

Изучение антиоксидантных свойств иммуномодулятора Полиоксидония*

Полиоксидоний (ПО) – физиологически активное высокомолекулярное соединение, обладающее выраженной иммуномодулирующей активностью. Действующим началом ПО является сополимер N-окси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиний бромида со средней молекулярной массой 100 кД. Полиоксидоний создан в ГНЦ – Институте иммунологии МЗ РФ Петровым Р.В., Хаитовым Р.М., Некрасовым А.В., Атауллахановым Р.И., Пучковой Н.Г. и Ивановой А.С. [1,2]. Кроме иммуномодулирующего, ПО обладает выраженным детоксицирующим, антиоксидантным и мембраностабилизирующим свойством. Совокупность этих свойств привела к успешному применению иммуномодулятора на протяжении 7 лет при лечении различных заболеваний, связанных с нарушениями иммунной системы [3,4,5]. При исследовании антиоксидантной активности ПО была использована система активированных фагоцитов, тушение люминол-зависимой хемилюминесценции которых может быть следствием не столько и не только перехвата АФК, продуцируемых фагоцитов. Вместе с тем, в настоящее время разработаны адекватные, широко применяемые модельные системы для определения антиоксидантной активности индивидуальных ингибиторов СРР, смесей и биологических жидкостей [6]. Применительно для водорастворимого ПО это могут быть системы на основе гидрофильных азосоединений [7] и гетерогенная система на основе суспензии липосом [8].

С помощью лазерной проточной цитометрии показано, что полиоксидоний взаимодействует со всеми ядродержащими клетками периферической крови человека. При использовании ФИТЦ-меченого полиоксидония (Ф-ПО) было выявлено, что клетками-мишенями иммуномодулятора являются моноциты и нейтрофилы, с которыми полиоксидоний взаимодействует с наибольшей интенсивностью. Взаимодействие имеет дозо- и время-зависимый характер.

Анализ процессов активации клетки, проведенный цитометрическим методом, под влиянием ПО выявил, что иммуномодулятор не усиливает мобилизацию внутриклеточного Ca^{2+} из цитоплазматических компартментов и извне. В качестве детектора Ca^{2+} использовался краситель Fluo-3. Однако наблюдалось статистически достоверное повышение продукции другого маркера активации клетки, внутриклеточной H_2O_2 , оцениваемой по индикаторному красителю дихлорфлуоресцеин-диацетату (ДФФ-ДА) проточной цитометрией, после часовой инкубации лейкоцитов с полиоксидонием (в фагоцитарных клетках в среднем на 40%) [9]. Усиление наработки H_2O_2 в нейтрофилах и моноцитах доноров под влиянием ПО возможно свидетельствует о способности иммуномодулятора влиять на механизмы передачи сигналов в клетке, что, по-видимому, приводит к активации ядерного фактора NF- κ B и запуску продукции цитокинов. Полиоксидоний стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ФНО- α и ИЛ-6 мононуклеарами в культуре *in vitro* [10]. Также иммуномодулятор стимулирует бактерицидные свойства фагоцитов, усиливая процент киллинга бактерий в дозе 250 мкг/мл в среднем на 44%, и доводит до нормы этот показатель у больных

хронической гранулематозной болезнью, компенсируя нарушенные функции моноцитов и нейтрофилов [11].

Ранее уже указывалось, что активация синтетических внутриклеточных процессов (синтез цитокинов, факторов роста и белков) с участием транскрипционных факторов NF- κ B, AP-1 и других происходит с участием активных форм кислорода (АФК) [12], способствующих деградации тримера NF- κ B-I κ B в активный димер. Иными словами ПО может участвовать в регуляции СРР.

В этой связи надо иметь в виду, что разные АФК (O_2^- , H_2O_2 , OH \cdot) обладают разной способностью инициировать последующие свободнорадикальные реакции (СРР). Наименьшей активностью обладает супероксид анион радикал (O_2^-), а максимальной — гидроксильный радикал (OH \cdot). Поэтому, если он образуется в цитоплазме клеток в такой же концентрации (мкМ), что и O_2^- , то можно предположить, что произойдет ингибирование активации транскрипционных факторов и синтеза белка и цитокинов.

