

Reports of Military Sciences Academy. 2006. 3 (21). 162-166.

Доклады академии военных наук. 2006. 3 (21). 162-166.

P.F. Zabrodskii, V.G. Lim

THE PATHOGENESIS OF SECONDARY IMMUNODEFICIENCY IN ACUTE POISONING BY ALCOHOL AND CHLORINATED HYDROCARBONS

This paper presents the results of a study on the pathogenesis of secondary immunodeficiency in acute alcohol poisoning and chlorinated hydrocarbons.

ПАТОГЕНЕЗ ФОРМИРОВАНИЯ ВТОРИЧНОГО ИММУНОДЕФИЦИТА ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ СПИРТАМИ И ХЛОРИРОВАННЫМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ

П.Ф. Забродский, В.Г. Лим

В настоящей работе приведены результаты исследования по изучению патогенеза формирования вторичного иммунодефицита при остром отравлении спиртами и хлорированными углеводородами

Одной из причин танатогенеза при острых отравлениях спиртами и хлорированными углеводородами являются инфекционные заболевания и осложнения (постинтоксикационные пневмонии), обусловленные снижением НРО и показателей иммунной системы [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 1998, 2002, 2004а, 2004б; Friedman H. et al., 2003]. При этом патогенез изменения НРО и иммунной защиты в условиях острой интоксикации спиртами и хлорированными углеводородами в настоящее время изучен недостаточно, не исследована взаимосвязь нарушений иммунного гомеостаза с перекисным окислением липидов (ПОЛ), активностью эстераз Т-лимфоцитов, изменением функции гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (ГГАС) и симпатико-адреналовой системы (САС) [Быкова А.А., Сединина Н.С., 2002; Забродский П. Ф., 1998, 1999б, 2002; Luster M. I. et al., 1987; Friedman H. et al., 2003].

Целью исследования являлось изучение патогенеза формирования иммунодефицита

под влиянием острого отравления спиртами и хлорированными углеводородами (оценка роли функции коры надпочечников, симпатико-адреналовой системы, перекисного окисления липидов, активности эстераз Т-клеток в нарушении иммунного статуса)..

Функцию коры надпочечников определяли по уровню кортикостерона в плазме крови крыс флюорометрическим методом (оценивали уровень неконъюгированных 11-оксикетостероидов) методом Moor P. et al., (1976) в модификации В.В. Давыдова (1970). Состояние САС исследовали по содержанию адреналина и норадреналина определяли в плазме крови спектрофлуориметрически [Филатова Г.Ф. и соавт., 1987]. Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в Т-лимфоцитах крыс определяли методом G.M. Ellman et al. (1961), выделяя клетки по методике С.В Ширшева (1998). Активность α -нафтил-AS-ацетатэстеразы и β -нафтилбутиратэстеразы спленоцитов крыс изучали гистохимическим методом [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983]. Состояние перекисного окисления липидов (ПОЛ) оценивали по суммарной продукции радикалов в крови методом люминолзависимой хемилюминесценции, активированной форболовым эфиром (0,156 МКм) [Михальчик Е.В. и соавт., 2004], по активности каталазы и пероксидазы, содержанию малонового диальдегида общепринятыми методами [Валеева И.Х. и соавт., 2002]. Полученные данные обрабатывались с использованием общепринятых статистических методов. Расчеты проводились на персональном компьютере с использованием пакета программ Statgraphics.

Под влияние спиртов и хлорированных углеводородов содержание кортикостерона в плазме крови через 1-3 ч после интоксикации увеличивалось (табл.1).

Под влиянием острой интоксикации токсикантами через 1 и 3 ч концентрация кортикостерона увеличивалась соответственно от 1,89 до 2,14 раза и от 1,40 до 1,68 раза, снижаясь до контрольного уровня через 24 ч. Существенных различий между действием исследуемых токсикантов не выявлено.

Коэффициенты корреляции (r) между концентрацией кортикостерона в крови и АОК к ЭБ при остром отравлении крыс метанолом и дихлорэтаном составляли соответственно $-0,715$ ($p < 0,05$) [$n=8$] и $-0,727$ ($p < 0,05$) [$n=9$]. Значения r при острых отравлениях метанолом, дихлорэтаном между концентрацией кортикостерона в крови и реакцией ГЗТ составляли соответственно $-0,708$ ($p < 0,05$) [$n=8$] и $-0,794$ ($p < 0,05$) [$n=9$]. Значения r между АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ крыс и концентрацией кортикостерона в крови при острых интоксикациях этиленгликолем, этанолом, тетрахлорметаном, трихлорэтиленом находились в пределах от $-0,642$ до $-0,785$. При этом r для всех сравниваемых пар

показателей после действия токсикантов были достоверны ($p < 0,05$), за исключением действия этанола (АОК к ЭБ и концентрация кортикостерона).

