

ANTIOXIDATIVE AND IMMUNE-RESPONSE MODULATING PROPERTIES OF NATURAL ZEOLITES

*K.S. Golokhvas^{1,4}, A.M. Panichev², A.N. Gulkov¹,
I.V. Mischakov³, A.A. Vedyagin³*

¹ Far Eastern State Technical University (37 Pushkinskaya St. Vladivostok 690990 Russia), ² Pacific Institute of Geography, FEB RAS (7 Radio St. Vladivostok 690041 Russia), ³ Institute of Catalysis, RAS, Siberian Branch (5 Lavrentiev St. Novosibirsk 630090 Russia), ⁴ Pacific Institute of Bioorganic Chemistry, FEB RAS (159 100-Anniversary Av. Vladivostok 690022 Russia)

Summary – The local immunity system in lungs is permanently exposed to injurious action of a number of chemical, physical and biological factors. Among other things, these are mineral

microparticles. This paper gives consideration to assessment of effects produced by the Vanginskiy and Kulikovskiy zeolite deposits on the local immunity in lungs. The authors used low-energy laser radiation as a factor very likely to induce lipid peroxidation and reduce functional activity of alveolar macrophages and lymphocytes. The studies allow to conclude that unlike the Kulikovskiy deposit zeolites appeared to intensify free radical reactions and suppress the local immunity system, the Vanginskiy deposit zeolites exhibited immunoprotective and antioxidative properties.

Key words: *zeolites, inhalation, laser radiation.*

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 62–64.

УДК 616.72-002.77-085.37:615.35

С.В. Белова

Саратовский НИИ травматологии и ортопедии (410002 г. Саратов, ул. Чернышевского, 148)

ФЕРМЕНТНЫЙ ИММУНОМОДУЛЯТОР В ТЕРАПИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АУТОИММУННОГО АРТРИТА

Ключевые слова: *экспериментальный аутоиммунный артрит, церулоплазмин.*

У кроликов с экспериментальным аутоиммунным артритом выявлены выраженные метаболические сдвиги, проявлявшиеся нарушением обмена протеогликанов, интенсификацией перекисного окисления липидов и несостоятельностью антиоксидантной системы защиты. При этом изменения наблюдались как в сыворотке крови, так и в суставном содержимом. Кроме того, имела место напряженность иммунопатологических реакций. Внутрисуставное введение иммуномодулятора церулоплазмينا в эксперименте привело к коррекции вышеописанных изменений, улучшению клинической картины и лабораторных показателей.

Аутоиммунные заболевания в развитых странах занимают третье место по частоте встречаемости и регистрируются у 5–8% населения [11]. К системным аутоиммунным поражениям относится и ревматоидный артрит, многие вопросы терапии которого до сих пор остаются открытыми.

Одним из механизмов развития ревматоидного артрита являются воспалительно-деструктивные процессы в суставных тканях, что сопровождается активацией свободно-радикального окисления, интенсификацией процессов перекисного окисления липидов и несостоятельностью антиоксидантной системы защиты [1, 4, 9].

Церулоплазмин (ЦП), являясь ключевым ферментным антиоксидантом сыворотки крови, обладает полифункциональными свойствами, в том числе и иммуномодулирующими. В последние годы данный препарат успешно применяется в комплексном консервативном, пред- и послеоперативном лечении больных ревматоидным артритом [1, 4]. В терапии подобных пациентов предусматривается и внутрисуставная терапия, преимуществом которой является целенаправленное воздействие на патологический очаг [6].

Белова Светлана Вячеславовна – канд. биол. наук, с.н.с. отдела лабораторной и функциональной диагностики СарНИИТО; тел.: 8 (452) 23-46-68; e-mail: sarniito_bsv@mail.ru.

В клинике практикуется внутривенное введение ЦП. Учитывая существенные метаболические изменения в суставных структурах у больных ревматоидным артритом, аутоиммунный компонент данной патологии и собственный положительный опыт по внутривенному применению ЦП [1, 4], а также его свойства [4], можно ожидать положительного эффекта и при внутрисуставном введении препарата.

Целью настоящего исследования послужил анализ эффективности внутрисуставной терапии аутоиммунного артрита ЦП в условиях эксперимента.

