

Е. П. Москвичёв, Я. В. Рожковский
Одесский национальный медицинский университет, г. Одесса

ВЛИЯНИЕ ИММУНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА АКТИВНОСТЬ МЕМБРАННЫХ ФЕРМЕНТОВ ЛИМФОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ КУРСОВОГО ВВЕДЕНИЯ ДОКСОРУБИЦИНА

В опытах на 228 беспородных крысах изучали динамику изменений активности мембранлокализованных ферментов АДА и 5'-НК в лимфоцитах мезентериальных лимфатических узлов на фоне курсового введения доксорубицина и профилактического применения иммуномодуляторов амиксина, имунофана и полиоксидония. Установлено, что курсовое введение доксорубицина в дозе 5 мг/кг приводит к разнонаправленным изменениям активности АДА и 5'-НК. При этом наиболее выраженные изменения ферментативной активности лимфоцитов развиваются после 4-разового введения цитостатика, а профилактическое применение амиксина, имунофана и полиоксидония уменьшает выраженность указанных нарушений. Показано, что иммуномодулятор полиоксидоний наиболее радикально снижает индуцированные доксорубицином нарушения активности АДА и 5'-НК в лимфоцитах, что свидетельствует о его более выраженных мембранопротекторных свойствах.

Ключевые слова: доксорубицин, иммунокоррекция, активность мембранных ферментов лимфоцитов.

Работа является фрагментом НИР «Молекулярные механизмы действия и конструирования биологически активных веществ (нейротропных, антивирусных, антимикробных)» (№ госрегистрации 0102V001629).

Антибиотики из группы антрациклинов широко применяют в лечении гемобластозов и злокачественных новообразований различной локализации. Большинство схем комбинированного лечения злокачественных новообразований содержит противоопухолевый антибиотик доксорубицин, который, наряду с высокой эффективностью и широким спектром противоопухолевого действия, обладает высокой системной токсичностью [6, 8, 14]. Одним из наименее изученных объектов токсического действия доксорубицина является иммунная система, которая играет ключевую роль в обеспечении общей резистентности организма и генетической неизменности его внутренней среды. Поскольку клетки иммунной системы, в результате высокой пролиферативной активности, обладают повышенной чувствительностью к цитотоксическому действию доксорубицина, химиотерапия этим средством может дополнительно углублять негативные изменения иммунорезистентности и инициировать развитие серьезных инфекционных осложнений, которые имеют место в условиях онкопатологии. В связи с этим перспективным является поиск эффективных и безопасных путей снижения иммунотоксического действия доксорубицина без ослабления его специфической активности. Учитывая ведущую роль оксидативного стресса в механизмах цитотоксического действия доксорубицина, вполне логичным был поиск средств профилактики иммунотоксических эффектов этого препарата среди иммуномодуляторов с мембранотропной и антиоксидантной активностью. В этом плане особое внимание привлек отечественный индуктор эндогенного интерферона амиксин, а также современные иммуномодуляторы пептидной структуры имунофан и полиоксидоний [4, 7, 12, 13, 15]. Однако молекулярные механизмы иммунотропного действия указанных препаратов в условиях доксорубицин-индуцированных расстройств иммунитета фактически не исследовались.

Известно, что изменения активности мембранлокализованных ферментов лимфоцитов, в частности аденозиндезаминазы (АДА) и 5' – нуклеотидазы (5'-НК), может влиять на формирование и регуляцию иммунного ответа организма [10, 11]. Указанные ферменты являются липидзависимыми и их активность в значительной степени опосредована структурными изменениями мембран, которые, как известно, имеют место в условиях оксидативного стресса, индуцированного доксорубицином. Следовательно, определение изменений активности указанных ферментов в лимфоцитах, на наш взгляд, было актуальным как с целью изучения одного из вероятных патогенетических механизмов доксорубициновой иммуносупрессии, так и выяснения молекулярных механизмов иммунотропного действия исследуемых иммуномодуляторов.

Целью работы было изучить динамику изменений активности мембранлокализованных ферментов лимфоцитов АДА и 5'-НК на фоне курсового введения доксорубицина и профилактического применения иммуномодуляторов амиксина, имунофана и полиоксидония.

