

УДК 616.155.3: 577.161.3:615.33

АНТИОКСИДАНТЫ КАК КОРРЕКТОРЫ ДАПСОН-ИНДУЦИРОВАННЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ**¹Лужнова С.А., ²Ясенявская А.Л., ²Самотруева М.А.**¹ФГБУ «Научно-исследовательский институт по изучению лепры» Минздрава России, Астрахань;²ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, Астрахань, e-mail: s.luzhnova@yandex.ru

В эксперименте на 360 белых нелинейных крысах-самцах 3-х возрастных групп проведено исследование влияния дапсона на гуморальное (РПГА) и клеточное (РГЗТ) звенья иммуногенеза, процессы пролиферации в иммунокомпетентных органах (тимус, селезенка) и формулу крови. Показано формирование иммуносупрессивных нарушений, проявляющихся ингибированием антителообразования, клеточной реакции иммуногенеза, а также пролиферативных процессов: снижения числа тимоцитов, спленоцитов, общего количества лейкоцитов периферической крови; изменением лейкоцитарной формулы. Особенно сильно неблагоприятному воздействию препарата подвержены особи старшей возрастной группы. Антиоксиданты α -токоферол и эмоксипин, применяемые в комбинации с дапсоном, препятствуют формированию неблагоприятных реакций со стороны иммунной системы, предотвращая или уменьшая нежелательные изменения. Полученные данные указывают на наличие у данных веществ выраженных иммуномодулирующих свойств, что может быть использовано для оптимизации терапии дапсоном.

Ключевые слова: дапсон, альфа-токоферол ацетат, эмоксипин, иммунная система, коррекция**ANTIOXIDANTS AS THE CORRECTORS OF DAPSONE-INDUCED CHANGES OF THE INDICATORS OF IMMUNE SYSTEM****¹Luzhnova S.A., ²Yasenyavskaya A.L., ²Samotrueva M.A.**¹Leprosy Research Institute, Astrakhan;²Astrakhan state medical academy, Astrakhan, e-mail: s.luzhnova@yandex.ru

In our experimental work on 360 white nonlinear male rats of 3 age groups the effect of dapsone on the humoral and cellular immunogenesis, processes of proliferation in organs of immune system (thymus, spleen) and blood formula were investigated. The formation immunosuppressivnyh disorders manifested by inhibition of antibody production, cellular reaction immunogenesis, and proliferative processes: reducing the number of thymocytes, splenocytes, the total number of peripheral blood leukocytes; change leukocyte. The formation of immunosuppression is manifested by inhibition of antibody production, cellular reaction of immunogenesis, and proliferative processes: reducing the number of thymocytes, splenocytes, the total number of peripheral blood leukocytes; change of leukocyte formula. Particularly strong adverse effects of the dapsone are in the older age group. Antioxidants α -tocopherol and emoxipin were used in combination with dapsone. Antioxidants prevent the formation of adverse reactions in the immune system. These data indicate that antioxidants have expressed immunomodulatory properties and can be used to optimize therapy of dapsone.

Keywords: dapsone, alpha-tocopherol acetate, emoxipine, immune system, correction

В последние десятилетия большое внимание уделяется повышению безопасности фармакотерапии различных заболеваний как при создании новых лекарственных средств, так и в процессе клинического использования препаратов в виде оптимизации их применения [1; 4].

Иммунная и кроветворная системы являются одними из основных индикаторов состояния гомеостаза организма [9]. Всё многообразие иммунных реакций направлено на поддержание физиологического равновесия, что и объясняет высокую чувствительность иммунной системы к различным факторам, в частности влиянию лекарственных средств. Экспериментальные данные ряда исследователей свидетельствуют, что вид, сила и продолжительность воздействия, а также исходное состояние организма определяют

направленность иммунной реакции от глубокой иммуносупрессии до выраженной иммуностимуляции, оказывая при этом на организм иммунопротективное, иммунорегуляторное или иммунопатологическое действие [3, 6, 2].

