

# ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ В РАЗНЫХ КОМБИНАЦИЯХ НА ЛЮЦИГЕНИН-ЗАВИСИМУЮ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЮ В АЛЬВЕОЛЯРНЫХ И ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ МАКРОФАГАХ КРОВИ

УДК 615.2

© **И. В. Зарубина, Е. В. Антоненкова, А. В. Болахан, Е. В. Мокренко**

«Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» МО РФ, Санкт-Петербург

## Ключевые слова:

альвеолярные и перитонеальные макрофаги; антиоксидантные свойства; иммуномодуляторы; метапрот; трекрезан; полиоксидоний.

## Резюме

*In vitro* альвеолярные и перитонеальные макрофаги являются системами с ограниченной возможностью оценки антиоксидантных свойств иммуномодуляторов, поскольку в них можно оценить только антирадикальный (антисупероксидный  $O_2\cdot^-$ ) эффект. В данных системах иммуномодуляторы в разных концентрациях (0,1–20 мМ) могут оказывать прооксидантное и антиоксидантное действия. Перитонеальные и альвеолярные макрофаги по-разному реагируют на добавление иммуномодуляторов с заведомо доказанными системными антиоксидантными свойствами (метапрот, трекрезан, полиоксидоний). Комбинирование иммуномодуляторов повышает вероятность выявления их антирадикальных свойств в данных клеточных системах.

Фагоциты как ключевые эффекторы гомеостаза участвуют в развитии острого и хронического воспаления. Способность фагоцитов генерировать активные формы кислорода обеспечивает микробицидную функцию гранулоцитов [9]. Продукцию активных форм кислорода при стимуляции фагоцитов обеспечивает НАДФН-оксидаза с участием ионов  $Ca^{2+}$ , восстанавливая молекулярный кислород во внеклеточном пространстве до супероксида кислорода и окисляя при этом цитозольный NADPH до  $NADP^+$  [1]. Супероксидный анион запускает дальнейший каскад свободнорадикальных реакций и сопряженных с ним феноменов. В то же время избыточное образование свободных радикалов кислорода сопровождается разрушением здоровых тканей в очаге воспаления.

В связи с этим поиск средств коррекции кислородзависимого метаболизма гранулоцитов является актуальной проблемой. В лечении воспалительных процессов различного генеза применяются иммуномодуляторы полиоксидоний и трекрезан [4, 5], антигипоксант метапрот, а также их комбинации [11, 12]. Эти средства обладают широким спектром фармакологической активности и, воздействуя на базальные клеточные процессы, стимулируют адаптационные возможности организма. Ранее нами было

показано, что при активации перекисного окисления липидов гипоксическим фактором метапрот проявляет выраженные антиоксидантные свойства [6, 11, 12]. Для полиоксидония также характерно подавление спонтанного образования активных форм кислорода [8, 9]. Сведения об антиоксидантных свойствах трекрезана немногочисленны и требуют дальнейшего изучения.

Целью данного исследования явилось изучение влияния иммуномодуляторов полиоксидония, трекрезана и метапрота, а также их комбинаций на биохемилюминесценцию макрофагальных клеток.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили перитонеальные и альвеолярные макрофаги интактных крыс самцов Вистар массой 230–250 г. Альвеолярные макрофаги получали в бронхоальвеолярных смывах, перитонеальные макрофаги — в смывах из брюшной полости с применением раствора Хенкса (рН 7,4). Взвесь макрофагов содержала  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл. Адгезии макрофагов на стекло достигали 20-минутной инкубацией во влажной камере при  $37^\circ C$ . Полученная суспензия содержала более 98% жизнеспособных клеток по результатам теста с 0,1%-м раствором трипанового синего. При дифференцированном подсчете в окрашенных мазках макрофаги составляли около 90%.

