

ЦИННАМАТЫ МОДИФИЦИРУЮТ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НЕЙТРОФИЛОВ

Е.А. Мельникова¹, К.А. Лукьянова¹, О.В. Орешко¹, Н.В. Амаэгбери¹, Г.Н. Семенкова²

¹Белорусский государственный университет, Минск

²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, n.amaegberi@gmail.com

Циннаматы (коричная, кофейная, феруловая и синаповая кислоты) – природные ароматические карбоновые кислоты, в большом количестве содержащиеся в зерновых, бобовых, масличных культурах, овощах, фруктах [1]. Циннаматы проявляют биологическую активность и оказывают антиоксидантное, противовоспалительное, противогрибковое нейтропротекторное, противоопухолевое действие *in vitro* и *in vivo* [2-5]. Такие биологические свойства этих соединений позволяют рассматривать их в качестве потенциальных средств профилактики и коррекции различных патологических состояний (инфекционные, нейродегенеративные, онкологические заболевания).

Известно, что многие заболевания сопровождаются воспалением, возникающим в результате формирования оксидативного стресса при гиперпродукции активных форм кислорода и хлора (АФКХ) фагоцитами и/или дисфункции антиоксидантной системы организма [6]. Основным источником АФКХ в организме являются нейтрофилы, генерирующие эти активные интермедиаты в процессе фагоцитоза [7]. Поиск соединений, модифицирующих функциональные свойства этих клеток позволит регулировать интенсивность протекания воспалительного процесса. Механизмы влияния циннаматов на функции нейтрофилов изучены недостаточно.

Цель работы: изучить влияние циннаматов на функциональную активность нейтрофилов.

Материалы и методы.

Материалы. В работе использовали коричную (3-фенилпропеную кислоту), кофейную (3,4-дигидроксифенилпропеную) («Chem-Implex», США), феруловую (3-метокси-4-гидроксифенилпропеную) («Thermo Fisher Scientific», США), синаповую (3,5-диметокси-4-гидроксифенилпропеную) («Apollo Scientific», Великобритания) кислоты, декстран, гистопак-1077, питательную среду RPMI-1640, иодида пропидиум (PI), люминол, Triton X-100, JC-1 (5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтил-бензамидозолокарбоцианин йодид), FCCP (карбонилцианид *p*-трифторометоксифенилгидразон), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, пероксид водорода, *Micrococcus lysodeikticus* («Sigma», США), компоненты для приготовления фосфатного буферного раствора (ФБР) и сбалансированного буферного солевого раствора Эрла (СБСРЭ) («Анализ X», Беларусь).

Методы. Нейтрофилы выделяли из крови здоровых людей по стандартной методике [8]. Жизнеспособность клеток определяли флуоресцентным методом с использованием иодида пропидиума (PI, $\lambda_{возб} = 530$ нм, $\lambda_{рег} = 640$ нм) на спектрофлуориметре (СМ 2203 «Солар», Беларусь) [9]. Генерацию АФКХ изучали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ЛюмХЛ) [10], на хемилюминометре БХЛ-1 (Минск, Беларусь). Лизат, содержащий МПО, получали из суспензии нейтрофилов путём трёхкратного замораживания/размораживания клеточной суспензии с после-

дующим центрифугированием. Пероксидазную активность МПО оценивали спектрофотометрическим методом ($\lambda = 450$ нм) по скорости окисления 3,3',5,5'-тетраметилбензидина пероксидом водорода в присутствии МПО в 3,3',5,5'-тетраметилбензидиндимиин [11]. Изменение митохондриального потенциала клеток ($\Delta\Psi_m$) оценивали с помощью флуоресцентного зонда JC-1 ($\lambda_{ex}=490$ нм, $\lambda_{em}=530$ нм, 590 нм) [12]. Отношение интенсивностей флуоресценции при 590 и 530 нм (I_{590}/I_{530}) пропорционально $\Delta\Psi_m$.