Специализированных молекулярных машин для образования гидроксильных радикалов в клетках нет. Они образуются в реакции Хаббера-Вайса с участием супероксиддисмутазы и ионов двухвалентного железа. Поэтому если в цитоплазме клеток возникают условия для хелатирования и/или окисления каталитических активного пула ионов двухвалентного железа (Fe^{2+}) в каталитически неактивное состояние ионов Fe^{3+} и тем самым приводящие к снижению действующей концентрации гидроксильных радикалов, то это создаст условия для достижения микромолярных концентраций АФК в цитоплазме клеток и активации свободнорадикального механизма синтетических процессов. В качестве примера такой схемы событий можно привести результаты работ, где использовали известный хелатор и окислитель Fe^{2+} — десферал [13].

Целью настоящей работы было исследование антиоксидантных свойств полиоксидония с использованием двух модельных систем окисления.

Материалы и методы

В работе использовали следующие препараты: 2,3,5,6-1Н,4Н-тетрагидро-9-(2-бензоимидазолил) хинолизино-(9,9a,1-gh) кумарин (С-525) («НИОПИК», Россия), люминол (ЛМ) («Serva», Германия), тролокс («Serva», Германия), 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорид (АДБА) («Aldrich», США), Антиоксидантные свойства гистохрома изучали с помощью гомогенной системы, представляющей собой раствор азосоединения 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида и люминола (АДБА-ЛМ) [7], и гетерогенной системы, суспензии модельных мембран липосом [8]

Для формирования суспензии многослойных липосом использовали общую фракцию фосфолипидов желтка яиц. Экстракцию общих фосфолипидов проводили по методу Folch J. и соавт. [14]. Один объем желтка яиц гомогенизировали в течение 30 мин в 20 объемах хлороформ-метанольной смеси (2:1 по объёму), гомогенат фильтровали через обезжиренный бумажный фильтр для отделения агрегировавшего белка. Полученный липидный экстракт промывали добавлением к нему 1/3 общего объёма

0,74% водного раствора KCl. После отстаивания в течение 12 час при 0–4°C верхнюю водно-метанольную фазу тщательно удаляли, нижнюю фазу переливали в круглодонную колбу и выпаривали с помощью роторного испарителя. Сухую липидную плёнку смывали 3–4 мл гексана и добавляли 20-кратное количество охлаждённого ацетона. При этом фосфолипиды выпадали в осадок в виде белых хлопьев. Преципитацию фосфолипидов ацетоном проводили 5 раз. Полученные фосфолипиды растворяли в хлороформ-метанольной смеси. Концентрацию фосфолипидов определяли гравиметрически.

Процедуру приготовления многослойных фосфолипидных липосом выполняли по методу Bangham A.D. и соавт. [15]. Для этого необходимое количество хлороформ-метанольного раствора фосфолипидов помещали в круглодонную колбу и упаривали растворитель на вакуумном роторном испарителе. Сухую липидную плёнку смывали со стенок колбы определенным объемом трис-HCl буфера (20 мМ трис, pH 7,4). С целью формирования липосом более однородных по своему размеру, полученную липосомальную суспензию подвергали криолитической обработке путем трехкратного замораживания-оттаивания. Перед использованием суспензия липосом выдерживалась не менее 1 часа при 37°C.

Хемилюминесцентные измерения проводили с помощью хемилюминометра ХЛМ-3 («Бикап», Россия). Кинетику хемилюминесценции (ХЛ) регистрировали и обрабатывали с помощью интерфейса MacLab/2e (ADInstruments, Австралия), связанного с компьютером Macintosh LC II.

Измерение Fe²⁺-индуцированной ХЛ суспензии липосом, проводили следующим образом. Реакционная среда общим объемом 5 мл содержала 0,1 мл суспензии липосом с концентрацией по фосфолипиду 0,4 мг/мл в 20 мМ трис-HCl буфере, pH 7,4. Для активации свечения в систему вводили спиртовой раствор C-525 до конечной концентрации 1 мкМ. Инициирование липидной пероксидации осуществляли введением раствора FeSO₄ до конечной концентрации 7 мкМ, после чего в течение 10–30 мин измеряли кинетику хемилюминесценции.