Материал и методы исследования. Экспериментальные исследования выполнены на 228 беспородных крысах массой 180-200 г, выращенных в питомнике вивария Одесского национального медицинского университета на стандартном рационе согласно санитарно - гигиеническим нормам и требованиями GLP. Все манипуляции на животных проводили согласно требованиям «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других

научных целей» (Страсбург, 1985). Доксорубициновую иммуносупрессию на животных моделировали в/м введением доксорубицина «ARTERIUM» (Україна) в дозе 5,0 мг/кг один раз в неделю в течение 4-х недель [9]. В качестве иммунокорректоров использовали препараты: амиксин-ІС «Інтерхим» (Україна) в дозе 2,0 мг/кг, в/брюшинно; имунофан «Бионокс» (РФ) – 20,0 мкг/кг, в/брюшинно; полиоксидоний «Бионокс» (РФ) – 0,3 мг/кг, в/брюшинно. Выбор доз препаратов базировался на данных об их токсичности и эффективности как иммуностропных препаратов. Контрольная группа животных получала соответственно 0,5 мл воды для инъекций.

Активность аденозиндезаминазы (АДА) и 5' - нуклеотидазы (5'-НК) исследовали в лимфоцитах мезентериальных лимфоузлов. Для этого выделенные и предварительно измельченные лимфоузлы осторожно гомогенизировали в культуральной бреде до полного опустошения стромы. Полученную суспензию фильтровали и центрифугировали трижды при 800 g в течение 10 минут. Клетки выделяли в градиенте плотности фиколл - гипак. Использовали готовую среду разделения "Histopaque" ($d = 1,077 \text{ г/см}^3$). Для этого на 3,0 мл указанной среды осторожно наносили 3,5 мл полученной суспензии клеток. Центрифугированием (30 мин при 300 g) получали следующие фракции: 1 - верхний слой, обогащенный лимфоцитами; 2 - нижний слой - эритроциты. Осторожно отделяли верхнюю фракцию и дважды отмывали клетки в среде Хэнкса. В полученных таким образом лимфоцитах изучали активность АДА и 5'-НК [2, 5]. Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью критерия Стьюдента [3].

Результаты исследования и их обсуждение. Исследования показали значительную зависимость изменения активности указанных ферментов от продолжительности курса доксорубицина (табл.1).

Таблица 1

Изменения активности АДА и 5'-НК (нмоль/мин на 10^8 клеток) в лимфоцитах мезентериальных лимфатических узлов (n= 8 -10) (M±m)

Показатель	Интактная группа	Количество введений доксорубицина			
		1 раз	2 раза	3 раза	4 раза
Активность АДА	120,5±6,7	138,4±8,3*	93,3±7,0*	90,1±5,4*	68,8±5,7*
Активность 5'-НК	9,1±0,6	9,2±0,5	8,0±0,3*	13,1±0,8*	14,0±0,9*

Примечание: * - изменения достоверны по сравнению с интактной группой, ($P < 0,05$).

В частности после однократного введения доксорубицина активность АДА в лимфоцитах мезентериальных ЛВ достоверно повышалась на 14,8 %, а активность 5'-НК оставалась неизменной. Двукратное введение цитостатика вызвало уменьшение активности АДА и 5'-НК относительно интактной группы соответственно на 22,6 % и 12,1 % ($P < 0,05$). При трёхкратном введении доксорубицина дальнейшие изменения активности обоих ферментов приобретали обратный характер - повышение активности 5'-НК сопровождалось существенным снижением активности АДА. Максимальный характер подобных изменений фиксировался после 4-кратного введения цитостатика и составил относительно интактной группы +53,8 % для 5'-НК ($P < 0,05$) и -42,9 % для АДА ($P < 0,05$) (рис.1).

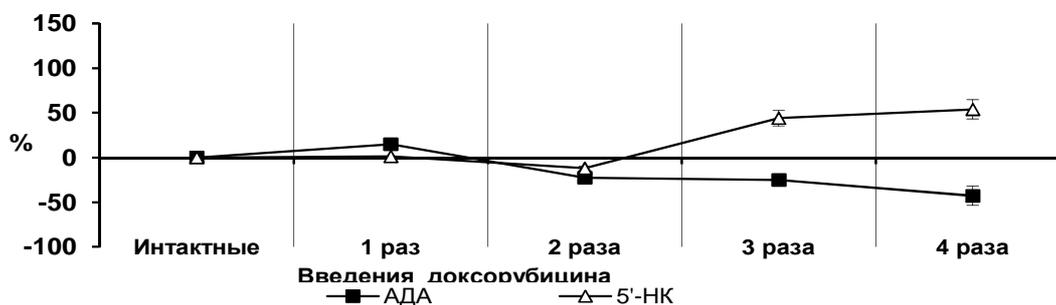


Рис.1. Динамика изменений активности АДА и 5'-НК в лимфоцитах мезентериальных лимфатических узлов у крыс на фоне курсового введения доксорубицина в дозе 5,0 мг/кг (в % по сравнению с показателями интактной группы).