Результаты и обсуждение. Поскольку действие циннаматов на нейтрофилы изучено недостаточно, на начальном этапе работы была проведена оценка токсичности коричневой, кофейной, феруловой и синаповой кислот в отношении этих клеток. Исследование проводили с использованием флуоресцентного зонда PI. При нарушении целостности мембраны этот краситель проникает в клетку и связывается с ДНК путем интеркаляции между азотистыми основаниями, что сопровождается усилением флуоресценции. Установлено, что инкубирование клеток в течение 1 ч с исследуемыми соединениями в концентрации 0,1 мкмоль/л не оказывает цитотоксического действия на нейтрофилы. Показано, что коричневая кислота в концентрациях 1 и 10 мкмоль/л снижает выживаемость нейтрофилов на 13,5 и 14 % соответственно. Инкубирование клеток с кофейной кислотой в концентрациях 1 и 10 мкмоль/л вызывает уменьшение их выживаемости на 25,2 и 32,7 % соответственно. Воздействие на клетки феруловой и синаповой кислот в концентрации 1 мкмоль/л практически не оказывает влияния на выживаемость нейтрофилов, а в концентрации 10 мкмоль/л эти циннаматы снижают выживаемость клеток на 15,9 и 14 % соответственно.

В таблице 1 представлены результаты влияния циннаматов в диапазоне концентраций 0,1-10 мкмоль/л на генерацию АФКХ нейтрофилами, стимулированными адгезией к поверхности стекла. Видно, что исследуемые соединения проявляют как про-, так и антиоксидантные свойства. Установлено, что коричневая кислота не влияет на продукцию АФКХ нейтрофилами. Кофейная кислота в концентрации 10 мкмоль/л снижает выход АФКХ на 22 % по сравнению с контролем. Выявлено, что феруловая кислота в концентрации 10 мкмоль/л увеличивает выход ЛюмХЛ. В концентрациях 0,1 и 1 мкмоль/л наблюдается снижение генерации АФКХ активированными нейтрофилами, причём в концентрации 0,1 мкмоль/л данное соединение ингибирует ЛюмХЛ на 77 %. Синаповая кислота проявляет антиоксидантные свойства в широком диапазоне концентраций (степень ингибирования ЛюмХЛ составляет 30-60 %). Таким образом, исследуемые циннаматы в зависимости от концентрации способны оказывать анти- или прооксидантное действие на стимулированные нейтрофилы.

Таблица 1. – Влияние циннаматов на генерацию АФКХ стимулированными нейтрофилами

Концентрация циннаматов, мкмоль/л	Интенсивность хемиллюминесценции, %			
	Коричневая кислота	Кофейная кислота	Феруловая кислота	Синаповая кислота
0 (контроль)	100	100	100	100
0,1	99,2±3,5	99,5±4,5	23±2	72,2±4,2
1	98,9±4	99,4±4,7	68,9±2,6	40±1,9
10	98,5±4	79,5±3,7	99,5±5	78,3±3,2

Примечание – Время инкубирования с добавками – 30 мин.

Образование АФКХ в нейтрофилах катализируют преимущественно такие ферменты, как НАДФН-оксидаза, генерирующая супероксидные анион-радикалы, и миелопероксидаза (МПО), катализирующая образование хлорноватистой кислоты [7]. Методом хемиллюминесценции с использованием специфического ингибитора МПО АВАН установлено, что в формировании «респираторного взрыва» в нейтрофилах при действии циннаматов вовлечена МПО (данные не приводятся). Мы предположили, что исследуемые соединения способны изменять активность этого фермента. С целью подтверждения этого предположения мы изучили влияние коричневой, кофейной, феруловой и синаповой кислот на оксидазную активность МПО в лизатах нейтрофилов (табл.2). Видно, что коричневая кислота в исследуемом диапазоне концентраций не оказывает влияния на оксидазную активность МПО. Кофейная кислота в концентрации 0,1 мкмоль/л на 12 % снижает активность этого фермента. Инкубирование лизата, содержащего МПО, с 1 и 10 мкмоль/л кофейной кислоты приводит к уменьшению активности этого фермента на 32,6 и 95 % соответственно. Воздействие на МПО феруловой кислоты в диапазоне концентраций 0,1–10 мкмоль/л по-

давляет активность МПО на 79, 45,8 и 10,5 % соответственно. В случае синаповой кислоты, ингибирующее действие выявлено для концентраций 1 и 10 мкмоль/л и составляет 39,4 и 99,3 %. Таким образом, в отличие от коричной кислоты, кофейная, феруловая и синаповая кислоты оказывают ингибирующее действие на пероксидазную активность МПО.

