

УДК 551.521.17

А.И. ПОТАПОВИЧ, Т.О. СУХАН, Т.В. КОСТЮК, А. ПАСКАРЕЛЛА (ИТАЛИЯ), В.А. КОСТЮК

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ОКИСЛЕННЫХ ЛПНП И ИХ КОРРЕКЦИЯ РАСТИТЕЛЬНЫМИ ПОЛИФЕНОЛАМИ

In the present work we studied effects of verbascoside, quercetin and resveratrol on HUVEC response to oxLDL. oxLDL (150–200 mol/mol LDL) was prepared using myeloperoxidase/nitrite-system. The MTT assay showed a gradual increase in proliferation of cells treated with oxLDL. The upregulation of proliferation was avoided by addition of either quercetin or resveratrol. Fluorescence microscopy analysis revealed a significant decrease of the intracellular level of NO and the overproduction of superoxide in cells treated with oxLDL, but not with LDL. The redox imbalance was prevented by the addition of quercetin or resveratrol. The present data indicate that, quercetin and resveratrol may prove to be potent antiatherogenic agents because they can prevent deleterious effects of oxLDL on endothelial cells.

Заболевания сердечно-сосудистой системы в настоящее время рассматриваются как одна из основных причин высокой смертности во всем мире. Ежегодно от этой патологии, и в частности от инфаркта миокарда и инсульта, умирают 17 млн человек [1]. Одним из основных этиологических факторов этих заболеваний является атеросклероз – хронический воспалительный процесс, протекающий в артериальных сосудах [2, 3]. Широко распространена теория, согласно которой ключевую роль в инициировании и развитии атеросклеротических изменений играют липопротеины низкой плотности (ЛПНП) [4, 5]. Проникая через поврежденную стенку эндотелия, ЛПНП аккумулируются и окисляются в интиме сосуда. Окисленная форма ЛПНП (окси-ЛПНП) стимулирует высвобождение эндотелиальных хемокинов и цитокинов (M-CSF, MCP-1), а также увеличивает экспрессию молекул адгезии (ICAM-1, VCAM-1), что ведет к развитию воспалительной реакции [3, 6, 7]. Полагают, что окисление ЛПНП происходит непосредственно в интиме, в месте развития воспалительного процесса [8]. Однако модифицированные ЛПНП могут захватываться из кровотока, поскольку окси-ЛПНП обнаружены в плазме крови, и их содержание коррелирует с сердечно-сосудистыми заболеваниями [9]. К настоящему времени выявлены различные ферментативные и не ферментативные системы, которые могут быть вовлечены в окисление ЛПНП *in vitro* [8]. В качестве основных кандидатов определены члены семейства липооксигеназ [10], НАДФН-оксидаз [11]. Один из наиболее вероятных путей окислительной модификации ЛПНП происходит с участием миелопероксидаз (МПО) [12].

Нами были исследованы функциональные нарушения в эндотелиальных клетках при воздействии окисленных ЛПНП и их коррекция растительными полифенолами, а также изучены антиоксидантные свойства данных соединений.

Материал и методика

Реактивы. Трипановый синий, этидиум бромид, трипсин, соли, растворители, детергенты и культуральная среда (Sigma-Aldrich, Италия). В работе были использованы следующие полифенолы: кверцетиндигидрат (98 % чистоты; Sigma-Aldrich, Италия), ресвератрол (BioMol, Италия) и вербаскозид (97 % чистоты), выделенный из *Syringa vulgaris*.

Выделение вербаскозида из *Syringa vulgaris*. Стабилизированная и высокоселективная клеточная линия, синтезирующая вербаскозид, получена в Институте биотехнологических исследований (IRB, Altavilla Vicentina, Италия) из цветов *Syringa vulgaris*. Асептический растительный материал получен

обработкой NaOCl и Tween 20 перед измельчением. Клеточная линия депонирована в растительном клеточном банке (Брауншвейг, Германия) с присвоением внутреннего кода IRBSV25/B и международного – DSM 16857.

