

Є. П. Москвичев, Я. В. Рожковський

# МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЯЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ДОКСОРУБІЦИН-ІНДУКОВАНОЇ ІМУНОСУПРЕСІЇ ІНДУКТОРОМ ЕНДОГЕННОГО ІНТЕРФЕРОНУ АМІКСИНОМ

Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

УДК 615.015:615.33:612.017:615.37

Е. П. Москвичев, Я. В. Рожковский

## МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ДОКСОРУБИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОСУПРЕССИИ ИНДУКТОРОМ ЭНДОГЕННОГО ИНТЕРФЕРОНА АМИКСИНОМ

Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина

Целью работы было изучение роли цитокинзависимых процессов в механизмах формирования доксорубицин-индуцированной иммуносупрессии и установление возможностей их фармакологической коррекции индуктором эндогенного интерферона амиксином. Установлено, что четырехразовое введение мышам доксорубицина (1 раз в неделю в дозе 5,0 мг/кг) приводит к угнетению иммуносекреторной активности перитонеальных макрофагов и интенсивности бласттрансформации лимфоцитов периферической крови вследствие нарушения их чувствительности к комитогенному воздействию ИЛ-1 $\beta$  в условиях *in vitro*. Профилактическое применение индуктора эндогенного интерферона амиксина уменьшает доксорубицин-индуцированные нарушения цитокинпродуцирующей активности перитонеальных макрофагов, восстанавливает функциональный резерв продукции лимфоцитактивирующего фактора при дополнительной стимуляции макрофагов стафилококками в условиях *in vitro* и повышает чувствительность лимфоцитов периферической крови к модулирующему воздействию ИЛ-1 $\beta$  в реакции бласттрансформации лимфоцитов.

**Ключевые слова:** экспериментальная доксорубицин-индуцированная иммуносупрессия, амиксин, механизмы иммуномодулирующего действия.

UDC 615.015:615.33:612.017:615.37

Ye. P. Moskvychov, Ya. V. Rozhkovsky

## MECHANISMS OF REGULATION OF EXPERIMENTAL DOXORUBICIN-INDUCED IMMUNOSUPPRESSION OF ENDOGENOUS INTERFERON INDUCER AMIXIN

The Odessa National Medical University, Odessa, Ukraine

Finding effective and safe way to reduce immunotoxic action of anticancer drugs without weakening their specific activity is the actual problem of modern medicine. In this regard, special attention was attracted to a national inducer of endogenous interferon amixin that is high means in the prevention and treatment of viral diseases and secondary immune deficiencies. However, the molecular mechanisms of action of immunotropic amixin and ability to use it for correcting violations of doxorubicin-induced immune disorders remain unclear. The aim was to study the role of cytokine-dependent processes in formation mechanisms of doxorubicin-induced immunosuppression and the establishment of opportunities for their pharmacological correction inducer of endogenous interferon amixin. It was found that 4-course treatment of mice with doxorubicin (1 time per week at a dose of 5.0 mg/kg) leads to inhibition of the activity of peritoneal macrophages and intensity of blasttransformation of peripheral blood lymphocytes as a result of violations of their sensitivity to the comitogenic effects of IL-1 $\beta$  *in vitro*. Prophylactic use of the inducer of endogenous interferon amixin reduces doxorubicin-induced disorders of cytokine producing activity of peritoneal macrophages, restores functional reserve lymphocyte activating factor production with additional stimulation of macrophages staphylococci *in vitro* and increases the sensitivity of peripheral blood lymphocytes to the modulating effects of IL-1 $\beta$  in reaction of blasttransformation of leukocytes.

**Key words:** experimental doxorubicin-induced immunosuppression, amixin, immunomodulatory action mechanisms.

Пошук ефективних і безпечних шляхів зниження імунотоксичної дії протипухлинних препаратів без послаблення їхньої специфічної активності залишається актуальною проблемою сучасної медицини. Біль-

шість схем комбінованого лікування злоякісних новоутворень різної локалізації містить протипухлинний антибіотик доксорубіцин, який разом із високою ефективністю та широким спектром протипухлин-

ної дії має високу системну токсичність [1–4]. З огляду на провідну роль оксидативного стресу в механізмах цито- й імунотоксичної дії доксорубіцину [2; 5], цілком логічним був пошук засобів профілактики



імунотоксичних ефектів цього препарату серед імуномодуляторів із мембранопротекторною й антиоксидантною активністю. У цьому сенсі особливу увагу привернув вітчизняний індуктор ендogenous інтерферону аміксин, який є високоактивним засобом у профілактиці та лікуванні вірусних захворювань і вторинних імунодефіцитів [6; 7].