Таблица 1

Влияние острой интоксикации спиртами и хлорированными углеводородами (0,75 ЛД₅₀) на содержание кортикостерона в плазме крови крыс, нг/мл ($M \pm m$)

Токсиканты	Контроль	Время после воздействия, ч		
		1	3	12
Метанол	19,7 $\pm$ 1,4	40,3 $\pm$ 3,3*	28,9 $\pm$ 3,1*	14,9 $\pm$ 2,7
Этиленгликоль		44,2 $\pm$ 4,0*	31,1 $\pm$ 2,4*	17,0 $\pm$ 1,9
Этанол		38,3 $\pm$ 3,1*	30,7 $\pm$ 3,3*	20,5 $\pm$ 1,8
Дихлорэтан		37,3 $\pm$ 4,2*	35,5 $\pm$ 3,2*	14,5 $\pm$ 2,6
Тетрахлорметан		40,3 $\pm$ 3,3*	27,5 $\pm$ 3,0*	15,5 $\pm$ 2,7
Трихлорэтилен		42,1 $\pm$ 4,7*	33,2 $\pm$ 2,8*	16,2 $\pm$ 2,0

Примечание: в скобках – число животных; в каждой серии использовалось от 7 до 10 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Наши эксперименты позволили установить, что под влиянием двукратного введения кортикостерона в дозах 1,0 и 0,5 мг/кг соответственно с интервалом 2 ч основные показатели системы иммунитета существенно снижаются. Следует отметить, что введение кортикостерона в указанных дозах вызывало увеличение данного гормона в крови через 1 ч до 45,2 $\pm$ 4,5 нг/мл ($n=7$), а через 3 ч – до 26,9 $\pm$ 3,7 нг/мл (контроль составлял – 19,7 $\pm$ 1,4 нг/мл). Данные концентрации приблизительно соответствовали содержанию кортикостерона в плазме крови после интоксикации спиртами и хлорированными углеводородами в дозе 0,75 ЛД₅₀.

Супрессия Т-зависимого, Т-независимого антителообразования (число АОК к ЭБ и Vi-Ag соответственно), Т-звена иммунитета (реакция ГЗТ), активности ЕКК (ЕЦ) и АЗКЦ под влиянием экзогенного кортикостерона в дозах 1,0 и 0,5 мг/кг соответственно с интервалом 2 ч составила соответственно 19,7; 21,7; 18,3; 25,1 и 25,4%. При этом достоверны только сдвиги числа АОК к ЭБ и ЕЦ ($p < 0,05$).

Проведенные опыты доказывают определенную, причем крайне незначительную, роль кортикостерона в супрессии основных иммунных реакций при остром отравлении спиртами и хлорированными углеводородами.

Установлено, что r между концентрацией адреналина в крови и АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ при остром отравлении крыс дихлорэтаном составляли соответственно $-0,708$ ($p < 0,05$) [$n=9$] и $-0,755$ ($p < 0,05$) [$n=9$]. Коэффициенты корреляции при острых отравлениях другими спиртами и хлорированными углеводородами между концентрацией адреналина в крови и реакцией ГЗТ, АОК к ЭБ составляли от $-0,576$ до $-0,767$. При этом r для всех сравниваемых пар показателей после действия токсикантов были достоверны ($p < 0,05$), за исключением действия этанола.