Известно, что активность 5'-НК находится в обратной связи с интенсивностью клеточного метаболизма. Так показано, что высокая активность этого фермента сопровождается низким содержанием в клетках РНК и включением в ДНК тимидина, что дало основание считать 5'-НК ферментом "деградации". Степень его активности практически полностью определяется функциональным состоянием мембраны и характером связи с её структурными элементами, особенно с фосфолипидами. При этом связь фермента с мембраной несет на себе "функцию подавления" его

активности [10, 11]. Существенная активация 5'-НК в лимфоцитах мезентериальных ЛВ в условиях доксорубин - индуцированной иммуносупрессии свидетельствует не только о преобладании клеточного катаболизма в лимфоцитах, но и о возможном высвобождении этого фермента вследствие возможного перекисного повреждения мембраны. С другой стороны, повышению активности 5'-НК может способствовать и снижение вследствие оксидативного стресса уровня АТФ и креатинфосфата, которые являются естественными ингибиторами этого фермента [1, 10].

Таким образом, выявленные нарушения ферментативной активности и метаболизма лимфоцитов может выступать одним из важных факторов снижения функциональной активности этих клеток в иммунных реакциях.

Фармакологическая коррекция существенно смягчает инициированные доксорубином нарушения ферментативной активности мембранных маркеров во все сроки наблюдения. На фоне профилактического введения исследуемых иммунокорректоров активность АДА и 5'-НК в лимфоцитах крыс в течение первых двух недель наблюдений достоверно не отличалась от уровня интактной группы. В условиях более глубоких ферментативных сдвигов, вызванных трех- и четырехкратным введением доксорубина, профилактическая активность полиоксидония оказалась выше по сравнению с амиксином и имунофаном (табл.2).

Таблица 2

Влияние иммунотропных препаратов на изменения активности АДА и 5'-НК (нмоль/мин на 10^8 клеток) в лимфоцитах мезентериальных лимфатических узлов (n= 8 -10) (M±m)

Показатель	Интактная группа	Контроль	Иммунокорректоры		
			Амиксин	Имунофан	Полиоксидоний
Одноразовое введение доксорубина					
Активность АДА	120,5±6,7	138,4±8,3*	130,1±10,1	133,4±11,3	128,4±8,8
Активность 5'-НК	9,1±0,6	9,2±0,5	8,8±0,7	9,4±0,7	9,4±0,6
Двухразовое введение доксорубина					
Активность АДА	120,5±6,7	93,3±7,0*	113,5±9,7#	105,5±8,6	115,0±7,8#
Активность 5'-НК	9,1±0,6	8,0±0,3	9,4±0,7#	8,9±0,4#	9,0±0,7
Трёхразовое введение доксорубина					
Активность АДА	120,5±6,7	90,1±5,4*	100,4±9,7*	99,5±6,0*	102,3±8,7*
Активность 5'-НК	9,1±0,6	13,1±0,8*	11,8±0,9*	11,1±0,7*#	10,4±0,7#
Четырёхразовое введение доксорубина					
Активность АДА	120,5±6,7	68,8±5,7*	88,9±7,0*#	85,8±6,6*#	97,5±8,1*#
Активность 5'-НК	9,1±0,6	14,0±0,9*	11,5±1,1*#	12,0±0,5*#	10,8±0,6*#

Примітки: 1. * - (P < 0,05) по сравнению с интактной группой; 2. # - (P < 0,05) по сравнению с интактной группой.

В частности у животных, которые на фоне 4-разового доксорубина получали полиоксидоний, активность АДА превышала соответствующий показатель контрольной группы в 1,42 раза (P < 0,05). При этом у животных без иммунокоррекции активность этого фермента снижалась почти вдвое - с 120,5±6,7 до 68,8±5,7 нмоль/мин на 10^8 лимфоцитов (P < 0,05). Все иммунокорректоры предотвращали значительную активацию 5'-НК в лимфоцитах. Если после четырехкратного ввода доксорубина максимальное отклонение от нормы активности АДА и 5'-НК составляло соответственно -42,9% (P < 0,05) и +53,8% (P < 0,05), то на фоне профилактического введения полиоксидония соответствующие изменения ферментативной активности мембранных маркеров составляли -19,1% (P < 0,05) и +18,7% (P < 0,05), на фоне профилактического введения амиксина - 26,2% (P < 0,05) и +26,4% (P < 0,05), и у животных, получавших имунофан - соответственно -28,8% (P < 0,05) и +31,9% (P < 0,05) (Рис.2).