Проте молекулярні механізми імунотропної дії аміксину та можливості його використання з метою корекції порушень доксорубіцин-індукованих розладів імунітету залишаються не з'ясованими. Відомо, що одним із головних клітинних ефекторів резистентності організму є система мононуклеарних фагоцитів. Як основне джерело імунорегуляторних цитокінів ці клітини здійснюють взаємодію неспецифічних і специфічних факторів резистентності [8]. Здатність цитокінів виконувати функцію комунікаційного сигналу поміж різними популяціями клітин, проникати усередину клітини, змінюючи її метаболізм, здійснювати дистанційний вплив на ЦНС відкриває реальну перспективу розширення уявлень про механізми компенсаторних реакцій [9]. Широкий спектр регуляторних ефектів цитокінів, їхній реальний вплив на резистентність організму та надзвичайна чутливість їх ендogenous секреції до впливу всіляких негативних факторів може слугувати підґрунтям для використання динаміки їх продукції з метою інтегральної оцінки функціонального стану організму.

Класичною моделлю мононуклеарних фагоцитів є перитонеальні макрофаги. Відомо, що лімфоцитаактивуюча активність перитонеальних макрофагів свідчить про загальну продукцію прозапальних цитокінів цими клітинами, передусім інтерлейкіну-1, інтерлейкіну-6 і фактора некрозу пухлин [10]. З другого боку, про-

цес регуляції імунних функцій залежить не тільки від інтенсивності продукції цитокінів, але й від чутливості клітин-мішеней до їхнього модулюючого впливу [8; 9]. Тому зважаючи на те, що найбільш важливою складовою частиною лімфоцитаактивуючого фактора (ЛАФ) є ІЛ-1, нами одночасно досліджувалася чутливість лімфоцитів периферичної крові тварин до комітогенного впливу ІЛ-1 $\beta$  у реакції бласттрансформації. Характер змін цитокін-продукуючої активності мононуклеарних фагоцитів і чутливості лімфоцитів до комітогенної дії цитокінів як в умовах формування доксорубіцин-індукованої імуносупресії, так і профілактичного застосування аміксину залишається нез'ясованим.

**Метою** дослідження було з'ясувати участь цитокінзалежних процесів у механізмах формування доксорубіцин-індукованої імуносупресії та визначити можливості їх фармакологічної корекції вітчизняним індуктором ендogenous інтерферону аміксином.

#### **Матеріали та методи дослідження**

Експериментальні дослідження виконані на 228 нелінійних мишах масою 18–22 г. Усі маніпуляції на тваринах проводили згідно з вимогами «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985). Доксорубіцинову імуносупресію на тваринах моделювали внутрішньом'язовим введенням доксорубіцину-КМП («Arterium», Україна) дозою 5,0 мг/кг один раз на тиждень протягом 4 тиж. [11]. Аміксин-ІС («Інтерхім», Україна) вводили профілактично протягом 5 діб після кожного введення доксорубіцину внутрішньоочеревинно дозою 2,0 мг/кг. Тварини були поділені на такі групи: 1-ша група — інтактна; 2-га–5-та

групи — тварини, які отримували доксорубіцин відповідно один, два, три та чотири рази; 6-та група — тварини, які отримували доксорубіцин протягом 4 тиж. на фоні профілактичного введення аміксину. Дослідження проводили на базі лабораторій Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України.

Виділення макрофагів з перитонеальної порожнини декапітованих тварин проводили шляхом їх змиву 5 мл середовища 199 («Sigma-Aldrich», Німеччина) з додаванням 100 ОД/мл бензилпеніциліну натрію («Київмедпрепарат», Україна). Виділені перитонеальні макрофаги суспендували в середовищі 199 у концентрації 3 млн клітин на міліметр і поміщали у 24-коміркову плату по 2 мл у кожну комірку для культивування (Scientific flow laboratories, Велика Британія). Для індукції утворення ЛАФ використовували *Staphylococcus aureus* (P-209) у розрахунку 20–30 убитих нагріванням мікробних тіл на 1 фагоцит. Активовані *in vitro* і неактивовані мононуклеарні фагоцити інкубували протягом 2 год при 37 °С в атмосфері 7 % вуглекислого газу (CO<sub>2</sub>-інкубатор, Flow laboratories, Велика Британія), видалляли супернатант із неприлиплими клітинами і додавали у тій же кількості середовище 199 з 5 % сироваткою великої рогатої худоби, 100 ОД/мл пеніциліну і 2 мМ глутаміну. Суспензію клітин інкубували ще протягом 18 год за тих же умов і видалляли центрифугуванням (1500 г при 400 °С протягом 30 хв). До вимірювання активності ЛАФ супернатант тримали при -20 °С. Лімфоцитаактивуючу активність інкубатів мононуклеарних фагоцитів оцінювали за їх здатністю додатково посилювати, тобто здійснювати комітогенний вплив на проліферацію тимоцитів, стимульованих субоптимальними дозами лектинів [12].