Окисление ЛПНП. Окси-ЛПНП являются результатом инкубации ЛПНП (Sigma) с МПО и нитритом. Раствор ЛПНП (200 мкг белка на 1 мл раствора) готовили в 0,1 М фосфатно-солевом буфере (ФСБ) с pH 7,4. Полученный раствор инкубировали с МПО (15 мкг/мл), нитритом (50 мкМ) и перекисью водорода (0,6 мМ) при 37 °С. Через 30 или 60 мин реакцию останавливали добавлением 1 мг/мл каталазы. Содержание продуктов перекисного окисления липидов измеряли, используя коммерческий набор «PeroxideDetecttm Kit» (Sigma-Aldrich, Италия), по прилагаемой инструкции производителя. Через 60 мин окисления их уровень составил 209 ± 15 моль на 1 моль ЛПНП. В экспериментах по изучению влияния полифенолов на окисление ЛПНП в описанную реакционную смесь добавляли растворы полифенолов в диметилсульфоксиде (ДМСО). Во всех экспериментах конечная концентрация ДМСО в реакционной смеси составляла 0,1 % (по объему).

Изучение антиоксидантной активности исследуемых полифенолов в системе перекисного окисления липидов. Влияние полифенолов на перекисное окисление липидов (ПОЛ) исследовали на микросомах, выделенных из печени белых беспородных крыс, по двум схемам: НАДФН-зависимое ПОЛ (концентрация НАДФН в реакционной смеси 0,3 мМ) или CCl_4 -зависимое ПОЛ (концентрация CCl_4 в реакционной смеси 3,4 мМ).

Клеточные культуры и условия культивирования. В работе использованы эндотелиальные клетки из пуповинной вены человека (HUVEC; Lonza, Бельгия). Эксперименты выполнены на клетках 4–7-го пассажа. Их культивировали в ростовой среде EGM-2 (BulletKit, # CC-3162, LONZA, Бельгия) с добавлением 2 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота в CO_2 -инкубаторе (37 °С, 5 % CO_2). Изучая влияние ЛПНП на клетки, культуральную среду их роста меняли на свежеприготовленную, содержащую ЛПНП в концентрации 11,5 нМ (10 мкг белка на 1 мл среды). Среды стерилизовали, пропуская через бактериальные фильтры с диаметром пор 0,2 мкм (Millipore, Италия). Исследование влияния полифенолов на клеточную реакцию в ответ на добавление окси-ЛПНП проводили при одновременной инкубации клеток с окси-ЛПНП и полифенолами. К клеткам контроля добавляли соответствующий объем ДМСО без полифенолов. Содержание ДМСО во всех экспериментах составляло 0,1 % (по объему).

Для анализа использовали как культуральную среду, так и сами клетки. Среду, собранную в микропробирки, и клетки без среды в планшетах помещали на хранение в низкотемпературную (–80 °С) морозильную камеру.

Определение NO и супероксид-аниона. Клетки растили до конфлюэнтного состояния в 24-луночных культуральных планшетах. После 1 и 6 ч инкубации клеток с окси-ЛПНП и с исследуемыми полифенолами была измерена внутриклеточная продукция NO с использованием 4,5-диаминофлуоресцеин-диацетата (ДАФ-ДА). Непосредственно после добавления окси-ЛПНП или через 5 ч инкубации к эндотелиальным клеткам добавляли 2,5 мкМ ДАФ-ДА и инкубировали 60 мин при 37 °С. Продукцию внутриклеточного супероксид-аниона оценивали, используя чувствительный к окислительно-восстановительным процессам дигидроэтидиум (ДГЭ) [13]. Через 0,5 или 5,5 ч инкубации клеток с окси-ЛПНП добавляли 10 мкМ ДГЭ, инкубировали 30 мин при 37 °С, затем клетки тщательно промывали ФСБ, фиксировали в 2 % формальдегиде и исследовали окрашивание под микроскопом. Количественный учет окраски проводили, измеряя на спектрофлуориметре «Shimadzu RF-5301» интенсивность флуоресценции в клеточной суспензии, полученной после снятия клеток с пластика с помощью скребка. Флуоресценцию ДАФ-ДА, характеризующую уровень NO, измеряли на длине волны $\lambda = 488$ нм (λ_{ex} , возбуждение) и $\lambda = 530$ нм (λ_{fl} , флуоресценция). Флуоресценцию ДГЭ, определяющую содержание супероксид-аниона, измеряли на 488 нм (λ_{ex} , возбуждение) и 580 нм (λ_{fl} , флуоресценция).