Одно из центральных мест в развитии медикаментозных нарушений иммунного реагирования занимают противомикробные препараты. Более шестидесяти лет в качестве основного препарата для терапии лепры используют дапсон [8], также успешно применяющийся и для лечения и профилактики ряда других заболеваний, таких как герпетический дерматит Дюринга, туберкулез, малярия, пневмоцистная пневмония, токсоплазмоз, кожный лейшманиоз, мицетом, провоцируемая актиномицетами; ревматоидный артрит, субкорнеальный дерматоз и некоторых других.

Несмотря на высокую фармакологическую активность, препарат обладает рядом негативных эффектов, обусловленных формированием в ходе метаболизма гидроксилламин-производных. Наряду с нарушениями со стороны сердечно-сосудистой системы, кожных покровов, органов ЖКТ, дапсон нередко проявляет и гематотоксическое действие, вызывая поражения системы крови (дозозависимый гемолиз с понижением уровня гемоглобина и повышением числа ретикулоцитов, гемолитическая анемия, метгемоглобинемия, гипопластическая анемия, агранулоцитоз) [8]. Высокий процент возникновения перечисленных выше нежелательных дапсон-индуцированных лекарственных реакций требует активного поиска оптимальных способов их коррекции.

Целью нашей работы явилось исследование возможных корректирующих свойств известного биорегулятора – альфа-токоферола и синтетического антиоксиданта – эмоксипина – в отношении показателей иммунореактивности у лабораторных животных, получающих дапсон.

Материалы и методы исследования

Исследование проведено на 360 белых нелинейных крысах-самцах 3-х возрастных групп: 1,5–2 мес. (75–120 г), 6–8 мес. (210–280 г), 20–24 мес. (260–350 г). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении. Все крысы были синхронизированы по питанию при свободном доступе к воде.

Проведено три серии экспериментов в весенне-летний период. Животные каждой серии были разделены на группы по 10 особей в каждой: 1-ю составляли контрольные крысы, получавшие эквивалент дистиллированной воды; 2-ю – особи, получавшие внутрижелудочно дапсон (фирма «Novartis») в дозе 25 мг/кг в течение 14 дней; 3-ю – животные, получавшие внутрижелудочно дапсон в дозе 25 мг/кг в комбинации с α -токоферолом *per os* в дозе 5 мг/кг в течение 14 дней, 4-ю группу – животные, получавшие внутрижелудочно дапсон в дозе 25 мг/кг и эмоксипин в/м в дозе 5 мг/кг в течение 14 дней.

По завершению эксперимента животные забивали под хлороформным наркозом. Забирали кровь, органы, лапы.

Все манипуляции с животными осуществляли согласно Международным правилам GLP [5, 10].

Иммунный статус животных оценивали на основании стандартных иммунофармакологических тестов: реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) с определением индекса реакции (I-серия), реакции прямой гемагглютинации (РПА) с определением титра антител (II-серия), изучения лейкоцитарной формулы, определения массы и клеточности иммунокомпетентных органов (III-серия) [7].

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакетов программ: Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США), BIostat 2008 Professional 5.1.3.1. с использованием t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони.

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ иммунореактивности показал, что на фоне применения дапсона происходит подавление клеточно-опосредованной РГЗТ и процесса антителообразования только у старых животных: индекс РГЗТ и титр антител в РПА снизились на 20% ($p < 0,05$) и 30% ($p < 0,05$) соответственно. В остальных возрастных группах изменений не выявлено (табл. 1).

У животных, получавших в комбинации с дапсоном α -токоферол, статистически значимые изменения были зафиксированы только в старшей возрастной группе. На фоне введения α -токоферола отмечалось повышение титра антиэритроцитарных антител в сравнении с особями, получавшими только дапсон, на 25% ($p < 0,05$), ИР ГЗТ – на 20% ($p < 0,05$). У молодых и зрелых животных отмечалась лишь тенденция к активации иммунореактивности (табл. 1).

Воздействие эмоксипина на фоне применения дапсона имело по направленности сходный характер, но статистически значимыми изменения не являлись (табл. 1).