Антиоксидантный эффект препаратов в макрофагах определяли в термостатируемой при  $37 \pm 0,5^\circ C$  кювете на хемилюминиметре «Хемилюм-1» (Россия), сопряженном с компьютером. Биохемилюминесценцию (БХЛ) регистрировали по изменению люцигенинзависимой хемилюминесценции, для усиления которой использовали люцигенин (бис-N-метилакридиний, «Sigma»). В кювету вносили 0,2 мл суспензии макрофагов, содержащую  $1 \times 10^7$  клеток, 0,1 мл раствора люцигенина (100 мкМ/л) и 0,1 мл физиологического раствора с соответствующими дозами тестируемых препаратов (в контроле — 0,1 мл физиологического раствора). Время инкубации составляло 20 мин и 40 мин. Уровень спонтанной БХЛ измеряли в течение 5 мин при постоянном перемешивании с помощью мешалки. После графической регистрации результатов с помощью оригинальной компьютерной программы вычисляли интен-

■ Таблица 1. Влияние метапрота, полиоксидония, трекрезана и их комбинаций на спонтанную люцигенинзависимую биохимилюминесценцию (БХЛсп) перитонеальных макрофагов (пМф) крыс ( $n = 10$ )

Препараты	Режим измерения	БХЛсп пМф, %*	
		Максимум свечения	Интенсивность свечения
Контроль	1	100	100
	2	100	100
Полиоксидоний 500 мкг/мл	1	109±7	115±5**
	2	97±3	108±3**
Полиоксидоний 1500 мкг/мл	1	91±6	86±6**
	2	84±5**	92±9
Трекрезан 0,1 мМ/л	1	105±3	100±2
	2	103±4	107±3
Трекрезан 20 мМ/л	1	79±3**	80±4**
	2	101±1	102±1
Метапрот 0,1 мМ/л	1	99±11	92±7
	2	90±7	85±6**
Метапрот 20 мМ/л	1	25±2**	21±2**
	2	43±6**	36±4**
Полиоксидоний 500 мкг/мл + метапрот 0,1 мМ/л	1	62±5**	62±5**
	2	96±4	99±3
Полиоксидоний 1500 мкг/мл + метапрот 20 мМ/л	1	25±2**	27±3**
	2	33±1**	36±3**
Трекрезан 0,1 мМ/л + метапрот 0,1 мМ/л	1	183±4**	191±6**
	2	285±12**	292±5**
Трекрезан 20 мМ/л + метапрот 20 мМ/л	1	23±4**	28±1**
	2	59±2**	38±2**

1 — БХЛсп Мф после инкубации с препаратом 20 мин; 2 — БХЛсп пМф после инкубации с препаратом 40 мин; \* — в % от контроля, где регистрируемые показатели спонтанной БХЛ пМф (без препаратов) принимали за 100%; \*\* — различия достоверны по сравнению с контролем при  $p < 0,05$

сивность БХЛ (интегральный показатель) и по высоте пика полученных кривых отмечали величину максимума интенсивности свечения. Показатели спонтанной БХЛ в контрольной группе (макрофаги в физиологическом растворе) принимали за 100%. Показатели БХЛ, полученные в опытных группах (макрофаги с препаратом), рассчитывали в процентах от контроля. С помощью регистрации спонтанной БХЛ клеток исследовали уровень продукции фагоцитами реактивных форм кислорода, прежде всего, супероксидного анион-радикала ( $O_2^{\cdot-}$ ), по интенсивности наработки которого можно оценить степень активности клетки и ее функциональный потенциал на фоне действия препарата [2, 3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние полиоксидония на интенсивность БХЛ в перитонеальных и альвеолярных макрофагах интактных животных было однонаправленным. В концентрации 500 мкг/мл полиоксидоний проявил прооксидантное, а в концентрации 1500 мкг/мл антиоксидантное действие, соответственно достоверно увеличивая и уменьшая уровень спонтанной БХЛ клеток (табл. 1, 2). Работами Б. В. Пинегина и соавторов [8] показано, что в лейкоцитах периферической крови нормальных доноров полиоксидоний в дозах 100, 250 и 500 мкг/мл резко подавляет спонтанное

образование перекиси водорода и супероксидного радикала, регистрируемых с помощью люминолзависимой и люцигенинзависимой спонтанной БХЛ. Ингибирование образования внеклеточных активных форм кислорода составляет основу антиоксидантного действия полиоксидония.