Культивацію клітин проводили в 96-коміркових планшетах (Flow laboratories, Велика Британія). У кожен комірку вносили 100 мкл суспензії тимоцитів — 0,5 млн клітин, 50 мкл канаваліну А (Con A) — 0,25 мкг і 50 мкл досліджуваних зразків супернатантів у різних розведеннях (1 : 16, 1 : 32). Контролем були культури без супернатантів і культури з препаратом ІЛ-1 $\beta$  (беталейкін) в оптимальній стимулювальній концентрації (250 нг/мл). Кожну дослідну і контрольну проби здійснювали у 3–4 паралельні комірочки. Планшети розміщували в CO<sub>2</sub>-інкубаторі з 5 % газу при температурі 37 °С та 100 % вологості. Через 56 год у культуру вносили мічений тритієм тимідин у розрахунок 5 мкКі/мл («Изотоп», Російська Федерація). Через 16 год після закінчення культивування клітини переносили на фільтри за допомогою напівавтоматичного харвестера. Включення міченого тимідину в ДНК поділених клітин оцінювали за допомогою сцинтиляційного  $\beta$ -лічильника (LKB).

Лімфоцити периферичної крові виділяли загальноприйнятим методом. Для здійснення реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) периферичної крові клітини культивували *in vitro* з Con A (0,75 мкг/мл) і препаратом беталейкін («ГосНИИ ОЧБ ФГУП», Російська Федерація) дозою 0,06 мкг/мл. Включення міченого Н<sup>3</sup>-тимідину оцінювали за допомогою сцинтиляційного  $\beta$ -лічильника (LKB). Реакцію визначали кількісно за включенням мітки в ДНК лімфоцитів протягом 1 хв [13]. Статистичну обробку результатів досліджень проводили за допомогою критерію Стьюдента [14].

### Результати дослідження та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що перитонеальні макрофаги інтактних мишей ЛАФ-

активністю не володіють, тимчасом як стимуляція макрофагів стафілококами за умов *in vitro* приводить до ініціації продукції цитокінів цими клітинами.

Установлено, що курсове введення доксорубіцину супроводжується вираженими змінами продукції ЛАФ, характер яких залежить від тривалості застосування цитостатика. Зокрема, одноразове введення доксорубіцину не викликало спонтанної продукції ЛАФ перитонеальними макрофагами тварин, а їх стимуляція за допомогою *Staphylococcus aureus* в умовах *in vitro* ініціювала продукцію ЛАФ, але не виявила достовірного збільшення цього показника порівняно зі стимульованими макрофагами інтактних тварин. Дворазове введення доксорубіцину ініціювало продукцію ЛАФ макрофагами, яка реєструвалася протягом 48 год, тимчасом як стимуляція цих клітин додатково збільшувала продукцію цитокінів у всі терміни спостережень, але за своєю інтенсивністю не перевищувала стимульовану продукцію макрофагів у інтактних тварин. Як відомо, ЛАФ-активність супернатантів макрофагів відображає продукцію низки цитокінів цими клітинами, а саме: ІЛ-1, ІЛ-6, фактора некрозу пухлин, і, таким чином, є прямим свідченням активного синтезу імунорегуляторних пептидів у відповідь на вплив екзогенних чинників. Ймовірно, що повторне введення доксорубіцину, внаслідок ініціації оксидативного стресу, може змінювати метаболізм макрофагів і спонукати їх до секреції цитокінів [2; 5].

