

*Савцова З. Д., Меньок Т. А.,
Джаман Н. І., Воейкова І. М.,
Ковбасюк С. Л., Мосієнко В. С.*

ДОЗОЗАЛЕЖНІСТЬ ВПЛИВУ ІМУНОМОДУЛЯТОРА МІКРОБНОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ДИСКРЕТНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ТА ЛІМФОЇДНИХ ОРГАНІВ ОПРОМІНЕНИХ ТВАРИН

Наведені відомості про вплив імуномодулятора мікробного походження (Бластена) при фракціонованому зовнішньому γ -опроміненні. За результатами дослідження периферичної крові, лімфоїдних органів, функціональної активності макрофагів (за продукцією ЧНП та ІЛ-1) і природних кілерних клітин обґрунтовано оптимальну схему використання Бластена для запобігання пострадіаційній цитосупресії.

Однією з актуальних проблем при лікуванні онкологічних хворих є цитосупресія, яку спричиняє застосування протипухлинних цитостатиків або іонізуюче опромінення [1—3]. Постпроменева і хімічно індукована цитосупресія не тільки заважає досягненню максимальної ефективності протипухлинної терапії, робить неможливим успішне застосування методів імунотерапії пухлин, але й у ряді випадків може призвести до виникнення ускладнень, що безпосередньо загрожують життю хворого [1, 4—6]. Тому обов'язковим компонентом протипухлинної терапії є використання так званих “підтримуючих засобів” для профілактики та лікування ятрогенної цитосупресії [2, 7, 8]. Незважаючи на широке коло “підтримуючих засобів”, проблема все ще остаточно не вирішена. Останнім часом в якості засобів корекції цитосупресії все активніше досліджують препарати природного походження: пробіотики, продукти синтезу мікроорганізмів-симбіонтів, фітокомплекси, ембріональні екстракти [9]. Однак клінічні схеми використання таких препаратів залишаються переважно емпіричними. Зберігається розрив між обґрунтуванням вказаних схем і сучасними даними про механізми фізіологічного захисту систем гемо-, імунопоезу і протипухлинної стійкості організму до цитотоксичних впливів.

Одним із оригінальних пробіотичних препаратів є Бластен, отриманий з клітинних стінок молочнокислих бактерій штаму *Lactobacillus Delbrückii* (патент 20509, А61К 35/74, С12 1/20, № 95083935). Результати доклінічного вивчення показали, що Бластен є ефективним імуномодулятором. Спектр імуномодулюючих ефектів препарату включає в себе вплив на реак-

ції специфічного імунітету, на неспецифічну резистентність організму, на продукцію цитокінів, у тому числі й таких, що обумовлюють відновлення гемо- і імунопоезу після опромінення [10, 11].

Метою даного дослідження було вивчення впливу різних доз препарату Бластен на пострадіаційну цитосупресію та активність ефекторів природної протипухлинної резистентності.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на мишах — гібридах F_1 СВА \times С $_{57}$ В1, що зазнали трикратного зовнішнього γ -опромінення з інтервалом у 3 доби на апараті “Ігур” (джерело випромінювання ^{137}Cs , потужність дози — 0,8—1,0 Гр/хв, доза опромінення за один сеанс — 1,5 Гр, сумарна доза становила 4,5 Гр). З опромінених тварин було сформовано три групи: 1-ша група — опромінення без додаткових впливів; 2-га група — опромінені тварини, які одержували Бластен у дозі 0,001 ЛД $_{50}$ (7 мг/кг маси тіла); 3-тя група — опромінені тварини, які одержували Бластен у дозі 0,000013 ЛД $_{50}$ (0,09 мг/кг маси тіла). Бластен вводили опроміненим тваринам триразово з інтервалом у 5 діб, перше введення — через годину після останнього сеансу опромінення. Контролем слугували інтактні тварини.