Действие трекрезана, метапрота и их сочетания с полиоксидонием на люцигенинзависимую БХЛ в перитонеальных и альвеолярных макрофагах было различным и дозозависимым. Так, в перитонеальных макрофагах после 20 мин инкубации трекрезан и метапрот в концентрации 20 мМ/л снижали интенсивность свечения на 20% и 80% соответственно (табл. 1). В альвеолярных макрофагах метапрот в дозе 20 мМ/л независимо от времени инкубации достоверно увеличивал интенсивность свечения. При 20-мин инкубации трекрезана в дозе 0,1 мМ/л интенсивность свечения в альвеолярных макрофагах возрастала на 22%, а при 40-минутной инкубации препарата в дозе 20 мМ/л — на 48% (табл. 2).

Известно, что в водорастворимой модельной системе (гемоглобин — перекись водорода — люминол), а также в суспензии липосом трекрезан в интервале концентраций от 1 до 10 мкМ уменьшает интенсивность БХЛ на фоне не меняющейся длительности латентного периода [5, 12].

При добавлении в клеточную среду перитонеальных и альвеолярных макрофагов полиоксидония (1500 мкг/мл) и трекрезана (20 мМ/л) в сочетании

■ Таблица 2. Влияние метапрота, полиоксидония, трекрезана и их комбинаций на спонтанную люцигенинзависимую биохимиллюминесценцию (БХЛсп) альвеолярных макрофагов (аМф) крыс ( $n = 10$ )

Препараты	Режим измерения	БХЛсп аМф, %*	
		Максимум свечения	Интенсивность свечения
Контроль	1	100	100
	2	100	100
Полиоксидоний 500 мкг/мл	1	140 ± 10**	180 ± 16**
	2	128 ± 9**	163 ± 16**
Полиоксидоний 1500 мкг/мл	1	84 ± 4**	85 ± 5**
	2	71 ± 5**	69 ± 4**
Трекрезан 0,1 мМ/л	1	117 ± 3**	122 ± 2**
	2	100 ± 4	101 ± 2
Трекрезан 20 мМ/л	1	88 ± 3**	96 ± 2
	2	133 ± 3**	148 ± 3**
Метапрот 0,1 мМ/л	1	140 ± 4**	169 ± 5**
	2	129 ± 3**	148 ± 5**
Метапрот 20 мМ/л	1	309 ± 14**	297 ± 23**
	2	320 ± 13**	302 ± 15**
Полиоксидоний 500 мкг/мл ± метапрот 0,1 мМ/л	1	120 ± 3**	196 ± 7**
	2	127 ± 5**	233 ± 11**
Полиоксидоний 1500 мкг/мл ± метапрот 20 мМ/л	1	74 ± 4**	66 ± 4**
	2	97 ± 3	85 ± 5**
Трекрезан 0,1 мМ/л ± метапрот 0,1 мМ/л	1	110 ± 4	133 ± 2**
	2	147 ± 3**	124 ± 3**
Трекрезан 20 мМ/л ± метапрот 20 мМ/л	1	60 ± 3**	40 ± 3**
	2	45 ± 3**	20 ± 2**

1 — БХЛсп аМф после инкубации с препаратом 20 мин; 2 — БХЛсп аМф после инкубации с препаратом 40 мин; \* — в % от контроля, где регистрируемые показатели спонтанной БХЛ аМф (без препаратов) принимали за 100%; \*\* — различия достоверны по сравнению с контролем при  $p < 0,05$