В процессе исследования было также установлено, что при воздействии дапсона у молодых и зрелых животных отмечаются тенденции к угнетению процессов пролиферации в иммунокомпетентных органах, о чём свидетельствовало снижение массы селезенки и тимуса в среднем на 15% ($p > 0,05$). У старых крыс данные изменения были более выражены ($p < 0,05$): количество спленоцитов и тимоцитов у молодых и зрелых животных уменьшилось относительно контроля на 10% ($p > 0,05$), у старых крыс-самцов в среднем на 25% ($p < 0,05$) (табл. 2).

Применяемые антиоксиданты в условиях дапсон-индуцированных нарушений (табл. 2) оказывали влияние на активность пролиферативных процессов, но статистически значимым это влияние было лишь у старых животных ($p < 0,05$). Воздействие α -токоферола в сравнении с эмоксипином было более выраженным.

При оценке показателей лейкопоза в условиях введения дапсона выявлено снижение общего количества лейкоцитов в среднем на 20% ($p < 0,05$) во всех возрастных группах. В лейкоцитарной формуле отмечалось достоверное снижение эозинофилов более чем на 40% у молодых и зрелых ($p < 0,05$, $p < 0,001$) и на 75% ($p < 0,001$) у старых животных, сегментоядерных нейтрофилов в среднем на 25% у молодых и зрелых особей ($p > 0,05$) и более чем на 40% ($p < 0,05$) у старых крыс, также

следует отметить статистически значимое увеличение палочкоядерных форм нейтрофилов: у молодых на 60%, у зрелых в 1,5 раза и у старых животных почти на 100% (табл. 3).

Таблица 1

Влияние антиоксидантов на формирование РГЗТ и РПГА у разновозрастных крыс-самцов на фоне применения дапсона

Группы (n = 10)	Показатели (M ± m)	Контроль	Дапсон (25 мг/кг)	Дапсон (25 мг/кг) + α-ТФ (5 мг/кг)	Дапсон (25 мг/кг) + Э (5 мг/кг)
Крысы-самцы 1,5–2 мес.					
ИР ГЗТ, %		10,21 ± 0,7	10,11 ± 0,9	12,28 ± 1,1	11,84 ± 1,0
Титр антител в РПГА, lg		1,55 ± 0,1	1,50 ± 0,09	1,67 ± 0,1	1,59 ± 0,1
Крысы-самцы 6–8 мес.					
ИР ГЗТ, %		11,78 ± 1,1	11,70 ± 0,8	12,01 ± 1,0	12,87 ± 1,1
Титр антител в РПГА, lg		1,47 ± 0,9	1,42 ± 0,9	1,56 ± 0,1	1,61 ± 0,1
Крысы-самцы 20–24 мес.					
ИР ГЗТ, %		21,63 ± 2,2	16,82 ± 1,0*	20,41 ± 1,0#	19,81 ± 1,2
Титр антител в РПГА, lg		1,90 ± 0,2	1,29 ± 0,2*	1,62 ± 0,1#	1,57 ± 0,1

Примечания: * – $p < 0,05$ – относительно контроля; # – $p < 0,05$ – относительно животных, получавших дапсон (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений); α-ТФ – α-токоферол, Э – эмоксипин.

Таблица 2

Влияние антиоксидантов на массу и клеточность иммунокомпетентных органов разновозрастных крыс-самцов на фоне применения дапсона

