

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА РАСТИТЕЛЬНЫХ ПОЛИФЕНОЛОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ *IN VITRO*

Долгих О.В.¹, Дианова Д.Г.^{1,2}, Ширинкина А.С.¹, Бомбела Т.В.²

¹ ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

² ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Резюме. Полифенолы обладают широким спектром биологических эффектов, в том числе иммуномодулирующим. Изучение влияния флавоноидов на фагоцитарную активность профессиональных фагоцитов представляется достаточно перспективным направлением для их дальнейшего использования в качестве фармакологического (терапевтического) агента. К наиболее распространенным представителям флавоноидов с плеiotропным действием относятся кверцетин и лютеолин. Углубленное изучение и понимание иммунотропных механизмов (в том числе на примере регуляции фагоцитоза) является необходимым условием для проведения адекватной фармакотерапии при инфекционных процессах, воспалительных заболеваниях неспецифической этиологии, аутоиммунных и онкологических состояниях. Цель работы — изучить влияние флавоноидов на фагоцитарную активность профессиональных фагоцитов (нейтрофилов) в системе *in vitro*. В работе использован биологический материал (венозная кровь) 30 практически здоровых человек (взрослые $n = 15$, дети $n = 15$). Исследование выполнено в соответствии с установленными международными правилами. В опытные пробы вносили 0,5 мг/л Luteolin (содержание основного вещества $\geq 98\%$) и Quercetin (содержание основного вещества $\geq 95\%$) и инкубировали 20 мин при 37 °С. Процент фагоцитоза, фагоцитарное число (количество поглощенных формализированных эритроцитов барана одной клеткой нейтрофила) определяли с помощью световой микроскопии в контрольных и опытных образцах. В системе *in vitro* отмечен однонаправленный характер угнетения фагоцитоза кверцетином и лютеолином. Идентифицировано статистически значимое ($p < 0,05$) ослабление на 10% интенсивности фагоцитоза в опытных образцах крови, полученной от взрослых пациентов, относительно контрольных значений. При добавлении кверцетина и лютеолина в пробы крови, полученной от детей, отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение на 30% фагоцитоза по сравнению с контрольными величинами. Вместе с тем среднее значение процента фагоцитоза и фагоцитарного числа в образцах крови после добавления флавоноидов регистрировались в диапазоне референтных значений, что демонстрирует адекватность и физиологичность угнетения чрезмерной агрессивности компартментов врожденного иммунитета кверцетином и лютеолином. Установлено, что в указанной концентрации более выраженное супрессорное действие флавоноиды оказывали на фагоцитарную активность у детей. Моделирование

Адрес для переписки:

Долгих Олег Владимирович
ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»
614045, Россия, г. Пермь, ул. Монастырская, 82.
Тел.: 8 (342) 236-39-30.
E-mail: oleg@fcrisk.ru

Address for correspondence:

Oleg V. Dolgikh
Federal Research Center for Medical and Preventive
Technologies for Public Health Risk Management
82 Monastyrskaya St
Perm
614045 Russian Federation
Phone: +7 (342) 236-39-30.
E-mail: oleg@fcrisk.ru

Образец цитирования:

О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, А.С. Ширинкина, Т.В. Бомбела «Иммуномодулирующие свойства растительных полифенолов в экспериментальной модели *in vitro*» // Медицинская иммунология, 2024, Т. 26, № 1. С. 143–150.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2655

© Долгих О.В. и соавт., 2024
Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

O.V. Dolgikh, D.G. Dianova, A.S. Shirinkina, T.V. Bombela
“Immunomodulatory properties of plant polyphenols shown
in an *in vitro* experimental model”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2024, Vol. 26, no. 1,
pp. 143–150.
doi: 10.15789/1563-0625-IPO-2655

© Dolgikh O.V. et al., 2024
The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License
DOI: 10.15789/1563-0625-IPO-2655

иммунного ответа на примере индикаторных показателей фагоцитоза с его верификацией на экспериментальных моделях *in vitro* на нейтрофилах, полученных у практически здоровых взрослых и детей, позволяет расширить понимание механизма иммуотропного эффекта флавоноидов кверцетина и лютеолина для задач коррекции иммунопатологических состояний.

Ключевые слова: иммуномодулирующая активность, кверцетин, лютеолин, фагоцитоз, нейтрофилы, эксперимент *in vitro*

IMMUNOMODULATORY PROPERTIES OF PLANT POLYPHENOLS SHOWN IN AN *IN VITRO* EXPERIMENTAL MODEL

Dolgikh O.V.^a, Dianova D.G.^{a, b}, Shirinkina A.S.^a, Bombela T.V.^b

^a Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies for Public Health Risk Management, Perm, Russian Federation

