

*Є.П. Москвичов***ВПЛИВ ІМУНОКОРИГУЮЧИХ ЗАСОБІВ НА ЗМІНИ ЦИТОКІНОВОГО ПРОФІЛЮ
В УМОВАХ КУРСОВОГО ВВЕДЕННЯ ДОКСОРУБІЦИНУ***Одеський національний медичний університет***Ключові слова:** доксорубіцин-індукована імуносупресія, аміксин, імунофан, поліоксидоній, цитокіновий профіль.

Встановлено, що аміксин, імунофан і поліоксидоній зменшують глибину супресії гуморальної імунної відповіді та порушення цитокінового профілю в умовах курсового введення доксорубіцину. При цьому аміксин активніше коригує зміни вмісту ІФН- γ , ІЛ-4 і ІЛ-6, тоді як імунофан і, особливо, поліоксидоній результативніше сприяють стабілізації вмісту ІЛ-2 і ІЛ-10, що, ймовірно, пов'язано з впливом на різні клітини-мішені та особливостями молекулярних механізмів імунотропної дії кожного з препаратів.

Влияние иммунокорректирующих средств на изменения цитокинового профиля в условиях курсового введения доxorубицина*Е.П. Москвичов*

Установлено, что амиксин, имунофан и полиоксидоний уменьшают глубину супрессии гуморального иммунного ответа и нарушения цитокинового профиля в условиях курсового введения доxorубицина. При этом амиксин более активно корригирует изменения содержания ИФН- γ , ИЛ-4 и ИЛ-6, тогда как имунофан и, особенно, полиоксидоний более результативно способствуют стабилизации содержания ИЛ-2 и ИЛ-6, что, по-видимому, связано с воздействием на разные клетки-мишени и особенностями молекулярных механизмов действия каждого из препаратов.

Ключевые слова: доxorубицин-индуцированная иммуносупрессия, амиксин, имунофан, полиоксидоний, цитокиновый профиль.**Influence of immunocorrective remedies on changes of cytokine profile in conditions of the course administration of doxorubicine***Е.П. Москвичов*

It is found that Amixin, Imunofan and Polyoxidonium reduce the depth of suppression of humoral immune response and cytokine profile disorder in conditions of the course administration of doxorubicine. Amixin more active corrects changes of IFN- γ , IL-4, IL-6 contents, while Imunofan and especially Polyoxidonium more effectively contribute to the stabilization of IL-2 and IL-6 contents, which is apparently associated with effect on different target cells and the characteristics of the molecular mechanisms of action of each of the drugs.

Key words: doxorubicine-induced immunosuppression, Amixin, Imunofan, Polyoxidonium, cytokine profile.

Більшість схем комбінованого лікування злоякісних новоутворень різної локалізації містить протипухлинний антибіотик доксорубіцин, що, разом з високою ефективністю і широким спектром протипухлинної дії, характеризується високою системною токсичністю [6,11,13,14]. Одним із найменш вивчених об'єктів токсичної дії доксорубіцину є імунна система, що відіграє ключову роль у забезпеченні загальної резистентності організму та генетичної незмінності його внутрішнього середовища. Оскільки клітини імунної системи внаслідок високої проліферативної активності характеризується підвищеною чутливістю до цитотоксичної дії доксорубіцину, хіміотерапія цим засобом може додатково поглиблювати негативні зміни імунорезистентності та ініціювати розвиток серйозних інфекційних ускладнень, що мають місце в умовах онкопатології. Це суттєво обмежує досягнення максимальної лікувальної дії більшості цитостатиків та зумовлює необхідність зниження їх дози, переривання або навіть припинення хіміотерапії. У зв'язку з цим, перспективним напрямком сучасної фармакотерапії є пошук ефективних і безпечних шляхів зниження як загальної, так і імунотоксичної дії доксорубіцину без послаблення його специфічної активності. З огляду на провідну роль оксидативного стресу в механізмах цитотоксичної дії доксорубіцину, цілком логічним був пошук засобів