Через 1, 2 і 3 тижні після останнього сеансу опромінення визначали за допомогою стандартних методик кількість еритроцитів і лейкоцитів у крові, відносну масу та клітинність тимуса, селезінки, периферичних лімфатичних вузлів і клітинний склад останніх [12, 13]; через 1 тиждень після опромінення досліджували продукцію макрофагами ЧНП та ІЛ-1 [14, 15]; через 3 тижні після

опромінення — активність природних кілерних клітин (ПКК) [16].

Математичну обробку результатів проводили з використанням *t*-критерію Стьюдента [17].

Результати й обговорення

Через 7 діб після опромінення у тварин першої групи спостерігали суттєве зниження в крові вмісту еритроцитів ($p < 0,05$) і, особливо, лейкоцитів ($p < 0,01$) (рис. 1). Через три тижні після опромінення кількість еритроцитів практично поверталась до норми, кількість лейкоцитів залишалась зниженою ($p < 0,05$). В дослідних групах (2 і 3) на 7—14-ту добу після опромінення лейкопенія була значно меншою, ніж у групі 1 ($p_{1-2} < 0,05$, $p_{1-3} < 0,05$), а наприкінці спостереження кількість лейкоцитів у тварин цих груп відновлювалась до рівня інтактного контролю. На динаміку вмісту еритроцитів Бластен практично не впливав.

При дослідженні імунокомпетентних органів опромінених тварин (група 1) через 7—14 діб після опромінення спостерігали статистично значуще ($p < 0,05$) зменшення відносної маси тимуса. Відносна маса периферичних лімфовузлів протягом всього часу спостереження мала чітку тенденцію до зменшення. Клітинність обох лімфоїдних органів у всі терміни обстеження була суттєво меншою ($p < 0,05$), ніж у інтактних тварин (рис. 2). Введення Бластена мало впливало на відносну масу тимуса і периферичних лімфовузлів, але запобігало зниженню їх клітинності.

При введенні $0,001 \text{ ЛД}_{50}$ кількість лімфоцитів була навіть більшою, ніж у інтактних тварин: на 14-ту добу після опромінення як у тимусі, так і в периферичних лімфовузлах; на 21-шу добу — в периферичних лімфовузлах. При введенні $0,000013 \text{ ЛД}_{50}$ кількість лімфоцитів і в тимусі, і в лімфовузлах залишалась протягом спостереження практично на рівні неопроміненого контролю. Слід зазначити, що різке збільшення кількості лейкоцитів крові та клітинності лімфоїдних органів тварин групи 2 є аргументом скоріше “проти”, ніж “за” застосування Бластена в дозі $0,001 \text{ ЛД}_{50}$. При вивченні впливу на гемопоез опромінених тварин іншого бактеріального імуномодулятора — ліпополісахариду — було показано, що надмірне посилення проліферативної активності кровотворних клітин-попередників у зв'язку з підвищенням попиту на зрілі клітини може призводити до підвищення частоти післярадіаційних лейкозів [18].

Досліджували також популяційний склад лімфоцитів у периферичних лімфовузлах (рис. 3). Відносний вміст у лімфовузлах зрілих Т-лімфоцитів суттєво не змінювався, абсолютний — був суттєво зниженим на 7-му добу після опромінення (інтактні тварини — $(6,8 \pm 1,2) \times 10^6$, група 1 — $(3,3 \pm 0,1) \times 10^6$, $p < 0,05$). Відносна кількість В-лімфоцитів залишалась майже незмінною через 1 тиждень після опромінення і достовірно збільшувалась до 14—21-ї доби, абсолютна кількість цих клітин була суттєво зниженою на 7-му добу після опромінення (інтактні тварини —