^b Perm State Academy of Pharmacy, Perm, Russian Federation

Abstract. Polyphenols exert a wide range of biological effects, including immunomodulatory action. Studying the effects of flavonoids on phagocytic activity of specialized phagocytic cells seems to be a rather promising direction for their further usage as pharmacological (therapeutic) agents. Quercetin and luteolin are the most commonly studied flavonoid substances with pleiotropic action. In-depth study and understanding of immunotropic mechanisms (e.g., regulation of phagocytosis) is a prerequisite for adequate pharmacotherapy in infectious conditions, nonspecific inflammatory diseases, autoimmune and oncological disorders. The aim of our work is to study the effect of flavonoids upon phagocytic activity of professional phagocytes (neutrophils) using an *in vitro* test system. The biological material (venous blood) from 30 practically healthy people (adults $n = 15$, children $n = 15$) was used in the present work. The study was carried out in accordance with established international regulations. 0.5 mg/L of Luteolin (basic substance content $\geq 98\%$) and Quercetin (basic substance content $\geq 95\%$) were added to experimental samples and incubated for 20 min at 37 °C. The percentage of phagocytosis, phagocytic number (mean number of formalin-treated sheep erythrocytes engulfed per one neutrophil) was determined in control and experimental samples using light microscopy. The unidirectional nature of phagocytosis inhibition by quercetin and luteolin was noted in the test experiments. A statistically significant ($p < 0.05$) decrease in the phagocytosis intensity by 10% was shown in experimental blood samples obtained from adult patients compared with control values. When quercetin and luteolin were added to blood samples obtained from children, a statistically significant ($p < 0.05$) decrease in phagocytosis by 30% was noted against control values. At the same time, the mean percentage of phagocytosis and phagocytic number in blood samples after the addition of flavonoids were found to be in the range of reference values, thus suggesting adequacy and physiological suppression of excessive activities of innate immunity compartments by quercetin and luteolin. At this concentration, the flavonoids were found to exert a more pronounced suppressive effect on phagocytic activity in children. Modeling of immune response using the phagocytosis indices assayed in experimental *in vitro* models with neutrophils from practically healthy adults and children enables us to expand the knowledge of mechanisms underlying the immunotropic effects of flavonoids (quercetin and luteolin), in order to correct immunopathological conditions.

Keywords: immunomodulatory activity, quercetin, luteolin, phagocytosis, neutrophils, *in vitro* study

Введение

Биофлавоноиды (кемпферол, кемпферид, апигенин, байкалейн, кверцетин, лютеолин, рутин и др.), являющиеся вторичными метаболитами многих растений или растительными полифенолами, обладают значительным разнообразием биологической активности, в том числе, иммуномодулирующими свойствами. У многих представителей флавоноидов обнаружены антиоксидантный, иммуномодулирующий, про-

тивовоспалительный, противоаллергический, противовирусный, гепатопротективный, анти-эластазный, противораковый, антиноцицептивный, жаропонижающий, противоартритный эффекты, многие из которых являлись дозозависимыми [3, 4, 6, 12, 13, 17]. В системе *in vitro* установлено, что лютеолин, кемпферол, апигенин, фезетин и кверцетин (50, 100 и 200 мкМ) снижали продукцию NO и ослабляли фагоцитоз, при этом ингибирующее влияние положительно коррелировало с антиоксидантной активностью

флавоноидов [13]. Установлено снижение LPS-индуцированной продукции IL-6 нейтрофилами человека после внесения в культуру клеток кверцетина (80 мкМ). Уменьшение дегрануляции нейтрофилов, выделенных из периферической крови человека, выявлено после добавления в культуру кверцетина, при этом отмечен дозозависимый характер эффекта. Показано ингибирующее действие кверцетина (в диапазоне концентраций 0,625–100 мкмоль/л) на миграцию полиморфноядерных лейкоцитов [6]. В экспериментах на клеточных культурах микроглии установлено, что кверцетин (5 мМ и 10 мМ) подавлял фагоцитоз, инкубация клеток аденокарциномы легкого человека (A549) с кверцетином (25 мМ и 50 мкМ) уменьшала высвобождение миелопероксидазы из нейтрофилов. Вместе с тем показано, что введение кверцетина (2 мг/кг и 4 мг/кг) мышам линии BALB/c дозозависимо стимулировало фагоцитоз перитонеальных макрофагов [15]. Инкубация нейтрофилов, выделенных из крови крупного рогатого скота, в течение 30 мин с кверцетином (50 мкМ) стимулировала фагоцитоз, однако при увеличении инкубации до 90 мин отмечено угнетение фагоцитарной активности клеток [12]. В двойном плацебо-контролируемом исследовании не обнаружено влияния флавоноидов (кверцетин) на показатели врожденного иммунитета при их длительном приеме (12 недель) [7]. Введение лютеолина мышам вызывало снижение выделения клетками O_2^- и H_2O_2 , дозозависимые антиоксидантные и противовоспалительные свойства лютеолина подтверждены в экспериментальных моделях клеточной линии альвеолярных макрофагов мыши (MH-S). При совместном культивировании клеток человеческой миеломы линии H929 с макрофагами из костного мозга мыши добавление лютеолина способствовало макрофагальному фагоцитозу раковых клеток. Показано, что лютеолин вызывал гибель опухолевых клеток, подавляя экспрессию bcl-2, активацию STAT3 и повышая активность бах, каспазы-3. В условиях эксперимента доказан антиканцерогенный эффект кверцетина, характеризующийся активацией ферроптоза, некроптоза и пироптоза патологических клеток [14]. Множественные и разнообразные эффекты флавоноидов зависят не только от их химического строения, но и особенностей экспериментальной модели и различных условий проведения эксперимента (уровень pH, время инкубации, температурный режим, доза/концентрация и т. д.). Различия спектра биологической активности кверцетина и лютеолина, обнаруженные у человека и животных, в значительной степени связаны с фармакокинетическими параметрами веществ, которые детерминированы генетическим профилем организма. В случае использования в качестве модели *in vitro* нейтрофильных гранулоцитов следует учитывать

