

УДК 60.615.2:616-006:616-092

О.Й. ГРИНЕВИЧ, докт. мед. наук, професор
 І.Г. МАРКОВИЧ, канд. мед. наук
 ДНУ «Державний центр інноваційних біотехнологій», Київ
 І.М. ВОЄЙКОВА, канд. біол. наук
 Г.П. ПОТЕБНЯ, докт. мед. наук
 Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ

ВПЛИВ ПРЕПАРАТІВ ZG-2011 ТА ZG-2012 НА ОКРЕМІ ПОКАЗНИКИ СИСТЕМИ ІМУНІТЕТУ В ІНТАКТНИХ МИШЕЙ BALB/C

Досліджено вплив препаратів ZG-2011 і ZG-2012 на окремі показники системи імунітету в інтактних мишей Balb/c. Показано, що препарати ZG-2011 і ZG-2012 чинять імуномодулюючу дію на імунну систему піддослідних тварин.

Патогенез більшості вірусних інфекцій складається з пошкоджуючого впливу вірусу на тропні тканини та відповідної реакції організму. Ретровірус роздвоює функції свого генетичного матеріалу: інфекційну функцію, тобто функцію самопоширення, виконує вірусна РНК, а функцію експресії вірусних генів і синтезу молекул РНК, які потім перенесуть генетичну інформацію до інших клітин, – вірусна ДНК. Ретровіруси викликають трансформацію заражених клітин і порушення імунітету, що призводить до злоякісних новоутворень і опортуністичних інфекцій [6, 10].

Незважаючи на велику кількість методів і засобів, спрямованих на лікування хворих на лейкемію, оптимального результату поки що досягти не вдалося, а багато з них (у т. ч. розробка протипухлинних засобів з імуномодулюючим ефектом) іще не впроваджені в клінічну практику або недостатньо широко використовуються, щоб можна було зробити однозначні висновки щодо їх ефективності.

Одним зі стратегічних напрямів імунотерапії пухлинної хвороби є створення препаратів біологічного походження для індукції ефективної імунної відповіді. Водночас одним з важливих підходів до з'ясування цих питань є оцінка імунотоксичного впливу таких засобів на організм інтактних тварин.

Мета роботи – порівняльне вивчення впливу принципово нових вітчизняних препаратів природного походження ZG-2011 і ZG-2012 на стан системи імунітету лабораторних тварин, у т. ч. окремих показників активності ефекторів протипухлинної резистентності організму, важливих для оцінки перебігу пухлинного процесу, зокрема ініційованого онкогенними вірусами.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Дію препаратів ZG-2011 та ZG-2012 вивчали на статевозрілих двомісячних мишах лінії Balb/c обох статей (самці масою $19,3 \pm 0,4$ г і самці – $20,6 \pm 0,5$ г) із віварію Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України. Враховуючи спрямованість дії препаратів, які вивчалися, для досліджень було вибрано лінію мишей Balb/c (H-2d) [8], оскільки частота пухлин молочних залоз у них низька (до 5%), а пухлини легень виникають у 25–30% тварин. Миші цієї лінії сприйнятливі до хронічної пневмонії й дуже чутливі до онкогенних ретровірусів.

Тварин утримували й досліджували відповідно до загальноприйнятих міжнародних правил з біологічної етики та виконання робіт з експериментальними тваринами [3, 7]. Використовували здорових лабораторних мишей,

які до початку експерименту впродовж 14 діб знаходилися в умовах карантину. Надалі тварин утримували в приміщенні з постійною температурою на збалансованому харчовому раціоні. За 2 год перед зважуванням і відбором їх не годували й не напували. Мишей було розділено на три групи: група 1 – контроль (ін'єкції фізіологічним розчином NaCl); група 2 – тварини, яким робили ін'єкції препарату ZG-2011; група 3 – тварини, яким робили ін'єкції препарату ZG-2012. Контролем для групи 1 слугували інтактні миші.