Группы (n = 10)	Показатели (M ± m)	Масса селезенки, мг	Кол-во спленоцитов в 1 мг органа, ·10 ⁵	Масса тимуса, мг	Кол-во тимоцитов в 1 мг органа, ·10 ⁵
Крысы-самцы 1,5–2 мес.					
Контроль		367,1 ± 19,7	126,2 ± 7,3	110,3 ± 7,8	42,3 ± 3,4
Дапсон (25 мг/кг)		310,1 ± 20,8	110,3 ± 6,5	95,4 ± 6,7	39,1 ± 2,7
Дапсон (25 мг/кг) + α-ТФ (5 мг/кг)		359,6 ± 19,1	120,3 ± 7,8	101,2 ± 5,9	41,4 ± 2,8
Дапсон (25 мг/кг) + Э (5 мг/кг)		352,1 ± 18,2	116,2 ± 6,4	98,6 ± 5,2	39,7 ± 3,1
Крысы-самцы 6–8 мес.					
Контроль		377,1 ± 19,3	115,4 ± 6,3	73,4 ± 7,6	32,5 ± 2,8
Дапсон (25 мг/кг)		322,8 ± 19,5	99,2 ± 5,5	65,3 ± 5,6	30,3 ± 2,7
Дапсон (25 мг/кг) + α-ТФ (5 мг/кг)		368,4 ± 18,1	110,1 ± 6,8	69,7 ± 6,1	31,3 ± 2,2
Дапсон (25 мг/кг) + Э (5 мг/кг)		359,2 ± 17,6	106,2 ± 6,4	68,3 ± 5,4	29,9 ± 2,6
Крысы-самцы 20–24 мес.					
Контроль		352,4 ± 17,3	73,2 ± 5,3	29,4 ± 3,4	29,5 ± 2,5
Дапсон (25 мг/кг)		292,1 ± 16,5*	50,3 ± 4,5**	20,3 ± 2,7*	21,6 ± 2,7*
Дапсон (25 мг/кг) + α-ТФ (5 мг/кг)		348,6 ± 18,1#	67,4 ± 5,8#	27,2 ± 2,1#	31,2 ± 2,3#
Дапсон (25 мг/кг) + Э (5 мг/кг)		342,1 ± 18,6#	60,1 ± 6,1	24,7 ± 2,2	30,4 ± 2,6#

Примечания: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$ – относительно контроля; # – $p < 0,05$ – относительно животных, получавших дапсон (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений); α-ТФ – α-токоферол, Э – эмоксипин.

При комбинированном применении дапсона как с α-токоферолом, так и эмоксипином количество лейкоцитов оставалось в пределах «нормы». Следует отметить, что более выраженное действие оказал аналог природного антиоксиданта –

α -токоферол. Анализ лейкограммы показал, что применение α -токоферола совместно с дапсоном способствовало устранению ингибирующего влияния последнего: количество эозинофилов у молодых особей практически не отличалось от показателей контрольной группы, у зрелых было выше относительно групп, получавшей только дапсон, – на 35% ($p < 0,001$), у старых крыс – более чем в 3,5 раза ($p < 0,001$). Под действием антиоксиданта уменьшалось

негативное влияние и на сегментоядерное звено: количество нейтрофилов у молодых и зрелых крыс в этих группах по сравнению с «дапсоном» в среднем было выше на 25% ($p > 0,05$), у старых животных на 55% ($p < 0,001$). Кроме того, применение α -токоферола сопровождалось снижением палочкоядерных форм нейтрофилов. При применении эмоксипина выявлены идентичные тенденции, но несколько менее выраженные (табл. 3).

Таблица 3

Влияние антиоксидантов на показатели лейкоцитарной формулы животных на фоне применения дапсона