Определение жизнеспособности эндотелиальных клеток. Жизнеспособность клеток при действии ЛПНП оценивали, используя МТТ-тест [14], в основе которого – способность митохондриальных и цитоплазматических дегидрогеназ конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиумбромид в нерастворимый формазан, образующий внутри живой клетки кристаллы синего цвета. Формазан переводят в раствор с помощью органического растворителя и измеряют оптическую плотность при $\lambda = 540 \div 550$ нм.

Эндотелиальные клетки растили в 96-луночной планшете (8000 клеток в 200 мкл среды на лунку) в присутствии и без (контроль) ЛПНП/окси-ЛПНП. Результаты выражали как процент жизнеспособных клеток по отношению к контролю, жизнеспособность которого принимали за 100 %.

Статистическая обработка данных. Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программного комплекса Microsoft XP. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Чтобы выявить достоверность различий между экспериментальной и контрольной группами, использовали *t*-тест Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Влияние полифенолов на процесс окисления ЛПНП в системе миелопероксидаза/нитрит. Инкубация ЛПНП, выделенных из крови человека, с МПО и перекисью водорода в присутствии 50 мкМ нитрита в течение 30 мин вызывала образование 93 ± 10 моль гидропероксида. Кверцетин в концентрации 5 мкМ практически полностью ингибировал окисление ЛПНП. Другой полифенол – вербаскозид – снижал окисление ЛПНП, но менее эффективно, чем кверцетин. Ресвератрол, в отличие от предыдущих полифенолов, не предотвращал процесс окисления ЛПНП и даже слегка его усиливал (рис. 1).

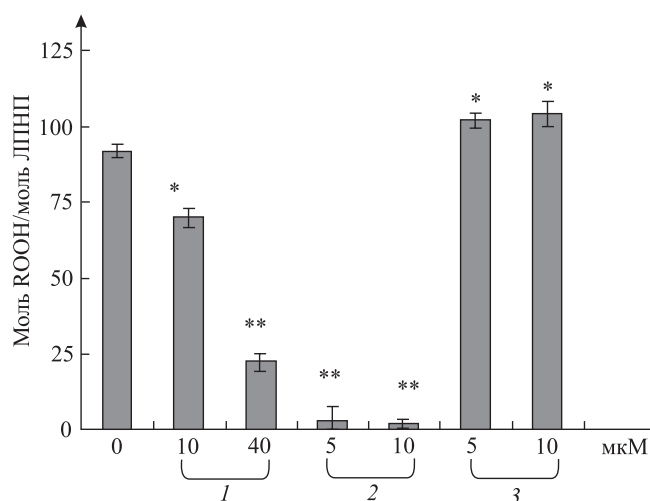


Рис. 1. Влияние растительных полифенолов на окисление ЛПНП: 1 – вербаскозид, 2 – кверцетин, 3 – ресвератрол: * / ** – различия достоверны по отношению к клеткам контроля (без флавоноидов) соответственно при $P < 0,05$ / $P < 0,01$

Влияние полифенолов на перекисное окисление липидов. Установлено, что по способности ингибировать ПОЛ в микросомах печени крыс исследуемые полифенолы можно расположить по мере убывания эффективности следующим образом: кверцетин, ресвератрол, вербаскозид. Причем в системе с НАДФН (0,3 мМ) и FeSO_4 (12 мкМ) ингибирующая активность всех полифенолов более выражена, чем в системе, содержащей НАДФН (0,3 мМ) и CCl_4 (3,4 мМ) (таблица).

Влияние полифенолов на перекисное окисление липидов в микросомах печени крыс

Полифенол	150, мкМ	
	НАДФН, FeSO_4	НАДФН, CCl_4
Кверцетин	0,6	1,0
Ресвератрол	1,1	10,0
Вербаскозид	6,0	40,0

Влияние полифенолов на пролиферацию клеток после инкубации с ЛПНП/окси-ЛПНП. Установлено, что после инкубации клеток с ЛПНП или окси-ЛПНП в течение 24 и 48 ч наблюдается увеличение по отношению к контролю пролиферативной активности на 15 и 30 % соответственно. Данный эффект был устранен добавлением в среду инкубации кверцетина и ресвератрола. Вербаскозид такого влияния не оказывал (рис. 2).