Режим уведення препаратів або стерильного фізіологічного розчину:

- 1-ша доба – $0,01 \text{ см}^3$ внутрішньошкірно;
- 2-га доба – $0,02 \text{ см}^3$ внутрішньошкірно;
- 3-тя доба – $0,03 \text{ см}^3$ підшкірно;
- 4-та доба – $0,1 \text{ см}^3$ підшкірно;
- 5–14-та доба – перерва між уведеннями;
- 15-та доба – $0,01 \text{ см}^3$ внутрішньошкірно;
- 16–17-та доба – перерва між уведеннями;
- 18-та доба – $0,2 \text{ см}^3$ підшкірно.

Забір імунокомпетентних органів проводили на 10-ту й 32-гу добу після початку введення препаратів або фізіологічного розчину. Можливі імунотоксичні прояви препаратів ZG-2011 і ZG-2012 оцінювали за зміною загальної маси тварин та маси й клітинності (загальна й питома) імунокомпетентних органів: тимуса, селезінки, лімфатичних вузлів, відсотка життєздатності клітин цих органів. Зміни показників



периферичної крові оцінювали на автоматичному гемоаналізаторі PCE-210. Визначали абсолютний вміст лейкоцитів, тромбоцитів, еритроцитів, абсолютний і відносний вміст лімфоцитів, моноцитів, гранулоцитів, рівень гемоглобіну. Вплив препаратів на ефекторні реакції неспецифічного імунітету оцінювали за допомогою реакцій лімфоцитів лімфовузлів на введення поліклональних Т-клітинного (Конканавалін А, «Sigma», США) та В-клітинного (ЛПС *S. typhimurium*, «Sigma», США) мітогенів в МТТ-тесті. Різні прояви функціональної активності перитонеальних макрофагів оцінювали за рівнем цитотоксичної (МТТ-тест) та цитохімічної (НСТ-тест) активності перитонеальних макрофагів (МФ) [1, 2, 9, 11]. Рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові мишей визначали в реакції осадження: високомолекулярних ЦІК – з використанням 3% поліетиленгліколю (ПЕГ), середньомолекулярних – 4,5% ПЕГ, низькомолекулярних – 6% ПЕГ [4]. Результати досліджень обробляли статистично з використанням t-критерію Стьюдента. Вірогідність отриманих результатів оцінювали при довірчому інтервалі ($P < 0,05$) [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У ході дослідження було встановлено, що введення мишам фізіологічного розчину не приводило до жодних відхилень від інтактного контролю.

Як видно з табл. 1, коливання значених показників у той чи інший бік відбувалось у межах фізіологічної норми й не супроводжувалось статистичною вірогідністю, що дозволило групі 1 використовувати надалі як адекватний контроль під час вивчення ефектів вищезазначених препаратів.

Для оцінки можливої токсичної дії препаратів ZG-2011 і ZG-2012 було досліджено вплив їх курсової дози на масу тіла тварин (див. табл. 2) [9].

Згідно з даними табл. 2 уведення мишам групи 3 препарату ZG-2012 супроводжувалося, порівняно з групою 1, суттєвим зниженням маси тіла тварин (самиць і самців) вже на 10-ту добу від початку лікування ($IM = -26,5$ і $-24,3\%$ відповідно, $P < 0,05$), яке зберігалось також у віддалені строки спостереження (14-та доба після останньої ін'єкції препарату, 32-га доба від початку лікування) ($IM = -22,9$ і $-19,6\%$ відповідно, $P < 0,05$). Застосування ZG-2011 мишам групи 2 в наведені строки спостережен-

ня не приводило до втрати маси експериментальними тваринами Balb/c, однак його ін'єкції супроводжувалися больовим синдромом.

Ще одним проявом можливого токсичного впливу будь-яких засобів є зміни в клітинному складі периферичної крові тварин.