Показатели ($M \pm m$)	Группы ($n = 10$)			
	Контроль	Дапсон (25 мг/кг)	Дапсон (25 мг/кг) + α -ТФ (5 мг/кг)	Дапсон (25 мг/кг) + Э (5 мг/кг)
Крысы-самцы 1,5–2 мес.				
Общее количество лейкоцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$	12,8 \pm 0,9	10,2 \pm 0,8*	12,7 \pm 0,9#	12,1 \pm 1,0
Эозинофилы, %	2,5 \pm 0,4	1,4 \pm 0,05*	2,7 \pm 0,3##	2,3 \pm 0,4#
Палочкоядерные нейтрофилы, %	6,0 \pm 0,7	9,5 \pm 0,2***	5,1 \pm 0,5####	7,2 \pm 0,6##
Сегментоядерные нейтрофилы, %	11,0 \pm 1,2	7,6 \pm 2,1	9,7 \pm 0,8	8,9 \pm 0,9
Лимфоциты, %	70,3 \pm 2,6	74,1 \pm 3,1	73,4 \pm 2,1	74,0 \pm 2,9
Моноциты, %	10,4 \pm 1,2	7,1 \pm 1,3	8,9 \pm 2,8	8,1 \pm 2,7
Крысы-самцы 6–8 мес.				
Общее количество лейкоцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$	13,1 \pm 1,0	10,1 \pm 0,9*	12,5 \pm 0,8#	12,0 \pm 0,9
Эозинофилы, %	10,2 \pm 0,2	6,2 \pm 0,2***	8,4 \pm 0,3####	7,7 \pm 0,4##
Палочкоядерные нейтрофилы, %	3,7 \pm 1,2	9,4 \pm 1,4*	4,9 \pm 1,4#	7,4 \pm 1,5
Сегментоядерные нейтрофилы, %	37,4 \pm 3,2	28,8 \pm 2,9	35,0 \pm 2,4	32,1 \pm 1,8
Лимфоциты, %	39,7 \pm 3,2	48,1 \pm 2,8	43,3 \pm 1,3	44,8 \pm 1,7
Моноциты, %	8,9 \pm 1,5	7,3 \pm 1,6	8,1 \pm 1,8	8,0 \pm 1,9
Крысы-самцы 20–24 мес.				
Общее количество лейкоцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$	13,5 \pm 1,1	10,7 \pm 0,8*	13,2 \pm 0,9#	12,6 \pm 0,9
Эозинофилы, %	4,6 \pm 0,05	1,2 \pm 0,05***	4,3 \pm 0,06####	3,6 \pm 0,5####
Палочкоядерные нейтрофилы, %	4,2 \pm 0,5	8,3 \pm 0,2***	3,5 \pm 0,2####	5,9 \pm 0,7##
Сегментоядерные нейтрофилы, %	28,3 \pm 2,4	16,4 \pm 1,3**	25,5 \pm 1,1####	21,9 \pm 2,2#
Лимфоциты, %	53,5 \pm 4,5	68,3 \pm 5,9	58,5 \pm 2,3	56,4 \pm 3,7
Моноциты, %	9,6 \pm 1,7	5,9 \pm 0,9	8,2 \pm 0,8	7,8 \pm 0,7

Примечания: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ – относительно контроля; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – относительно животных, получавших дапсон (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений); α -ТФ – α -токоферол; Э – эмоксипин.

Выводы

Таким образом, α -токоферол и эмоксипин, применяемые на фоне введения дапсона, влияют на показатели гуморального и клеточного звена иммунитета, пролиферативные процессы в иммунокомпетентных органах и показатели лейкоцитарной формулы, оказывая корри-

гирующее действие, более выраженное в позднем возрасте.

На основании полученных данных может быть разработан способ коррекции дапсон-индуцированных нарушений для оптимизации терапии дапсоном в дерматологии, в том числе в лепрологии, а также при лечении ряда инфекционных болезней (малярии, пневмоцистной пневмонии и др.).