с метапротом в концентрации 20 мМ/л наблюдалось уменьшение интенсивности свечения, сопоставимое с эффектами метапрота. Однако при внесении в клеточную среду перитонеальных и альвеолярных макрофагов сочетания препаратов в наименьших из исследованных концентраций регистрировали значительное увеличение интенсивности БХЛ. Так, в перитонеальных макрофагах при инкубации в течение 20 и 40 мин трекрезана и метапрота в дозах 0,1 мМ/л интенсивность свечения возрастала на 91% и 192% соответственно (табл. 1). В альвеолярных макрофагах при инкубации в течение 20 и 40 мин трекрезана и метапрота в тех же дозах БХЛ увеличивалась на 33% и 24% соответственно (табл. 2). Комбинация полиоксидония в дозе 500 мкг/мл с метапротом в дозе 0,1 мМ/л в перитонеальных макрофагах при инкубации в течение 20 мин снижала интенсивность свечения на 38% (табл. 1), а в альвеолярных макрофагах, напротив, увеличивала БХЛ в 2 раза (табл. 2).

Различие антиоксидантных эффектов препаратов может быть обусловлено метаболическим портретом исследованных макрофагов. Несмотря на общее происхождение из моноцитов крови, перитонеальные и альвеолярные макрофаги имеют существенные метаболические различия. Альвеолярные макрофаги, преимущественно аэробы, зависящие от функционирования процессов окислительного фосфорилирования, имеют высокую активность сук-

цинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы. Из всех классов макрофагов альвеолярные наиболее активно генерируют супероксидный анион, что при нормально функционирующей антиоксидантной системе поддерживает стерильность альвеол и предупреждает инфекционное заражение легких.

Перитонеальные макрофаги — факультативные анаэробы с характерной высокой активностью гликолитических ферментов пируваткиназы и фосфофруктокиназы [10]. Следует подчеркнуть, что эти различия носят адаптивный характер. Очевидно, исследуемые препараты в зависимости от концентрации способны регулировать кислородзависимый метаболизм фагоцитирующих клеток крови, которые служат значительным источником образования свободных радикалов, и в активном состоянии продуцируют в 12 раз больше супероксида кислорода и перекиси водорода [7].

## ВЫВОДЫ

1. *In vitro* альвеолярные и перитонеальные макрофаги являются системами с ограниченной возможностью оценки антиоксидантных свойств иммуномодуляторов, поскольку в них можно оценить только антирадикальный (антисупероксидный  $O_2^{\cdot -}$ ) эффект. В данных системах иммуномодулятор в разных концентрациях может оказывать прооксидантное и антиоксидантное действие.

2. Перитонеальные и альвеолярные макрофаги по-разному реагируют на добавление иммуномодулятора с заведомо доказанными системными антиоксидантными свойствами. Комбинирование иммуномодуляторов повышает вероятность выявления их антирадикальных свойств в данных клеточных системах.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бигдай Е. В., Самойлов В. О., Малышев М. Е. Внутриклеточные сигнальные системы в альвеолярных макрофагах, обеспечивающие респираторный взрыв // Мед. биофизика. — М., 1999. — С. 22.
2. Величковский Б. Т. Свободнорадикальное окисление как звено срочной и долговременной адаптации организма к факторам окружающей среды // Вестник РАМН. — 2001. — № 6. — С. 45–52.
3. Владимиров Ю. А., Шерстнев М. П. Хемилиюминесценция клеток животных // Итоги науки и техники. Серия «Биофизика». — М.: ВИНТИ, 1989. — 176 с.
4. Зарубина И. В., Болехан А. В., Шабанов П. Д. Сравнение энергостабилизирующих и иммуностропных свойств трекрезана и полиоксидония при бронхолегочном воспалении у крыс // Эксперим. и клин. фармакология. — 2006. — Т. 69, № 5. — С. 50–54.
5. Зарубина И. В., Ходченкова И. П., Шабанов П. Д. Метаболические эффекты трекрезана при доброкачественной гиперплазии предстательной железы у крыс и ее осложнении простатитом // Клин. патофизиология. — 2006. — № 2. — С. 32–35.
6. Зарубина И. В., Шабанов П. Д. Бемитил в качестве антиоксидантного средства при активации перекисного окисления липидов гипоксическим фактором: Метод. рекомендации для врачей. — СПб., 2002. — 21 с.
7. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. — Новосибирск: Наука, 1989. — 344 с.
8. Пинегин Б. В., Некрасов А. В., Хаитов Р. М. Иммуномодулятор «полиоксидоний»: механизмы действия и аспекты клинического применения // Медлайн эксп. — 2005. — № 1 (177). — С. 19–23.