Материал и методы. Под наблюдением находилось 47 кроликов-самцов породы «шиншилла русская» в возрасте 6 мес., весом 3–3,6 кг. Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к воде и пище. 10 особей составили группу контроля, 23 особи с экспериментальным аутоиммунным артритом [2] получали внутрисуставную терапию лекарственным препаратом Ceruloplasminum в дозе 1,5 мг/кг массы тела (основная группа). Группу сравнения сформировали 14 животных с экспериментальным артритом, которым выполнялись внутрисуставные инъекции 0,85% раствора NaCl.

Эффективность результатов терапии оценивали с помощью клинических (осмотр, пальпация, измерение окружности коленных суставов и объема движений в них, определение массы тела), инструментальных (тепловизионная термография) и лабораторных методов исследования. Среди последних – гематологические (СОЭ, уровень гемоглобина и эритроцитов, лейкоформула), цитологические (общий цитоз и клеточный состав суставной жидкости), иммунологические (уровень циркулирующих иммунных комплексов). Оценивали состояние процессов перекисного окисления липидов (по уровню малонового диальдегида) и неклеточного ферментного звена

Таблица 1

Результаты гематологического исследования экспериментальных животных ($M \pm t$)

Показатель	Контроль	Опыт до лечения	Опыт после лечения	
			основная группа	группа сравнения
Кол-во животных	10	37	23	14
СОЭ, мм/ч	2,80±0,20	5,82±0,29 ¹	3,04±0,18 ²	5,71±0,48 ³
Гемоглобин, г/л	124,30±0,80	117,04±1,12 ¹	122,16±0,91	116,52±1,00 ³
Эритроциты, 10 ¹² /л	4,04±0,10	3,18±0,15 ¹	3,74±0,12	3,07±0,14
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	7,60±0,11	10,17±0,19 ¹	7,05±0,14 ²	13,07±0,20 ³
П/я нейтрофилы, %	3,96±0,18	5,94±0,10 ¹	4,01±0,11 ²	7,06±0,19 ³
С/я нейтрофилы, %	42,60±1,81	52,84±1,42 ¹	43,60±1,07 ²	55,01±1,69 ³
Лимфоциты, %	47,80±0,84	30,18±0,41 ¹	43,63±0,50 ²	28,06±0,78 ³
Эозинофилы, %	1,49±0,10	2,12±0,06 ¹	1,60±0,08 ²	3,11±0,09 ³
Моноциты, %	3,44±0,12	4,09±0,28	3,40±0,10	4,19±0,31

¹ Разница статистически значима по сравнению с контролем.² Разница статистически значима по сравнению с показателями до лечения.³ Разница с основной группой статистически значима.

антиоксидантной системы (по активности ЦП в сыворотке крови и суставном содержимом). Изучали обмен протеогликанов соединительной ткани – общее содержание гликозаминогликанов, определяемое по урановым кислотам и гексозам в сыворотке крови. Проводили гистоморфометрические исследования тканей коленных суставов. Статистическую обработку полученных данных выполняли с использованием пакета прикладных программ Medstat с вычислением средней арифметической, среднеквадратического отклонения, средней ошибки средней арифметической и коэффициента Стьюдента.

Забор крови для лабораторных исследований осуществляли утром, натощак из краевой вены уха. Все манипуляции проводились с соблюдением правил асептики. Клинико-лабораторное обследование животных осуществлялось в динамике: до иммунизации, до и после терапии. Животных выводили из опыта путем воздушной эмболии. Все эксперименты на животных осуществляли в соответствии со стандартами Этического комитета и Хельсинкской декларации 1983 г.

Результаты исследования. После иммунизации у всех животных основной группы наблюдались выраженные метаболические нарушения, проявлявшиеся клинически и подтверждавшиеся результатами инструментальных и лабораторных методов исследования. При осмотре кролики были вялыми, гиподинамичными, пониженного питания по сравнению с интактными. Регистрировалась очаговая алопеция. У всех иммунизированных кроликов развился выраженный артрит правого коленного сустава, что проявлялось отеком, повышением местной температуры, ограничением подвижности, выраженной болевой реакцией. Данные дистанционной термографии свидетельствовали о температурной асимметрии в области пораженных суставов. В среднем температура

суставов, пораженных артритом, была на 1,3°С выше, чем интактных.