Список литературы

1. Астахова А.В., Лепехин В.К. Неблагоприятные побочные реакции и контроль безопасности лекарственных средств. – М.: КогитоЦентр, 2004. – 200 с.
2. Булгакова О.С. Иммуитет и различные стадии стрессорного воздействия // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 4. – С. 31–35.
3. Першин С.Б. Стресс и иммунитет / С.Б. Першин, Т.В. Кончугова. – М.: Крон-пресс, 1996. – 160 с.
4. Профилактика неблагоприятных побочных реакций / под общ. ред. проф. Н.В. Юргеля, акад. РАМН В.Г. Кукеса. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. – 450 с.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / под общ. ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М., 2010. – 345 с.
6. Федорова О.В. Постстрессовая модуляция органов иммуногенеза / О.В. Федорова, Н.Г. Краюшкина, Е.Г. Шефер [и др.] // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2010. – № 3. – С. 8–12.
7. Хаитов, Р.М. Методические указания по изучению иммуотропной активности фармакологических веществ / Р.М. Хаитов, И.С. Гушин, Б.В. Пинегин, А.И. Зебров // Руководство по экспериментальному доклиническому изучению новых фармакологических веществ; под. ред. Р.У. Хабриева. – М., 2005. – С. 501–514.
8. Ghu G.I., Stiller M.G. Dapsone and sulfones in dermatology overview and update // Journal of the American Academy of dermatology. – 2001. – Vol. 45. № 3. – P. 420–434.
9. Ichiki Y. Simultaneous cellular and humoral immune response against mutated p53 in a patient with lung cancer / Y. Ichiki, M. Takenoyama, M. Mizukami, T. So, M. Sugaya, M. Yasuda, T. Hanagiri, K. Sugio, K. Yasumoto // J. Immunol. 2004. – Vol. 72, № 8. – P. 4844–4850.
10. Directive 2004/9/EC of the European parliament and of the council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP) // Official Journal of the European Union 20.2.2004. – P. 29–43.
3. Pershin, S.B., Konchugova T.V. *Stress i immunitet* [Stress and immunity]. M.: Kron-press, 1996. 160 p.
4. *Profilaktika neblagoprijatnyh pobochnykh reakcij* [Prevention of adverse drug reactions] pod obshh. red. prof. N.V. Jurgelja, akad. RAMN V.G. Kukesa. M.: GJEOTAR-Media, 2009. 450 p.
5. *Rukovodstvo po laboratornym zivotnym i al'ternativnym modeljam v biomeditsinskih tehnologijah* [Guidance on laboratory animals and alternative models in biomedical technology] pod obshh. red. N.N. Karkishhenko, S.V. Gracheva. M., 2010. 345 p.
6. Fedorova O.V., Krajushkina N.G., Shefer E.G. [i dr.] *Poststressovaja moduljacija organov immunogeneza* [Post-stress modulation of immunogenesis] Vestnik Volgogradskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta 2010. no. 3. pp. 8–12.
7. Haitov R.M., Gushhin I.S., Pinegin B.V., Zebrov A.I. *Metodicheskie ukazaniya po izucheniju immunotropnoj aktivnosti farmakologicheskikh veshhestv* [Methodological guidelines for the study of immunotropic activity of pharmacological substances] Rukovodstvo po jeksperimental'nomu doklinicheskomu izucheniju novykh farmakologicheskikh veshhestv. M., 2005. pp. 501–514.
8. Ghu G.I., Stiller M.G. *Dapsone and sulfones in dermatology overview and update*. Journal of the American Academy of dermatology. 2001. Vol. 45. no. 3. pp. 420–434.
9. Ichiki Y. *Simultaneous cellular and humoral immune response against mutated p53 in a patient with lung cancer* J. Immunol. 2004. Vol. 72. no. 8. pp. 4844–4850.
10. Directive 2004/9/EC of the European parliament and of the council of 11 February 2004 on the inspection and verification of good laboratory practice (GLP). Official Journal of the European Union 20.2.2004. pp. 29–43.

References

1. Astahova A.V., Lepahin V.K. *Neblagoprijatnye pobochnye reakcii i kontrol' bezopasnosti lekarstvennykh sredstv* [Adverse collateral reactions and control of safety of medicines]. Moscow, KogitoCentr, 2004. 200 p.
2. Bulgakova O.S. *Immunitet i razlichnye stadii stressornogo vozdejstvija* [Immunity and the various stages of stress]. Uspеhi sovremennogo estestvoznaniya. 2011. no. 4. pp. 31–35.

Рецензенты:

Тризно Н.Н., д.м.н., заведующий кафедрой патологической физиологии, ГБОУ ВПО «Астраханская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Астрахань;

Котельников А.В., д.б.н., профессор кафедры «Гидробиология и общая экология», ФГБОУ ВПО «Астраханский технический университет», г. Астрахань.

Работа поступила в редакцию 02.12.2014.