Оценка эффектов катехоламинов в концентрациях соизмеримых с содержанием адреналина и норадреналина в плазме крови после острой интоксикации спиртами и хлорированными углеводородами ($0,75$ ЛД₅₀) показала, что при введении адреналина в дозе $0,025$ мг/кг в крови обеспечивается концентрация соизмеримая с содержанием адреналина в крови после интоксикации спиртами и хлорированными углеводородами. Данная концентрация, составляющая $15,5 \pm 2,5$ мкг/л, практически не влияла на активность ЕКК, незначительно повышала ГЗТ и статистически достоверно ($p < 0,05$) увеличивала Т-зависимый иммунный ответ (число АОК к ЭБ в селезенке), Т-независимый иммунный ответ (число АОК к Vi-Ag в селезенке), АЗКЦ в 1,38; 1,59 и 1,43 раза соответственно. При введении крысам норадреналина в дозе $0,025$ мг/кг (данная доза обеспечивала содержание норадреналина в крови $- 4,1 \pm 0,7$ мкг/л – соизмеримое с концентрацией этого медиатора при действии спиртов и хлорированных углеводородов) происходило незначительное ($p > 0,05$) увеличение Т-зависимого иммунного ответа (число АОК к ЭБ в селезенке), Т-независимой иммунной реакции (число АОК к Vi-Ag в селезенке) и АЗКЦ.

Менее выраженная активация иммунных реакций норадреналина связана с тем, что данный медиатор в отличие от адреналина стимулирует преимущественно β -адренорецепторы иммуноцитов. Именно данные структуры, а не α -адренорецепторы обеспечивают активацию лимфоцитов [Rinner I., et al., 1995].

В дозе $1,0$ мг/кг адреналин и норадреналин вызывали редукцию всех исследованных иммунных реакций. Следует отметить, что данная доза адреналина и норадреналина способна создать концентрацию в плазме крови, превышающую содержание данных катехоламинов после острой интоксикации спиртами и хлорированными углеводородами ($0,75$ ЛД₅₀) более, чем в 30 раз (с учетом биотрансформации, взаимодействия с рецепторами и выведения эти значения могут быть несколько меньшими).

Таким образом, несмотря на выявленную обратную корреляцию между Т-зависимым гуморальным иммунным ответом, реакцией ГЗТ и концентрацией адреналина в крови после острого отравления спиртами и хлорированными углеводородами, иммуносупрессивные эффекты данных токсикантов не связаны с увеличением концентрации при их остром действии в плазме крови адреналина и норадреналина.

Проведенные нами опыты показали (табл. 2), что под влиянием хлорированных углеводов активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в Т- лимфоцитах тимуса и селезенки у крыс через 3 сут существенно снижается.

Таблица 2

Влияние острого отравления спиртами и хлорированными углеводородами (0,75 ЛД₅₀) на активность ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах тимуса и селезенки у крыс (мЕд/10⁹) через 3 сут (М±m)

Токсиканты	Тимус	Селезенка
Контроль	69,2±7,0	58,4±6,1
Метанол	61,4±6,9	51,0± 5,7
Этиленгликоль	73,1±7,2	62,4± 6,0
Этанол	64,7±6,8	55,2± 5,3
Дихлорэтан	44,5±5,3*	37,5± 4,5*
Тетрахлорметан	48,0±6,1*	45,0±4,8**
Трихлорэтилен	54,5±5,7**	48,4±4,7**

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 9 крыс; *, ** - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$ (*; ** - для расчета достоверности различий использовали соответственно t –критерий Стьюдента и непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна-Уитни).

Острое отравление дихлорэтаном, тетрачлорметаном и трихлорэтиленом вызывало статистически значимое уменьшение активности АХЭ в Т-лимфоцитах тимуса соответственно в 1,55; 1,49 и 1,27 раза ($p < 0,05$). В Т-клетках селезенки активность АХЭ снижалась под влиянием дихлорэтана, тетрачлорметана и трихлорэтилена соответственно

в 1,56; 1,30 и 1,21 раза ($p < 0,05$). Интоксикация метанолом, этиленгликолем и этанолом на активность АХЭ Т-лимфоцитов влияния не оказывала.

Несомненно, что ингибирование ацетилхолинэстеразы Т-клеток дихлорэтаном, тетрахлорметаном и трихлорэтиленом имеет существенное значение в формировании постинтоксикационного иммунодефицитного состояния. При этом Т-лимфоциты, возможно, существенно утрачивают свои функции, что приводит к редукции Т-зависимого гуморального иммунного ответа, снижению цитотоксической активности Т-клеток. По-видимому, функция К-клеток, обеспечивающих АЗКЦ, также снижается вследствие ингибирования ацетилхолинэстеразы, так как эти клетки являются потомками предшественников Т-лимфоцитов [Delves P.J., Roitt I.M., 2000].

