

Антииммуносупрессивное действие глюконатов 3d-металлов при экспериментальном иммунодефиците

Ольга Александровна Князева^{1*}, Сабина Ильясовна Уразаева¹,
Ирина Григорьевна Конкина², Лилиана Минкаировна Саптарова¹,
Луиза Мавлетовна Газдалиева¹, Юрий Ильич Муринов²

¹Башкирский государственный медицинский университет, г. Уфа, Россия;

²Уфимский институт химии Российской академии наук, г. Уфа, Россия

Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-255

Цель. Оценка влияния глюконатов 3d-металлов на комплемент-фиксирующую функцию иммуноглобулинов G и функциональную активность комплемента.

Методы. Исследование проведено *in vivo* на 2,5–3-месячных белых лабораторных мышах массой тела 25–28 г с вторичным иммунодефицитом, который индуцировали с помощью однократного внутрибрюшинного введения циклофосфамида, а также *in vitro* в тест-системе с использованием сенсibilизированных эритроцитов барана. Иммунологические исследования были проведены у интактных животных, а также до и после введения глюконатов Mn, Co, Cu, Zn мышам с индуцированным иммунодефицитом. Содержание иммуноглобулинов G и их комплексов с субкомпонентом первого компонента комплемента C1q определяли в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа с помощью специфических моноклональных антител.

Результаты. Показано, что 2-недельное пероральное введение глюконатов 3d-металлов (Mn, Co, Cu, Zn) в дозе 1/10 LD₅₀ иммунодефицитным мышам вызывает значительное повышение уровня иммуноглобулинов G и их комплексов с C1q. Наибольшее повышение концентрации отмечено при введении глюконата цинка. Также с помощью сенсibilизированных эритроцитов барана *in vitro* было показано, что глюконаты кобальта и (в меньшей степени) марганца увеличивают функциональную активность C1q.

Вывод. Глюконаты 3d-металлов (Mn, Co, Cu, Zn) обладают иммунокорригирующими свойствами: повышают содержание иммуноглобулинов G и их комплексов с C1q, значительно снижающееся в результате действия циклофосфамида; глюконаты кобальта и марганца оказывают стимулирующее действие на функциональную активность комплемента по классическому пути, что свидетельствует о различных механизмах иммунокорригирующего действия исследуемых глюконатов металлов и требует дальнейшего изучения.

Ключевые слова: глюконаты 3d-металлов, циклофосфамид, IgG, C1q, комплексы C1q-IgG.

Antiimmunosuppressive action of 3d-metal gluconates in experimental immunodeficiency

O.A. Knyazeva¹, S.I. Urazayeva¹, I.G. Konkina², L.M. Saptarova¹, L.M. Gazdalieva¹, Yu.I. Murinov²

¹Bashkir State Medical University, Ufa, Russia;

²Ufa Institute of Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

Aim. Evaluation of the effect of 3d-metal gluconates on complement-fixing function of immunoglobulin G and functional activity of complement.

Methods. The study was conducted *in vivo* on 2.5–3 month-old white laboratory mice weighing 25–28 g with secondary immunodeficiency, which was induced by a single intraperitoneal injection of cyclophosphamide, as well as *in vitro* in a test system using sensitized sheep erythrocytes. Immunological studies were performed in intact animals, and before and after the administration of Mn, Co, Cu, and Zn gluconates to mice with induced immunodeficiency. The content of immunoglobulin G and its complexes with subcomponent of the complement first component C1q was determined in serum by ELISA using specific monoclonal antibodies.

Results. Two-week oral administration of 3d-metal gluconates (Mn, Co, Cu, Zn) in a dose of 1/10 LD₅₀ to immunodeficient mice was shown to cause a significant increase in the level of immunoglobulin G and its complexes with C1q. The greatest increase in concentration was observed with the introduction of zinc gluconate. Also by means of sensitized sheep erythrocytes *in vitro*, cobalt and, to a lesser extent, manganese gluconates were shown to increase the functional activity of C1q.

