

ВЛИЯНИЕ НА ИММУНИТЕТ НОВОГО ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА КОЛХИПРИТА-НЕО

Еникеева З.М., Уразов Н.Э., Ибрагимов Ш.Н., Залялиева М.В.
Республиканский специализированный научно-практический медицинский центр
Онкологии и Радиологии МЗ РУз,
Институт иммунологии и геномики человека Ан РУз

XULOSA

Kolxiprit-neo shishga qarshi preparatini o'tkazgan tadqiqotlar immune statusi parametrlari darajasi va nisbatiga ijobiy ta'sir ko'rsatdi. 100 mg/kg dozada per os kiritilgan kolxiprit o'simliklardagi AOK sonini nazorat guruhiga nisbatan oshiradi. Preparat joriy etilgach, immun javobning samarali bosqichida o'tkazilgan limfotsitlarning yuzaki retseptorlari tadqiqotlari shuni ko'rsatdiki, Kolxiprit-neo o'rganilgan barcha yuzaki reseptorlarni 1,1 dan 1,56 martagacha stimulyatsiya qilishga sabab bo'lgan.

Kalit so'zlar: yangi kolxiprit-neo preparati, immunomodulyatsiya qiluvchi ta'sir, sarkoma 180.

Создание и последующий анализ противоопухолевых препаратов является одним из приоритетных направлений современной иммунофармакологии.

Большинство противоопухолевых препаратов, применяемых для лечения онкологических больных, оказывают заметное иммуносупрессивное действие. Однако имеются примеры веществ с иммуномодулирующим и противоопухолевым действием, это тилорон и леакадин, но их противоопухолевый эффект слабо выражен; противоопухолевым и иммуномодулирующим действием обладают некоторые каротиноиды - природные липофильные пигменты растительного происхождения [1,2]. Известен китайский препарат карнглайт, обладающий выраженным противоопухолевым и иммуномодулирующим действием [3]. Также примером веществ, вызывающих стимуляцию иммунной системы после проведенного лечения в высоких терапевтических дозах, явились новые хлорэтиламинные производные колхицина: К-42 и К-48, полученные в РСНПМЦОиР МЗ РУз [4]. Особенностью же препарата К-48, кроме того, была стимуляция АОК особенно выраженная при применении дозы 1 мг/кг, причем оказалось, что эта доза обладает и противоопухолевым эффектом. Было выявлено у ряда новых веществ, и в наибольшей степени у К-48, способности к выраженной индукции стволовых клеток, позволившее сделать предположение, что этот препарат не только не ингибирует клетки костного мозга, но и продуцирует их к интенсивному размножению, которое в дальнейшем приводит к последующему образованию иммуно- и гемопоэтических клеток, что несколько проясняет феномен получения противоопухолевого препарата с

SUMMARY

Studies of the anticancer drug Colchiritis-neo showed its positive effect on the level and ratio of immune status parameters. Colchiritis - administered orally at a dose of 100 mg/kg increases the amount of AOC in tumor carriers compared to the control group with a simultaneous increase in spleen weight. Studies of surface receptors of lymphocytes carried out in the productive phase of the immune response after administration of the drug showed that Colchirite -neo caused stimulation of all studied surface receptors from 1.1 to 1.56 times.

Keywords: new drug colchiprit-neo, immunomodulatory effect, sarcoma 180.

отсутствием иммуносупрессивных свойств и не воздействующего негативно на костный мозг.

В настоящей работе проведено исследование иммунологического действия производного колхицина колхиприта-нео (так назван препарат К-20, введенный перорально) путем определения численности антителообразующих клеток (АОК), а также используя моноклональные антитела после 10-кратного внутривентриального и перорального введения этого вещества в терапевтической дозе животным с перевивным штаммом Саркома-180. **ЦЕЛЬ РАБОТЫ** - найти отличия в иммунологическом действии этого препарата, введенного в терапевтических дозах при разных способах введения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования был препарат колхиприт-нео, синтезированный из колхицина в РСНПМЦОиР МЗ РУз.

1. Изучение иммунологического действия соединений проводили на беспородных мышцах с перевивным опухолевым штаммом Саркома 180 путем определения численности антителообразующих клеток (АОК) в селезенке с помощью метода локального гемолиза эритроцитов по Erne и Nordin, (1963) в модификации [5]. После 8-кратного внутривентриального введения исследуемых веществ в терапевтических дозах, на 15-е сутки после перевивки опухоли, животных иммунизировали 2×10^8 отмытыми эритроцитами барана путем введения в хвостовую вену в объеме 0,5 мл. Через 4 дня после введения антигена животных забивали декапитацией, извлекали селезенку, взвешивали и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе в растворе Хенкса (pH 7,2-

7,4). Взвесь клеток профильтровывали через 2 слоя капронового фильтра. К 0,1 мл взвеси добавляли 0,1 мл (2×10^8) эритроцитов барана и 2,5 мл агара фирмы Difco (0,8%). Смесь тщательно перемешивали и выливали в чашки Петри. Содержимое чашек инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После этого добавляли 4 мл сухого комплемента морской свинки, разведенного в 5 раз 0,9% раствором хлористого натрия и реинкубировали еще 1 час. В чашках подсчитывали количество АОК, которые определяли по наличию зон гемолиза и рассчитывали на весь объем селезенки.