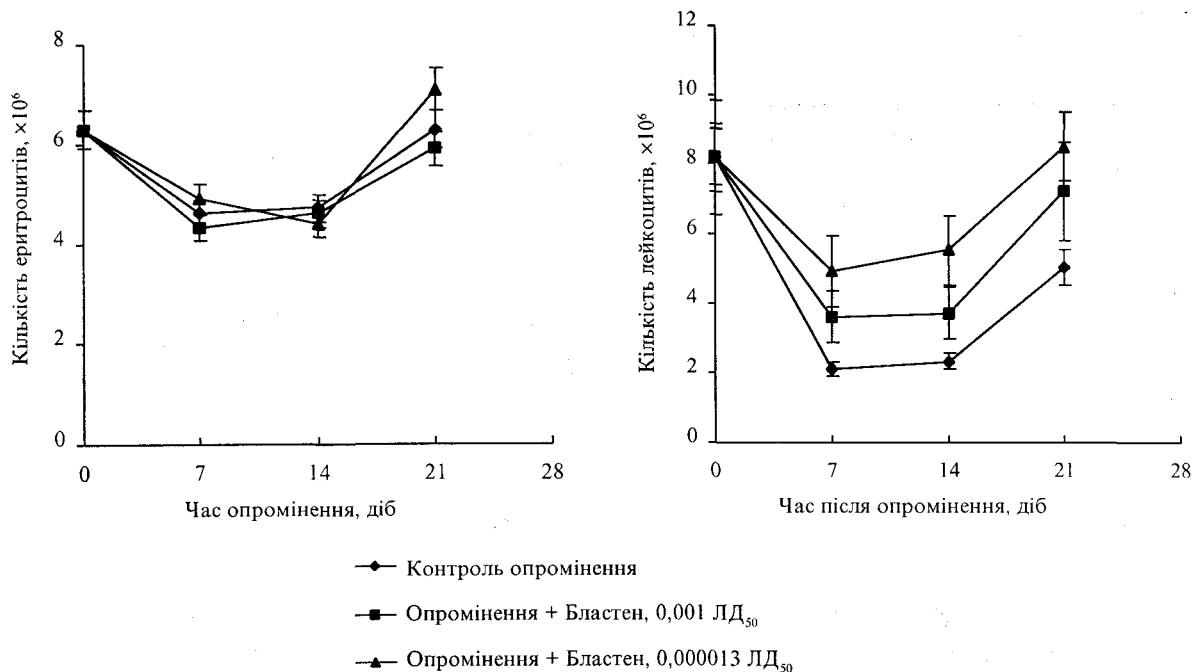


Рис. 1. Вплив Бластена на вміст еритроцитів ($\times 10^6$) та лейкоцитів ($\times 10^6$) у крові опромінених тварин

$(4,0 \pm 0,7) \times 10^6$, група 1 — $(1,7 \pm 0,2) \times 10^6$, $p < 0,05$), і не відрізнялась від показників інтактних тварин в інші строки. Суттєво зниженими протягом 7–21-ї доби після опромінення були і абсолютна, і відносна кількість великих лімфоцитів та бластів (інтактні тварини — $(0,9 \pm 0,04) \times 10^6$, група 1 — $(0,3 \pm 0,05) \times 10^6$, $(0,4 \pm 0,02) \times 10^6$, $(0,3 \pm 0,1) \times 10^6$ відповідно, $p < 0,05$).

Сукупність наведених результатів свідчить, що Бластен нормалізує як кількісні, так і якісні показники клітинного складу периферичної крові і лімфоїдних органів та ефективно зменшує радіаційно індуковану цитосупресію.

Відомо, що при дії іонізуючої радіації захист кровотворних клітин від цитотоксичного впли-

ву, поновлення пула стовбурових клітин і кількості циркулюючих клітин периферичної крові забезпечуються “цитокиновим каскадом”, який запускається індукцією чинника некрозу пухлин (ЧНП), інтерлейкіну-1 (ІЛ-1) та ІЛ-6 [19–21].

Дослідження продукції ЧНП та ІЛ-1 макрофагами виявило, що в опроміненіх тварин підвищений рівень продукції обох цитокинів, особливо, ЧНП. Введення Бластена додатково підвищувало продукцію цих цитокинів. Доза 0,01 ЛД₅₀ більше впливала на ЧНП, а на продукцію ІЛ-1 обидві дози діяли однаково (табл. 1).