Результаты и их обсуждение

В первой серии экспериментов антиоксидантные свойства гистохрома и других ингибиторов изучали с помощью модельной гомогенной системы, предложенной в 1987 г. Вайнером [7] на основе 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (АДБА). Принцип этой системы состоит в том, что при температуре 37°C одна молекула этого азосоединения подвергается

термодеградации с образованием двух водорастворимых RO[•]2 радикалов, взаимодействие которых с введённым в систему люминолом сопровождается возникновением т.н. люминол-зависимой хемилюминесценцией (ЛХЛ). При введении в систему перехватчика свободных радикалов, образованных в системе при разложении азосоединения возникает конкуренция между взаимодействием радикалов модельной системы с люминолом и перехватчиком свободных радикалов. В результате происходит тушение ЛХЛ, увеличивается длительность латентного периода хемилюминограммы, что является показателем антиоксидантной активности исследуемых ингибиторов СРР. После завершения способности антиоксидантов взаимодействовать с радикалами модельной системы, эти радикалы вновь обретают способность взаимодействовать с люминолом и это приводит к возгоранию ЛХЛ.

На рис. 1 и 2 приведены кинетики и концентрационные зависимости ЛХЛ, сопровождающие окисление люминола, вызванное радикалами АДБА без и в присутствии различных концентраций ПО. Видно, что по мере увеличения концентрации ПО, длительность латентного периода хемилюминесценции модельной системы АДБА увеличивается, что свидетельствует о способности ПО перехватывать радикалы модельной системы. Вместе с тем обращает на себя внимание тот факт, что по мере увеличения концентрации ПО после завершения латентного периода наблюдается уменьшение интенсивности ЛХЛ. В самом общем случае интерпретация механизма влияния различных антиоксидантов на интенсивность ЛХЛ, возникающей после латентного периода хемилюминограммы, не столь однозначна. Можно лишь предположить, что в случае ПО, равно как и других перехватчиков свободных радикалов, это может быть следствием взаимодействия с люминолом продуктов реакции радикалов АДБА с ПО, которые накапливаются в процессе латентного периода хемилюминограммы.

Антирадикальная активность исследуемых антиоксидантов в системе АДБА обычно сравнивают со способностью арбитражного перехватчика радикалов АДБА, тролокса, водорастворимого аналога α-токоферола [16].

На рис. 1 приведены результаты исследования тролокса на ЛХЛ модельной системы АДБА. Видно, что как и следовало ожидать, тролокс задерживает развитие ЛХЛ модельной системы, увеличивая длительность латентного периода. Отсюда можно заключить, что ПО обладает способностью перехватывать водорастворимые радикалы АДБА, образующиеся в данной модельной системе.

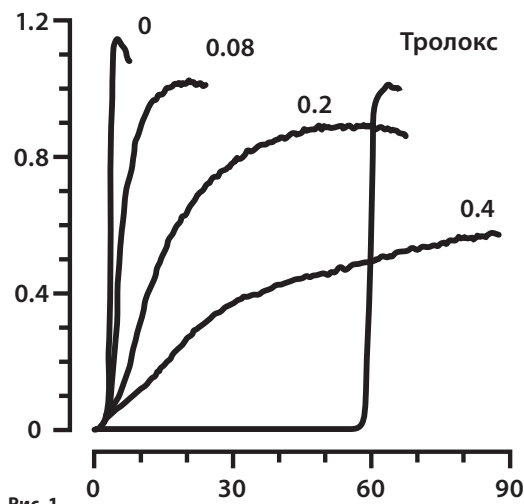


Рис. 1
Кинетики ХЛ в модельной системе ЛМ—АДБА в присутствии ПО и тролокса (в концентрации 10 мкМ). Цифры у кривых — концентрация ПО (в мг/мл). По оси абсцисс — время (в мин). По оси ординат — интенсивность ХЛ (в отн. ед.). Здесь и на рис. 2 состав реакционной среды: ЛМ (10 мкМ), АДБА (10 мМ) в 50 мМ КН₂РO₂, pH 7,4.