профілактики імунотоксичних ефектів цього препарату серед імуномодуляторів з мембранопротекторною і антиоксидантною активністю. В цьому аспекті особливу увагу привернув вітчизняний індуктор ендogenous інтерферону аміксин, що є високоактивним засобом у профілактиці та лікуванні вірусних захворювань і вторинних імунодефіцитів, імуномодуючі властивості якого пов'язані насамперед з регуляцією секреторної активності клітин імунної системи [5]. Цікавими у цьому плані є й сучасні імуномодулятори пептидної структури з протипухлинною і детоксикуючою активністю – імунофан і поліоксидоній, що останнім часом активніше використовують з метою «прикриття» імунотоксичних ефектів хіміотерапії [7,9]. Проте молекулярні механізми імунотропної дії зазначених препаратів і можливості їх регуляторного впливу зокрема на цитокінзалежні процеси в умовах доксорубіцин-індукованих розладів імунітету фактично не досліджували.

Одним із об'єктивних показників функціонального стану імунної системи організму є здатність імунокомпетентних клітин до секреції регуляторних цитокінів. Тому зміни цитокінового профілю можуть відображати глибину порушень резистентності організму і водночас бути одним із критеріїв ефективності запропонованих методів імунокорекції. Водночас закономірності змін цитокінового профілю в



умовах відтворення доксорубіцинової імуносупресії до цього часу не з'ясовано. Отже, існує необхідність оцінки впливу курсового введення доксорубіцину на імунні реакції і продукцію цитокінів з метою розробки ефективних методів фармакологічної корекції порушень імунного гомеостазу, викликаних тривалим введенням цього цитостатика.

МЕТА РОБОТИ

Оцінка впливу курсового введення доксорубіцину на імунні реакції та динаміку змін вмісту ІФН- γ , ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6, ІЛ-10 в крові тварин і з'ясування можливості фармакологічної корекції виявлених порушень препаратами аміксин, імунофан і поліоксидоній.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні дослідження виконано на 126 білих нелінійних щурах масою 180–220 г, вирощених у розпліднику віварію Одеського національного медичного університету на стандартному раціоні згідно з санітарно-гігієнічними нормами та вимогами GLP. Доксорубіцинову імуносупресію на тваринах моделювали в/м введенням доксорубіцину в дозі 5,0 мг/кг один раз на тиждень протягом 4 тижнів [11]. У якості імунокоректорів використовували препарати аміксин-ІС («Інтерхім», Україна) в дозі 2,0 мг/кг, в/очеревинно; імунофан («Біонокс», РФ) – 20,0 мкг/кг, в/очеревинно; поліоксидоній («Біонокс», РФ) – 0,3 мг/кг, в/очеревинно. Всі засоби вводили профілактично протягом терміну відтворення доксорубіцинової імуносупресії. Контрольна група тварин отримувала відповідно по 0,5 мл води для ін'єкцій.

Гуморальну імунну відповідь до тимусзалежного антигену (еритроцити барана (ЕБ)), що характеризує здатність Th1-лімфоцитів брати участь у продукції плазматичними клітинами ІgM, визначали за кількістю АУК в селезінці через 5 діб після імунізації (пік продукції ІgM), яку проводили в/очеревинно ЕБ в дозі 1×10^9 клітин. Функцію Th1-лімфоцитів оцінювали за реакцією гіперчутливості уповільненої дії (ГУД) [7]. Формування ГУД досліджували у тварин за збільшенням об'єму стопи задньої лапи в %. Відповідну дозу ЕБ (5×10^8) вводили в задню лапу щурів через 4 доби після імунізації, яку здійснювали на наступний день після останнього введення доксорубіцину. Реакцію ГУД оцінювали через 24 години. Функцію Th2-лімфоцитів

досліджували за кількістю АУК, що синтезують ІgG до ЕБ на піку продукції цього імуноглобуліну (14 діб після імунізації) методом непрямого локального гемолізу в гелі [12].

Концентрацію цитокінів ІФН- γ , ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6 та ІЛ-10 досліджували в плазмі крові методом ферментного імуносорбентного аналізу (ELISA), використовуючи набори (ELISA Kits) фірми BioSource Int. (USA). При цьому вміст ІФН- γ , ІЛ-2, ІЛ-6 та ІЛ-10 визначали через 5 діб, а вміст ІЛ-4 – через 14 діб після імунізації, яку здійснювали після останнього введення доксорубіцину.

