 10.1006/abbi.2000.2118.
5. Kostyuk VA, Potapovich AI, Strigunova EN, Kostyuk TV, Afanas'ev IB. Experimental evidence that flavonoid metal complexes may act as mimics of superoxide dismutase. *Archives Biochemistry and Biophysics*. 2004;428(2):204–208. DOI: 10.1016/j.abi.2004.06.008.
6. Tarahovsky YS, Kim YA, Yagolnik EA, Muzafarov EN. Flavonoid-membrane interactions: Involvement of flavonoid-metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 2014;1838(5):1235–1246. DOI: 10.1016/j.bbame.2014.01.021.
7. Kostyuk VA, Potapovich AI, Kostyuk TV, Cherian MG. Metal complexes of dietary flavonoids: evaluation of radical scavenger properties and protective activity against oxidative stress *in vivo*. *Cellular and Molecular Biology*. 2007;53(1):61–68. DOI: 10.1170/T774.
8. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(4):1620–1624. DOI: 10.1073/pnas.87.4.1620.

9. Kooy NW, Royall JA, Ischiropoulos H, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated oxidation of dihydrorhodamine 123. *Free Radical Biology and Medicine*. 1994;16(2):149–156. DOI: 10.1016/0891-5849(94)90138-4.
10. Paxinou E, Chen Q, Weisse M, Giasson BI, Norris EH, Rueter SM, et al. Induction of α -synuclein aggregation by intracellular nitrate insult. *The Journal of Neuroscience*. 2001;21(20):8053–8061. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.21-20-08053.2001.
11. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25(4):402–408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
12. Rudaya AY, Steiner AA, Robbins JR, Dragic AS, Romanovsky AA. Thermoregulatory responses to lipopolysaccharide in the mouse: dependence on the dose and ambient temperature. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2005;289(5):R1244–1252. DOI: 10.1152/ajpregu.00370.2005.
13. Sorata Y, Takahama U, Kimura M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1984;799(3):313–317.
14. Rebrin I, Breger C, Gallaher TK, Sohal RS. Detection and characterization of peroxynitrite-induced modifications of tyrosine, tryptophan, and methionine residues by tandem mass spectrometry. *Methods in Enzymology*. 2008;441:283–294. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)01215-9.
15. Schindler R, Mancilla J, Endres S, Ghorbani R, Clark SC, Dinarello CA. Correlations and interactions in the production of interleukin-6 (IL-6), IL-1 and tumour necrosis factor (TNF) in human blood mononuclear cells: IL-6 suppresses IL-1 and TNF. *Blood*. 1990;75(1):40–47.
16. Gao J, Zhao WX, Zhou LJ, Zeng BX, Yao SL, Liu D, et al. Protective effects of propofol on lipopolysaccharide-activated endothelial cell barrier dysfunction. *Inflammation Research*. 2006;55(9):385–392. DOI: 10.1007/s00011-006-5116-0.
17. Lu JL, Schmiede LM, Kuo L, Liao JC. Downregulation of endothelial constitutive nitric oxide synthase expression by lipopolysaccharide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1996;225(1):1–5. DOI: 10.1006/bbrc.1996.1121.

Статья поступила в редколлегию 16.11.2018.
Received by editorial board 16.11.2018.