

## ВЛИЯНИЕ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ НА ФАГОЦИТАРНУЮ ГЕНЕРАЦИЮ ОКСИДАНТОВ

В статье представлены результаты исследования модулирующего влияния глюкокортикостероидов (ГКС) и нестероидных противовоспалительных средств (НПС) на генерацию активных форм кислорода (АФК) макрофагами по данным хемилюминесцентного анализа. Установлено, что относительно высокие концентрации ГКС и НПС подавляют, а терапевтические концентрации НПС стимулируют генерацию АФК в тесте *in vitro*. Возможные механизмы обнаруженного феномена обсуждаются. Ключевые слова: противовоспалительные средства, эйкозаноиды, активные формы кислорода, фагоциты, хемилюминесценция. The effects of glucocorticosteroids (GCS) and non-steroid anti-inflammatory drugs (NAD) on the active oxygen radicals (AOR) generation in macrophages studied *in vitro* by chemiluminescence analysis are presented. High concentrations of both GCS and NAD decrease AOR generation but therapeutic concentrations of NAD stimulate. The possible mechanisms of this phenomenon are discussed. Key words: anti-inflammatory drugs, eicosanoides, active oxygen radical, phagocytes, chemiluminescence.

**Ключевые слова:** противовоспалительные средства, эйкозаноиды, активные формы кислорода, фагоциты, хемилюминесценция.

The effects of glucocorticosteroids (GCS) and non-steroid anti-inflammatory drugs (NAD) on the active oxygen radicals (AOR) generation in macrophages studied *in vitro* by chemiluminescence analysis are presented. High concentrations of both GCS and NAD decrease AOR generation but therapeutic concentrations of NAD stimulate. The possible mechanisms of this phenomenon are discussed. Key words: anti-inflammatory drugs, eicosanoides, active oxygen radical, phagocytes, chemiluminescence.

Генерация активных форм кислорода (АФК) фагоцитами приводит не только к элиминации чужеродных агентов, но и разрушению клеток и межклеточного матрикса в очаге воспаления [1, 6]. Подобный механизм тканевых повреждений реализуется, в частности, при деструктивных и дегенеративных заболеваниях опорно-двигательного аппарата – ревматоидном артрите и остеоартрите, когда генерируемый фагоцитами избыток АФК повреждает коллаген, усиливая воспалительные и дегенеративные изменения хряща [1, 5]. Не менее важной группой биологически активных веществ очага воспаления являются эйкозаноиды, которые, как сами по себе, так и в кооперации с АФК определяют динамику воспалительной реакции [3, 6, 10]. Общеизвестно, что глюкокортикостероиды (ГКС) и нестероидные противовоспалительные средства (НПС) способны подавлять выработку инфламматорных эйкозаноидов, однако сведения о действии этих агентов на фагоцитарную генерацию АФК неоднозначны [7, 8, 9, 11].

Расширение представлений о роли АФК в патогенезе воспаления и реализации эффектов инфламматорных медиаторов делают актуальным исследование модулирующего влияния противовоспалительных агентов стероидной и нестероидной природы на фагоцитарную генерацию оксидантов.

Материалы и методы

Исследования проведены на изолированных перитонеальных макрофагах (МФ) беспородных крыс-самцов массой 180-220 г. МФ получали промыванием брюшной полости крыс 20 мл среды Хенкса с гепарином (10 ЕД/мл) под эфирным наркозом. Клетки отмывали и ресуспендировали в бесцветной среде Хенкса. Полученная суспензия содержала около 80% МФ. Количество клеток подсчитывали в камере Горяева и доводили до концентрации  $5 \times 10^6$ /мл.

Клеточную продукцию оксидантов исследовали методом люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) в условиях спонтанно протекающей (СХЛ) и взрывной генерации АФК, индуцированной фагоцитарным стимулом (ИХЛ). Измерение хемилюминесценции проводили на люминометре LKB-Wallac-1251 (Финляндия). При оценке ИХЛ пробы содержали в 1 мл бесцветной среды Хенкса: МФ ( $10^6$ ), люминол ( $7 \times 10^{-5}$  М), исследуемый противовоспалительный агент (ПВА) и индуктор оксидантного взрыва — опсонизированный зимозан (ОЗ) ( $5 \times 10^7$  частиц), который добавляли непосредственно перед регистрацией ХЛ. При исследовании СХЛ индуктор в пробы не добавляли. В качестве модуляторов испытывали: преднизолон “Никомед”, Австрия), дексаметазон (KRKA, Словения), ацетилсалициловую кислоту (Борисовский завод медицинских препаратов), диклофенак (Agio-Pharmaceuticals Ltd, Индия), целекоксиб (Searle, Morpeth, Великобритания) в диапазоне концентраций  $10^{-9}$ - $10^{-1}$  М. Указанные реагенты предварительно инкубировали с клетками 10 мин при  $20^\circ\text{C}$  до внесения в среду индуктора (ИХЛ). Каждый агент испытан в 3-4 повторностях на клетках, полученных от разных животных.