Статистичну обробку результатів досліджень здійснювали методами варіаційної статистики за допомогою критерію Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що курсове введення доксорубіцину протягом чотирьох тижнів викликало зниження гуморальної імунної відповіді на Т-залежний антиген через 5 діб після імунізації відносно інтактних тварин у 2,86 рази ($P < 0,05$), через 14 діб після імунізації – відповідно у 1,82 рази ($P < 0,05$), тоді як функціональна активність Th1-лімфоцитів у реакції ГУД знижувалась з $35,2 \pm 3,6\%$ до $20,4 \pm 2,1\%$ ($P < 0,05$). Якщо розцінювали зміни вмісту АУК через 4 доби після імунізації як прояв функціональної активності саме Th1-лімфоцитів, а через 14 діб після імунізації, як прояв функціональної активності переважно Th2-лімфоцитів, то зазначені кількісні зміни вказують, що в умовах відтворення доксорубіцинової імуносупресії функції Th1-лімфоцитів є вразливішими.

Профілактичне застосування імунокоригуючих засобів суттєво зменшувало глибину супресії активності як Th1-, так і Th2-лімфоцитів. Зокрема, вміст АУК селезінки через 4 доби після імунізації на фоні аміксину перевищував відповідний показник нелікованих тварин в 1,72 рази ($P < 0,05$), на фоні імунофану – в 1,45 рази ($P < 0,05$), на фоні поліоксидонію – в 1,66 рази ($P < 0,05$). Інтенсивність реакції гіперчутливості уповільненої дії, що відображає функцію Th1-лімфоцитів, під впливом аміксину посилювалась відносно контрольної групи в 1,38 рази ($P < 0,05$), під впливом імунофану – в 1,31 рази ($P < 0,05$), під впливом поліоксидонію – в 1,46 рази ($P < 0,05$) (табл. 1).

Таблиця 1

Вплив імунокоригуючих засобів на функцію Th1- і Th2-лімфоцитів щурів на фоні курсового чотириразового щотижневого введення доксорубіцину в дозі 5,0 мг/кг ($M \pm m$, $n = 10-12$)

Група тварин	Функція Th1-лімфоцитів		Функція Th2-лімфоцитів
	АУК селезінки (10^6) через 5 діб після імунізації	Реакція ГУД, %	АУК селезінки, (10^6) через 14 діб після імунізації
Інтактна	76,6 \pm 12,1	35,2 \pm 3,6	83,2 \pm 7,6
Контроль (доксорубіцин)	26,8 \pm 4,5*	20,4 \pm 2,1*	45,8 \pm 5,5*
Доксорубіцин + аміксин	46,0 \pm 5,2*#	28,1 \pm 1,5*#	65,4 \pm 4,9*#
Доксорубіцин+імунофан	38,8 \pm 4,8*#	26,8 \pm 1,4*#	59,0 \pm 5,4*#
Доксорубіцин+поліоксидоній	44,5 \pm 7,2*#	29,8 \pm 2,0#	68,7 \pm 4,8*#

Примітки: * – ($P < 0,05$) порівняно з інтактною групою; # – ($P < 0,05$) порівняно з контрольною групою.

Вплив імунокоригуючих засобів на зміни вмісту цитокінів (пг/мл) у плазмі крові щурів на фоні курсового чотириразового щотижневого введення доксорубіцину в дозі 5,0 мг/кг ($M \pm m$, $n = 10-12$)

Показник	Інтактна група	Контроль	Засоби імунокорекції		
			Аміксин	Імунофан	Поліоксидоній
ІФН- γ	1238 \pm 96	507 \pm 47*	1308 \pm 112#	801 \pm 56*#	889 \pm 90*#
ІЛ-4	130 \pm 10	88 \pm 7*	120 \pm 9#	103 \pm 8*#	109 \pm 6*#
ІФН- γ /ІЛ-4	9,5	5,7	10,8	7,7	8,1
ІЛ-2	1370 \pm 101	715 \pm 70*	928 \pm 87*#	970 \pm 83*#	1153 \pm 77*#
ІЛ-6	98 \pm 10	58 \pm 5*	90 \pm 9#	75 \pm 6*#	80 \pm 8#
ІЛ-10	518 \pm 39	356 \pm 37*	432 \pm 28*#	471 \pm 50#	480 \pm 41#

Примітки: * – ($P < 0,05$) порівняно з інтактною групою; # – ($P < 0,05$) порівняно з контрольною групою.