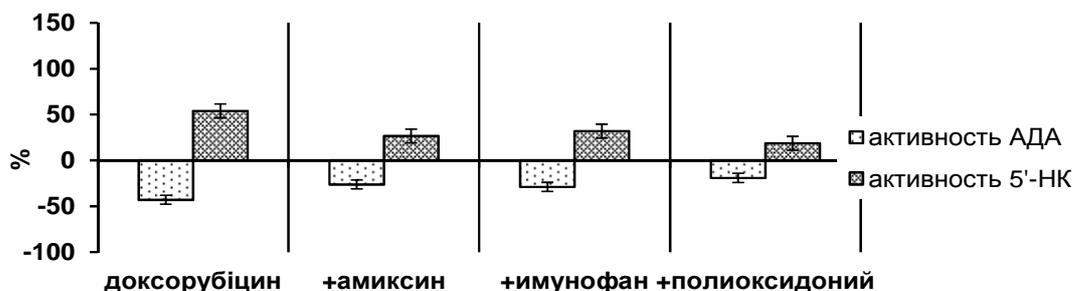


Рис. 2. Влияние иммуномодуляторов на изменения активности АДА и 5'-НК в лимфоцитах мезентериальных лимфатических узлов у крыс на фоне 4-разового введения доксорубина в дозе 5,0 мг/кг (в % отклонения от показателей интактной группы).

По нашему мнению, подобное профилактическое воздействие исследуемых препаратов в условиях моделируемой иммуносупрессии объясняется прежде всего их антиоксидантными свойствами, способностью к активной коррекции нарушений компонентов липидной фазы мембран лимфоцитов. Вероятно, что при этом подобные свойства в полиоксидония по отношению к мембранам лимфоцитов выше, чем у амиксина и имунофана.

Выводы

1. Курсовое введение доксорубина сопровождается разнонаправленными изменениями активности АДА и 5'-НК в лимфоцитах мезентериальных лимфатических узлов. Наиболее выраженные изменения ферментативной активности развиваются после 4-разового введения цитостатика.
2. Одним из механизмов иммунокорректирующего действия амиксина, имунофана и полиоксидония в условиях экспериментальной доксорубин - индуцированной иммуносупрессии является стабилизация активности ферментов обмена аденозина в лимфоцитах.
3. Полиоксидоний наиболее радикально устраняет индуцированные доксорубином нарушения активности АДА и 5'-НК в лимфоцитах, что свидетельствует о его более выраженных мембранопротекторных свойствах.

Перспективы дальнейших исследований. Будут изучены механизмы иммуотоксичного действия доксорубина и предложена их наиболее оптимальная коррекция с учётом индивидуальных особенностей действия иммуномодуляторов на разные звенья патогенеза указанных нарушений.