Триразове, з тижневим інтервалом, введення доксорубіцину також приводило до активації перитонеальних макрофагів і викликало ще більш тривалу (понад 72 год) продукцію ЛАФ. Проте рівень цієї продукції був вірогідно нижчим, ніж у тварин попередньої

групи (табл. 1). Після триразового введення цитостатика перитонеальні макрофаги піддослідних тварин практично не відповідали підвищенням продукції ЛАФ у відповідь на додаткову стимуляцію клітин стафілококами в умовах *in vitro*. При цьому стимульована продукція ЛАФ була більше ніж удвічі меншою за відповідний показник у інтактних тварин. Найбільш характерна ознака цього терміну застосування доксорубіцину — той факт, що стимуляція макрофагів уже не сприяла додатковому збільшенню їх ЛАФ-активності.

Таблиця 1

**Вплив доксорубіцину (5,0 мг/кг, в/м) на ЛАФ-активність перитонеальних макрофагів мишей (ЛАФ-активність · 10<sup>-3</sup> ОД/мл), M $\pm$ m, n=8**

| Термін спостереження   | ЛАФ-активність |                             |
|------------------------|----------------|-----------------------------|
|                        | без стимуляції | після стимуляції            |
| Інтактна група         | 0              | 4,8 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>  |
| Уведення доксорубіцину |                |                             |
| 1 раз                  |                |                             |
| 0 год                  | 0              | 4,6 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>  |
| 24 год                 | —              | —                           |
| 48 год                 | —              | —                           |
| 72 год                 | —              | —                           |
| 2 рази                 |                |                             |
| 0 год                  | 3,4 $\pm$ 0,2  | 4,2 $\pm$ 0,3 <sup>#</sup>  |
| 24 год                 | 3,0 $\pm$ 0,3  | 3,8 $\pm$ 0,4 <sup>*</sup>  |
| 48 год                 | 2,3 $\pm$ 0,4  | 3,3 $\pm$ 0,4 <sup>*</sup>  |
| 72 год                 | 0              | 4,0 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>  |
| 3 рази                 |                |                             |
| 0 год                  | 2,5 $\pm$ 0,3  | 2,5 $\pm$ 0,4 <sup>*</sup>  |
| 24 год                 | 2,0 $\pm$ 0,5  | 2,1 $\pm$ 0,3 <sup>*</sup>  |
| 48 год                 | 2,1 $\pm$ 0,2  | 1,9 $\pm$ 0,2 <sup>*</sup>  |
| 72 год                 | 1,2 $\pm$ 0,3  | 1,3 $\pm$ 0,3 <sup>*</sup>  |
| 4 рази                 |                |                             |
| 0 год                  | 2,2 $\pm$ 0,3  | 1,4 $\pm$ 0,2 <sup>**</sup> |
| 24 год                 | 2,0 $\pm$ 0,4  | 1,5 $\pm$ 0,3 <sup>*</sup>  |
| 48 год                 | 2,0 $\pm$ 0,3  | 1,0 $\pm$ 0,3 <sup>**</sup> |
| 72 год                 | 0,8 $\pm$ 0,2  | 1,0 $\pm$ 0,4 <sup>*</sup>  |

Примітка. \* — зміни вірогідні порівняно з інтактною групою (p<0,05); # — порівняно з показником ЛАФ-активності без стимуляції (p<0,05).



Найвираженіші зміни секреторної активності макрофагів були зафіксовані після чотириразового введення доксорубіцину. Продукція ЛАФ перитонеальними макрофагами тварин цієї групи була ще менш інтенсивною, але, порівняно з іншими термінами застосування цитостатика, більш тривалою і зберігалася понад 72 год. З огляду на відомі літературні дані, які свідчать про негативний вплив тривалої продукції цитокінів на функцію імунокомпетентних клітин [9], цей факт можна розглядати як один з імовірних механізмів розвитку імуносупресії, яка спостерігається в умовах тривалого застосування доксорубіцину. Найбільш характерною ознакою відтворення доксорубіцин-індукованої імуносупресії було зниження стимульованої продукції ЛАФ до рівня, нижчого ніж спонтанна продукція цитокінів. Якщо без стимуляції активність продукції ЛАФ макрофагами тварин цієї групи становила  $(2,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$  ОД/мл, то після додаткового впливу стафілококів вона знижувалася до рівня  $(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$  ОД/мл ( $p < 0,05$ ). Це означає, що за даних умов експерименту додаткова стимуляція макрофагів викликає протилежний ефект і, навпаки, пригнічує продукцію ними ЛАФ. Зниження реакції макрофагів у відповідь на вплив мікробних агентів може розглядатись як один з імовірних патогенетичних механізмів розвитку інфекційних ускладнень в умовах тривалої хіміотерапії доксорубіцином.