Эффект полифенолов на окислительно-восстановительное равновесие в эндотелиальных клетках. Содержание внутриклеточного NO определяли, используя флуоресцентный краситель диаминофлуоресцеин (ДФ-ДА), способный проникать в цитоплазму клетки через цитоплазматическую мембрану. Регистрация зеленой флуоресценции с помощью инверсионного микроскопа показала зна-

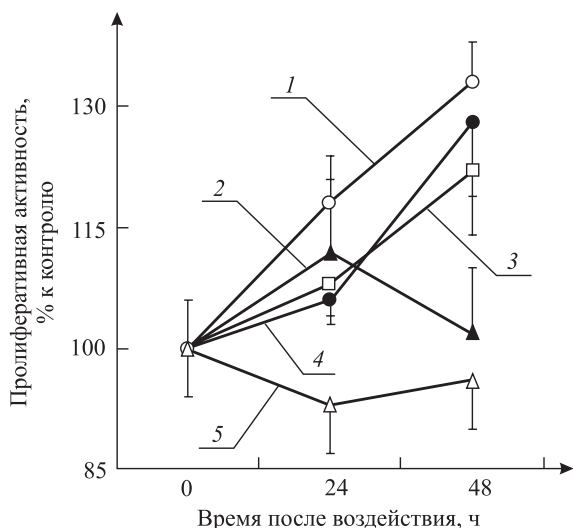


Рис. 2. Влияние растительных полифенолов (10 мкМ) и окси-ЛПНП на пролиферацию HUVEC: 1 – ЛПНП, 2 – окси-ЛПНП + кверцетин, 3 – окси-ЛПНП + вербаскозид, 4 – окси-ЛПНП, 5 – окси-ЛПНП + ресвератрол

кверцетина. Следует отметить, что сами по себе вербаскозид и ресвератрол через 6 ч инкубации с клетками вызвали заметное снижение внутриклеточного NO (рис. 3 а).

чительное снижение по отношению к контролю внутриклеточного уровня NO в клетках, которые инкубировали с окси-ЛПНП, за исключением тех клеток, к которым помимо окси-ЛПНП добавляли кверцетин.

Для количественного подтверждения результатов микроскопии была измерена интенсивность ДАФ-ДА-флуоресценции в суспензии HUVEC (рис. 3 а). Показано, что инкубация клеток с окси-ЛПНП в течение 1 и 6 ч вызывает снижение по отношению к контролю уровня NO на (19±6) и (41±11) % соответственно. Через 1 ч инкубации клеток с комбинацией окси-ЛПНП и кверцетин или окси-ЛПНП и вербаскозид внутриклеточный уровень NO был значительно ниже, чем после инкубации клеток только с окси-ЛПНП. Однако после 6-часовой инкубации с окси-ЛПНП снижение уровня NO в клетках ослабевало при добавлении вербаскозида и полностью предотвращалось с добавлением ресвератрола или кверцетина.