Враховуючи наявність негативної регуляції з боку цих цитокинів щодо активності ПКК [22, 23], які до того ж є найбільш ураженою по-

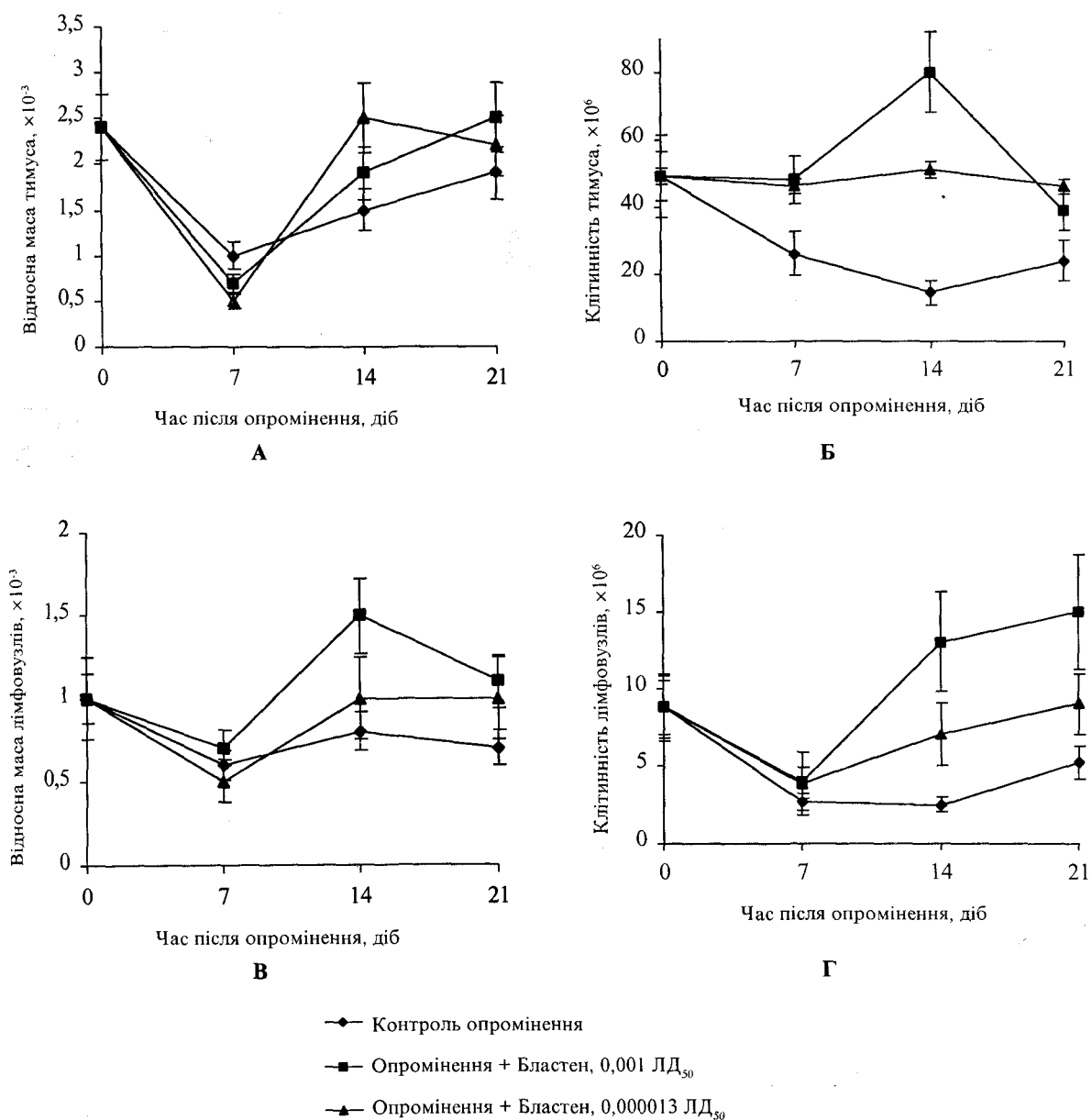


Рис. 2. Вплив Бластена на відносну масу (А, В), кількість клітин (Б, Г) тимуса та периферичних лімфатичних вузлів опроміненіх тварин

пуляцією протипухлинних ефекторів при радіотерапії та при дії практично всіх протипухлинних препаратів [24], для визначення оптимальної дози Бластена порівнювали активність ПКК у тварин 1—4 груп.