Conclusion. 3d-metal gluconates (Mn, Co, Cu, Zn) demonstrate immunocorrecting properties: increase the content of immunoglobulin G and its complexes with C1q, significantly decreasing as a result of cyclophosphamide effect; cobalt and manganese gluconates have a stimulating effect on the functional activity of complement by its classical pathway, which indicates different mechanisms of immunocorrection action of studied metal gluconates and requires further studies.

Keywords: 3d-metal gluconates, cyclophosphamide, IgG, C1q, C1q-IgG complexes.

Иммуносупрессивное действие химиотерапевтических препаратов — весьма существенный негативный фактор, снижающий эффективность их применения. В связи с этим изучение действия иммуномодуляторов различной природы при восстановлении резистентности организма после приёма экзотоксикантов является актуальной задачей медицины и биохимии.

Одним из широко применяемых в онкологии препаратов служит цитостатик алкилирующего действия циклофосфамид, представляющий собой фосфорилированное циклическое производное иприта [1, 2]. Известно, что при его попадании в организм млекопитающих развивается выраженная супрессия пролиферации В-лимфоцитов и, как следствие, снижение уровня иммуноглобулинов, а также нарушения в системе комплемента, который служит важным звеном врождённого гуморального иммунитета [3, 4].

В качестве корректоров иммунных нарушений в данной работе были рассмотрены глюконаты 3d-элементов, обладающие способностью корректировать иммунные нарушения [5]. Соединения 3d-металлов характеризуются многообразием направлений взаимодействия с биологическими мишенями [6]. Введение этих металлов в организм в виде неорганических солей проявляется выраженной токсичностью [7–10], поскольку они воспринимаются иммунной системой слизистой оболочки тонкой кишки как гаптены, активирующие моноцитарно-макрофагальную систему по механизму незавершённого фагоцитоза [11]. В результате происходит индуцирование перекисных процессов, которые приводят к повреждению клеточных мембран. Однако в составе координационных соединений с рядом хелатирующих лигандов 3d-элементы в значительной степени теряют токсичность и способны проявлять иммунокорректирующие свойства [6, 12, 13].

В этом плане представляет интерес изучение комплексных соединений 3d-металлов с полиоксикислотами, в частности с D-глюконовой кислотой. Было показано, что эти соединения имеют более низкую токсичность по сравнению с неорганическими соединениями [12]. Возможно, хелатирующий эффект D-глюконовой кислоты препятствует реализации индуцирования перекисных процессов, и 3d-элементы могут формировать стабильный биодоступный пул, не оказывающий выраженного цитотоксического действия.

Инициация классического пути системы комплемента начинается с взаимодействия субкомпонента первого фактора комплемента C1q, который находится в сыворотке крови в виде мультимолекулярного комплекса C1q-2C1r-2C1s с активатором, которым является главным образом иммуноглобулин G (IgG) в составе комплекса антиген-антитело. Комплексы C1q-IgG-антиген формируются постоянно в результате иммунного ответа организма, так как они запускают каскад биохимических реакций системы комплемента по классическому пути и стимулируют активацию натуральных киллеров, привлекающих фагоциты и лимфоциты [14].

Целью настоящей работы было изучение влияния глюконатов 3d-металлов на комплемент-фиксирующую функцию IgG и функциональную активность комплемента.

Эксперимент проведён на 2,5–3-месячных белых беспородных мышах с массой тела 25–28 г, самцах. Иммунодефицит индуцировали путём однократного внутрибрюшинного введения цитостатика циклофосфамида (эндоксана; Бакстер АГ, Швейцария) в дозе 50 мг/кг. Контролем служили две группы: интактные и иммунодефицитные животные («без лечения»), которым вводили дистиллированную воду.

Влияние глюконатов Mn, Co, Cu, Zn, синтезированных по методике, описанной в [12], изучали в сравнении с двумя группами: (1) введение препарата липоксид — [4-О-(2-ацетиламино-2-дезоксид-β-D-глюкопиранозил)-N-ацетилмураamil]-L-аланил-D-α-глутамиламид, который относится к фармакотерапевтической группе иммуностимулирующих средств, являясь синтетическим аналогом бактериальных гликопептидов, и (2) глюконата кальция (CaGl).