Таблица 2. – Влияние циннаматов на оксидазную активность МПО

Концентрация циннаматов, мкмоль/л	Оксидазная активность МПО, мкмоль/мл*мин			
	Коричная кислота	Кофейная кислота	Феруловая кислота	Синаповая кислота
0 (контроль)	471±22			
0,1	450±25	416±18	375±23	458±27
1	422±16	323±15	216±20	290±14
10	425±19	25±3	47±4	3±0,2
АВАН	37±5			

Примечание – [АВАН] = 1 мкмоль/л. Время инкубирования с циннаматами – 30 мин.

Активация нейтрофилов к фагоцитозу сопровождается секрецией гранул, содержащих гидролитические ферменты (в частности, лизоцим) и МПО, во внеклеточную среду [13]. Усиление секреции МПО и образование НОС1 во внеклеточной среде приводит к повреждению клеток и тканей организма. Нами исследовано влияние циннаматов на высвобождение лизоцима из фагоцитов. Установлено, что все исследуемые циннаматы в диапазоне концентраций 0,1-10 мкмоль/л не оказывают влияния на процесс секреторной дегрануляции нейтрофилов.

Важным источником АФК в клетке являются митохондрии. Изменение величины митохондриального мембранного потенциала ($\Delta\Psi_m$) часто используют для оценки состояния клетки. Продолжительные изменения $\Delta\Psi_m$ (деполяризация или гиперполяризация) приводят к нарушению функциональной активности клеток (снижению жизнеспособности), что может стать причиной различных патологий [14]. Мы оценили влияние циннаматов на $\Delta\Psi_m$ нейтрофилов (рис.).

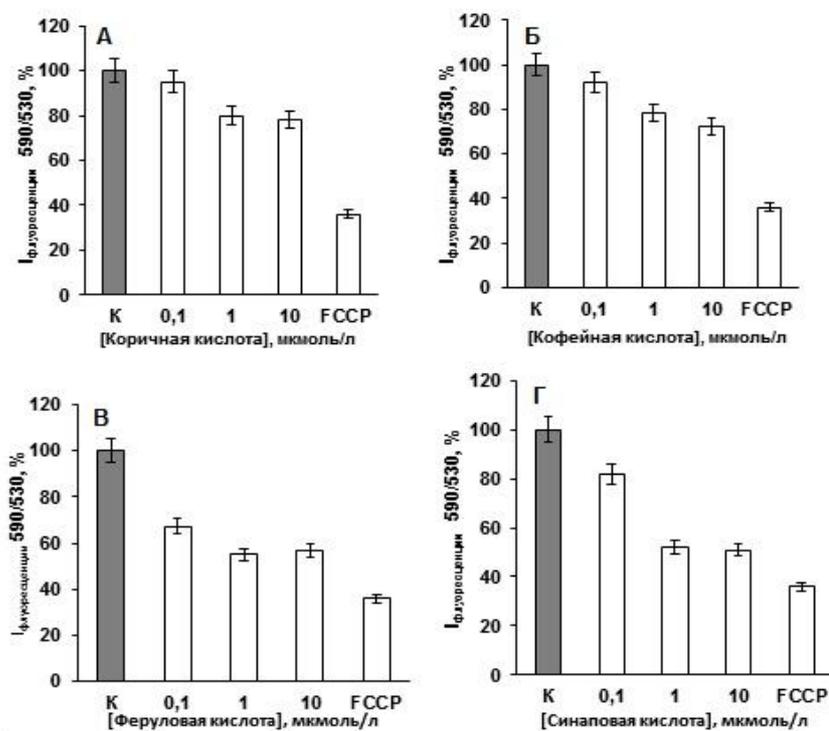


Рисунок – Влияние коричной (А), кофейной (Б), феруловой (В) и синаповой (Г) кислот на величину митохондриального мембранного потенциала нейтрофилов

Время инкубирования с добавками – 30 мин

Установлено, что коричная и кофейная кислоты в концентрации 0,1 мкмоль/л не оказывают влияния на величину $\Delta\Psi_m$. Коричная кислота в концентрациях 1 и 10 мкмоль/л вызывает снижение $\Delta\Psi_m$ на 20 и 21,8 % соответственно. Показано, что инкубирование нейтрофилов с 1 и 10 мкмоль/л кофейной кислоты приводит к уменьшению $\Delta\Psi_m$ на 21,4 и 28 % соответственно. Феруловая кислота в диапазоне концентраций 0,1-10 мкмоль/л ингибирует $\Delta\Psi_m$ на 33-44 %. Инкубирование нейтрофилов с 0,1-10 мкмоль/л синаповой кислоты приводит к снижению $\Delta\Psi_m$ на 19-49 % по сравнению с контролем.