Відомо, що лімфоцити периферичної крові тварин відповідають реакцією бласттрансформації на дію ІЛ-1 $\beta$  у присутності субоптимальної дози лектинів — у цьому виявляється добре відомий комітогенний ефект ІЛ-1 $\beta$  [15; 16]. У наших експериментах за умов *in vitro* препарат ІЛ-1 $\beta$  — беталейкін спричиняв таку дію дозою 0,06 мкг/мл у присутності субоптимальної (0,625 мкг/мл)

доза Con A. Нами встановлено, що індуковане ІЛ-1 $\beta$  включення Н<sup>3</sup>-тимідину у ДНК лімфоцитів периферичної крові інтактних тварин зростало у 8,42 разу, про що свідчило збільшення зареєстрованих імпульсів з  $788 \pm 59$  до  $6639 \pm 310$ ;  $p < 0,05$  (табл. 2).

Курсове чотириразове введення доксорубіцину призводило практично до повної втрати відповідної реакції лімфоцитів на комітогенний вплив ІЛ-1 $\beta$ . Показник, який характеризує інтенсивність РБТЛ, при цьому знижувався з  $(6639 \pm 310)$  до  $(628 \pm 49)$  імп/хв, що у 10,6 разу менше порівняно з аналогічним у інтактних тварин. Вірогідно зменшувалася на 49,2 % — з  $(788 \pm 59)$  до  $(400 \pm 30)$  імп/хв ( $p < 0,05$ ) й міотична активність лімфоцитів за умов їх культивування тільки з Кон А без присутності ІЛ-1 $\beta$ . Отже, лімфоцити периферичної крові тварин в умовах доксорубіцин-індукованої імуносупресії втрачали чутливість до ІЛ-1 $\beta$  і переставали відповідати проліферацією на його комітогенний вплив. Зменшення інтенсивності бласттрансформації лімфоцитів спостерігалось

протягом усього терміну спостереження (0–72 год).

Таким чином, нами встановлено, що модель доксорубіцинової імуносупресії призводить до зниження продукції ЛАФ перитонеальними макрофагами і, що особливо важливо, характеризується зниженням функціонального резерву продукції ЛАФ макрофагами при їхній додатковій стимуляції стафілококами, а також різким пригніченням проліферативної активності лімфоцитів у РБТЛ у відповідь на комітогенний вплив ІЛ-1 $\beta$ .

Профілактичне застосування аміксину суттєво змінювало показники резистентності організму. На тлі імуномодулюючої терапії перитонеальні макрофаги тварин зразу ж після закінчення курсового введення доксорубіцину продукували ЛАФ набагато інтенсивніше, ніж без корекції, але тривалість цієї секреції скорочувалася до 48 год, тимчасом як в умовах доксорубіцинової імуносупресії без корекції цей термін перевищував 72 год. З огляду на те, що надлишкова і тривала продукція цитокінів може викликати ушкоджувальний вплив

Таблиця 2

**Вплив аміксину на ЛАФ-активність перитонеальних макрофагів і реакцію бласттрансформації лімфоцитів периферичної крові у тварин на фоні чотиритижневого введення доксорубіцину (1 раз на тиждень дозою 5,0 мг/кг, в/м),  $M \pm m$ ,  $n=8-10$**