гетерогенность популяции нейтрофилов, что обуславливает значительную их функциональную вариабельность и инициацию ими разноплановых процессов в организме. Перспективным является решение задачи управления профилем иммуномодулирующей активности флавоноидов, потенциально действующие на различные биологические мишени и сайты связывания, для поиска и разработки иммунофармакологических агентов.

Специализированные клетки, так называемые профессиональные фагоциты, к которым относятся макрофаги, нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки и остеокласты, осуществляют наиболее эффективный фагоцитоз. Нейтрофилы представляют основную популяцию фагоцитирующих гранулоцитов и составляют 50–70% циркулирующих лейкоцитов. В последние годы появляются данные, указывающие на то, что нейтрофильные гранулоциты обладают фенотипической и функциональной пластичностью. Нейтрофилы, являясь важнейшими клетками врожденного иммунитета, первыми реагируют на повреждение тканей и оказывают регуляторное влияние на клетки адаптивного иммунитета. При скоплении нейтрофилов в очагах инфекции/воспаления происходит реализация их антимикробной эффекторной функции (фагоцитоз, дегрануляция с высвобождением целого ряда антимикробных пептидов и ферментов, формирование нейтрофильных внеклеточных ловушек (NET), генерация активных форм кислорода (ROS)), что ускоряет разрешение воспаления, связанного с инфекцией. Между тем в результате реверсивной миграции из тканей обратно в сосуды нейтрофилы способны доставлять живые патогены из очага поражения в сосудистое русло, что благоприятствует генерализации инфекционного процесса и формированию септического состояния. Показана роль полиморфонуклеарных нейтрофилов в патогенезе аутоиммунных заболеваний, аутовоспалительного процесса и канцерогенеза. Так, зрелые нейтрофилы, выступая в роли антигенпрезентирующих клеток, опосредуют развитие Th1 или Th17 поляризацию иммунного ответа, а перепроизводство NET и сохранение недеградированных NET дополнительно способствуют выработке аутоантител против клеток хозяина. Нейтрофилы, экспрессируя BAFF, облегчают выживание В-клеток и их дифференцировку в плазматические клетки. У пациентов с COVID-19 в случае развития нейтрофилии отмечено значительное образование ROS и неконтролируемое производство NET, что усугубляет повреждение легочной ткани с развитием пневмонии, осложненной фиброзом. Нейтрофильные гранулоциты, секретируя иммунные медиаторы для рекрутирования и активации противоопухолевых эффекторных клеток, унич-

тожают злокачественные клетки. В то же время нейтрофилы облегчают онкогенез, опосредуют иммуносупрессию. Нейтрофилы, генерируя выработку ROS, обуславливают повреждение ДНК и развитие опухоли; высвобождая нейтрофильную эластазу, поддерживают злокачественный рост; высвобождая протеиназы (катептин G, эластаза) и VEGF, облегчают и усиливают метастазирование. Установлена роль нейтрофилов в патогенезе хронических неинфекционных заболеваний — сахарный диабет, неалкогольная жировая болезнь печени, нейтрофильная астма, хроническая обструктивная болезнь легких, муковисцидоз, нейродегенеративные заболевания, показано значение клеток в образовании и дестабилизации атеросклеротической бляшки. Нейтрофилы постоянно рекрутируются в очаг хронического воспаления, что способствует поддержанию патологического процесса за счет высвобождения сериновых протеаз и образования внеклеточных ловушек нейтрофилов, а также активации других иммунных клеток. Важнейшей функцией фагоцитоза является поддержание тканевого гомеостаза. Появление фосфатидилсери- на на поверхности мембраны клетки дает команду фагоциту «съешь меня». Полагают, что апоптотические клетки, экспонирующие высокий уровень фосфатидилсери- на, в отличие от некротических клеток значительно быстрее и эффективнее поглощаются фагоцитами. Однако есть сообщения о противоположных результатах. Возможно, при осуществлении фагоцитоза клеток, погибших по различным сценариям, используются отличные системы лиганд/рецептор и механизмы реализации поглощения. Независимо от типа клеточной смерти, быстрое удаление умирающих клеток профессиональными фагоцитами остается первостепенным для поддержания физиологического гомеостаза, а механизмы, с помощью которых реализуется фагоцитоз погибших клеток, в настоящее время активно изучается. Показано, что количественный баланс и функциональная активность нейтрофилов во многом обуславливает условия для нормальной работы организма, позволяя своевременно и адекватно реагировать

на различные негативные факторы. Очевидно, регуляция механизмов фагоцитоза представляет научный и практический интерес, поскольку реализуется возможность потенциально усиливать уничтожение патогенов или защищать хозяина от повреждения собственных тканей.