Як видно з табл. 3, після закінчення повного курсу (14-та доба після останньої ін'єкції, 32-га доба від початку лікування) жоден із препаратів не викликав статистично суттєвих змін з боку досліджуваних показників периферичної крові тварин, що свідчить про відсутність ознак токсичного або запального процесів. Лише в самиць групи 3 після чотирьох ін'єкцій препарату ZG-2012 (10-та доба від початку дослідження) спостерігали суттєве зниження кількості лейкоцитів, яке відбувалося за рахунок зменшення загальної кількості лімфоцитів і моноцитів, та це явище мало транзиторний характер і не впливало на загальний стан тварин.

Ще одним завданням доклінічного дослідження імунотоксичності потенційних лікарських засобів є вивчення небажаних реакцій імунної системи у відповідь на їх дію.



Таблиця 1 – Зміни маси тварин і маси та клітинності імунокомпетентних органів у мишей лінії Balb/c (самиць і самців), щодо яких застосовували фізіологічний розчин за схемою введення препаратів, які вивчалися

Показник	Миші лінії Balb/c контрольних груп (32-га доба від початку експерименту)			
	самиці		самці	
	інтактний контроль n=6	група 1 (NaCl) n=6	інтактний контроль n=6	група 1 (NaCl) n=6
Маса тварин, г	24,26±0,41	24,45±0,15	25,32±0,35	25,00±0,30
Питома вага ¹ :				
тимуса	5,11±0,54	5,83±0,53	6,99±0,90	7,57±2,50
селезінки	1,72±0,61	3,08±0,19	1,43±0,40	2,08±0,92
лімфовузлів	1,92±0,25	2,04±0,17	1,98±0,09	1,89±0,07
печінки	28,37±8,54	33,87±17,38	30,0±7,50	33,36±12,72
Клітинність на 1 мг маси органа ² :				
тимуса	1,5±0,2	1,41±0,11	1,30±0,10	1,31±0,25
селезінки	1,15±0,15	0,96±0,07	1,78±0,22	1,79±0,15
лімфовузлів	1,16±0,25	1,59±0,07	1,26±0,19	1,06±0,07
Проліферативна активність лімфоцитів ЛВ:				
спонтанна	0,273±0,081	0,136±0,036	0,424±0,015	0,413±0,003
індукована Кон А	0,517±0,076	0,440±0,058	0,498±0,040	0,643±0,021
індукована ЛПС	0,158±0,018	0,176±0,016	0,257±0,097	0,424±0,015
Клітинність перитонеальних МФ	6,6±0,6	6,20±0,50	4,6±0,5	5,45±0,95
Цитотоксична активність МФ	44,3±1,0	39,4±1,0	43,2±1,0	41,7±1,8
Активність МФ в НСТ-тесті	0,609±0,024	0,623±0,020	0,631±0,015	0,640±0,028

¹ Питома вага = маса органа (мг)/маса тіла тварини (г).

² Клітинність на 1 мг маси органа = загальна кількість лімфоцитів (×106)/маса органа (мг).

Таблиця 2 – Вплив препаратів ZG-2011 та ZG-2012 на показники маси мишей Balb/c

Стать	Маса					
	10-та доба після початку досліджу			32-га доба від початку лікування		
	група 1 (NaCl)	група 2 (ZG-2011)	група 3 (ZG-2012)	група 1 (NaCl)	група 2 (ZG-2011)	група 3 (ZG-2012)
Самиці	24,1±0,7	23,6±0,4	17,7±0,7 ^{1,2}	24,45±0,15	20,35±0,05	18,80±1,8 ¹
Самці	25,5±0,6	26,5±0,5	19,3±0,5 ^{1,2}	25,00±0,30	21,40±1,90	20,10±0,10 ¹

¹ P<0,05 порівняно з групою 1 (NaCl); ² P<0,05 порівняно з групою 2 (ZG-2011)

Таблиця 3 – Результати дослідження гематологічних показників у мишей лінії Balb/c (самців і самиць) на 14-ту добу після закінчення повного курсу препаратів ZG-2011 і ZG-2012 (32-га доба від початку досліджу)