2. Для изучения показателей иммунного статуса в системе *in vivo* проводили изучение показателей иммунного статуса в циркулирующей крови и селезенке в день забоя, используя моноклональные антитела, согласно методическим рекомендациям Института иммунологии РФ [6]. Забой проводили путем декапитации, когда начали погибать животные-опухоленосители контрольной группы (К-1). Исследования включали подсчет количества лейкоцитов и общих лимфоцитов, лимфоциты выделяли из 4-5 мл гепаринизированной периферической крови по Воупм (1968 г.) на градиенте плотности фиколл-верографин

(1,077 г/л), определение количества общих лимфоцитов, фенотипирование лимфоцитов осуществляли с помощью метода непрямого розеткообразования с использованием моноклональных антител производства ООО «СОРБЕНТ» РФ (CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD19+, CD95+), входящих в панель основных CD-маркеров для определения Т-лимфоцитов, Т-хелперов/индукторов, натуральных киллеров, Т-цитотоксических /супрессоров, В-лимфоцитов и рецепторов апоптоза соответственно.

ПОЛУЧЕННЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ показали, что новое соединение проявляет различное действие на численность АОК в селезенке: введенный внутривенно в дозе 4 мг/кг К-20 значительно, почти вдвое, снижает этот показатель (8.300 -К-20; 14.000 -контроль) по сравнению с контрольной группой с одновременным угнетением массы селезенки. Введенный же перорально в дозе 100 мг/кг К-20, напротив, повышает количество АОК у опухоленосителей (17.000 АОК на селезенку). При этом значительно увеличивается масса селезенки по сравнению как с контролем, так и с К-20, введенным внутривенно (таблица 1).

Таблица 1

Влияние соединений на численность АОК в селезенке у животных-опухоленосителей

Группа, способ введения	Доза мг/кг	Ср. масса опухоли	% тормож. роста опухоли	Ср. масса селезенки мг	Абс. число АОК
Контроль	-	460,0±22,1*	-	116,7±4,15	14000±705,0
К-20(в/б)	4,0	48,3±2,15*	89,5	110,3±4,75*	8300±314*
К-20 (per os)	100,0	83,3±3,05*	81,9	136,6±8,2*	17000±720*

Далее была проведена оценка иммуномодулирующей активности колхиприта-нео после лечения им мышей с Саркомой 180, проводили изучение экспрессии рецепторов иммунокомпетентных клеток (ИКК) в селезенке в день забоя после лечения им мышей с Саркомой 180, которым начали вводить препарат через 3 дня после перевивки опухоли. Забой животных был осуществлен на 7-ой день после последнего

введения препаратов. 1-ой контрольной группе вводили физиологический раствор. 2-ой группе вводили 10-кратно колхиприт-нео в дозе 100 мг/кг (суммарная доза 1000мг/кг), который вызвал значительное торможение роста опухоли 92/90%. Масса тела в этой группе была выше исходной на 13%, масса селезенки превышала массу селезенки в контроле на 10%. (таблица 2).

Таблица 2

Противоопухолевая активность препаратов на штамме С-180 (лечение с 3 дня после перевивки опухоли: 10 введений веществ)

Группы животных, дозы (мг/кг) и кол-во введений	Масса животных до опыта,(г)	Масса животных после опыта,(г)	Масса опухоли (г)	Объем опухоли, (см3)	% ТРО V/M	Масса селезенки (мг)
1. контроль	22,3±0,8	24,0±0,8	2,1±0,31	2,6±0,3		318±29
2. колхиприт-нео (100-10-кр)	24,5± 1,8	27,7± 2,6	0,2±0,1*	0,21 ±0,08 *	92/90	350±58

Примечание: в группах лечения n=6, в контроле n=8; * различия статистически достоверны в сравнении с контролем при P<0,05.

Исследования экспрессии поверхностных рецепторов лимфоцитов были проведены на 17 день после введения колхиприта-нео (продуктивная фаза иммунного ответа). Препарат вызывал стимуляцию экспрессии всех изученных поверхностных рецепторов. Отмечен широкий размах индивидуальных значений, что вызвано беспородностью мышей.