Дозы обоих препаратов рассчитывали по инструкциям: липоксид — 0,17 мг/кг (0,14–0,28 мг/кг), глюконат кальция — 50 мг/кг (28–71 мг/кг). Пероральное введение всех препаратов начинали через 24 ч после инъекции циклофосфамида и далее ежедневно в течение 2 нед в дозе 1/10 полудельной дозы (LD₅₀) [12]. На 15-е сутки у животных забирали кровь и отделяли сыворотку, в которой методом иммуноферментного анализа с помощью специфических мышинных моноклональных антител против C1q и поликлональных кроличьих антител против IgG мыши, конъюгированных с пероксидазой (ГНЦ НИИ ОЧБ,

Санкт-Петербург), определяли уровень IgG и комплексов C1q-IgG.

Оценку влияния глюконатов металлов на функциональную активность компонента по классическому пути выполняли с использованием сенсibilизированных гемолитической сывороткой (ФГУП НПО «Микроген» МЗ России) эритроцитов барана. В качестве источника компонента использовали донорскую сыворотку в разведении от 1:2 до 1:128. Глюконаты 3d-металлов в изотоническом растворе натрия хлорида (10^{-2} М) по 50 мкл вносили в 96-луночный планшет и инкубировали в течение 30 мин при 4 °С. После этого добавляли сенсibilизированные эритроциты барана в вероналовом буферном растворе (по 50 мкл) и инкубировали при 37 °С в течение часа.

Оптическую плотность надосадочной жидкости, перенесённой в новый планшет, измеряли в той же последовательности при длине волны 450 нм (иммуноферментный анализатор Stat Fax-2100, США). Фиксацию компонента (С%) сенсibilизированными эритроцитами в присутствии глюконатов металлов рассчитывали по формуле:

$$C\% = (E_o - E_k) / E_o \times 100\%,$$

где E_o — оптическая плотность в присутствии препарата; E_k — оптическая плотность контрольной пробы.

Манипуляции с лабораторными мышами проводили в соответствии с положением Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, которое соответствует положениям, принятым в Российской Федерации (МЗ РФ от 19 июня 2003 г. №267).

Результаты статистически обрабатывали с помощью программ Microsoft Excel и Statistica 10.0. Для описания количественных признаков в малых выборках применяли медиану (Me) и интерквартильный размах ($Q_1 - Q_3$). Для расчёта статистической значимости различий между группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни для двух независимых групп. Статистически значимыми считали значения при $p < 0,05$.

Представленные результаты исследования (табл. 1, 2) показывают, что введение циклофосфида вызывает у мышей снижение уровня IgG на 53%, а комплексов C1q-IgG — на 31,5% относительно группы интактных мышей, что указывает на побочное действие цитостатика, который

вызывает изменения в системе лимфопоэза, вследствие чего происходит угнетение синтеза IgG. С другой стороны, препарат в результате своего цитотоксического действия неселективно угнетает митотическую активность клеток различных тканей, способствуя их дисконформации, дистрофическим и дегенеративным изменениям, приводящим к гибели по пути некроза, или же потенцируя апоптоз. Образующиеся вследствие этого «осколки» и метаболиты распада, которые не могут полностью инактивироваться угнетённой макрофагально-фагоцитарной системой, связываются с Fc-фрагментами IgG, конкурируя с C1q, тем самым снижая долю связывания C1q с IgG. Кроме того причиной снижения образования комплексов может быть гепатотоксическое действие циклофосфида, которое обуславливает недостаточный синтез компонентов компонента или их некомпетентность [1].

Введение глюконатов 3d-металлов в течение 2 нед приводило к существенному повышению концентрации IgG в сыворотке крови (см. табл. 1) по сравнению с животными контрольной группы «без лечения» ($p < 0,05$). При введении глюконата цинка зарегистрировано наибольшее повышение концентрации IgG — на 31%, далее в порядке убывания следуют кобальт — на 25%, медь — на 22%. В меньшей степени эффект проявлялся под действием глюконата марганца — на 17%.