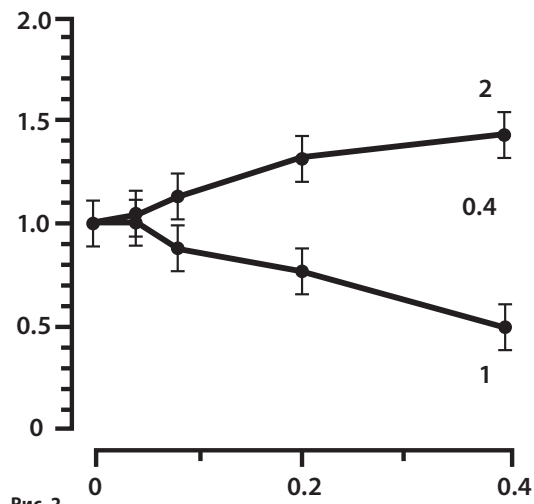


Рис. 2
Влияние ПО на амплитуду (1) и латентный период (2) ХЛ модельной системы ЛМ-АДБА. По оси абсцисс — концентрация ПО (в мг/мл). По оси ординат — изменение параметров ХЛ (I/I₀, t/t₀).

В качестве второй модельной системы для определения активности и механизма действия ПО и ряда других ингибиторов CPP использовали гетерогенную модельную систему на основе суспензии малослойных липосом, сформированных из общей фракции фосфолипидов липидка куриных яиц в Трис-НСl буфере, инициацию перекисного окисления липидов в которых осуществляли введением раствора сернокислого железа, а детектирование индукции CPP — методом активированной производным кумарина C-525 хемилюминесценции [12].

Хорошо известно, что [17] введение в систему структурированных липидов (мембраны, липопротеиды) ионов двухвалентного железа вызывает развитие характерной кинетики хемилюминесценции, на которой можно выделить несколько стадий: быстрая вспышка, латентный период и медленное свечение (рис.3)

Ранее в работах Ю.А.Владимирова было показано, что интенсивность быстрой вспышки ХЛ (h) при определённых условиях пропорциональна концентрации т.н. предсуществующих гидроперекисей ($ROOH$), которые образовались в системе по ряду причин до введения Fe^{2+} . Длительность латентного периода (t) зависит от времени достижения т.н. «критической» концентрации ионов двухвалентного железа в системе, которое в свою очередь, определяется вкладом веществ, влияющих на окисление и/или элиминацию (хелатирование) Fe^{2+} . Интенсивность (H) или светосумма медленного свечения определяется скоростью CPP, протекающих в гидрофобной фазе мембран или липопротеидов и способностью ингибиторов к перехвату липидных радикалов [17].

На рис. 4 представлены кинетики развития Fe^{2+} -индуцированной хемилюминесценции суспензии липосом без и в присутствии ПО. Было обнаружено, что введение в модельную систему иммуномодулятора приводит к незначительному уменьшению как амплитуды медленного свечения так и длительности латентного периода хемилюминесценции модельной системы.

Ранее уже указывалось, что длительность латентного периода кумарин-активированной хемилюминесценции суспензии липосом (t) в значительной степени определяется концентрацией в системе Fe^{2+} . Сразу же после введения раствора $FeSO_4$ в суспензию липосом и окончания быстрой вспышки хемилюминесценции, за время которой концентрация Fe^{2+} уменьшается незначительно, избыток ионов двухвалентного железа за счёт взаимодействия с пероксильными радикалами субстрата окисления, ненасыщенными жирными кислотами, вызывает тушение хемилюминесценции, что проявляется в формировании латент-

тного периода хемилюминограммы. На протяжении латентного периода за счёт окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} или хелатирования Fe^{2+} происходит уменьшение стационарной концентрации катализатора (Fe^{2+}). При достижении определённой т.н. «критической» концентрации ионов двухвалентного железа в системе способность Fe^{2+} к перехвату пероксильных радикалов липида ($RO_2\cdot$) исчезает и восстанавливается каталитическая функция Fe^{2+} , латентный период хемилюминесценции заканчивается и начинается развитие медленного свечения [17]