Список литературы

1. Барабой В. А. Окислительно-антиоксидантный гомеостаз в норме и при патологии / В. А. Барабой, Д. А. Сутковой // К.: Наукова думка, - 1997. - 420 с.
2. Дмитренко Н. М. Субклеточное распределение некоторых ферментов обмена аденозина и АМФ в лимфоцитах тимуса крысы / Н. М. Дмитренко, С. В. Комиссаренко, В. Ю. Уманский // Докл. АН УССР. Серия биология. - 1980. - № 4. - С. 68 - 71.
3. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич // - К.: Морион, - 2001. - 320 с.
4. Нікітін С. В. Вивчення впливу інтерферонотропу «Аміксин-ІС» на інтерфероногенез і цитотоксичну активність NK-клітин у хворих на хронічний гепатит С / Є. В. Нікітін, К. Л. Сервєцький, К. М. Усиченко [та ін.] // Досягнення біології та медицини. - 2008. - №2(12). - С. 4-8.
5. Рыбальченко В. К. Структура и функции мембран / В. К. Рыбальченко, М. М. Коганов // - Киев: Выща школа, - 1988. - 312 с.
6. Саенко Ю. В. Изучение органоспецифических механизмов оксидативного стресса: дис... на соиск. учён. степен. канд. биол. наук: 14.00.25 - фармакология / Ю.В.Саенко. - Ульяновск, - 2006. - 168 с.
7. Феденко А. Ф. Влияние некоторых иммуномодуляторов на иммунную систему и переносимость адьювантной химио- и лучевой терапии у больных раком молочной железы: дис. на соиск. учён. ст. канд. мед. наук: 14.00.14.- онкология / А. Ф. Феденко // - М., - 2007. - 181 с.
8. Фандеев О. А. Клиническое значение кардиотоксичности антрациклинов: современные подходы к диагностике, профилактике и лечению / О. А. Фандеев, С. С. Васечкин, М. Н. Алехин [и др.] // Кардиология. - 2011. - №7. - С.40-47.
9. Чекман І. С. Ефективність застосування тіотриазоліну за умов доксорубінової кардіоміопатії / І. С. Чекман, Т. С. Трофімова, І. А. Мазур [та ін.] // Запорозький медичинський журнал. - 2010. - Т.12, №5. - С.207-210.
10. Chalmers A. H. Lymphocyte 5'-ectonucleotidase: an indicator of oxidative stress in humans? / A. H. Chalmers, J. S. Blake-Mortimer, A. H. Winefield // Redox Rep. - 2000. - Vol. 5. - P. 89 - 91.
11. Colgan S. P. Physiological roles for ecto-5'-nucleotidase / S. P. Colgan, H. K. Eltzschig, T. Eckle [et al.] // Purinergic Signalling. - 2006. - Vol. 2, № 2. - P. 351 - 360.
12. Gein O. N. Influence of polyoxidonium on IL-1 beta, TNF-alpha and IL-6 production by mononuclears and monocytes under the dexamethasone effect / O. N. Gein, K. G. Gorshkova, S. V. Gein // Patol. Fiziol. Eksp. Ter. - 2010. - №1. - P.10-13.
13. Mar'in G. G. Effect of imunofan on several indexes of immunity and pyoderma incidence among cadets of educational institutes / G. G. Mar'in, V. G. Akimkin, V. A. Novikov [et al.] // Voen. Med. Zh. - 2009. - Vol.330, №9. - P.27-31.
14. Simůnek T. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron / T. Simůnek, M. Stěrba, O. Popelová [et al.] // Pharmacol. Rep. - 2009. - Vol.61, №1. - P.154-171.
15. Silin D. S. Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers / D.S. Silin, O.V. Lyubomska, F.I. Ershov [et al.] // Current Pharmaceutical Design. - 2009. - Vol.15. - P.1238-1247.

Реферати

ВПЛИВ ІМУНОТРОПНИХ ПРЕПАРАТІВ НА АКТИВНІСТЬ МЕМБРАННИХ ФЕРМЕНТІВ ЛІМФОЦИТІВ ЗА УМОВ КУРСОВОГО УВЕДЕННЯ ДОКСОРУБІЦИНУ

Москвичов Є. П., Рожковський Я. В.

В дослідях на 228 безпородних щурах досліджували динаміку змін мембранлокалізованих ферментів АДА і 5'-НК в лімфоцитах мезентеріальних лімфатичних вузлів на фоні курсового введення доксорубіцину і профілактичного

EFFECTS OF IMMUNOTROPIC PREPARATIONS ON ACTIVITY OF LYMPHOCYTES' MEMBRANE ENZYMES UNDER RATE INPUT DOXORUBICIN

Moskvichev E. P., Rozhkovsky Ya. V.

In experiments on 228 outbred rats studied the dynamics of changes in the activity of enzymes membran adenosine deaminase (ADA) and 5'-nucleotidase (5'-NK) lymphocytes in the mesenteric lymph nodes on the background

застосування імуномодуляторів аміксину, імунофану і поліоксидонію. Встановлено, що курсове уведення доксорубіцину в дозі 5 мг/кг призводить до різноспрямованих змін активності АДА і 5'-НК. При цьому найбільш глибокі зміни ферментативної активності лімфоцитів проявляють себе після 4-разового уведення цитостатика, а профілактичне застосування аміксину, імунофану і поліоксидонію зменшує виразність вказаних порушень. Показано, що імуномодулятор поліоксидоній найбільш ефективно знижує індуковані доксорубіцином порушення активності АДА і 5'-НК, що вказує на його більш потужні мембранопротекторні властивості стосовно лімфоцитів.

Ключові слова: доксорубіцин, імунокорекція, активність мембранних ферментів лімфоцитів.