Цель работы — изучить влияние биофлавоноидов на фагоцитарную активность профессиональных фагоцитов (нейтрофилов) в системе *in vitro* (на примере лютеолина и кверцетина).

Материалы и методы

При выполнении исследования учтены требования, изложенные в Хельсинкской декларации ВМА (1964, 2013). Для изучения иммуномодулирующего эффекта флавоноидов выполнена оценка фагоцитарной активности лейкоцитов периферической крови. Образцы цельной крови были получены от практически здоровых взрослых ($n = 15$) и детей ($n = 15$) (табл. 1). Информированное согласие на участие в исследовании и использование персональных данных подписано всеми взрослыми участниками исследования и родителями (опекунами) детей. Критериями включения являлось: молодой и средний возраст (35-50 лет), младший школьный возраст и подростковый возраст (7-17 лет); критериями исключения: обострение хронических заболеваний, участие в другом исследовании. Выполнен расчет процента фагоцитоза, фагоцитарного числа (ФЧ). В качестве объектов фагоцитоза использовали диагностикумы на основе тщательно отмытых несенсибилизированных формализованных эритроцитов барана. Критерием оценки фагоцитоза и фагоцитарного числа являлись референтные уровни (35-60% и 0,8-1,2 у. е. соответственно). Для определения иммунотропного действия использовали образец Luteolin (5,7,3,4-tetrahydroxyflavone) с содержанием основного вещества $\geq 98\%$ (CAS 49-70-3) и Quercetin (5,7,3',4'-tetrahydroxyflavonol-3) с содержанием основного вещества $\geq 95\%$ (CAS 117-39-5) фирмы Sigma-Aldric. Контрольные пробы — пробы без добавления лютеолина (Lu) и кверцетина (Qu), опытные пробы — пробы с до-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF STUDY OBJECTS

| Обследуемые Subjects | Возраст, лет Age, years | | Мужчины Men | | Женщины Women | |
|-------------------------|----------------------------|------------------|----------------|------|------------------|------|
| | M (σ) | 95% ДИ 95% CI | n | % | n | % |
| Взрослые Adults | 41,00 (8,20) | 36,46-45,54 | 10 | 66,7 | 5 | 33,3 |
| Дети Children | 12,53 (3,22) | 10,75-14,31 | 9 | 60,0 | 6 | 40,0 |

бавлением Lu и Qu в концентрации 0,5 мг/л, что соответствует терапевтической концентрации.

Процедуры статистического анализа данных осуществляли с использованием пакета STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Для проверки статистических гипотез о виде распределения был применен критерий Колмогорова–Смирнова. Во всех случаях распределение признаков соответствовало закону нормального распределения. Количественные признаки представлены как среднее арифметическое значение, стандартное отклонение и 95%-ный доверительный интервал для среднего (М (σ) 95% ДИ). Для оценки значимости различий зависимых выборок использовали t-критерий Стьюдента. Проверка нулевых гипотез об отсутствии различий между долями выполнена с помощью критерия хи-квадрат (χ^2). Критическое значение уровня статистической значимости при проверке нулевых гипотез принималось равным 0,05. Если значение p было меньше 0,001, то p указывали в формате $p < 0,001$.

Результаты и обсуждение

Результаты эксперимента продемонстрировали, что внесение флавоноидов в образцы цельной крови вызывало супрессорный эффект на отдельные показатели неспецифической резистентности (табл. 2). После добавления в пробы крови, полученной от взрослых обследуемых, кверцетина и лютеолина отмечено статистически значимое ($p = 0,008-0,018$) снижение в 1,1 раза процентного содержания фагоцитирующих клеток и

в 1,2 раза — фагоцитарного числа по отношению к исходным значениям. Установлено, что при инкубации периферической крови, полученной от детей, с Lu и Qu происходило статистически значимое ($p < 0,001$) ингибирование в 1,25 раза относительного фагоцитоза и снижение в 1,6 раза фагоцитарного числа по сравнению к спонтанному уровню.