Регистрацию ХЛ проводили в дискретном режиме при  $37^\circ\text{C}$  на протяжении 30-40 минут с интервалом 2-3 мин. Спонтанную генерацию АФК и респираторный взрыв МФ количественно оценивали по площади под кривой ХЛ (AUC) и максимальному приросту ХЛ в мВ/ $10^6$  клеток. Показатели ХЛ опытных проб, содержащих ПВА, выражали в % к ХЛ параллельной контрольной пробы. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента при уровне значимости 5%.

#### Результаты и обсуждение

Установлено, что преднизолон и дексаметазон умеренно подавляли генерацию оксидантов макрофагами при индукции фагоцитоза (табл. 1). Максимальное ингибирующее действие отмечалось при высоких концентрациях обоих ГКС и составило для преднизолона 37% ( $10^{-4}$  М), для дексаметазона 29% ( $10^{-5}$  М). Та же концентрация дексаметазона подавляла спонтанную генерацию макрофагами АФК на 33%, подобный эффект преднизолона был выражен лишь в виде тенденции. Модулирующие концентрации ГКС в клеточном тесте приближаются к терапевтическим концентрациям ( $10^{-7}$ - $3 \times 10^{-6}$  М) при назначении ГКС в качестве противовоспалительных средств, при местном применении стероидов их содержание в воспаленной ткани может достигать  $10^{-4}$  М.

Известно, что ГКС способны ингибировать фосфолипазу А<sub>2</sub> (ФЛА<sub>2</sub>), предотвращая накопление свободной арахидоновой кислоты (АА) – главного субстрата циклооксигеназ (ЦОГ) и липооксигеназ (ЛОГ), образующих две основные линии эйкозаноидов: простаноиды и лейкотриены (ЛТ). Поскольку последние способны усиливать генерацию фагоцитами АФК [3], ингибирование ГКС макрофагальной генерации оксидантов может лимитироваться степенью участия метаболитов арахидоната в их наработке. Одновременно, липидная природа ГКС предопределяет способность этих соединений стабилизировать клеточные мембраны, а наличие в структуре свободных гидроксильных групп наделяет ГКС потенциальной

антиоксидантной активностью. Возможно, указанные свойства ГКС являются дополнительной компонентой модулирующего действия не только в тесте на изолированных макрофагах, но и в очаге воспаления.

Исследование модулирующего влияния ингибиторов ЦОГ – ацетилсалициловой кислоты (АСК), диклофенака и целекоксиба показало, что НПС оказывают двойственное действие на макрофагальную генерацию АФК. При эффективных противовоспалительных концентрациях исследованные соединения стимулировали спонтанный и индуцированный синтез оксидантов по данным люминолзависимой хемилюминесценции. Наиболее выраженным стимулирующим влиянием обладал целекоксиб – новый селективный ингибитор ЦОГ II – изофермента ответственного за синтез провоспалительных простагландинов и тромбксана. Целекоксиб усиливал генерацию оксидантов в макрофагах на 100-150% по отношению к контролю (5Ч10-6-10-5М) (табл. 2).

Таблица 1

Влияние глюкокортикостероидов на ХЛ макрофагов

Агент	Преднизолон		Дексаметазон	
	ИХЛ	СХЛ	ИХЛ	СХЛ
К <sup>0</sup>	30,0±8,6	5,6±2,3	23,6±4,9	3,5±0,7
[С], М	АУС, % к контролю			
10 <sup>-9</sup>	93,9±0,8	113,8±29,8	90,5±4,9	95,1±5,4
10 <sup>-8</sup>	88,9±14,7	97,9±11,8	82,4±5,9	100,6±20,5
10 <sup>-7</sup>	81,9±2,1*	100,9±17,9	96,8±17,8	71,6±7,9*
10 <sup>-6</sup>	90,1±7,3	83,7±9,1	80,5±4,3*	89,3±4,8
10 <sup>-5</sup>	83,6±7,3	84,0±7,1	71,2±3,6**	66,7±8,7*
10 <sup>-4</sup>	62,8±4,0*	64,2±14,2	71,9±4,0**	104,9±16,7

Примечание: К<sup>0</sup> – показатели хемилюминесценции контрольных проб (АУС, мВ·10<sup>4</sup>, Мнм, n=3-4); \* p<0,05; \*\* p<0,01.