Стаття надійшла 10.06.2014 р.

of a course of administration of doxorubicin and the prophylactic use of immunomodulators amixin, imunofan and polyoxidonium. Established that the course administration of doxorubicin at a dose of 5 mg / kg resulted in a multidirectional changes the activity of ADA and 5'-NK. The most pronounced changes in the enzymatic activity of lymphocytes develop after 4 single administration of cytostatic and prophylactic amixin, immunofan and polyoxidonium and reduces the severity of such violations. It is shown that immunomodulator polioxidonium most radically reduces doxorubicin-induced activity of ADA violations and 5'-NK lymphocytes, which indicates its more pronounced membrane-protective properties.

Key words: doxorubicin, immunotherapy, activity of lymphocytes' membrane enzymes.

Рецензент Бобирьов В.М.

УДК 616.36-004.001.4-032:615.31:546.17

О. М. Олещук

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України», м. Тернопіль

ВПЛИВ АМІНОГУАНІДИНУ НА ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ ОКСИДУ АЗОТУ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦИРОЗІ ПЕЧІНКИ

Вивчали вплив аміногуанідину (10 мг/ кг і.п., 10 днів) на показники системи оксиду азоту та морфологічну структуру печінки при експериментальному цирозі, викликаному тривалим введенням тетрахлорметану. Встановлено, що розвиток циротичного ураження печінки, морфологічно підтверженого наявністю вираженого склерозу перипортальних полів та формуванням псевдокапсул, супроводжується зниженням вмісту ендотеліальної та наростанням індукційної NO-синтази (iNOS), збільшенням концентрації стабільного метаболіту оксиду азоту нітрит-аніону в крові та її зменшення у печінці. Активізація показників системи оксиду азоту супроводжується зростанням продукції прозапальних цитокінів IL-1 β , IL-6 та TNF- α . Застосування селективного інгібітора iNOS аміногуанідину при цирозі призводить до зниження вмісту нітрит-аніону та індукційної NOS, як у крові, так і у печінці та зменшення вмісту TNF- α у крові. Застосування препарату не призводить до значного покращення морфологічного стану печінки.

Ключові слова: аміногуанідин, оксид азоту, печінка, цироз.

Структурна перебудова органу та гіпоксія при цирозі печінки ведуть до порушення внутрішньопечінкової гемодинаміки [1, 7]. Портальна гіпертензія поступово призводить і до системних змін гемодинаміки, до яких належать підвищення частоти серцевих скорочень і серцевого індексу, а також зменшення системного судинного опору.

Відомо, що у патогенезі цирозу печінки, а саме, порушень системної гемодинаміки та розвитку метаболічних порушень при даній патології, провідну роль відіграє оксид азоту. Вченими Valance і Moncada (1991) було висунуто гіпотезу про те, що гіперпродукція NO при цирозі печінки пов'язана зі зростанням ендотоксемії, яка через систему цитокінів стимулює синтез оксиду азоту [14]. Результати інших дослідників засвідчили, що в умовах цирозу виникає зниження біодоступності NO та наростання явищ органної вазоконстрикції, що веде до розвитку портальної гіпертензії при даній патології [6, 13].

Метою роботи було вивчення ролі системи оксиду азоту в патогенезі циротичного ураження печінки нами було проведено дослідження впливу селективного інгібітора синтезу NO аміногуанідину на стан системи оксиду азоту та структуру печінки при експериментальному цирозі, що викликаний тривалим введенням тетрахлорметану.

Матеріал і методи дослідження. В експерименті використано 18 білих щурів-самців вагою від 220-300 г. Тварини перебували у віварії ДВНЗ Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського МОЗ України з контрольованим температурним режимом, на стандартному раціоні з вільним доступом до їжі та води і 12-годинним циклом день-ніч. Робота з тваринами виконувалась згідно Європейської конвенції про гуманне ставлення до лабораторних тварин [3]. Цироз печінки моделювали за методикою, описаною Kurabe S. та співак [10]. 50 % розчин тетрахлорметану вводили перорально двічі на тиждень протягом 3-х місяців з розрахунку 2 мл на кг маси тварини. Аміногуанідин вводили щоденно повторно ітраперітонеально в дозі 10 мг/кг протягом 10 днів після закінчення моделювання досліді [9]. Контрольній групі вводили відповідний об'єм ізотонічного розчину. Декапітацію тварин проводили під кетаміновим наркозом через 24 год після останнього введення засобу корекції.