У животных основной группы СОЭ была повышена более чем в 2 раза по сравнению с нормой, наблюдалось увеличение количества лейкоцитов, сдвиг лейкоцитарной формулы влево, уменьшение количества эритроцитов и лимфоцитов (табл. 1).

Исследование содержимого пораженных суставов показало значительное повышение общего цитоза, который сопровождался изменением качественного состава клеточных элементов: определялись нейтрофилы, макрофаги, лимфоциты и рагоцитоподобные клетки с характерными включениями в цитоплазме (табл. 2). В этих же наблюдениях в сыворотке крови определялся повышенный уровень малонового диальдегида – маркера перекисного окисления липидов, достигавший 4,27±0,06 мкмоль/л (норма – 3,58±0,09 мкмоль/л) и повышение активности ЦП – основного фермента антиоксидантной системы до 41,08±1,69 усл. ед. (норма – 24,38±1,95 усл. ед.). Аналогичные изменения были отмечены и в суставной жидкости: уровень малонового диальдегида достигал 0,10±0,03 мкмоль/л (норма – 0,06±0,01 мкмоль/л), а активность ЦП – 5,12±0,31 усл. ед. (норма – 3,40±0,11 усл. ед.). Наряду с этим наблюдалось статистически достоверное повышение концентрации гликозаминогликанов в сыворотке крови, определяемой по урановым кислотам – (2,58±0,08)×10⁻² г/л и гексозам – (4,08±0,09)×10⁻² г/л; норма – (1,71±0,01)×10⁻² и (2,58±0,11)×10⁻² г/л соответственно.

Статистически достоверное повышение содержания циркулирующих иммунных комплексов отмечено в сыворотке крови животных основной группы – 21,20±1,00 усл. ед. (контроль – 14,00±0,92 усл. ед.).

При гистоморфометрическом исследовании была установлена инфильтрация синовиальной оболочки

Таблица 2

Общий цитоз и клеточный состав суставного содержимого коленных суставов экспериментальных животных ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Опыт до лечения	Опыт после лечения	
			основная группа	группа сравнения
Кол-во животных	10	37	23	14
Общий цитоз, 10^9 /л	$0,15 \pm 0,01$	$2,24 \pm 0,09^1$	$0,40 \pm 0,08^2$	$2,61 \pm 0,10^3$
Нейтрофилы, %	$9,51 \pm 0,11$	$56,19 \pm 2,41^1$	$20,17 \pm 1,38^2$	$58,13 \pm 3,25^3$
Лимфоциты, %	$8,43 \pm 0,09$	$38,11 \pm 1,92^1$	$11,82 \pm 0,51^2$	$42,00 \pm 2,07^3$
Макрофаги, %	0	$41,15 \pm 2,77^1$	$0,48 \pm 0,07^2$	$47,00 \pm 2,02^3$
Рагоциты, %	0	$27,40 \pm 0,50^1$	0 ²	$31,00 \pm 0,81^3$

¹ Разница статистически значима по сравнению с контролем.

² Разница статистически значима по сравнению с показателями до лечения.

³ Разница с основной группой статистически значима.

лимфоидно-гистиоцитарными и плазмочитарными элементами, а также пирониофилия большинства лимфоцитов и плазматических клеток, что было связано с включением этих клеток в процесс анти-телообразования. В ткани менисков встречались единичные плазматические клетки, наблюдались пролиферация фибробластов и ослабление метахро-мазии глубоких зон.

Поверхность гиалинового хряща была матовой, без блеска, неравномерной толщины, имелись небольшие участки с разрыхленным и частично утраченным поверхностным слоем, в котором располагались дистрофически измененные хондроциты. При этом наиболее выраженным признаком поражения была потеря гликозаминогликанов поверхностной и частично основной зонами суставного хряща, свидетельствующая о деградации его матрикса. Строение субхондральной кости было нарушено, наблюдалось истончение субхондральной костной пластинки и трабекул, свидетельствующее о потере костного вещества.