| Група тварин, термін спостереження | ЛАФ-активність, $\cdot 10^{-3}$ ОД/мл |                             | РБТЛ (на Con A), імпульсів за хвилину |                              |
|------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|------------------------------|
|                                    | без стимуляції                        | після стимуляції            | без ІЛ-1 $\beta$                      | з ІЛ-1 $\beta$               |
| Інтактна група                     | 0                                     | 4,8 $\pm$ 0,4               | 788 $\pm$ 59                          | 6639 $\pm$ 310               |
| Доксорубіцин                       |                                       |                             |                                       |                              |
| 0 год                              | 2,2 $\pm$ 0,3                         | 1,4 $\pm$ 0,2 <sup>#</sup>  | 400 $\pm$ 30 <sup>#</sup>             | 628 $\pm$ 49 <sup>#</sup>    |
| 24 год                             | 2,0 $\pm$ 0,4                         | 1,5 $\pm$ 0,3 <sup>#</sup>  | 508 $\pm$ 59 <sup>#</sup>             | 688 $\pm$ 68 <sup>#</sup>    |
| 48 год                             | 2,0 $\pm$ 0,3                         | 1,0 $\pm$ 0,3 <sup>#</sup>  | 478 $\pm$ 50 <sup>#</sup>             | 700 $\pm$ 90 <sup>#</sup>    |
| 72 год                             | 0,8 $\pm$ 0,2                         | 1,0 $\pm$ 0,4 <sup>#</sup>  | 603 $\pm$ 49 <sup>#</sup>             | 1136 $\pm$ 128 <sup>#</sup>  |
| Доксорубіцин + аміксин             |                                       |                             |                                       |                              |
| 0 год                              | 4,8 $\pm$ 0,6*                        | 6,6 $\pm$ 0,4* <sup>#</sup> | 660 $\pm$ 47* <sup>#</sup>            | 4551 $\pm$ 240* <sup>#</sup> |
| 24 год                             | 3,6 $\pm$ 0,4*                        | 5,3 $\pm$ 0,4*              | 689 $\pm$ 40*                         | 4674 $\pm$ 225* <sup>#</sup> |
| 48 год                             | 0,5 $\pm$ 0,3*                        | 5,0 $\pm$ 0,6*              | 700 $\pm$ 61*                         | 4864 $\pm$ 347* <sup>#</sup> |
| 72 год                             | 0                                     | 4,5 $\pm$ 0,7*              | 682 $\pm$ 59                          | 6392 $\pm$ 346*              |

Примітка. \* — порівняно з тваринами, які отримували доксорубіцин ( $p < 0,05$ ); # — порівняно з інтактними тваринами ( $p < 0,05$ ).



на деякі показники резистентності організму, зафіксоване нами обмеження тривалої продукції ЛАФ може розцінюватися як один із проявів імунопротекторної дії аміксину.

При цьому імунокорекція сприяла активному відновленню функціонального резерву продукції ЛАФ макрофагами в умовах їх додаткової стимуляції стафілококом. Зокрема, якщо в умовах доксорубіцинової імуносупресії стимульована *in vitro* продукція ЛАФ макрофагами нелікованих тварин становила  $(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^{-3}$  ОД/мл, то за умов профілактичного застосування аміксину вона збільшувалася до  $(6,6 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$  ОД/мл ( $p < 0,05$ ). Імунокорекція аміксином збільшувала резерв стимуляції секреторної активності макрофагів (співвідношення стимульованої і нестимульованої продукції ЛАФ) у терміні спостереження 0 год — у 1,38 разу ( $p < 0,05$ ), через 24 год — у 1,47 разу ( $p < 0,05$ ), через 48 год — у 10,0 разів ( $p < 0,05$ ) (див. табл. 2). Це вказує на можливість аміксину відновлювати втрачену в умовах хімотерапії доксорубіцином здатність макрофагів відповідати на дію мікробних агентів активним синтезом імунорегуляторних пептидів, що забезпечує участь цих клітин у реалізації протиінфекційного імунітету організму.

Разом із тим відомо, що ефективність модуляції імунної відповіді залежить не тільки від інтенсивності продукції імуномедіаторів, але й від чутливості клітин-мішеней до їхнього регулювального впливу. Зокрема, нами встановлено, що лімфоцити периферичної крові тварин в умовах імунокорекції доксорубіцин-індукованої імуносупресії, на відміну від тварин контрольної групи, зберігали здатність до бласттрансформації у присутності Con A фактично на рівні показників інтактної групи і відповідали значним посиленням РБТЛ у відповідь на додатковий

комітогенний вплив ІЛ-1 $\beta$ . Якщо комітогенний вплив ІЛ-1 $\beta$  на проліферацію лімфоцитів у тварин контрольної групи (без імунокорекції) у терміні спостереження 0 год проявляв себе збільшенням кількості радіоактивних імпульсів з  $(400 \pm 30)$  до  $(628 \pm 49)$  імп/хв ( $p < 0,05$ ), то на фоні профілактичного застосування аміксину цей показник зростав із  $(660 \pm 47)$  до  $(4551 \pm 240)$  імп/хв ( $p < 0,05$ ). Подібний характер активуючого впливу аміксину на показники стимульованої *in vitro* бласттрансформації лімфоцитів спостерігався і в інші терміни спостереження (24–72 год) після останнього введення доксорубіцину.