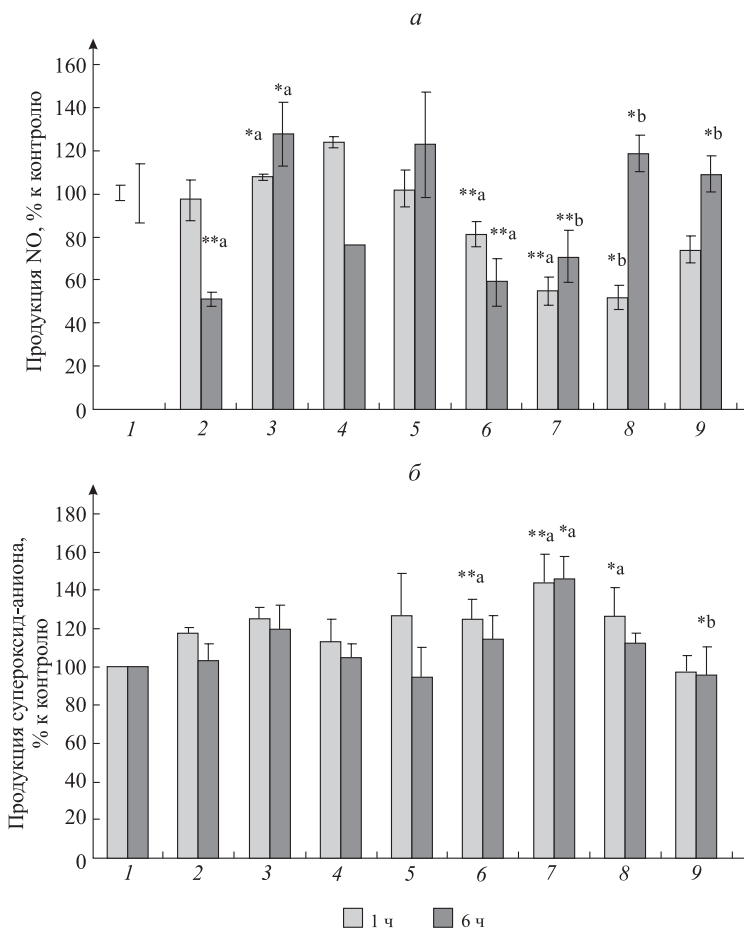


Рис. 3. Влияние растительных полифенолов (10 мкМ) и окси-ЛПНП (10 мкг белка/мл) на уровень: а – внутриклеточного NO и б – внутриклеточного $O_2^{\cdot-}$ в HUVEC через 1 и 6 ч: 1 – контроль, 2 – вербаскозид, 3 – кверцетин, 4 – ресвератрол, 5 – ЛПНП, 6 – окси-ЛПНП, 7 – окси-ЛПНП + вербаскозид, 8 – окси-ЛПНП + кверцетин, 9 – окси-ЛПНП + ресвератрол. *a/**a – различия достоверны по отношению к клеткам контроля соответственно при $P < 0,05 / P < 0,01$; **b – различия достоверны по отношению к клеткам, которые инкубировали с окси-ЛПНП при $P < 0,01$

Количественное определение внутриклеточного супероксид-аниона проводили в клетках с флуоресцентным красителем ДГЭ [13]. Выявлено, что через 60 мин инкубации окси-ЛПНП вызывает

кратковременное повышение уровня внутриклеточного супероксид-аниона в эндотелиальных клетках в сравнении с клетками контроля, затем продукция супероксид-аниона снижается до уровня контроля (рис. 3 б). Окислительно-восстановительный дисбаланс в HUVEC, вызванный окси-ЛПНП, был частично снижен добавлением кверцетина и полностью предотвращен ресвератролом (рис. 3 б).

Проникновение через эндотелий и накопление в сосудистой стенке модифицированных ЛПНП является начальным этапом атерогенеза [3, 6]. Нарушению целостности эндотелия и прохождению через него липопротеидов способствует ряд внутренних и внешних факторов, среди которых развитие окислительного стресса и структурно-функциональные нарушения в эндотелиальных клетках [6, 7]. В настоящее время принято считать, что коррекция такого рода нарушений ведет к подавлению атерогенеза [15]. Мы исследовали влияние ряда природных полифенольных соединений на некоторые ответы культивируемых эндотелиальных клеток, инициируемые при воздействии модифицированных ЛПНП, а именно на продукцию монооксида азота и анион-радикала кислорода. Монооксид азота, образующийся в эндотелиальных клетках из аминокислоты L-аргинина в результате ферментативной реакции, катализируемой NO-синтазой, играет ключевую роль в поддержании нормального уровня вазодилатации и предотвращении тромбогенеза [16].