Показник	14-та доба після останньої ін'єкції або 32-га доба від початку досліджу					
	самці			самиці		
	група 1 (NaCl)	група 2 (ZG-2011)	група 3 (ZG-2012)	група 1 (NaCl)	група 2 (ZG-2011)	група 3 (ZG-2012)
Лейкоцити, ×10 ⁹ /л	7,5±3,6	13,7±0,4	6,8±3,7	6,4±1,9	7,3±1,6	7,5±0,1
Еритроцити, ×10 ¹² /л	11,3±2,1	12,5±2,8	11,8±0,9	12,2±0,4	12,3±1,0	10,2±0,6
Тромбоцити, ×10 ⁹ /л	451,5±72,8	699,0±195,2	443,0±186,7	403,5±13,4	439,5±113,8	478,0±4,2*
Гемоглобін, г/л	168,2±25,2	183,5±38,9	166,50±4,9	178,0±4,2	173,0±16,9	157,5±3,5*
Лейкоцитарна формула:						
Лімфоцити, ×10 ⁶ /л	4,3±1,6	8,9±2,5	5,00±2,7	4,7±1,4	5,4±1,0	6,3±0,3
Моноцити, ×10 ⁶ /л	2,0±0,7	2,6±1,3	0,85±0,4	0,7±0,2	0,9±0,3	0,7±0,1
Гранулоцити, ×10 ⁶ /л	1,7±0,8	2,2±0,8	0,95±0,5	0,9±0,3	1,1±0,23	0,8±0,1
Лімфоцити, %	58,9±7,8	65,3±16,4	73,55±0,4	75,0±1,4	73,8±2,9	81,2±1,40*
Моноцити, %	19,0±8,0	18,8±10,3	12,35±0,6	11,8±0,2	11,3±2,3	7,7±0,4*
Гранулоцити, %	22,07±0,2	16,0±6,2	14,10±0,3*	14,2±0,3	15,0±0,6	11,6±0,5

* Різниця з відповідним показником групи 1 (NaCl) статистично вірогідна (P<0,05)



Із рис. 1 видно, що введення мишам групи 2 повного курсу препарату ZG-2011 призводило до значного збільшення маси селезінки й лімфатичних вузлів – на 84 і 37,2% відповідно порівняно з контролем (група 1), $P < 0,05$. Такі зміни супроводжувалися зниженням маси тимуса (з одночасним підвищенням його клітинності), що свідчить про модулюючий ефект препарату. При застосуванні препарату ZG-2012 можна відзначити таку ж тенденцію впливу на імунокомпетентні органи, але вираженість цих змін була меншою (див. рис. 2).

Досить інформативним є вивчення впливу досліджуваних препаратів на проліферативні властивості лімфоцитів тварин. Проліферація імунокомпетентних клітин як основний етап ефекторної реакції імунної системи дає змогу охарактеризувати стан клітинного імунітету.

Під час дослідження імунологічних показників було показано, що в мишей групи 1 спонтанна проліферативна активність лімфовузлів становила $0,15 \pm 0,02$ ум. од., мітоген-індукована для Кон А – $0,45 \pm 0,04$; для ЛПС – $0,21 \pm 0,04$ ум. од.

Вивчення показників проліферативної активності лімфоцитів периферичних лімфовузлів мишей (самиць і самців) виявило, що препарати ZG-2011 і ZG-2012 мали вірогідний вплив ($P < 0,05$) як на спонтанну, так і на індуковану Кон А і ЛПС, проліферативну активність лімфоцитів периферичних ЛВ у бік суттєвого підвищення (для ZG-2011: $+168,0$, $+15,3$ і $+72,3\%$ відповідно, $P < 0,05$; для ZG-2012: $+181,3$, $+39,1$ і $+95,0\%$ відповідно, $P < 0,05$), що може свідчити про гіперактивацію В-клітинної ланки системи імунітету.

Враховуючи доведену на сьогодні здатність імунної системи до активації під час розвитку її компенсаторної реакції на лімфотоксичне порушення, можна припустити, що одним з механізмів дії препаратів є індукція компенсаторно-адаптаційних змін з боку Т- і В-системи імунітету, які вказують на можливість розвитку алергічних або аутоімунних процесів у відповідь на вплив досліджуваних препаратів.