Дослідження активності ПКК показало, що через 21 добу після опромінення в першій групі активність ПКК була зниженою порівняно з інтактними мишами в 3 рази. Результатом введення Бластена в обох дозах (1 та 2 групи) було суттєве підвищення активності ПКК. У мишей, що отримали $0,000013 \text{ ЛД}_{50}$, цей показник досягав рівня інтактних тварин (див. табл.).

Таким чином, сукупність отриманих нами даних дозволяє зробити висновок, що оптимальною схемою застосування Бластена для нейтралізації радіаційної цитосупресії є трикратне введення з інтервалом у 5 діб при разовій дозі $0,000013 \text{ ЛД}_{50}$ ($0,09 \text{ мкг/кг}$). Використання низьких доз цього імуномодулятора дає можливість запобігти надмірній активації гемопоезу у відновлювальний період та дисрегуляції запальних цитокінів, яка може сприяти посиленню пухлинного росту за рахунок зниження активності ПКК та інгібування експресії молекул головного комплексу гістосумісності I та II класів [22].

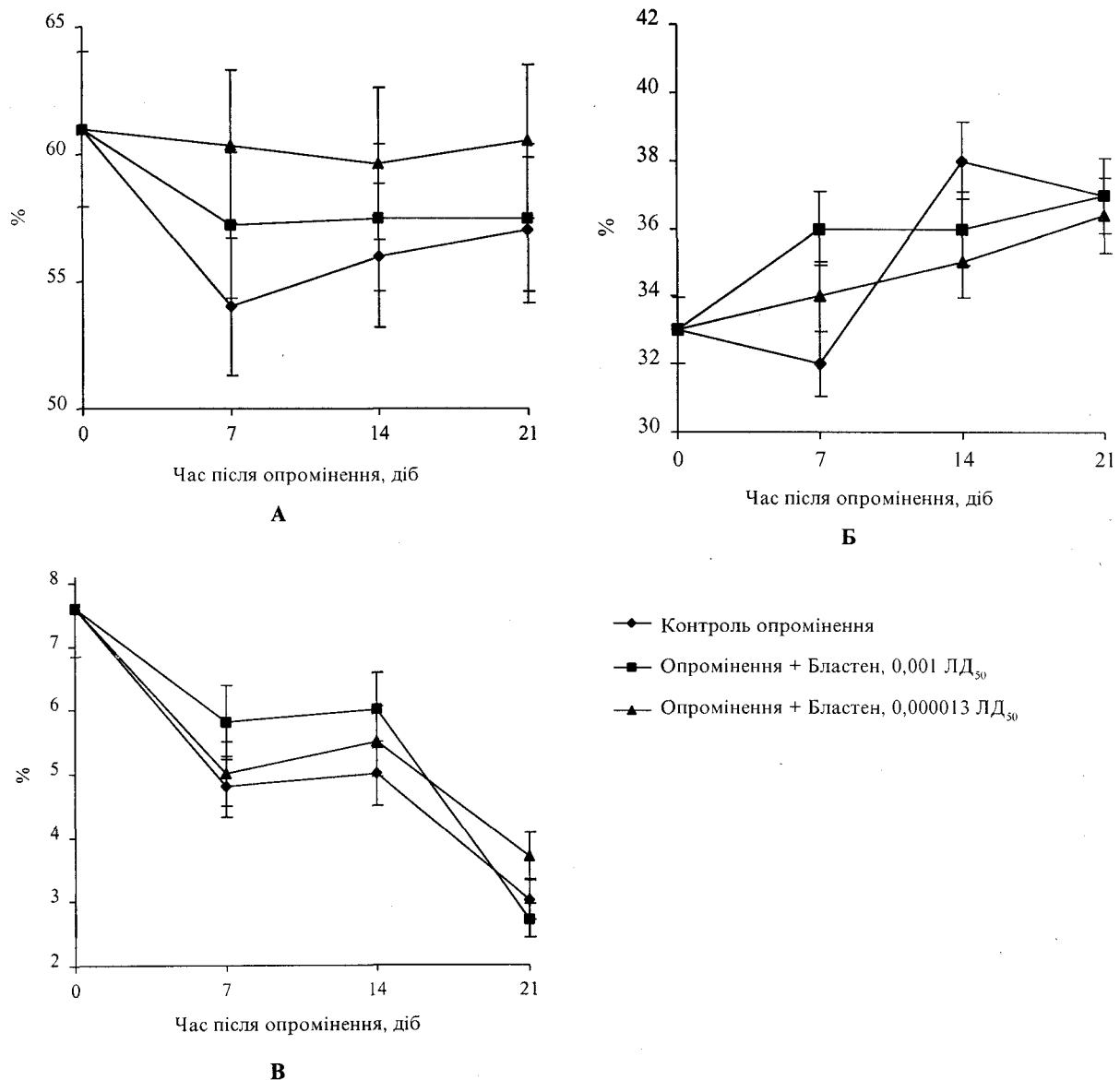


Рис. 3. Вплив Бластена на відносний вміст зрілих Т- (А), В- (Б) лімфоцитів, бластів та великих лімфоцитів (В) периферичних лімфатичних вузлів опромінених тварин

**Вплив Бластена на активність моноцитів і природних кілерних клітин тварин,
що зазнали опромінення**

Група тварин	ЧНП за індексом цитотоксичності (%) для клітин L929	ІЛ-1 за індексом активності в тимоцитарному тесті	Індекс цитотоксичності (%) природних кілерних клітин
Інтактний контроль	12,5±2,5	1,6±0,1	24,9±2,6
Контроль опромінення	20,7±1,4*	2,8±0,6	7,6±2,8*