В предварительных исследованиях установлено, что окси-ЛПНП в используемой нами физиологической концентрации (10 мкг белка/мл) не оказывает прямого цитотоксического действия на клетки и даже достоверно активизирует процессы пролиферации. Вместе с тем окисленные, но не интактные ЛПНП существенно снижают уровень внутриклеточного NO, и этот эффект устраняется при добавлении к клеткам ресвератрола и кверцетина. Воздействие на клетки окисленных ЛПНП приводит к достоверному увеличению внутриклеточного уровня анион-радикала кислорода, что свидетельствует о нарушении редокс-баланса клеток. Добавление к клеткам кверцетина и особенно ресвератрола оказывает нормализующее действие на редокс-баланс клеток. Можно предположить, что одним из механизмов, обуславливающим снижение уровня внутриклеточного NO при воздействии на эндотелиальные клетки окисленных ЛПНП, является ускорение реакции между NO и анион-радикалом кислорода вследствие существенного увеличения продукции последнего. В водном растворе реакция радикалов O_2^- и NO протекает очень быстро, константа скорости равна $3,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. В результате этой реакции образуется высокотоксичный интермедиат – пероксинитрит ($ONOO^-$). Поэтому снижение ЛПНП-зависимой продукции анион-радикала кислорода кверцетином и ресвератролом препятствует развитию функциональных нарушений в эндотелиальных клетках. Следует также отметить, что кверцетин и вербаскозид предотвращают окислительную модификацию ЛПНП, катализируемую МПО. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что растительные полифенолы оказывают антиатерогенное действие как за счет ингибирования окислительной модификации ЛПНП, так и благодаря предотвращению в эндотелиальных клетках функциональных нарушений, инициируемых воздействием модифицированных ЛПНП.

1. World Health Organization. The Atlas of Heart Disease and Stroke. Internet: http://www.who.int/cardiovascular_diseases/resources/atlas/en/ (на 01.01.2005).
2. Ross R. // N. Engl. J. Med. 1999. Vol. 340. P. 115.
3. Webb N. R. // Nat. Med. 2008. Vol. 14. P. 1015.
4. Hessler J. R., Morel D. W., Lewis L. J., Chisolm G. M. // Arteriosclerosis. 1983. Vol. 3. P. 215.
5. Meisinger C., Baumert J., Khuseynova N. et al. // Circulation. 2005. Vol. 112. P. 651.
6. Berliner J. A., Heinecke J. W. // Free radic. Biol. Med. 1996. Vol. 20. P. 707.
7. Cybulsky M. I., Gimbrone M. A. // Science. 1991. Vol. 251. P. 788.
8. Chisolm G. M., Steinberg D. // Free Radical Biology & Medicine. 2000. Vol. 28. № 12. P. 1815.
9. Holvoet P., Vanhaecke J., Janssens S. et al. // Circulation. 1998. Vol. 98. P. 1487.
10. Schewe T. // Biol. Chem. 2002. Vol. 383. P. 365.
11. Heinecke J. W., Baker L., Rosen H., Chait A. J. // Clin. Invest. 1986. Vol. 77. P. 757.
12. Daugherty A., Dunn J. L., Rateri D. L., Heinecke J. W. // J. Clin. Invest. 1989. Vol. 94. P. 437.
13. Zhao H., Kalivendi S., Zhang H. et al. // Free Radical Biology & Medicine. 2003. Vol. 34. № 11. P. 1359.
14. Tangirala R. K., Casanada F., Miller E. et al. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995. Vol. 15. P. 1625.
15. Schewe T., Steffen Y., Sies H. // A position paper arch biochem biophys. 2008. Vol. 476. № 2. P. 102.
16. Bredt D. S. // Free radic. Res. 1999. Vol. 31. P. 577.

Поступила в редакцию 12.05.10.

Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник НИЛ проблем терморегуляции кафедры физиологии человека и животных.

Татьяна Олеговна Сухан – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник НИЛ проблем терморегуляции кафедры физиологии человека и животных.

Татьяна Владимировна Костюк – аспирант кафедры физиологии человека и животных. Научный руководитель – кандидат биологических наук, доцент кафедры физиологии человека и животных Г.Т. Маслова.

Антониа Паскарелла – аспирант Института дерматологии и иммунологии (Рим, Италия). Научный руководитель – В.А. Костюк.

Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, старший научный сотрудник, заведующий НИЛ проблем терморегуляции кафедры физиологии человека и животных.