Аналогичная картина отмечена и в содержании комплексов C1q-IgG (см. табл. 2). Здесь выраженное увеличение было отмечено в группах мышей, получавших глюконат цинка (на 28,5%), глюконат марганца (на 25%) и глюконат меди (на 20%), в меньшей степени — при введении глюконата кобальта (на 18,5%). Не исключено, что такое действие глюконатов 3d-металлов может быть связано со стимулированием дополнительного синтеза IgG, а также, возможно, с конкурирующим взаимодействием этих соединений с метаболитами распада, смещающим равновесие реакции C1q с IgG в сторону увеличения доли образования комплексов.

Поскольку в группе животных, получавших глюконат кальция, зафиксировано лишь незначительное повышение уровня IgG (на 0,4%) и комплексов C1q-IgG (на 3%) относительно группы «без лечения», можно предположить, что определяющее влияние на изменение приведённых показателей оказывают 3d-элементы.

Таблица 1. Влияние глюконатов 3d-металлов на уровень иммуноглобулинов G (IgG) в сыворотке крови иммунодефицитных мышей

Статистический показатель	IgG, мг/мл							
	1 — интактные (n=12)	2 — ИД без лечения (n=12)	3 — ИД + липоид (n=12)	4 — ИД + CaG1 (n=12)	5 — ИД + MnG1 (n=12)	6 — ИД + CoG1 (n=12)	7 — ИД + CuG1 (n=12)	8 — ИД + ZnG1 (n=12)
M±σ	1,48±0,23	0,69±0,09	0,84±0,12	0,7±0,09	0,94±0,11	1,07±0,16	1,02±0,15	1,16±0,14
Me	1,51	0,71	0,86	0,72	0,96	1,09	1,04	1,18
[Q ₁ -Q ₃]	[1,34-1,72]	[0,63-0,76]	[0,74-0,93]	[0,63-0,78]	[0,89-0,99]	[0,98-1,21]	[0,92-1,12]	[1,07-1,24]
p	—	p _{1,2} =0,00003	p _{2,3} =0,003	p _{2,4} =0,00729 p _{3,4} =0,0130	p _{2,5} =0,0004 p _{3,5} =0,00003 p _{4,5} =0,00005	p _{2,6} =0,00006 p _{3,6} =0,0009 p _{4,6} =0,00006	p _{2,7} =0,0002 p _{3,7} =0,0006 p _{4,7} =0,0002	p _{2,8} =0,00003 p _{3,8} =0,00005 p _{4,8} =0,00003

Примечание: IgG — иммуноглобулин G; ИД — иммунодефицит.

Таблица 2. Влияние глюконатов 3d-металлов на уровень комплексов C1q-IgG в сыворотке крови иммунодефицитных мышей

Статистический показатель	C1q-IgG, ед. экстинкции							
	1 — интактные (n=12)	2 — ИД без лечения (n=12)	3 — ИД + липоид (n=12)	4 — ИД + CaG1 (n=12)	5 — ИД + MnG1 (n=12)	6 — ИД + CoG1 (n=12)	7 — ИД + CuG1 (n=12)	8 — ИД + ZnG1 (n=12)
M±σ	1,99±0,31	1,34±0,20	1,65±0,24	1,41±0,18	1,86±0,20	1,69±0,23	1,76±0,19	1,93±1,36
Me	2	1,37	1,66	1,43	1,87	1,74	1,77	1,95
[Q ₁ -Q ₃]	[1,72-2,24]	[1,28-1,42]	[1,54-1,77]	[1,31-1,53]	[1,73-2,02]	[1,6-1,83]	[1,65-1,87]	[1,94-1,44]
p	—	p _{1,2} =0,0002	p _{2,3} =0,0093	p _{2,4} =0,2726 p _{3,4} =0,011	p _{2,5} =0,0001 p _{3,5} =0,0282 p _{4,5} =0,0002	p _{2,6} =0,0038 p _{3,6} =0,4357 p _{4,6} =0,0051	p _{2,7} =0,0005 p _{3,7} =0,2040 p _{4,7} =0,0011	p _{2,8} =0,00003 p _{3,8} =0,00005 p _{4,8} =0,00003

Примечание: IgG — иммуноглобулин G; ИД — иммунодефицит.