Опромінення + 0,001 ЛД ₅₀ Бластена	36,2±2,4*/**	4,1±0,2*/***	15,1±1,5*/**
Опромінення + 0,000013 ЛД ₅₀ Бластена	29,4±1,2*/**	3,4±0,5*	22,8±2,5**

* $P < 0,05$ при порівнянні з інтактним контролем.

** $P < 0,05$.

*** $0,05 < P < 0,1$ при порівнянні з контролем опромінення.

1. Маркова И. В. Вспомогательная терапия в онкологии (часть I) // Мир. мед.— 1998.— № 7.— С. 17—18.

2. Hamsen S. K., Miller L. L. Regulatory strategies for the development of adjunctive cancer chemotherapies / Drug Inf. J.— 1997.— V. 31.— N 3.— P. 789—803.

3. Montero M. C., Valdivia M. L., Carvajal E. et al. Economic study of neutropenia induced by mielotoxic chemotherapy / Pharm. World Sci.— 1994.— V. 16.— P. 187—192.

4. Vento S., Cainelli F., Mirandola F. et al. Fulminant hepatitis on withdrawal of chemotherapy in carriers of hepatitis C virus / Lancet.— 1996.— N 8994.— P. 92—93.

5. Hewitt A. A. Cancer and neutropenia data base study / Can. J. Oncol.— 1994.— V. 4.— P. 277—284.

6. Kath R., Hartmann M., Hoffken K. Pharmacoeconomic evaluation of high-dose chemotherapy and peripheral blood stem cell support in high-risk or poor-prognosis malignancies / J. Cancer Res. Clin. Oncol.— 1998.— V. 124.— P. 288—290.

7. Красовский О. Е., Дубина Д. Ш., Матвеева А. Б. К оценке иммуотропной активности антибластных средств / Вопр. практ. онкол. Астрах. гос. мед. акад.— Астрахань, 1996.— С. 88—91.

8. Lyman G. H., Kuderer N., Greene J., Balducci L. The economics of febrile neutropenia: implications for the use of colony-stimulating factors / Eur. J. Cancer.— 1998.— V. 34.— P. 1857—1864.