В этой связи длительность латентного периода хемилюминограммы может определяться вкладом веществ, влияющих на концентрацию Fe^{2+} . К числу подобных факторов следует отнести хелаторы (комплексообразователи) и вещества, воздействующие на состояние ионов железа: окислители и восстановители. Хорошо известно, что ЭДТА, фосфаты, десферал – это вещества, хелатирующие ионы Fe^{2+} , образующие с этими ионами более или менее прочные комплексы, из состава которых Fe^{2+} не обладают

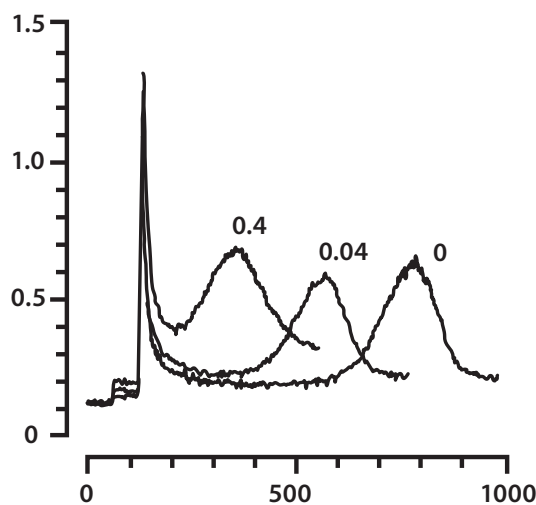


Рис. 4
Кинетики ХЛ в модельной системе липосомы — Fe^{2+} в присутствии ПО. Цифры у кривых — концентрации ПО (в мг/мл).
По оси абсцисс — время (в с).
По оси ординат — интенсивность ХЛ (в отн. ед.)

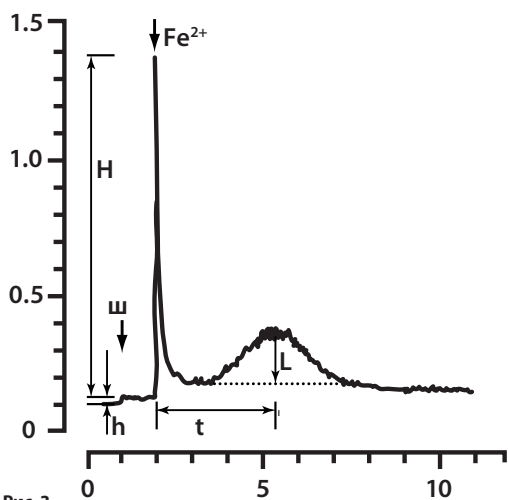


Рис. 3
Кинетика ХЛ в модельной системе окисления фосфолипидных липосом, индуцированного ионами Fe^{2+} . Стрелками показаны момент открытия шторки хемилюминометра и момент добавления ионов Fe^{2+} . А — интенсивность спонтанного свечения, H — интенсивность быстрой вспышки, L — интенсивность медленной вспышки. По оси абсцисс — время (в мин). По оси ординат — интенсивность ХЛ (в отн. ед.). Здесь и на рис. 4 и 5 состав реакционной среды: липосомы (0,4 мг/мл), C-525 (0,5 мкМ), $FeSO_4$ (7 мкМ) в 20 мМ трис-НО-буфере, рН 7,4.