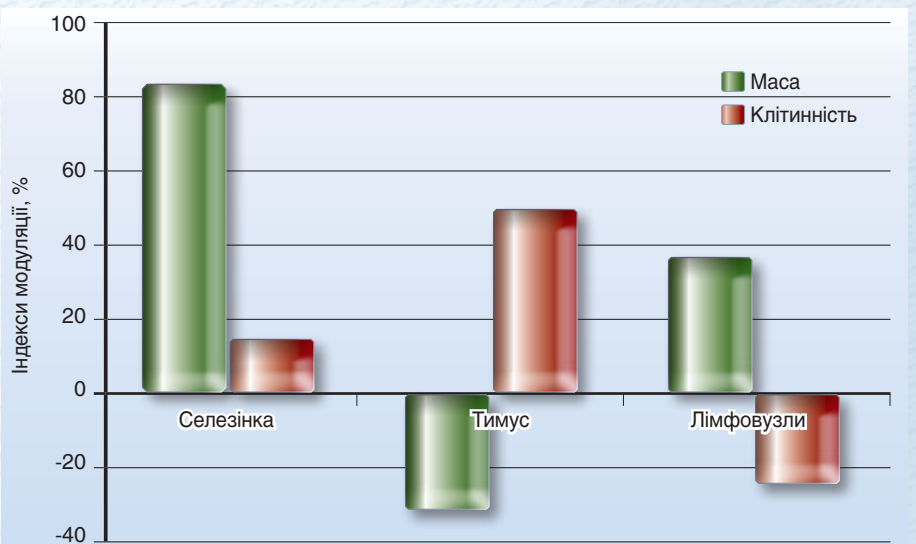


Рис. 1. Зміни маси й клітинності імунокомпетентних органів мишей групи 2 лінії Balb/c після повного курсу препарату ZG-2011 порівняно з тваринами групи 1

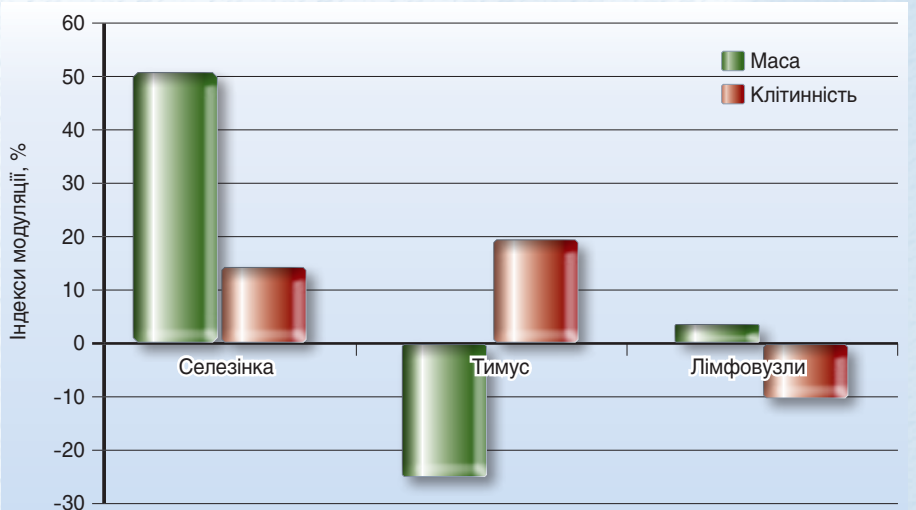


Рис. 2. Зміни маси й клітинності імунокомпетентних органів мишей групи 3 лінії Balb/c після повного курсу препарату ZG-2012 порівняно з тваринами групи 1