Острое действие дихлорэтана, тетрахлорметана и трихлорэтилена вызывало статистически значимое уменьшение активности α -нафтил-AS-ацетатэстеразы соответственно в 1,45; 1,29 и 1,21 раза ($p < 0,05$), а α -нафтилбутиратэстеразы - соответственно в 1,42; 1,31 и 1,20 раза ($p < 0,05$). Действие спиртов на активность α -нафтил-AS-ацетатэстеразы и α -нафтилбутиратэстеразы спленоцитов влияния не оказывало.

Существенных различий в антихолинэстеразной активности отдельных хлорированных углеводов не выявлено. При объединении показателей редукции в единую совокупность для различных ядов установлено, что дихлорэтан в среднем снижал активность эстераз на 32,9%, а тетрахлорметан и трихлорэтилен – на 21,9% ($p < 0,05$).

Коэффициент корреляции между активностью АХЭ в Т- лимфоцитах тимуса крыс и АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ при остром отравлении крыс дихлорэтаном составляли соответственно 0,755 ($p < 0,05$) [$n=9$] и 0,772 ($p < 0,05$) [$n=9$]. Коэффициент корреляции при острых отравлениях другими хлорированными углеводородами между активностью ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах тимуса крыс и реакцией ГЗТ, АОК к ЭБ составляли от 0,767 до 0,805, а между содержанием различных эстеразопозитивных клеток в спленоцитах и реакцией ГЗТ, АОК к ЭБ - от 0,756 до 0,798. При этом для всех сравниваемых пар показателей после действия тетрахлорметана и трихлорэтилена были достоверны ($p < 0,05$).

Проведенные нами эксперименты свидетельствуют о том, что под влиянием всех использованных ксенобиотиков, происходит увеличение суммарной продукции радикалов (СПР) и содержания малонового диальдегида (МДА) в крови и снижение активности

каталазы и пероксидазы. Так, метанол, этиленгликоль, этанол, дихлорэтан, тетрахлорметан и трихлорэтилен статистически значимо ($p < 0,05$) повышали СПР соответственно в 2,37; 2,12; 1,54; 3,22; 3,44 и 2,50 раза, а содержание в крови МДА - в 1,31; 1,39; 1,13 ($p > 0,05$); 1,38; 1,51 и 1,33 раза соответственно.

По степени увеличения СПР токсиканты располагались в последовательности: тетрахлорметан, дихлорэтан, трихлорэтилен, метанол, этиленгликоль и этанол, а по нарастанию содержания МДА – в порядке: тетрахлорметан, дихлорэтан, трихлорэтилен, этиленгликоль, метанол и этанол. Существенных различий в увеличении данных показателей под влиянием ядов не выявлено, за исключением действия дихлорэтана и этанола. Метанол, этиленгликоль, этанол, дихлорэтан, тетрахлорметан и трихлорэтилен статистически достоверно ($p < 0,05$) снижали активность каталазы в крови соответственно в 1,62; 1,50; 1,41; 1,82; 1,95 и 1,76 раза. Аналогичное действие токсиканты оказывали на активность пероксидазы. Статистически значимых различий в редукции данных показателей под влиянием различных спиртов и хлорированных углеводов не выявлено. При вычислении средней степени активации ПОЛ хлорированными углеводородами и спиртами установлено, что хлорированные углеводороды инициируют ПОЛ в 2,01 раза, а спирты – в 1,54 раза ($p < 0,05$).

Изменения показателей ПОЛ в плазме крови, несомненно, отражают процесс свободно-радикального окисления липидов, как всех клеток различных органов в целом, так и органов системы иммунитета и, в частности, лимфоцитов. Существуют основания считать, что стресс-реакция, приводящая к повышению уровня кортикостероидов и катехоламинов в крови под влиянием ксенобиотиков, может являться одним из факторов, инициирующим ПОЛ [Меерсон Ф.З., 1984; Валеева И.Х. и соавт., 2002; Зарубина И.В., Миронова О.П., 2002].

Обращает на себя внимание то, что активация ПОЛ под влиянием тетрахлорметана максимальная. Это объясняется высокой активностью радикалов данного соединения, образующихся при его метаболизме [Тиунов Л.А., 1990].

Коэффициенты корреляции между показателями системы иммунитета (числом АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ) при остром отравлении тетрахлорметаном и суммарной продукцией радикалов составили соответственно -0,732 ($p < 0,05$) и -0,783 ($p < 0,05$). Коэффициенты корреляции при острых отравлениях спиртами и хлорированными углеводородами между АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ и содержанием каталазы и пероксидазы в крови крыс составляли от 0,645 до 0,759. Коэффициенты корреляции между содержанием МДА в крови и

показателями иммунного статуса при действии спиртов и хлорированных углеводов составляли от -0,639 до -0,769. Значения r между параметрами были статистически значимы, за исключением показателей, сравниваемых после действия этанола.