Установлено, что в образцах цельной крови, полученной от взрослых, доля проб со сниженной фагоцитарной активностью нейтрофилов относительно минимальных нормативных величин после инкубации с флавоноидами возросла в 1,9 раза ($p = 0,571$), что составило 6,7% и 13,3% соответственно. Доля проб со значением ФЧ выше верхнего диапазона референтного интервала в пробах крови взрослых в условиях экспозиции Qu и Lu снизилась в 1,6 раза ($p = 0,270$), что составило 53,3% и 33,3% соответственно. После внесения флавоноидов в пробы крови, полученной от детей, доля проб с пониженным значением фагоцитоза, относительно референтного интервала, увеличилась в 2,7 раза ($p = 0,059$), что составило 20% и 53,3% соответственно. Обнаружено, что в опытных образцах детской крови доля проб со значениями ФЧ выше регистровой границы уменьшилась по сравнению со спонтанным уровнем в 6,8 раза ($p = 0,014$), что составило 46,7% и 6,7% соответственно. Таким образом, результаты оценки иммуномодулирующего влияния кверцетина и лютеолина на показатели врожденного иммунитета продемонстрировали, что данные

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТ ФЛАВОНОИДОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТОЗА В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ УСЛОВИЯХ *IN VITRO*, М (Σ) 95% ДИ (n = 15)

TABLE 2. EFFECT OF FLAVONOIDS ON INDICATORS OF PHAGOCYTOSIS UNDER EXPERIMENTAL CONDITIONS *IN VITRO*, М (Σ) 95% CI (n = 15)

| Показатель Index | Контрольная проба Control sample | Проба с нагрузкой Load test | | p ¹ | p ² |
|--|--|--------------------------------|------------------------------|----------------|----------------|
| | | Qu | Lu | | |
| Показатели неспецифической резистентности у взрослых (n = 15) Indicators of nonspecific resistance in adults (n = 15) | | | | | |
| Фагоцитоз, % Phagocytosis, % | 49,73 (10,78) 43,76-55,70 | 45,46 (12,28) 38,66-52,26 | 46,20 (12,58) 39,23-53,17 | 0,018 | 0,010 |
| ФЧ, у. е. FC, с. у. | 1,28 (0,42) 1,05-1,51 | 1,07 (0,36) 0,87-1,27 | 1,02 (0,37) 0,82-1,22 | 0,008 | 0,001 |
| Показатели неспецифической резистентности у детей (n = 15) Indicators of nonspecific resistance in children (n = 15) | | | | | |
| Фагоцитоз, % Phagocytosis, % | 46,00 (15,41) 37,47-54,53 | 36,80 (14,44) 28,80-44,80 | 36,80 (14,18) 28,95-44,65 | < 0,001 | 0,010 |
| ФЧ, у. е. FC, с. у. | 1,39 (0,69) 1,01-1,77 | 0,91 (0,57) 0,59-1,23 | 0,86 (0,48) 0,59-1,13 | < 0,001 | < 0,001 |

Примечание. p¹ — сравнение с кверцетином; p² — сравнение лютеолином.

Note. p¹, comparison with quercetin; p², comparison with luteolin.

флавоноиды в концентрации 0,5 мг/л вызывали однонаправленный ингибирующий эффект на фагоцитарную активность нейтрофилов и их поглонительную способность. Установлено, что в указанной концентрации более выраженное супрессорное действие флавоноиды оказывали на функциональную активность фагоцитов у детей.

Согласно различным источникам с учетом воздействия различных факторов диапазон референтных значений показателей фагоцитоза значительно различается. Так, в соответствии с рекомендациями ряда авторов референтные нормативы для фагоцитоза предлагаются в диапазоне значений от 60 до 80% [1], отдельных исследователей — от 7 до 68% [2]. Широкий диапазон референтного интервала также обусловлен существенной вариабельностью иммунологических показателей. Рядом исследователей установлена связь фагоцитоза с возрастными и гендерными особенностями индивидуумов, а другими исследователями данная причинно-следственная зависимость не выявлена [16]. Однако следует отметить, что у взрослых вторичный адаптивный иммунный ответ модифицирует ответную реакцию на антиген, которая у детей компартментами врожденного иммунного ответа может формироваться в виде воспаления как альтерация. Учитывая возрастные особенности реализации иммунной защитной стратегии организма, существует необходимость в использовании растительных полифенолов как фармакологических агентов, модулирующих ответ иммунной системы, в том числе посредством модификации механизма неспецифической защиты с участием нейтрофильных гранулоцитов.

Установлено, что значительная роль в запуске фагоцитоза принадлежит высоко реакционно-способным формам кислорода. Во время окислительного взрыва фагоциты, продукция ROS, повышают эффективность фагоцитоза. Являясь участником фосфорилирования/дефосфорилирования белковых молекул, ROS контролируют внутриклеточные сигнальные каскады, координируют экспрессию генов, регулируют активность потенциалзависимых кальциевых каналов и др. Однако избыток ROS может стать причиной нарушения внутриклеточного гомеостаза, фактором изменения функциональной активности клетки и в итоге пусковым механизмом местного повреждения тканей или хронического воспаления. Необходимо оптимальное соотношение между генерацией и утилизацией ROS, обеспечивающее полезные и необходимые для клетки эффекты, что требует вовлечения в процесс регуляции механизмов окислительного взрыва антиоксидантов. Кверцетин и лютеолин обладают значительным потенциалом поглощения свободных радикалов [8, 13, 17].