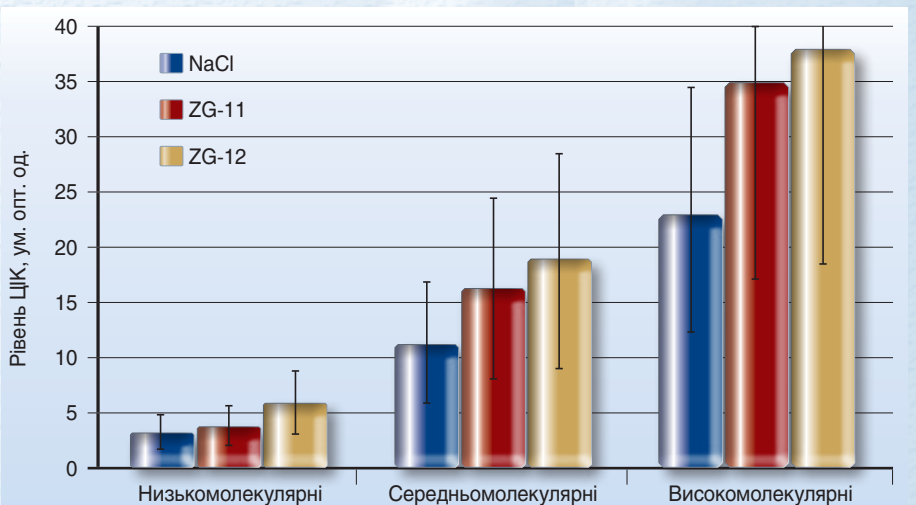


Рис. 3. Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові мишей лінії Balb/c у відповідь на введення препаратів ZG-2011 і ZG-2012 (14-та доба після закінчення курсу)

УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПЛАТА НА ЖУРНАЛ НА 2014 РІКІ

Оскільки в регуляції й реалізації реакцій неспецифічної імунної відповіді, в т. ч. протипухлинного імунітету, важливу роль відіграють також клітини моноцитарного походження (макрофаги), наступним етапом дослідження стало вивчення впливу препаратів ZG-2011 і ZG-2012 на різні прояви функціональної активності макрофагів.

Показники активності макрофагів (МФ), які були виділені від мишей з групи 1, охарактеризовані за рівнем цитотоксичної активності МФ щодо клітин К-562 ($40,5 \pm 1,9$ ум. опт. од.) і показником цитохімічної активності в НСТ-тесті з використанням нітросинього тетразолію ($0,63 \pm 0,03$ ум. опт. од.).

Встановлено, що при застосуванні повного курсу препарату ZG-2011 у мишей лінії Balb/c (самці й самиці) не спостерігали суттєвих змін з боку активності МФ як щодо клітин-мішеней К-562, так і в реакції НСТ-тесту порівняно з тваринами групи 1. Тоді як ZG-2012, за даними НСТ-тесту, мав здатність збільшувати цитохімічний показник активності макрофагів на $+31,4\%$ ($P < 0,05$ порівняно з групою 1), що свідчить про збереження їх бактеріцидної функції через здатність до киснезалежного кілінгу, й може розглядатись як критерій їх здатності до завершеного фагоцитозу. Цей механізм реалізується через активацію спеціального ферменту НАДФ-оксидази, який веде до появи у фагоциті активних форм кисню. У той же час гіперактивація показника НСТ-тесту може свідчити про початковий період гострих бактеріальних інфекцій, гнійно-запальних процесів, а його зниження – про хронічний перебіг інфекційного процесу.

Оцінка рівнів циркулюючих імунних комплексів показала, що в мишей групи 1 рівні ЦІК становили: низькомолекулярні – $3,2 \pm 1,2$ ум. опт. од., середньомолекулярні – $11,2 \pm 2,4$, високомолекулярні – $22,9 \pm 5,1$ ум. опт. од. Як видно з рис. 3, введення препаратів ZG-2011 та ZG-2012 не приводило до статистично вірогідного підвищення кількості низько-, середньо- та високомолекулярних ЦІК порівняно з відповідним показником інтактного контролю через широкі межі індивідуальних коливань.