Отже, проведені дослідження дозволяють зробити такі

#### ВИСНОВКИ:

1. Одноразове введення доксорубіцину не впливає, дворазове — стимулює, а три- і особливо чотириразове введення доксорубіцину виражено пригнічує імуносекреторну активність перитонеальних макрофагів мишей після їх додаткової стимуляції *Staphylococcus aureus* в умовах *in vitro*. При тривалому введенні доксорубіцину лімфоцити периферичної крові втрачають чутливість до комітогенного впливу ІЛ-1 $\beta$  в РБТЛ за умов *in vitro*.

2. Профілактичне застосування індуктора ендogenous інтерферону аміксину спричиняє імуномодуючий вплив, зменшуючи доксорубіцин-індуковані зміни цитокінпродукуючої активності перитонеальних макрофагів, відновлює функціональний резерв стимульованої продукції ЛАФ в умовах *in vitro* та підвищує чутливість лімфоцитів периферичної крові до модулюючого впливу ІЛ-1 $\beta$  в РБТЛ.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. *Индукцированная* антрациклинами кардиотоксичность: механизмы развития и клинические проявления / М. Г. Матяш, Т. Л. Кравчук, В. В. Высоккая [и др.] // Сибирский онкологический журнал. — 2008. — № 6 (30). — С. 66–76.

2. *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, N 1. — P. 154–171.

3. *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, N 1. — P. 195–202.

4. *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.

5. *Саенко Ю. В. Изучение органо-специфических механизмов оксидативного стресса*: дис. на соискание учен. степени канд. биол. наук: 14.00.25 — фармакология / Ю. В. Саенко. — Ульяновск, 2006. — 168 с.

6. *Вивчення впливу інтерферогену «Аміксин-ІС» на інтерферогенез і цитотоксичну активність НК-клітин у хворих на хронічний гепатит С* / Є. В. Нікітін, К. Л. Сервецький, К. М. Усиченко, О. О. Буйко // Дослідження біології та медицини. — 2008. — № 2 (12). — С. 4–8.

7. *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.

8. *Innate immunity in aging: impact on macrophage function* / J. Plowden, M. Renshaw-Hoelscher, C. Engleman [et al.] // Aging Cell. — 2004. — Vol. 3, N 4. — P. 161–167.

9. *Кетлинский С. А. Цитокины* / С. А. Кетлинский, А. С. Симбирцев. — СПб.: Фолиант, 2008. — 552 с.

10. *Ковальчук Л. В. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии*: учебник / Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская, Р. Я. Мешкова. — М.: ГЭОТАР-МЕДИА, 2011. — 640 с.

11. *Ефективність застосування тіотриазоліну за умов доксорубіцинової кардіоміопатії* / І. С. Чекман, Т. С. Трофімова, І. А. Мазур, Н. О. Горчакова // Запорожский медицинский журнал. — 2010. — Т. 12, № 5. — С. 207–210.

12. *Rosenwasser L. J. Ability of human leukocytic pyrogen to chance phytohemagglutinin induced murine thymocyte proliferation* / L. J. Rosenwasser, C. A. Dinarello // Cell. Immunol. — 1981. — Vol. 63, N 1. — P. 134–142.

13. *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.

14. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, Д. М. Кретьер // *Цитокине*. – 2000. – Vol. 12, N 6. – P. 595–602.

15. Hedger M. P. Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1 beta or interleukin 6 in vitro / M. P. Hedger, D. J. Phillips, D. M. Kretser // *Цитокине*. – 2000. – Vol. 12, N 6. – P. 595–602.

16. Олейник А. А. Рецепторы и механизмы реализации нейротропных эффектов цитокинов и факторов роста / А. А. Олейник, Р. С. Вастьянов // *Успехи физиологических наук*. – 2008. – Т. 39, № 2. – С. 47–57.

#### REFERENCES

1. Matyash M.G., Kravchuk T.L., Vysotskaya V.V., Chernov V.I., Goldberg V.E. Anthracycline-induced cardiotoxicity: mechanisms and clinical implications of development. *Siberian Oncol. Zhurnal* 2008; 6 (30): 66-76.

2. Simůnek T., Stérba M., Popelová O., Adamcova M., Hrdina R., Gersl V. Anthracycline-induced cardiotoxicity: overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacol. Rep.* 2009; 1 (61): 154-171.

3. Gilliam L.A., Moylan J.S., Patterson E.W., Smith J.D., Wilson A.S., Rabani Z., Reid M.B. Doxorubicin acts via mitochondrial ROS to stimulate catabolism in C2C12 myotubes. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2012; 1 (302): 195-202.