На фоні застосування імунокоректорів також суттєво покращувались імунні реакції, що характеризують функцію Th2-лімфоцитів. Вміст АУК через 14 діб після імунізації тварин під впливом зазначених препаратів в 1,29–1,50 рази ($P < 0,05$) перевищував відповідний показник контрольної групи, що вказує на відносно збереження здатності Th2-лімфоцитів до синтезу IgG, максимальний пік якого спостерігається у цьому періоді.

Отримані дані щодо більшої редукції активності Th1-лімфоцитів відносно Th2-лімфоцитів в умовах курсового введення доксорубіцину підтверджуються також характерними змінами цитокінового профілю в крові щурів. Після відтворення моделі доксорубіцин-індукованої імуносупресії виявлено зменшення концентрації ІФН- γ у плазмі крові щурів (через 5 діб після імунізації ЕБ) – в 2,44 рази (з 1238 \pm 96 пг/мл до 507 \pm 47 пг/мл) ($P < 0,05$), а ІЛ-4 – в 1,48 рази (з 130 \pm 10 пг/мл до 88 \pm 7 пг/мл) ($P < 0,05$). Це вказує на те, що під впливом імунотоксичної дії доксорубіцину концентрація ІФН- γ в плазмі крові знижується суттєвіше порівняно зі змінами ІЛ-4 (табл. 2).

Визначене зменшення співвідношення ІФН- γ /ІЛ-4 більшою мірою характеризує зниження функціональної активності лімфоцитів Th1-типу порівняно з відповідною функцією Th2-клітин. Зокрема, в умовах курсового введення доксорубіцину коефіцієнт ІФН- γ /ІЛ-4 знижувався відносно інтактної групи у 1,67 рази ($P < 0,05$). Ймовірно, подібний ефект може бути зумовлений здатністю доксорубіцину до активації гіпоталамо-гіпофізарно-адреналової системи та збільшенням в крові концентрації кортикостерону [13]. Адже відомо, що цей гормон істотно знижує функцію Th1-лімфоцитів порівняно з Th2-клітинами [3]. Отримані дані також дозволяють припустити, що доксорубіцинова імуносупресія може збільшувати чутливість до вірусного інфікування, оскільки відомо, що відносна перевага активності Th2-лімфоцитів над Th1-клітинами є фактором більшого ризику вірусних інфекцій порівняно з мікробними [1,8,15].

Профілактичне застосування імунофану і поліоксидонію суттєво зменшувало глибину зазначених змін цитокінового профілю, а індуктор ендегенного інтерферону аміксин повністю запобігав цим змінам. Зокрема, на фоні його профілактичного введення вміст ІФН- γ і ІЛ-4 залишався на фізіологічному рівні, а співвідношення ІФН- γ /ІЛ-4 навіть

перевищувало його на 13,7% на користь ІФН- γ . Така висока коригуюча активність аміксину відносно до порушень вмісту ІФН- γ пояснюється тим, що цей препарат здатний стимулювати його продукцію не тільки Th1-лімфоцитами, але й іншими клітинами імунної системи, зокрема клітинами СМФ, що є головними продуцентами цього цитокіну.

При дослідженні впливу курсового чотириразового введення доксорубіцину на зміни вмісту ІЛ-2, ІЛ-6 та ІЛ-10 у плазмі крові щурів встановлено суттєве зменшення їх рівня відповідно в 1,92; 1,69 і 1,45 рази ($P < 0,05$).

Зафіксоване зменшення вмісту ІЛ-2 може свідчити про зниження його продукції Т-лімфоцитами (зокрема CD4⁺ та CD8⁺), супресію проліферації Т- і В-клітин (синтезу J-ланцюга молекули імуноглобуліну) та відображати пригнічення активності нормальних кілерних клітин крові (NK-клітини) [10,15]. Зниження в крові вмісту прозапального цитокіну ІЛ-6, що за деяких умов може виявляти й протизапальні властивості, найімовірніше, відображає зменшення його продукції макрофагами і лімфоїдними дендритними клітинами [4].