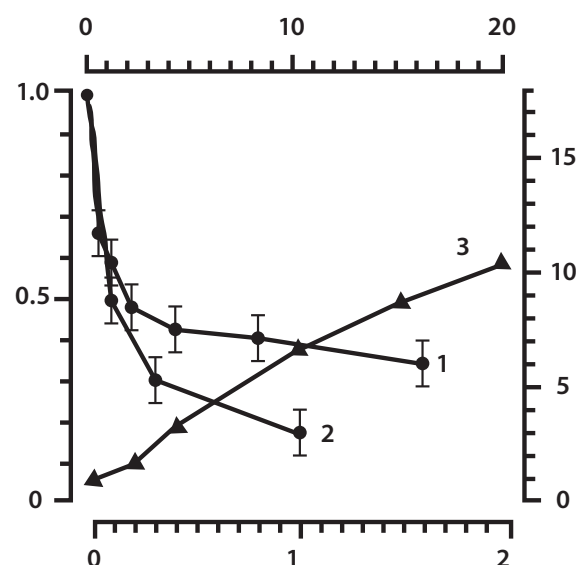


Рис. 5
Влияние ПО (1), ЭДТА (2) и аскорбата (3) на изменение латентного периода ХЛ в модельной системе липосомы — Fe^{2+} .
По оси абсцисс снизу — концентрация ПО (в мг/мл).
По оси абсцисс сверху — концентрация ЭДТА и аскорбата (в мкМ).
По оси ординат слева — изменение латентного периода ХЛ для ПО и ЭДТА (в отн. ед.).
По оси ординат справа — изменение латентного периода ХЛ для аскорбата (в отн. ед.).

каталитической активностью. Из данных, приведённых на рис. 5, видно, что по мере увеличения концентрации ПО длительность латентного периода хемиллюминограммы уменьшилась в интервале концентрации иммуномодулятора до 0,4 мг/мл. После достижения этого предела концентраций ПО длительность латентного периода не изменялась. Важно подчеркнуть, что примерно такая же концентрационная зависимость изменения τ отмечается и для известного хелатора — ЭДТА (рис. 5, кривая 3). Аскорбат же в противоположность ПО и ЭДТА не уменьшал, а наоборот, увеличивал длительность латентного периода хемиллюминограммы суспензии липосом. Это обусловлено тем, что аскорбат, являясь восстановителем и в том числе, восстанавливает Fe^{3+} в Fe^{2+} . Так действуют на величину латентного периода и церулоплазмин, плазменный белок, обладающий ферриоксидазной активностью [18].

Таким образом, суммируя полученные экспериментальные результаты можно заключить, что иммуномодулятор ПО обладает умеренной способностью к перехвату водных радикалов модельной системы АДБА и гидрофобных радикалов, образующихся в липидной фазе мембран липосом (интенсивность медленно свечения кумарин-активированной хемиллюминесценции липосом). Вместе с тем, обнаружено новое свойство ПО – его взаимодействие с каталитически активными ионами двухвалентного железа, что проявляется в уменьшении длительности латентного периода хемиллюминесценции (τ) модельной системы окисления, суспензии липосом.

Этот эффект сокращения τ в присутствии ПО совпал с действием на этот хемиллюминесцентный параметр модельной системы таких окислителей и хелаторов Fe^{2+} , как церулоплазмин [18] и ЭДТА (рис. 5, кривая 3). Важно подчеркнуть, что действие ПО на величину τ хемиллюминограммы суспензии липосом, равно как и ЭДТА, в зависимости от концентрации носили насыщающий характер, т.е. при достижении некоего предела концентрации иммуномодулятора в системе (0,4 мг/мл для ПО) уменьшения величины τ не наблюдалось. Это может означать, что при такой концентрации ПО весь пул ионов Fe^{2+} оказался задействован в комплексообразовании на иммуномодуляторе.

Ещё одним доказательством комплексообразования ПО с Fe^{2+} являются результаты измерения спектров поглощения ПО и смеси ПО с $FeSO_4$ (рис. 6). Из рис. 6 видно, что раствор ПО является практически бесцветным веществом, поглощающим

излучение в дальнем ультрафиолетовом диапазоне спектра. При добавлении к ПО раствора $FeSO_4$ в спектре поглощения бинарной смеси появляется максимум в области 360 нм. Важно подчеркнуть, подобный спектр поглощения можно измерить только в кислых рН, до $pH \approx 6,0$. При дальнейшем защелачивании среды до нейтральных рН наблюдается быстрый распад комплекса, характерный максимум поглощения исчезает, и образуется бурый осадок (Fe^{3+}). Иными словами, ПО обладает свойством хелатора Fe^{2+} и окислителя Fe^{2+} в Fe^{3+} .

Хелатирование и окисление каталитически активных ионов железа ПО играет важную роль в регуляции свободнорадикального механизма синтетических процессов (См. введение). Кроме этого надзор за концентрацией Fe^{2+} может иметь определённое значение и в регуляции генерализованных свободнорадикальных реакций: перекисного окисления липидов, инактивации белков и нуклеиновых кислот.