Инкубация нейтрофилов периферической крови человека с кверцетином (100 мкмоль/л) уменьшала их форбол-миристан-ацетат-индуцированное образование супероксидного радикала на 42%, при этом не отмечено влияния на интактные клетки. Ингибирующий эффект Qu вызван подавлением фосфорилирования белков по аминокислотным остаткам серин/треонин и транслокацией цитозольных белков p47 phox и p67 phox через клеточную мембрану [11]. В системе *in vivo* лютеолин (70 мкмоль/кг) снижал интенсивность респираторного взрыва и ослаблял хемотаксис нейтрофилов [10]. Показано модулирующее влияние Qu и Lu на активность Ca^{2+} АТФазы и Na^+/K^+ АТФазы, участвующих во внутриклеточных сигнальных процессах [11]. Уровень цитозольного Ca^{2+} интактного нейтрофила (0,1 мкМ) в 10 000 раз ниже, чем во внеклеточной среде. Повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} активированного нейтрофила достаточно быстро происходит за счет высвобождения Ca^{2+} из внутриклеточных запасов и/или за счет притока внеклеточного Ca^{2+} . Внутриклеточный Ca^{2+} увеличивает как образование ROS (стимуляция в митохондриях ферментов цикла Кребса и окислительного фосфорилирования), так и процессы клиренса ROS (повышение активности каталазы, GSH-редуктазы, SOD). Образование фагосом также зависит от уровня кальция, что обуславливает сокращение нитей вакуоли.

Экспериментально установлено модифицирующее влияние лютеолина и кверцетина на MAPK, Wnt, PI3K/AKT/mTOR, JAK/STAT [3, 4, 5, 10, 17, 18]. Данные сигнальные каскады принимают участие в реализации респираторного взрыва и хемотаксиса, их молекулярная перестройка в результате воздействия, например, кверцетина или лютеолина, являются причиной изменения фагоцитарной активности лейкоцита. Состояние JAK/STAT-сигнальной трансдукции во многом определяет эффективность фагоцитоза. Кверцетин подавляет фосфорилирование P38/ERK/JNK, блокирует фосфорилирование mTOR, что приводит к уменьшению продукции IL-6, IL-1 β , TNF α и снижению чрезмерно выраженной воспалительной реакции. MAPK-сигнальный путь взаимодействует с PI3K/AKT/mTOR-сигнальным каскадом. Следует отметить, что на mTOR замыкаются многие сигнальные пути [17]. PI3K/AKT/mTOR-сигнальный путь в раковых клетках выполняет интегративную функцию между пролиферативными сигналами и активацией биосинтеза белка. Значительная роль в развитии ангиогенеза, индуцированного фагоцитами, отводится активированному mTOR и STAT3. Обнаружено регулирующее влияние Qu на фосфорилирование STAT3, ингибирующее влияние на активность NF- κ B [17]. Показана роль STAT3 в производстве митохондриальных

ROS и гомеостазе Ca^{2+} клетки. Установлено, что активация STAT3 усиливает фагоцитарную активность клетки, а mTORC1 отвечает за фосфорилирование данного белка. На клетках глиомы крысы (C6) показано, что кверцетин угнетал JAK2/STAT3-каскад и образование митохондриальных ROS, проявляя антиоксидантную и противоопухолевую активность, что характеризовалось снижением продукции IL-6, TNF α (активаторы JAK/STAT) и IL-1 β [18]. Кверцетин (25, 50 мкМ) в клетках линии HeLa ингибировал Wnt/ β -катениновый сигнальный путь и ERK1/2-зависимый каскад [1]. Кверцетин дозозависимо (10, 20, 40, 80, 160, 320 мкМ) блокировал Wnt-путь в клетках глиобластомы человека (U87) и эпителиоподобных клетках глиобластомы человека (T98 G) [5]. Ингибирующий эффект, зависящий от дозы лютеолина (18, 35, 70 мкмоль/кг), отмечен в системе *in vivo*. В присутствии Lu снижалось LPS-индуцированное MEK, ERK и Akt фосфорилирование в нейтрофилах. Инактивация p38 MAPK наблюдалась только при максимальной дозе лютеолина [10]. Установлено регулирующее влияние кверцетина и лютеолина на активность кальций-зависимой протеинкиназы C. Сообщалось, что в клетках линии базофильной лейкемии крыс (RBL-2H3) Lu (50 мкМ) ингибировал NF- κ B, в тучных клетках человека (HMC-1) снижал высвобождение Ca^{2+} из внутреннего депо необходимого для активации MAPK [9]. При суточной экспозиции клеточной линии MN-S с взвешенными частицами размером до 2,5 мн (25, 50, 100 мкг/мл), добавление в опытные пробы лютеолина (80, 40, 20, 10, 5 мкМ) снижало активность JAK2/STAT1/NF- κ B сигнального пути. В эксперименте обнаружено антиоксидантное действие (повышение экспрессии HO-1) и противовоспалительный эффект (снижение экспрессии COX-2, IL-6, TNF α) лютеолина [8]. В экспериментальной модели продемонстрировано, что STAT1, являясь трансдуктором сигналов от рецепторов IFN γ и вызывая трансактивацию Fc γ RI и Fc γ RIV, повышает фагоцитарную активность макрофагов (селезенки человека и мыши соответственно). В системе *in vivo* отмечен