В умовах відтворення доксорубіцинової моделі імуносупресії в крові піддослідних тварин також знижується рівень протизапального цитокіну ІЛ-10, що може пояснюватись зниженням секреторної активності Th0-, Th2-лімфоцитів, моноцитів, макрофагів і В-клітин [4]. Але оскільки глибина супресії синтезу ІЛ-10 виявилась меншою порівняно з супресією синтезу ІФН- γ , це може додатково свідчити про вищу чутливість Th1-лімфоцитів до імунотоксичної дії доксорубіцину порівняно з іншими клітинами крові.

Імунокоригуюча дія препаратів полягала у зменшенні глибини зазначених порушень цитокінового профілю. При цьому виявлено індивідуальні відмінності захисної дії окремих імунокоректорів. Зокрема аміксин активніше порівняно з референс-препаратами (крім ІФН- γ і ІЛ-4) коригував зміни вмісту ІЛ-6, зберігаючи його в умовах модельованої імуносупресії на фізіологічному рівні. Ймовірно, це пов'язано зі здатністю зазначеного препарату активніше впливати на функції не тільки Th1-лімфоцитів, але й макрофагів, що також секретують ці цитокіни. Водночас, імунофан і, більшою мірою, поліоксидоній в умовах імунотоксичної дії доксорубіцину активніше сприяли збереженню вмісту ІЛ-2 і ІЛ-10 (рис. 1).

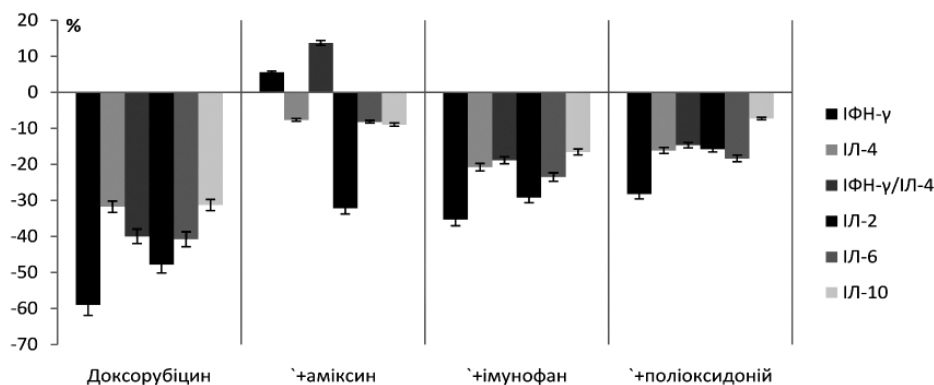


Рис. 1. Вплив імунокоригуючих засобів на зміни вмісту цитокінів у плазмі крові щурів на фоні курсового чотириразового щотижневого введення доксорубіцину в дозі 5,0 мг/кг (в % відхилення від показників інтактної групи).

Зокрема рівень ІЛ-2 на фоні профілактичного введення поліоксидонію перевищував показник контрольної групи у 1,61 рази ($P < 0,05$), імунофану – у 1,36 рази ($P < 0,05$), аміксину – у 1,30 рази ($P < 0,05$). Найімовірніше, це свідчить про більшу спроможність поліоксидонію порівняно з іншими засобами регулювати функціональний стан лімфоцитів в умовах імунотоксичної дії доксорубіцину, що узгоджується з результатами попередніх досліджень щодо здатності цього засобу до найефективнішої корекції порушень НК-клітинної цитотоксичності.

ВИСНОВКИ

1. Курсове чотириразове введення доксорубіцину щурам у дозі 5,0 мг/кг викликає пригнічення гуморальної імунної відповіді, пов'язаної з функцією Th1-лімфоцитів більшою мірою, ніж з функцією Th2-лімфоцитів.

2. В умовах відтворення доксорубіцинової імуносупресії вміст ІФН-γ, ІЛ-2, ІЛ-4, ІЛ-6 та ІЛ-10 в плазмі крові тварин суттєво зменшується, що відображає супресію імуносекреторної активності клітин імунної системи. При цьому зниження рівня ІФН-γ, що продукується переважно Th1-лімфоцитами, суттєвіше порівняно зі змінами ІЛ-4, що продукується Th2-лімфоцитами.