Несмотря на рост экспрессии рецепторов Т-лимфоцитов (CD3, CD4, CD8) в 1,1-1,15-1,3 раза (табл. 3), достоверного отличия данных опытной группы относительно контрольной нами не выявлено (p>0,05). Тем не менее, эти результаты позволяют сделать вывод, что применение колхиприта-нео вызывает стимуляцию Т-клеточного звена иммуни-

тета. Известно, что опухоли вызывают инволюцию тимуса, снижают пролиферацию и дифференцировку тимоцитов, ограничивают выработку противоопухолевого иммунного ответа. Стимуляция экспрессии рецепторов CD8+Т-лимфоцитов является доказательством синтеза цитокинов (ИФН- γ , ФНО- α), которые стимулируют естественные киллерные клетки –ЕКК - (CD16). Действительно, на 17 день после начала применения противоопухолевого препарата с

высокой степенью достоверности увеличилось количество ЕКК, экспрессирующих CD16 поверхностные рецепторы. Кроме того, наблюдался рост В-клеток (CD19), ответственных за гуморальный иммунитет, выработку антител, направленных против опухоли. Увеличивался процент клеток с рецепторами апоптоза (CD95) почти в 2 раза, что является показателем индукции гибели опухолевых клеток путем апоптоза.

Таблица 3

Средние показатели некоторых параметров иммунитета у мышей в контроле и в эксперименте

	CD3	CD4	CD8	CD16	CD19	CD95
Контроль	40,7 \pm 2,3	48,7 \pm 3,3	42,3 \pm 3,9	49,3 \pm 1,45	37,3 \pm 1,2	39,3 \pm 6,0
Колхиприт-нео	44,75 \pm 5,5	56,25 \pm 6,2	55,25 \pm 5,5	59,5 \pm 0,5**	58,25 \pm 5,7	57,5 \pm 6,7*

Примечание: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,001$.

Таким образом, применение противоопухолевого препарата колхиприта-нео стимулирует клеточные и гуморальные факторы иммунного ответа, направленные на уничтожение опухоли, что имеет большое значение для дальнейшего испытания применения его у онкологических больных. Учитывая рост заболеваемости и летальности от онкологии (7), новый препарат представляет интерес для лечения злокачественных процессов.

Известно, что противоопухолевые препараты в зависимости от дозы и времени введения могут и подавлять, и стимулировать иммунный ответ. Однако, как правило, многократное введение противоопухолевого препарата вызывает значительную или полную иммунодепрессию, а также подавляют гемопоэз. Проведенные же нами исследования противоопухолевого препарата колхиприта-нео показали его положительное воздействие на уровень противоопухолевого ответа.

Таким образом, 2-мя методами показано, что препарат колхиприт-нео стимулирует иммунитет как путем определения численности антителообразующих клеток (АОК) в селезенке с помощью метода локального гемолиза эритроцитов по Erne и Nordin, так и с помощью моноклональных антител.

Было показано, что показатели иммунитета повышаются за счет стимуляции Т-клеточного звена иммунитета, роста В-клеток (CD19), ответственных за гуморальный иммунитет, выработку антител, направленных против опухоли и почти в 2 раза увеличения процента клеток с рецепторами апоптоза (CD95), что является показателем индукции гибели опухолевых клеток путем апоптоза

Таким образом, К-20 при пероральном введении, названный колхиприт-нео, является веществом, способным, наряду с высокой противоопухолевой активностью, стимулировать иммунитет в терапевти-

ческой дозе.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гарин А.М., Личиницер М.Р, Дмитриева Н.В. и др. Биологические эффекты леакадина. // Вопросы онкологии - 1988.- т. XXXIY.- №2.- С. 192- 195.
2. Дейчман Г.И. Современные концепции иммунологических взаимоотношений опухоли и организма // В кн.: Опухолевый рост как проблема биологии развития. - М.: Наука.-1989.-С.208-230.
3. Руководство по химиотерапии рака. // Дабурфарма, 4 изд-е, стр.224–232
4. Еникеева З.М., Баленков О.Ю., Алиева Д.А., Агзамова Н.А., Ибрагимов А.А. Изучение воздействия на иммунную систему препаратов Дэкцин, К-42 и К-48. /МатериалыУШ Всероссийского съезда онкологов. Том 1, приложение к №3 - 2013, том 59 Vol.59, 11-13 сент. 2013, С-Петербург, РФ. - С.59
5. Лефковитс И., Козенца У. Исследование антителообразующих клеток методом локального гемолиза в геле // Методы исследования в иммунологии / Под ред. И.Лефковитса, Б.Перниса. - М. -1981. -С.288-289.
6. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. / Составители Е.М.Трещалина, О.С.Жукова, Г.К.Герасимова, Н.В.Андропова, А.М.Гарин в кн. «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Под общей ред. Р.У.Хабриева. Москва, 2005, с.637-682.
7. Тилляшайхов М.Н., Ибрагимов Ш.Н., Джанклин С.М. Онкологическая служба республики Узбекистан:Анализ заболеваемости и смертности // Онкологический журнал 2021 т. 15, С 74-80