Стимулирующее действие неизбирательных ингибиторов ЦОГ диклофенака и ацетилсалициловой кислоты в отношении ИХЛ существенно не различалось в соответствующем терапевтическом диапазоне обоих соединений, составляя 20-30% прироста люминесценции. При дальнейшем увеличении концентраций агентов, активация ХЛ сменялась ингибированием вплоть до полного ее подавления. Чем большей липофильностью обладало исследуемое соединение, тем меньшие его концентрации были необходимы для достижения максимального ингибирования ХЛ в клеточном тесте. Так, высоко липофильный целекоксиб практически полностью ингибировал ИХЛ и значительно СХЛ уже при 10<sup>-4</sup> М, аналогичный эффект диклофенака проявлялся при 10<sup>-3</sup>М, гидрофильная ацетилсалициловая кислота подавляла хемилюминесценцию только при 0,1 М (см. табл. 2).

Влияние нестероидных противовоспалительных агентов на ХЛ макрофагов

Агент	АСК		Диклофенак		Целекоксиб	
[Сэф], М	1-2·10 <sup>-3</sup>		1-3·10 <sup>-6</sup>		1-5·10 <sup>-6</sup>	
	ИХЛ	СХЛ	ИХЛ	СХЛ	ИХЛ	СХЛ
К <sup>о</sup>	12,0±1,5	2,6±0,4	26,1±4,7	13,7±2,2	12,9±1,3	3,0±0,7
[С], М	АУС, % к контролю					
10 <sup>-3</sup>	-	-	-	-	104,0±5,9	123,3±6,8
10 <sup>-4</sup>	-	-	116,8±11,2*	110,4±27,1	136,6±20,5	116,6±22,4
10 <sup>-5</sup>	-	-	118,4±8,3*	83,0±16,8	134,7±40,6	103,8±15,7
10 <sup>-6</sup>	114,1±11,1	99,1±8,9	129,0±9,5*	105,4±5,6	133,7±12,4*	96,8±4,9
3·10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	109,3±8,3	96,9±5,1
5·10 <sup>-6</sup>	-	-	-	-	118,2±12,4	249,4±7,2*
10 <sup>-3</sup>	108,3±15,2	77,6±14,9	101,9±5,9	120,5±19,6	205,1±6,4**	68,5±5,4
3·10 <sup>-3</sup>	-	-	-	20,4±4,6*	79,5±6,2	-
10 <sup>-4</sup>	111,0±28,7	114,8±14,1	74,8±8,2*	63,9±3,9**	8,1±1,6**	40,0±4,8**
10 <sup>-5</sup>	123,6±12,1*	89,9±7,9	6,5±0,5**	14,3±4,1**	-	-
10 <sup>-6</sup>	100,7±17,1	73,9±11,7	-	-	-	-
10 <sup>-7</sup>	5,0±0,5**	14,4±1,4**	-	-	-	-

Примечание: К<sup>о</sup> - показатели хемиллюминесценции контрольных проб (АУС, мВ·10<sup>4</sup>, М<sub>тп</sub>, n=3);  
\* p<0,05; \*\* p<0,01.