После терапии ЦП наступало улучшение клинического состояния животных и лабораторных показателей (табл. 1, 2). В основной группе, судя по уменьшению температурной асимметрии, отмечалось выраженное уменьшение отека пораженного сустава. Данные гематологического исследования свидетельствовали о снижении общей активности воспалительного процесса (табл. 1). Снижалась и местная воспалительная активность. Цитологическое исследование показало снижение уровня общего цитоза и улучшение качественного состава клеточных элементов суставного содержимого (табл. 2). Установлено положительное изменение показателей процессов перекисного окисления липидов: снижение уровня малонового диальдегида до $4,82 \pm 0,06$ мкмоль/л и активности ЦП до $36,18 \pm 1,12$ усл. ед.

Показатели метаболизма протеогликанов в сыворотке крови также изменялись в сторону улучшения: гликозаминогликаны, определяемые по урановым кислотам, составили $(1,73 \pm 0,08) \times 10^{-2}$ г/л, а по гексо-

зам – $(2,69 \pm 0,08) \times 10^{-2}$ г/л. После терапии уменьшалась и напряженность иммунопатологических реакций, судя по статистически достоверно пониженному уровню циркулирующих иммунных комплексов (до $16,02 \pm 1,04$ усл. ед.).

Положительное влияние препарата подтверждал и гистоморфометрический анализ тканей коленных суставов животных основной группы. При этом микроскопическая характеристика синовиальной оболочки, суставного хряща и субхондральной кости приближалась к норме. Установлено торможение процесса дезорганизации соединительной ткани и снижение степени выраженности иммуноморфологических признаков поражения. Сумма баллов всех признаков поражения была значительно меньше, чем у кроликов группы сравнения.

У животных группы сравнения положительной динамики изучаемых показателей обнаружено не было, напротив, имело место дальнейшее прогрессирование ревматоидного артрита, что подтверждалось данными клинико-лабораторного обследования (табл. 1, 2).

Обсуждение полученных данных. Развитие аутоиммунных заболеваний происходит в случае, когда аутоиммунный процесс по отношению к собственным антигенам приводит к поражению клеток, тканей и органов. Как правило, объектами при этом выступают ДНК, рибонуклеопротеиды, ядерные и цитоплазматические белки. При ревматоидном артрите как системном аутоиммунном заболевании аутоантитела направлены против молекулярных и структурных компонентов клеток, образующих ткани и органы. При этом выявляются антитела к ядерным рибонуклеопротеидам [5].

В более ранних собственных исследованиях у больных ревматоидным артритом и у кроликов с аутоиммунным артритом было констатировано схожее метаболическое состояние, проявлявшееся нарушением обмена протеогликанов, активацией процессов перекисного окисления липидов и несостоятельностью

антиоксидантной системы, а также напряженностью иммунопатологических реакций [1].

Данное исследование внутрисуставной терапии аутоиммунного артрита с помощью ферментного иммуномодулятора — церулоплазмина в условиях эксперимента показало улучшение клинической картины заболевания и результатов лабораторного обследования. У леченых животных имелись положительные сдвиги в метаболизме протеогликанов, о чем свидетельствовала нормализация общего содержания гликозаминогликанов в сыворотке крови. Улучшение показателей процессов перекисного окисления липидов и активности антиоксидантной защиты наблюдалось как в сыворотке крови, так и в синовиальной жидкости пораженных суставов. Результаты гематологического и цитологического исследований свидетельствовали о снижении общей и местной активности воспалительного процесса соответственно. Показатели иммунологического исследования демонстрировали положительную динамику в отношении циркулирующих иммунных комплексов, что указывало на снижение напряженности иммунопатологических реакций.

Результаты данной работы согласуются с исследованиями авторов и разработчиков препарата, которые указывали на то, что введение ЦП мышам линии C57BL/6 с онкологическим процессом (метастазирующая карцинома легких Льюиса) удлиняет латентный период развития опухоли и тормозит ее рост. Установлено, что ЦП потенцирует функциональную активность Т- и В-клеточных звеньев иммунной системы. Полученные данные позволили заключить, что ЦП обладает способностью к стимуляции иммуногенеза как на уровне индукции пролиферации иммунных клеток, так и на уровне их дифференцировки. Как полагают авторы, это могло быть обусловлено комплексным характером иммуномодулирующего действия ЦП [3].