инактивирующий эффект лютеолина на JAK/STAT3 и NF- κ B [4]. Очевидно, научные сведения, полученные в различных экспериментальных моделях, подтверждают наличие иммуномодулирующего эффекта кверцетина и лютеолина.

В целом результаты настоящего эксперимента согласуются с результатами исследований, представленных другими авторами, о прямом/косвенном влиянии кверцетина и лютеолина на отдельные показатели иммунитета. Ослабление фагоцитоза указывает на потенциальное участие иммуномодулирующего механизма в лютеолин-опосредованном и кверцетин-опосредованном эффекте, обусловленном, возможно, выраженной антиоксидантной активностью флавоноидов. В системе *in vitro* модулирующий эффект, оказываемый флавоноидами на нейтрофильные лейкоциты практически здоровых людей, имел однонаправленный ингибирующий характер. Установлено, что кверцетин и лютеолин в концентрации 0,5 мг/л статистически значимо ($p < 0,05$) в среднем на 20% снижали интенсивность фагоцитоза относительно контрольных величин, однако средние значения показателей (процент фагоцитоза, фагоцитарное число) идентифицированы в диапазоне референтного интервала, что позволяет говорить о терапевтическом, а не токсическом эффекте Qu и Lu. При этом более выраженную ответную реакцию на флавоноиды продемонстрировали клетки периферической крови, полученные у детского населения. Вместе с тем следует отметить необходимость дальнейших исследований как *in vitro*, так и *in vivo* для детализации иммуномодулирующего механизма и определения молекул-мишеней Qu и Lu. Таким образом, использование экспериментальной модели *in vitro* для изучения влияния биофлавоноидов на показатели врожденного иммунитета позволило получить дополнительные научные сведения об иммуномодулирующих свойствах растительных полифенолов, необходимые для создания новых эффективных фармакологических препаратов, модифицирующих механизм неспецифической защиты с участием нейтрофильных гранулоцитов.

Список литературы / References

1. Кетлинский С.А., Калинина Н.М. Иммунология для врача. СПб.: Гиппократ, 1998. 156 с. [Ketlinsky S.A., Kalinina N.M. Immunology for the doctor]. St. Petersburg: Gippokrat, 1998. 156 p.
2. Селянина Г.А. Оценка состояния иммунной системы у жителей Челябинской области // Медицинская иммунология. 2006. Т. 8, № 5-6. С. 741-744. [Selyanina G.A. Evaluation of the state of the immune system in residents of the Chelyabinsk region. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006. Vol. 8, no. 5-6, pp. 741-744. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2006-5-6-741-744.
3. Almatroodi S.A., Alsahli M.A., Almatroudi A., Verma A.K., Aloliki A., Allemailem K.S., Khan A.A., Rahmani A.H. Potential therapeutic targets of quercetin, a plant flavonol, and its role in the therapy of various types of cancer through the modulation of various cell signaling pathways. *Molecules*, 2021, Vol. 26, no. 5, 1315. doi: 10.3390/molecules26051315.
4. Caporali S., de Stefano A., Calabrese C., Giovannelli A., Pieri M., Savini I., Tesaro M., Bernardini S., Minieri M., Terrinoni A. Anti-Inflammatory and active biological properties of the plant-derived bioactive compounds luteolin and luteolin 7-glucoside. *Nutrients*, 2022, Vol. 14, no. 2, 1155. doi: 10.3390/nu14061155.