4. Fandeyev O.A., Vasechkin S.S., Alekhin M.N., Odintsov S.V., Callisto V.E., Sidorenko B.A. Clinical significance of anthracycline cardiotoxicity: current approaches to diagnosis, prevention and treatment. *Cardiology* 2011; 7: 40-47.

5. Saenko Yu.V. Study of organ mechanisms of oxidative stress : diss. of cand. biol. nauk : 14.00.25. Pharmacology. Ulyanovsk, 2006, 168 p.

6. Nikitin E.V., Servetsky K.L., Usichenko K.M., Buyko O.O. Study of the effect interferonogen "Amixin-IC" on interferogenesis and cytotoxic activity of NK-cells in patients with chronic hepatitis C. *Dosyagnennya biol ta med.* 2008; 2 (12): 4-8.

7. Silin D.S., Lyubomska O.V., Ershov F.I., Frolov V.M., Kutsyna G.A. Synthetic and natural immunomodulators acting as interferon inducers. *Current Pharmaceutical Design* 2009; 15: 1238-1247.

8. Plowden J., Renshaw-Hoelscher M., Engleman C., Katz J., Sambhara S. Innate immunity in aging: impact on macrophage function. *Aging Cell* 2004; 4 (3): 161-167.

9. Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. Saint-Petersburg, Foliant, 2008. 552 p.

10. Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R.Ya. Clinical immunology and allergy Immunology common with the basics: the textbook. M., GEOTAR-MEDIA, 2011, 640 p.

11. Chekman I.S., Trofimova T.S., Mazur I.A., Horchakova N.O. Efficacy of Thiotriazoline under conditions doxorubitsyn cardiomyopathy. *Zaporozhye Medical Journal* 2010; 5 (12): 207-210.

12. Rosenwasser L.J., Dinarello C.A. Ability of human leukocytic pyrogen to chance phyto-hemagglutinin induced murine thymocyte proliferation. *Cell. Immunol.* 1981; 1 (63): 134-142.

13. Goncharov A.G., Freidlin I.S., Smirnov V.S. Fundamentals of clinical immunology and methodological approaches to the assessment of the immune status : Workshop. Kaliningrad, KGU, 1997, 73 p.

14. Lapach S.N., Chubenko A.V., Babich P.N. Statistical methods in biomedical research using Excel. Kyiv, Morion, 2001, 320 p.

15. Hedger M.P., Phillips D.J., Kretser D.M. Divergent cell-specific effects of activin-A on thymocyte proliferation stimulated by phytohemagglutinin, and interleukin 1 beta or interleukin 6 in vitro. *Cytokine* 2000; 6 (12): 595-602.

16. Oleinik A.A., Vastyanov R.S. Receptors and mechanisms of neurotrophic effects of cytokines and growth factors. *Uspekhi fisiol. nauk* 2008; 2 (39): 47-57.

Надійшла 12.05.2014

УДК 535.343:612.017.4

О. І. Сирма<sup>1</sup>, В. М. Скобеєва<sup>2</sup>, В. О. Ульянов<sup>1</sup>

## МОРФОМЕТРИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА СУДИННОГО РУСЛА ШКІРИ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА

<sup>1</sup> Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна,

<sup>2</sup> НДІ фізики Одеського національного університету ім. І. І. Мечникова,  
Одеса, Україна

УДК 535.343:612.017.4

Е. И. Сырма<sup>1</sup>, В. М. Скобеева<sup>2</sup>, В. А. Ульянов<sup>1</sup>

### МОРФОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОСУДИСТОГО РУСЛА КОЖИ ПРИ УСЛОВИИ ВВЕДЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА

<sup>1</sup> Одесский национальный медицинский университет, Одесса, Украина,

<sup>2</sup> НИИ физики Одесского национального университета им. И. И. Мечникова, Одесса, Украина

Цель работы — исследовать морфометрические изменения микроциркуляторного русла кожи, которые возникают при внутрикожном введении наночастиц серебра. Использовались наночастицы серебра сферической формы диаметром 30 нм, синтезированные цитратным методом. Эксперимент проводился на 140 крысах линии Вистар. Животные были разделены на четыре группы: интактные крысы; животные, которым вводились наночастицы серебра; протаргол; физиологический раствор. После подкожного введения 0,01 мл раствора эффект оценивался на 1, 3,