Таблица 3. Влияние глюконатов 3d-металлов на фиксацию комплемента в тесте с сенсibilизированными эритроцитами барана

Показатель	Контроль (n=12)	CaG1 (n=12)	MnG1 (n=12)	CoG1 (n=12)	CuG1 (n=12)	ZnG1 (n=12)
E ₄₅₀	0,92±0,09	0,95±0,1	1,13±0,13	1,89±0,2	0,85±0,09	0,91±0,09
Фиксация комплемента (С%), %	0	3,2±0,3	18,6±1,9	51,3±5,2	-8,2±0,9	1,1±0,12

Из указанных в таблицах данных также видно, что глюконаты 3d-металлов превосходят по корректирующему действию препарат сравнения ликопид ($p < 0,05$).

Результаты определения влияния глюконатов 3d-металлов на функциональную активность субкомпонента C1q по гемолизу сенсibilизированных эритроцитов барана представлены в табл. 3. Из них видно, что способностью активировать комплемент обладают CoGl и (в меньшей степени) MnGl. Узнавание C1q субкомпонентом активаторов патологического процесса — ключевое событие в запуске каскада реакций классического пути комплемента, приводящего к образованию мембраноатакующего комплекса и уничтожению опознанных клеток.

ВЫВОДЫ

1. Глюконаты 3d-металлов (Mn, Co, Cu, Zn) обладают иммунокорректирующими свойствами: повышают содержание иммуноглобулинов G и их комплексов с субкомпонентом первого фактора комплемента C1q, значительно снижающееся в результате действия циклофосамида.

2. Глюконаты кобальта и марганца оказывают стимулирующее действие на функциональную активность комплемента по классическому пути, что свидетельствует о различных механизмах иммунокорректирующего действия исследуемых глюконатов металлов и требует дальнейшего изучения.

*Все авторы заявляют
об отсутствии конфликта интересов
по представленной статье.*

ЛИТЕРАТУРА

1. Anwer F., Yun S., Nair A. et al. Severe refractory immune thrombocytopenia successfully treated with high-dose pulse Cyclophosphamide and Eltrombopag. *Case Reports in Hematology*. 2015; 2015: 583451. DOI: 10.1155/2015/583451.

2. Huang R., Zhang J., Liu Y. et al. Immunomodulatory effects of polysaccharopeptide in immunosuppressed mice induced by cyclophosphamide. *Mol. Med. Rep.* 2013; 8 (2): 669–675. DOI: 10.3892/mmr.2013.1542.

3. Лебединская Е.А., Тройнич Я.Н., Малыкина А.Е., Годовалов А.П. Изменение фагоцитарной активности нейтрофилов и моноцитов периферической крови здоровых доноров под действием циклофосфана. *Вестн. уральской мед. академ. науки*. 2011; 2/2: 36–37. [Lebedinskaya E.A., Troynich Ya.N., Malykina A.E., Godovalov A.P. Change in phagocytic activity of neutrophils and monocytes of peripheral blood of healthy donors under the influence of cyclophosphamide. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki*. 2011; 2/2: 36–37. (In Russ.)]

4. Hodge J.W., Garnett C.T., Farsaci B. et al. Chemotherapy-induced immunogenic modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes

and is distinct from immunogenic cell death. Chemotherapy-induced immunogenic modulation of tumor cells enhances killing by cytotoxic T lymphocytes and is distinct from immunogenic cell death. *Int. J. Cancer*. 2013; 133 (3): 624–636. DOI: 10.1002/ijc.28070.