5. Chen B., Li X., Wu L., Zhou D., Song Y., Zhang L., Wu Q., He Q., Wang G., Liu X., Hu H., Zhou W. Quercetin suppresses human glioblastoma migration and invasion via GSK3 β / β catenin/ZEB1 signaling pathway. *Front. Pharmacol.*, 2022, Vol. 13, 963614. doi: 10.3389/fphar.2022.963614.
6. Han L., Fu Q., Deng C., Luo L., Xiang T., Zhao H. Immunomodulatory potential of flavonoids for the treatment of autoimmune diseases and tumour. *Scand. J. Immunol.*, 2022, Vol. 95, e13106. doi: 10.1111/sji.13106.
7. Heinz S., Henson, D., Nieman, D., Austin, M., Jin F. A 12-week supplementation with quercetin does not affect natural killer cell activity, granulocyte oxidative burst activity or granulocyte phagocytosis in female human subjects. *Br. J. Nutr.*, 2010, Vol. 104, no. 6, pp. 849-857.
8. Hsieh W.C., Lai C.Y., Lin H.W., Tu D.G., Shen T.J., Lee Y.J., Hsieh M.C., Chen C.C., Han H.H., Chang Y.Y. Luteolin attenuates PM2.5-induced inflammatory responses by augmenting HO-1 and JAK-STAT expression in murine alveolar macrophages. *Food Agricul. Immunol.*, 2022, Vol. 33, pp. 1, 47-64.
9. Kang O., Choi J., Lee J.H. Luteolin isolated from the flowers of *Lonicera japonica* suppresses inflammatory mediator release by blocking NF- κ B and MAPKs activation pathways in HMC-1 cells. *Molecules*, 2020, Vol. 15, no. 1, pp. 385-398.
10. Lee J., Li Y., Chen H., Lin R., Huang S., Chen H., Kuan P., Liao M., Chen C., Kuan Y. Protective effects of luteolin against lipopolysaccharide-induced acute lung injury involves inhibition of MEK/ERK and PI3K/Akt pathways in neutrophils. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 2010, Vol. 31, pp. 831-838.
11. Pečivová J., Mačičková T., Světeková K., Nosál R. Quercetin inhibits degranulation and superoxide generation in PMA stimulated neutrophils. *Interdiscip. Toxicol.*, 2012, Vol. 5, no. 2, pp. 81-83.
12. Srikok S., Nambut S., Wongsawan K., Chuammitri P. Quercetin promotes the expression of genes involved in phagocytosis in bovine neutrophils. *Am. J. Anim. Vet. Sci.*, 2017, Vol. 12, no. 2, pp. 85-95.
13. Tian C., Liu X., Chang Y., Wang R., Lv T., Cui C., Liu M. Investigation of the anti-inflammatory and antioxidant activities of luteolin, kaempferol, apigenin and quercetin. *S. Afr. J. Bot.*, 2021, Vol. 137, pp. 257-264.
14. Yang H., Xu S., Tang L., Gong J., Fang H., Wei J., Su D. Targeting of nonapoptotic cancer cell death mechanisms by quercetin: Implications in cancer therapy. *Front. Pharmacol.*, 2022, Vol. 13, 1043056. doi: 10.3389/fphar.2022.1043056.
15. Yu C.S., Lai K.C., Yang J.S., Chiang J.H., Lu C.C., Wu C.-L., Lin J.P., Liao C.L., Tang N.Y., Wood W.G., Chung J.G. Quercetin inhibited murine leukemia WEHI-3 cells in vivo and promoted immune response. *Phytother. Res.*, 2010, Vol. 24, pp. 163-168.
16. Verhoeven D. Immunometabolism and innate immunity in the context of immunological maturation and respiratory pathogens in young children. *J. Leukoc. Biol.*, 2019, Vol. 106, pp. 301-308.
17. Wang X., Fu Y., Botchway B.O.A., Zhang Y., Zhang Y., Jin T., Liu X. Quercetin can improve spinal cord injury by regulating the mTOR signaling pathway. *Front. Neurol.*, 2022, Vol. 13, 905640. doi: 10.3389/fneur.2022.905640.
18. Zalpoor H., Nabi-Afjadi M., Forghaniesfidvajani R., Tavakol C. Farahighasreaboonasr F., Pakizeh F., Dana V.G., Seif F. Quercetin as a JAK-STAT inhibitor: a potential role in solid tumors and neurodegenerative diseases. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 2022, Vol. 27, no. 1, 60. doi: 10.1186/s11658-022-00355-3.

Авторы:

Долгих О.В. — д.м.н., заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Дианова Д.Г. — д.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории методов клеточных технологий отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения»; профессор кафедры фармакологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Ширинкина А.С. — младший научный сотрудник лаборатории методов клеточных технологий отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», г. Пермь, Россия

Бомбела Т.В. — д.фарм.н., доцент, профессор кафедры ботаники и фармацевтической биологии ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Пермь, Россия

Authors:

Dolgikh O.V., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies for Public Health Risk Management, Perm, Russian Federation

Dianova D.G., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Cell Technology Methods of the Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies for Public Health Risk Management; Professor, Department of Pharmacology, Perm State Academy of Pharmacy, Perm, Russian Federation

Shirinkina A.S., Junior Research Associate, Laboratory of Cell Technology Methods of the Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Federal Research Center for Medical and Preventive Technologies for Public Health Risk Management, Perm, Russian Federation

Bombela T.V., PhD, MD (Pharmacy), Associate Professor, Professor of the Department of Botany and Pharmaceutical Biology, Perm State Academy of Pharmacy, Perm, Russian Federation

Поступила 09.02.2023
Принята к печати 24.02.2023

Received 09.02.2023
Accepted 24.02.2023