9. Пинегин Б. В., Некрасов А. В., Хаитов Р. М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения // Цитокины и воспаление. — 2004. — Т. 3, № 3. — С. 41–47.
10. Самойлов В. О., Бигдай Е. В. Участие внутриклеточной сигнальной системы цАМФ альвеолярных макрофагов в реакции на биомицин // Сиб. мед. журн. — 2001. — № 3. — С. 50–53.
11. Шабанов П. Д. Нейропротектор метапрот: механизм действия и новые клинические направления использования // Мед. альманах. — 2011. — № 1 (14). — С. 197–199.
12. Шабанов П. Д., Зарубина И. В., Новиков В. Е., Цыган В. Н. Метаболические корректоры гипоксии. — СПб.: Информ-навигатор, 2010. — 916 с.

## EFFECT OF IMMUNE MODULATORS IN DIFFERENT COMBINATIONS ON LUCEGININE-DEPENDENT CHEMICAL LUMINESCENCE IN THE BLOOD ALVEOLAR AND PERITONEAL MACROPHAGES

Zarubina I. V., Antonenkova Ye. V., Bolekhan A. V., Mokrenko Ye. V.

◆ **Summary:** *In vitro* the blood alveolar and peritoneal macrophages can be assessed as systems with limit possibilities for evaluation of antioxidant properties of immune modulators because we can assess only antiradical (anti-superoxide O<sub>2</sub>•) effect of them in these systems. Immune modulators in different concentrations (0.1–20 mM) can induce prooxidant or antioxidant effect in these systems. The blood alveolar and peritoneal macrophages differentially react on adding of immune modulators with proved systemic antioxidant properties (metaprot, trekresan, polyoxydonium). Combination of immune modulators increases the possibility of appearance of intradical properties in these cellular systems.

◆ **Key words:** alveolar and peritoneal macrophages; antioxidant properties; immune modulators; metaprot; trekresan; polyoxydonium.

## ◆ Информация об авторах

*Зарубина Ирина Викторовна* — д. б. н., профессор, старший научный сотрудник кафедры фармакологии. Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 6. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Антоненкова Елена Владимировна* — к. б. н., преподаватель кафедры нормальной физиологии. Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 6. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Болехан Анна Владимировна* — к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии кафедры военно-полевой терапии. Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 6. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Мокренко Евгений Викторович* — к. м. н., докторант кафедры фармакологии. Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова. 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, д. 6. E-mail: pdshabanov@mail.ru.

*Zarubina Irina Viktorovna* — Doct. Biol. Sci. (Pharmacology), Professor, Senior Researcher, Dept. of Pharmacology. Kirov Military Medical Academy. 194044, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6, Russia. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Antonenkova Yelena Vladimirovna* — PhD (Physiology), Assistant Professor, Dept. of Physiology. Kirov Military Medical Academy. 194044, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6, Russia. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Bolekhan Anna Vladimirovna* — PhD (Pharmacology), Senior Researcher, Lab. of Immunology, Dept. of Therapy. Kirov Military Medical Academy. 194044, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6, Russia. E-mail: I.V.Zarubina@inbox.ru.

*Mokrenko Yevgeniy Viktorovich* — PhD (Stomatology), PostDoc Fellow, Dept. of Pharmacology. Kirov Military Medical Academy. 194044, St. Petersburg, Acad. Lebedev St., 6, Russia. E-mail: pdshabanov@mail.ru.