Другие экспериментальные исследования также подтверждали положительный терапевтический эффект изучаемого препарата. Так, при гипергаммонии у крыс церулоплазмин в суммарной дозе 60 мг/кг нормализовал коагуляционный гомеостаз и ряд показателей функциональной активности тромбоцитов [7]. В другом эксперименте при гипобарической гипоксии у крыс изучалось антиоксидантное и антигипоксическое действие церулоплазмина, причем максимальный эффект препарата наблюдался при его введении за один день до моделирования гипоксии [10]. При изучении влияния проникающей радиации на крысах было показано, что введение церулоплазмина животным за 1 час до облучения нормализовало показатели перекисного окисления липидов и активность антиоксидантных ферментов [8].

Таким образом, использование иммуномодулятора церулоплазмина, обладающего полифункциональ-

ными свойствами, способствует улучшению клинической картины экспериментального аутоиммунного артрита и лабораторных показателей.

Литература

1. Белова С.В. Перекисно-антиоксидантный дисбаланс в условиях ревматоидного воспаления и возможность его медикаментозной коррекции: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Саратов, 1999. 23 с.
2. Белова С.В., Карякина Е.В., Кистнер Е.А. Способ моделирования экспериментального ревматоидного артрита. Решение о выдаче патента по заявке № 2007148301 от 15.10.2008, приор. от 24.12.2007 г.
3. Бердинских Н.К., Измайлова И.М., Юдин В.М. Иммуномодулирующая активность экзогенного церулоплазмина при экспериментальном опухолевом процессе // Бюл. эксп. биол. мед. 1992. Т. 113, № 5. С. 520–522.
4. Карякина Е.В., Белова С.В., Горячев В.И. Церулоплазмин — фермент крови и лекарство. Саратов: Научная книга. 2006. 140 с.
5. Красильщикова М.С., Зацепина О.В. Тяжелые металлы как индукторы аутоиммунных процессов у человека и лабораторных животных // Научно-практич. ревматол. 2007. № 3. С. 54–63.
6. Насонова В.А., Бунчук Н.В. Ревматические болезни: руководство для врачей. М.: Медицина, 1997.
7. Осиков М.В., Макаров Е.В., Кривожикина Л.В. Церулоплазмин устраняет нарушения гемостаза при экспериментальной гипергаммонии // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2006. Т. 142. № 10. С. 396–399.
8. Hadjili O.P., Andriichuk T.R., Merkulov S.P. et al. Effect of the substances «Ammivit» and «ceruloplasmin» on lipid peroxidation products level and of antioxidant system indicators under irradiation // Ukr. Biokhim. Zh. 2002. Vol. 74, No. 1. P. 97–100.
9. Kamanli A., Naziroglu M., Aydilek N., Hacıevliyagil C. Plasma lipid peroxidation and antioxidant levels in patients with rheumatoid arthritis // Cell. Biochem. Funct. 2004. Vol. 22, No. 1. P. 53–57.
10. Krainova T.A., Efremova L.M., Mukhina I.V., Anastasiev V.V. Antioxidant and antihypoxic effects of the ceruloplasmin preparation in the hypobaric hypoxia model // Eksp. Klin. Farmakol. 2003. Vol. 66, No. 3. P. 62–65.
11. Leffel E., Wolf C., Poklis A. et al. Drinking water exposure to cadmium, an environmental contaminant, results in the exacerbation of autoimmune disease in the murine model // Toxicology. 2003. Vol. 188, No. 2–3. P. 233–250.

Поступила в редакцию 10.04.2009.

APPLICATION OF ENZYMATIC IMMUNE-RESPONSE MODULATING AGENT TO TREAT EXPERIMENTAL ANTIGEN-INDUCED ARTHRITIS

S.V. Belova

Saratov Research Centre of Traumatology and Orthopedic Surgery (148 Chernyishevskiy St. Saratov 410002 Russia)

Summary — The authors have revealed marked metabolic shifts in rabbits with experimental antigen-induced arthritis resulted in a metabolic imbalance between proteoglycans, intensification of lipid peroxidation and inadequacy of antioxidative protection system. The changes were observed in blood serum and articulation content. There were tense immunopathological reactions. Intra-articular introduction of the immune-response modulating agent ceruloplasmin in this experiment resulted in the correction of these changes and improvement of clinical picture and laboratory indices.

Key words: experimental antigen-induced arthritis, ceruloplasmin.

Pacific Medical Journal, 2009, No. 3, p. 64–67.