Відсутність вірогідних змін рівня середньомолекулярних ЦІК після введення досліджуваних препаратів є додатковим свідченням відсутності розвитку запального процесу внаслідок проведення курсу препаратів.

Рівень низькомолекулярних ЦІК також перебував у межах контролю NaCl, тобто імунізація не приводила до синтезу неповних або моновалентних антитіл, які, зав'язуючись із антигеном, не спричиняють його елімінації, а, навпаки, екранують від повноцінної атаки імунної системи [1].

ВИСНОВКИ

1. Проведені дослідження засвідчили, що обидва препарати не є токсичними, не викликають розвитку запальних або алергічних процесів і виявляють певний імуномодуючий ефект (більшою мірою це стосується ZG-2011).

2. Отримані результати дають підставу сформуванню погляду на вірогідний механізм дії ZG-2011 і ZG-2012, який певним чином ґрунтується на індукції компенсаторно-адаптаційних змін з боку Т-, В- і макрофагальної ланки системи імунітету внаслідок дії препаратів.

3. У той же час для узагальненої оцінки імуномодулювальної дії даних агентів, на нашу думку, доцільно дослідити їх вплив на організм тварин на тлі розвитку пухлинного процесу або за умов перебігу експериментальних інфекцій, які є інтегральними критеріями функціонування імунної системи як єдиного цілого.

СПИСОК

ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Дворченко О.С. Моделювання ксеногенних клітинних систем на твердих фазах з використанням пухлиноасоційованих та ембріональних антигенів і їх застосування в протипухлинній терапії / О.С. Дворченко, Г.В. Діденко, О.І. Чередарчук та ін. // Доп. НАН України. – 2007. – № 12. – С. 155–161.
2. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.

3. Кожем'якін Ю.М. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю.М. Кожем'якін, О.С. Хромов, М.А. Філоненко та ін. – К., 2002. – 179 с.
4. Костржевская Е.Г. Циркулирующие IgG-содержащие комплексы при злокачественном росте / Е.Г. Костржевская // Эксперим. онкол. – 1986. – № 3. – С. 10–17.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 293 с.
6. Лихтенштейн А.В. Канцерогенез: эволюция представлений / А.В. Лихтенштейн // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – № 4. – С. 437–447.
7. Медведев Н.Н. Линейные мыши (справочное руководство) / Н.Н. Медведев. – Л.: Медицина, 1964. – 179 с.
8. Передерий В.Г. Иммуный статус, принципы его оценки и коррекции иммунных нарушений / В.Г. Передерий, А.М. Земсков, Н.Г. Бычкова, В.М. Земсков. – К., 1995. – С. 61–62.
9. Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) / О.В. Стефанов. – К.: Авіцена, 2001. – 527 с.
10. Boccardo E. Viral origins of human cancer / E. Boccardo, L.L. Villa // Curr. Med. Chem. – 2007. – Vol. 14. – Issue 24. – P. 2526–2539.
11. Frederick M. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages / M. Frederick, R. Halvor, S.F. Stig // APMS. – 1989. – Vol. 97. – P. 490–496.

Одержано 29.07.2013

Влияние препаратов ZG-2011 И ZG-2012 на отдельные показатели системы иммунитета у интактных мышей Balb/c. А.И. Гриневич, И.Г. Маркович, Г.П. Потеня, И.М. Воейкова

Исследовано влияние препаратов ZG-2011 и ZG-2012 на отдельные показатели системы иммунитета у интактных мышей Balb/c. Показано, что препараты ZG-2011 и ZG-2012 проявляют иммуномодулирующее действие на иммунную систему подопытных животных.

Effect of drugs ZG-ZG-2011 and 2012 on some indices of immune system in intact mice Balb/c. O.I. Grynevych, I.G. Markovych, G.P. Potebnya, I.M. Voeykova

The influence of drugs ZG-ZG-2011 and 2012 on some indices of immune system in intact mice Balb/c. It is shown that drugs ZG-ZG-2011 and 2012 show a stimulating effect on the immune system of experimental animals. ☉