9. Онкология 2000. Тезисы II съезда онкологов стран СНГ. (Украина, Киев, 23—26 мая 2000 г.) // Experim. Oncol.— 2000.— Vol. 22, Suppl.— P. 247—294.

10. Мосієнко В. С., Мосієнко М. Д., Савцова З. Д. та ін. Бластен — новий вітчизняний імуномодулятор біологічного походження // Журн. Акад. мед. наук України.— 1999.— Т. 5.— № 1.— С. 79—86.

11. Мосієнко В. С., Савцова З. Д., Менек Т. А. и др. Эффективность иммуномодулятора Бластен в профилактике и лечении лучевой и химической цитосупрессии // Имунология та алергологія.— 1999.— № 3.— С. 54.

12. Yalkut S. I., Varaboy V. A., Zhukova V. M., et al. Influence of low molecular thymic factors on postradiation and chemically induced cytosuppression in experiment // Experim. Oncol.— 1995.— V. 17.— N 2.— P. 145—151.

13. Савцова З. Д., Ковбасюк С. А., Юдина О. Ю. и др. Биологические эффекты у животных в связи с аварией на Чернобыльской АЭС. Сообщение 9. Морфофункциональное изучение некоторых иммунокомпетентных органов // Радиобиология.— 1991.— № 5.— С. 679—686.

14. Fisch H., Gifford G. In vitro production of rabbit macrophage tumor cell cytoxin // Int. J. Cancer.— 1983.— V. 32.— N 1.— P. 105—112.

15. Лимфоциты. Методы (под ред. Дж. Клауса).— Москва: Мир, 1990.— 395 с.

16. Hokland M., Heron I., Berg K. et al. Natural killer cell activity correlates with the amount of B₂-microglobulin on human periferal blood lymphocytes // Cell. Immunol.— 1982.— V. 72.— N 1.— P. 40—51.

17. Лакин Г. Ф. Биометрия.— Москва: Высш. школа, 1980.— 290 с.

18. Муксинова К. Н., Мурзина Л. Д., Ревина В. С. Повышение частоты индуцированных тритием лейкозов при повторном введении бактериального липополисахарида // Радиобиология.— 1990.— Т. 30.— Вып. 2.— С. 199—202.

19. Hallahan D. E., Heimovitz-Friedman A., Kufe D. W. et al. / Imp. adv. oncol.— 1993.— P. 71—80.

20. Neta R., Williams D., Selzer F., Abrams J. / Blood.— 1993.— V. 81.— N 2.— P. 324—327.

21. Рогачева С. А., Симбирцев А. С., Муксинова К. Н. Изучение противолучевого действия интерлейкина-1β в эксперименте // Рад. биол. Радиоэкология.— 1994.— Т. 34.— Вып. 3.— С. 419—423.

22. Holden R. J., Pakula I. S., Mooney P. A. An immunological model connecting the pathogenesis of stress, depression and carcinoma // Med. Hypotheses.— 1998.— V. 51.— N 4.— P. 309—314.

23. Возанов А. Ф., Бутенко А. К., Зак К. П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства.— Киев: Наук. думка, 1998.— 320 с.

24. Britten J., Heys S. D., Ross J., Eremin O. Natural killer cells and cancer // Cancer.— 1996.— V. 77.— N 7.— P. 1226—1243.

*Savtsova Z. D., Menyok T. A., Dzhaman N. I.,
Voyekova I. M., Kovbasyuk S. A., Mosienko V. S.*

DOSE-RESPONSE INFLUENCE
OF IMMUNOMODULATOR OF MICROBIO ORIGIN
ON THE DISCRETE PARAMETERS OF BLOOD
AND LYMPHOID ORGANS OF THE ANIMALS
IRRADIATED

The data showing the influence immunomodulator of microbic origin (Blasten) in the process of fractionated external gamma-irradiation are presented. To prevent the postradiation cytosuppression the optimum scheme of Blasten using was grounded by the results of investigations of peripheral blood, lymphoid organs, functional activity of macrophages (by production TNF and IL-1) and natural killer cells.