Хорошо известно, что при возникновении и развитии ряда воспалительных заболеваний наблюдается активация генерализованных СРР. Это обстоятельство дало право назвать подобные заболевания «свободнорадикальными патологиями» [19]. Активация СРР в процессе развития свободнорадикальных патологий обусловлено двумя основными причинами: увеличением уровня продукции первичных и вторичных радикалов-инициаторов и участников СРР (стадия инициации СРР) и появлением катализаторов СРР в основном ионов Fe^{2+} (стадия разветвления цепей окисления) [17]. Отсюда следует, что ингибирование СРР может осуществляться как за счёт перехвата радикалов, так и за счёт элиминации каталитически активных ионов Fe^{2+} . Последнее особенно важно при патологиях, для которых характерно нарушение целостности кровеносных сосудов и выливания крови в ткань: раны [20], инсульты, желудочные кровотечения, гемофтальмы [21] и т.д. ПО, обладая свойством хелатирования Fe^{2+} и окисления Fe^{2+} в Fe^{3+} будет ингибировать катализ СРР и тем самым тормозить свободнорадикальное окисление. Ингибирование СРР в этой связи можно было бы ещё более усилить, если пойти по пути создания комплексного антиоксидантного препарата, содержащего кроме ПО, элиминирующего из системы Fe^{2+} , какие-либо перехватчики свободных радикалов: флавоноиды, каротиноиды [] и др. Создание и апробация такого комплексного препарата создаст условия для эффективного ингибирования свободнорадикальных процессов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В., Атауллаханов Р.И., Пинегин Б.В., Пучкова Н.Г., Иванова А.С. Полиоксидоний – иммуномодулятор последнего поколения: итоги трехлетнего клинического применения. // Аллергия, астма и клин. иммунол – 1999. – №3. – с.3-6.
2. Некрасов А.В., Пучкова Н.Г., Иванова А.С. и др. Производное поли-1,4-этиленпиперазина, обладающее иммуномодулирующей, противовирусной и антибактериальной активностью. Пат. РФ № 2073031, 1997.
3. Лусс Л.В., Некрасов А.В., Пучкова Н.Г., Бхардварж А., Бхардварж Л.А. Роль иммуномодулирующей терапии в общеклинической практике. // Иммунология. – 2000. – № 5. – с. 34-39.
4. Романова А.В., Латышева Т.В. Применение полиоксидония в комплексной терапии больных с тяжелой формой бронхиальной астмы. // Иммунология. – 2002. – № 6. – с. 372-376.
5. Аршинова С.С., Пинегин Б.В., Стаханов В.А., Симонова А.В., Мазуров Д.В., Голубева Н.М., Перевезенцева Е.О. Иммуномодулятор полиоксидоний в комплексной терапии больных туберкулезом легких. // Иммунология. – 2001. – № 3. – с. 35-40.
6. Дьяконова В.А., Дамбаева С.В., Голубева Н.М., Бураков В.В., Шаронов Г.В., Комогорова Е.Э., Пинегин Б.В. Изучение механизма действия иммуномодулятора полиоксидония на клеточном и молекулярном уровнях на клетках периферической крови человека в условиях *in vitro*. // Физиология и патология иммунной системы, 2004, т.8, №2, с.100-115.
7. Дьяконова В.А., Климова С.В., Ким К.Ф., Пинегин Б.В. Продукция цитокинов под действием полиоксидония *in vitro*. // Иммунология, 2002, № 6, с. 337-340.
8. Dambaeva S.V., Mazurov D.V., Golubeva N.M., D'yakonova V.A., Pinegin B.V. The effect of polyoxidonium, a novel immunomodulator, on the phagocytic activity of human peripheral blood leukocytes. *Centr Eur J Immunol*, 2003; 28(2): 127-33.
9. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Некрасов А.В., Атауллаханов Р.И., Пучкова Н.Г., Иванова А.С., Пинегин Б.В., Кулаков В.В., Климова С.В., Хамидуллина К.Ф., Мазуров Д.В., Дамбаева С.В. Полиоксидоний – препарат нового поколения иммуномодуляторов с известной структурой и механизмом действия. // Иммунология, 2000, № 5, с. 24-28.