3. Імунокоригуюча дія препаратів полягає у зменшенні глибини супресії гуморальної імунної відповіді та значених змін цитокінового профілю. При цьому аміксин активніше порівняно з референс-препаратами коригує зміни вмісту ІФН-γ, ІЛ-4 і ІЛ-6, тоді як імунофан і, особливо, поліоксидоній результативніше сприяють стабілізації вмісту ІЛ-2 і ІЛ-10, що, ймовірно, пов'язано з різними клітинами-мішенями та особливостями молекулярних механізмів імуотропної дії цих препаратів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андрейчин М.А. Клінічна імунологія та алергологія / М.А. Андрейчин., В. В. Чоп'як, І. Я. Господарський – Тернопіль: Укрмедкнига, 2004. – 372 с.
2. Гончаров А.Г. Основы клинической иммунологии и методологические подходы к оценке иммунного статуса: практикум / А.Г. Гончаров, И.С. Фрейдлин, В.С. Смирнов – Калининград: Изд-во КГУ, 1997. – 73 с.
3. Забродский П.Ф. Оценка роли кортикостерона в реализации иммуносупрессивных эффектов при сочетанном действии дихлорэтана и тяжелой механической травмы / П.Ф. Забродский, В.Ф. Киричук, Д.Ю. Иванов // Саратов. науч.-мед. журнал. – 2007. – Т. 3, №1. – С. 51–58.
4. Кетлинский С.А. Цитокины / С.А. Кетлинский, А.С. Симбирцев. – СПб: Фолиант, 2008. – 552 с.
5. Литвинова Л.О. Пероральный индуктор эндогенного интерферона та противірусний препарат АМІКСИН ІС / Л.О. Литвинова, А.В. Птяшко // Наука та інновації. – 2007. – Т. 3, №4. – С. 74–75.
6. Матяш М.Г. Индуцированная антрациклинами кардиотоксичность: механизмы развития и клинические проявления / М.Г. Матяш, Т.Л. Кравчук, В.В. Высоцкая // Сибирский онкол. журнал. – 2008. – №6 (30). – С. 66–76.
7. Морозова Е.Н. Изменения морфометрических параметров лимфатических узлов пейеровых бляшек тонкой кишки после коррекции иммунодефицитного состояния имунофаном в эксперименте / Е.Н. Морозова // Кліні. анатомія та операт. хірургія. – 2011. – Т. 10, №4. – С. 19–22.
8. Особенности нарушения функции Th1-лимфоцитов и Th2-лимфоцитов при остром отравлении различными токсическими веществами / Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., Мандыч В.Г. и др. // Токсикологический вестник. – 2007. – №6. – С. 16–19.
9. Петрушенко Д.А. Морфологические изменения в сетчатке под влиянием полиоксидония при экспериментальной хронической алкогольной интоксикации / Д.А. Петрушенко // Таврический мед.-биол. вестник. – 2011. – Т. 14, №4. – С. 315–317.
10. Пинегин Б.В. НК-клетки: свойства и функции / Б.В. Пинегин, С.В. Дамбаева // Иммунология. – 2007. – Т. 28, №2. – С. 105–111.
11. Трофімова Т.С. Експериментальні дослідження ефективності тіотриазоліну за умов доксорубіцинової кардіоміопатії: автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 14.03.05 «Фармакологія» / Т.С. Трофімова. – Одеса, 2008. – 20 с.
12. Чернушенко Е.Ф. Иммунологические методы исследования в клинике / Е.Ф. Чернушенко, Л.С. Косоголова. – К.: Здоров'я, 1978. – 159 с.
13. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron / T. Simunek, M. Stérba, O. Popelová et al. // Pharmacol. Rep. – 2009 – Vol. 61, №1. – P. 154–171.
14. Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes / L. A. Gilliam, J. S. Moylan, E. W. Patterson et al. // Am. J. Physiol. Cell. Physiol. – 2012. – Vol. 302, №1. – P. 195–202.
15. French A.R. Natural killer cells and viral infection / A.R. French, W.M. Yokoyama // Curr. Opin. Immunol. – 2003. – Vol. 15. – P. 45–51.

Відомості про автора:

Москвичов Є.П., лікар хімотерапевтичного відділення Одеського обласного онкологічного диспансеру, дисертант.

Поступила в редакцію 23.01.2013 г.