Таким образом, под влиянием острой интоксикации спиртами и хлорированными углеводородами увеличивается функция коры надпочечников и активируется симпатико-адреналовая система, что сопровождается увеличением концентрации кортикостерона, адреналина, норадреналина в крови, инициируется перекисное окисление липидов. Установлена обратная корреляция между показателями иммунных реакций и параметрами, характеризующими инициацию ПОЛ после острого отравления спиртами и хлорированными углеводородами. Несмотря на выявленную обратную корреляцию между гуморальным, клеточным иммунным ответом и концентрациями адреналина и кортикостерона в крови после острого отравления спиртами и хлорированными углеводородами иммуносупрессивные эффекты токсикантов не зависят от увеличения содержания при их действии в плазме крови адреналина и норадреналина, а роль кортикостерона в формировании постинтоксикационного иммунодефицита незначительна. Острое отравление хлорированными углеводородами вызывает снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса и селезенки, α -нафтил-AS-ацетатэстеразы и α -нафтилбутиратэстеразы в спленоцитах, при этом у дихлорэтана проявляется максимальный антиэстеразный эффект. Влияние спиртов на активность эстераз Т-лимфоцитов тимуса и спленоцитов не выявлено. Установлена прямая корреляция между иммунными реакциями и активностью ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса, а также содержанием эстераз в спленоцитах после острого отравления хлорированными углеводородами.

Список литературы

1. Быкова А.А., Сединина Н.С. // Фармакол. и токсикол. - 2002. - №1. – С.85-87.
2. Валеева И.Х., Зиганшина Л.Е., Бурнашова З.А., Зиганшин А.У. // Эксперим. и клин. фармакол. - 2002. - Т.65, № 2. - С.40-43.
3. Давыдов В.В. // Труды ВмедА. - Л., 1970. - Т.189. - С.85-86.
4. Забродский П.Ф. Иммуотропные свойства ядов и лекарственных средств. - Саратов: Изд. СГМУ, 1998. - 213 с.
5. Забродский П.Ф. // Эксперим. и клин. фармакол. – 1999б. - Т 62, №3. - С.48-49.

6. Забродский П. Ф. // Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. - М.: Медицина, 2002. – С. 352-384.
7. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Нодель М.Л., Василенко О.А., Аредаков А.Н. // Эксперим. и клин. фармакол. - 2004а. – Т. 67, №5. - С.28-30.
8. Зарубина И.В., Миронова О.П // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.133, №2. – С.165-167.
9. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления. - М.: Медицина, 2000. – 434 с.
10. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. - М.: Медицина, 1984. - 272 с.
11. Михальчик Е.В., Иванова А.В., Ануров М.В., Титкова С.М., Пеньков Л.Ю., Коркина Л.Г. // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 2004. - Т.138, №9. - С.299-301.
12. Тиунов Л.А. // Вредные химические вещества. / Справочник под. ред. В.А. Филова – Л.: Химия, 1990а.- С. 337-372.
13. Тиунов Л.А. // Вредные химические вещества. / Справочник под. ред. В.А. Филова – Л.: Химия, 1990б. - С.438-454.
14. Филатова Г.Ф., Кузнецова Г.А., Бобков Ю.Г. // Пат. физиол. и эксперим. терапия. – 1987. - №4. – С.48-50.
15. Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. – М.: Медицина, 1983.- 319 с.
16. Ширшев С.В. // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1998. - №6. - С.666-669.
17. Delves P.J., Roitt I.M. // N. Engl. J. Med. - 2000. – Vol.343, №2. – P.37-49.
18. Ellman G.M., Countney K.D., Anders V. // Biochem. Pharm. - 1961. - Vol.7, №1. – P.88.
19. Friedman H., Newton C., Klein T.W. // Clin. Microb. Rev. - 2003. - Vol.16. - №2. - P.209-219.
20. Luster M. J., Blank J. A., Dean J. H. // Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol. - Vol.27. - Palo Alto, Calif. - 1987. - P.23-49.
21. Moor P., Steeno O. Raskin M., Hendrikx A. // Acta endocrinol. - 1976. - Vol.33, №2. - P.297-307.