5. Князева О.А., Усачёв С.А., Уразаева С.И. Роль соединений глюконовой кислоты с 3d-металлами в коррекции индуцированного иммунодефицита у мышей. *Ж. научн. статей «Здоровье и образование в XXI веке»*. 2016; 18 (4): 88–93. [Knyazeva O.A., Usachev S.A., Urazayeva S.I. The role of gluconic acid compounds with 3d metals in the correction induced immunodeficiency in mice. *Zhurnal nauchnykh statey Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke*. 2016; 18 (4): 88–93. (In Russ.)]

6. Кудрин А.В., Громова О.А. *Микроэлементы в иммунологии и онкологии*. М.: ГЭОТАР-Медиа. 2007; 544 с. [Kudrin A.V., Gromova O.A. *Mikroelementy v immunologii i onkologii*. (Microelements in immunology and oncology.) Moscow: GEOTAR-Media. 2007; 544 p. (In Russ.)]

7. Лебедева С.А., Бабаниязова З.Х., Радионов И.А., Скальный А.А. Металлокомплексы цинка и кобальта в восстановительном лечении гипоксических состояний. *Вестн. восстановительн. мед.* 2013; (2): 67–69. [Lebedeva S.A., Babaniyazova Z.H., Radionov I.A., Skal'nyy A.A. Metal complexes of zinc and cobalt in the rehabilitative treatment of hypoxic conditions. *Vestnik vosstanovitel'noy meditsiny*. 2013; (2): 67–69. (In Russ.)]

8. Скальная М.Г., Скальный А.В. Микроэлементы: биологическая роль и значение для медицинской практики. Сообщение 1. Медь. *Вопр. биол., мед. и фармацевтич. химии*. 2015; (1): 15–31. [Skal'naya M.G., Skal'nyy A.V. Trace elements: the biological role and significance for medical practice. Communication 1. Copper. *Voprosy biologicheskoy, meditsinskoy i farmatsevticheskoy khimii*. 2015; (1): 15–31. (In Russ.)]

9. Calabro A.R., Gazarian D.I., Barile F.A. Effect of metals on β -actin and total protein synthesis in cultured human intestinal epithelial cells. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 2011; 63 (1): 47–58. DOI: 10.1016/j.vascn.2010.04.012.

10. Yu S., Wang X.-H., Chen Y.-G. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of effects of Mg-6Zn alloy on tight junction of intestinal epithelial cell. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 2015; 25 (11): 3760–3766. DOI: 10.1016/S1003-6326(15)64014-6.

11. Саптарова Л.М., Камилов Ф.Х., Князева О.А., Когина Э.Н. Накопление тяжёлых металлов в печени крыс в процессе хронической интоксикации медно-цинковой колчеданной рудой. *Вестн. Башкирского ун-та*. 2017; 22 (1): 90–91. [Saptarova L.M., Kamilov F.Kh., Knyazeva O.A., Kogina E.N. Accumulation of heavy metals in the liver of rats in the process of chronic intoxication by copper-zinc sulfide ore. *Vestnik Bashkirskogo universiteta*. 2017; 22 (1): 90–91. (In Russ.)]

12. Конкина И.Г., Иванов С.П., Князева О.А. и др. Физико-химические свойства и фармакологическая активность глюконатов Mn, Fe, Co, Cu и Zn. *Хим.-фармацевтич. ж.* 2002; 36 (1): 18–21. [Konkina I.G., Ivanov S.P., Knyazeva O.A. et al. Physico-chemical properties and pharmacological activity of Mn, Fe, Co, Cu and Zn gluconates. *Khimiko-farmatsevticheskij zhurnal*. 2002; 36 (1): 18–21. (In Russ.)]

13. Tripathi K. Can metal ions be incorporated into drugs? *Asian J. Research Chem.* 2009; 2 (1): 14–18.

14. Черемных Е.Г., Иванов П.А., Фактор М.И. и др. Новый метод оценки функциональной активности системы комплемента. *Мед. иммунол.* 2015; 5: 479–488. [Cheremnykh E.G., Ivanov P.A., Faktor M.I. et al. A new method to assess functional activity of serum complement system. *Meditsinskaya immunologiya*. 2015; 5: 479–488. (In Russ.)] DOI: 10.15789/1563-0625-2015-5-479-488.