Полученные в работе результаты позволяют сделать следующие выводы:

1. Коричная, феруловая и синаповая кислоты в концентрации 10 мкмоль/л незначительно снижают выживаемость нейтрофилов. Кофейная кислота в концентрациях 1 и 10 мкмоль/л вызывает уменьшение выживаемости клеток на 25,2 и 32,7 % соответственно, что свидетельствует о гибели нейтрофилов по механизму некроза;

2. В отличие от коричной, кофейная, феруловая и синаповая кислоты способны подавлять продукцию АФКХ в стимулированных нейтрофилах, что обусловлено их ингибирующим действием на активность МПО;

3. Исследуемые циннаматы в диапазоне концентраций 0,1-10 мкмоль/л не влияют на процесс секреторной дегрануляции нейтрофилов;

4. Установлено, что коричная, кофейная, феруловая и синаповая кислоты вызывают снижение митохондриального мембранного потенциала нейтрофилов.

Работа выполнена при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований, грант М22М-071.

Список использованных источников

1. Ruwizhi, N. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy / N. Ruwizhi, A.B. Atim // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – Vol. 21. – P. 1–34.

2. Sova, M. Antioxidant and antimicrobial activities of cinnamic acid derivatives / M. Sova // Med Chem. – 2012. – Vol. 12(8). – P. 749–67.

3. Wang, Y. Antifungal Activity and Action Mechanism of the Natural Product Cinnamic Acid Against *Sclerotinia sclerotiorum* / Y. Wang [et al.] // Plant Dis. – 2019. – Vol. 103(5). – P. 944–950.

4. Zhang, W.X. Design, synthesis and biological evaluation of cinnamic acid derivatives with synergistic neuroprotection and angiogenesis effect / W.X. Zhang [et al.] // Eur. J. Med. Chem. – 2019. – Vol. 183:111695.

5. De, P. Cinnamic acid derivatives as anticancer agents-a review / P. De, M. Baltas, F. Bedos-Belval // Curr. Med. Chem. – 2011. – Vol. 18. – P. 1672–1703.

6. Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine / H. Sies // Redox. Biol. – 2015. – Vol. 4. – P. 180–183.

7. Dupré-Crochet, S. ROS production in phagocytes: why, when, and where? / Dupré-Crochet S., Erard M., Nüße O. // J. Leukoc. Biol. – 2013. – Vol. 94(4). – P. 657–670.

8. Böyum, A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages / A. Böyum // Scand. J. Immunol. – 1976. – Vol. 5. – P. 9–15.

9. Kato, F. Rapid fluorometric assay for cell viability and cell growth using nucleic acid staining and cell lysis agents / F. Kato, M. Tanaka, K. Nakamura // Toxicol. in Vitro. – 1999. – Vol. 13. – P. 923–929.

10. Liu, L. A simple chemiluminescence assay for the determination of reactive oxygen species produced by human neutrophils / L. Liu [et al.] // J. Immunol. Meth. – 1996. – Vol. 192 (1–2). – P. 173–178.

11. Pulli, B. Measuring Myeloperoxidase Activity in Biological Samples / B. Pulli [et al.] // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8(7): e67976.

12. Sivandzade, F. Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic JC-1 dye as a sensitive fluorescent probe / F. Sivandzade, A. Bhalerao, L. Cucullo // Bio Protoc. – 2019. – Vol. 9 (1).

13. Lacy, P. Mechanisms of degranulation in neutrophils / P. Lacy // Allergy Asthma Clin Immunol. – 2006. – Vol. 2, № 3. – P. 98-108.

14. Mitochondrial membrane potential / L.D. Zorova [et al.] // Anal Biochem. – 2018. – Vol. 552 – P. 50-59.