Известно, что ингибиторы ЦОГ усиливают метаболизм АА, мобилизованной при стимуляции лейкоцитов [6] по 5-липооксигеназному пути с образованием в качестве промежуточных продуктов нестабильных перекисей (5-НРЕТЕ, 12-НРЕТЕ, 15-НРЕТЕ) и соответствующих им гидроксидериватов (НЕТЕ) [3], обладающих стимулирующим влиянием на генерацию оксидантов и иные функции фагоцитов [4]. Не исключено также, что указанные соединения, являясь оксидантами, могут напрямую взаимодействовать с люминолом, усиливая люминесценцию фагоцитарной суспензии. Трансформация 5-НЕТЕ в ЛТА4 и гидролиз последнего до ЛТВ4 происходит быстро и в отличие от синтеза других лейкотриенов не требует дополнительных субстратов. Лейкотриен В4, в свою очередь, является стимулятором хемотаксиса, фагоцитоза и респираторного взрыва фагоцитов [3]. Таким образом, активация НПС люминесценции МФ *in vitro* может быть обусловлена как модулирующим влиянием продуктов липооксигеназного метаболизма АА на активную генерацию фагоцитами АФК, так и взаимодействием эйкозатетраеновых метаболитов с люминофором. Учитывая, что МФ экспрессируют в основном ЦОГ II, хемиллюминесцентный анализ действия потенциальных НПС на генерацию макрофагами АФК может стать дополнительным тестом для поиска высокоэффективных противовоспалительных средств.

Ингибирующее действие высоких концентраций НПС на макрофагальную генерацию оксидантов могут быть обусловлены, с одной стороны, их стабилизирующим влиянием на клеточные мембраны фагоцитов, с другой стороны, возможной утратой специфичности действия НПС в отношении ЦОГ.

Проведенные исследования показали, что ингибиторы синтеза эйкозаноидов двойственно модулируют образование оксидантов в макрофагах: относительно высокие концентрации ГКС и НПС подавляют, а терапевтические концентрации НПС стимулируют генерацию АФК в клеточном тесте. Вопрос о сохранении подобной закономерности действия стероидных и нестероидных противовоспалительных средств *in vivo* и значении для тканевого гомеостаза требует дополнительных исследований в области патофизиологии и фармакологии воспаления.

## Литература

1. Воспаление. Руководство для врачей / Под ред. В.В. Серова, В.С. Паукова. – М.: Медицина, 1995. – 640 с.
2. Насонов Е.Л., Цветкова Е.С., Тов Н.Л. Селективные ингибиторы циклооксигеназы-2: новые перспективы лечения заболеваний человека. // Терапевтический архив. – 1998. – № 5. – С. 8-14.
3. Сала А., Зарини С., Болла М. Лейкотриены: липидные биоэффекторы воспалительных реакций. // Биохимия. – 1998. – Т. 63, вып. 1. – С. 101-110.
4. Czech W., Barbisch M., Tenscher K. e.a. Chemotactic 5-oxo-eicosatetraenoic acids induce oxygen radical production, Ca<sup>2+</sup>-mobilization, and actin reorganization in human eosinophils via a pertussis toxin-sensitive G-protein. // J. Invest. Dermatol. – 1997. – Vol. 108, № 1. – P. 108-112.
5. Henderson B., Revell P.A., Edwards J.C. Synovial lining cell hyperplasia in rheumatoid arthritis: dogma and fact. // Ann. Rheum. Dis. – 1988. – V. 47, № 4. – P. 348-349.
6. Inflammation: basic principles and clinical correlates / Eds. John I Gallin, Ira M. Goldstein, Ralph Snyderman. – 2nd ed.—Raven Press. New York, 1992. – 1186 p.
7. Neumuller J., Tohidast-Akrad M. Comparative in vitro investigations of the influence of mofebutazone, phenylbutazone and diclofenac on phagocytosis and respiratory burst of human peripheral blood leucocytes. // Arzneimittel-Forschung. – 1994. – V. 44, № 5. – P. 636-641.
8. Olinescu R., Radu D., Pinteа G., Militaru M. Evaluation of the therapeutic efficiency of voltarene by using the in vitro chemiluminescence emitted by leukocytes polymorphonuclear. // Romanian J. of Internal Medicine. – 1991. – V. 29, № 3-4. – P. 199-204.
9. Olinescu R., Hertoghe J., Savoiu D. e.a. Steroid hormones may modulate the chemiluminescence emission produced by polymorphonuclear leukocytes. // Romanian J. of Internal Medicine. – 1994. – V. 32, № 1. – P. 37-46.
10. Perez H.D., Weksler B.B., Goldstein I.M. Generation of chemotaxic lipid from arachidonic acid by exposure to a superoxide generation system. // Inflammation. – 1980. – V. 4(3). – P. 313-328.
11. Phillips T.R., Yang W.C., Schultz R.D. The effects of glucocorticosteroids on the chemiluminescence response of bovine phagocytic cells. // Veterinary Immunology and Innunopharmacology. – 1987. – V. 14, № 3. – P. 245-256.