

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ И КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ, 2007.-N 5.-С.30-32. БИБЛ. 15

**СУПРЕССИЯ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ФУНКЦИЕЙ  
В-КЛЕТОК, TH1- И TH2-ЛИМФОЦИТОВ И ПРОДУЦИРУЕМЫХ  
ИМИ ЦИТОКИНОВ, И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ЭТИХ  
НАРУШЕНИЙ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ МЕТАНОЛОМ**

**П. Ф. Забродский<sup>1</sup>, В.Г. Мандыч,<sup>1</sup> В.В. Серов<sup>2</sup>,**

**И.А. Плахута<sup>2</sup>**

*Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической защиты<sup>2</sup>*

*Саратовский Государственный медицинский университет<sup>1</sup>*

---

В экспериментах на крысах Wistar установлено, что при остром отравлении метанолом (0,75 DL<sub>50</sub>) супрессия клеточных и гуморальных реакций и снижение концентрации в крови интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4) с увеличением соотношения ИЛ2/ИЛ-4 свидетельствует, что редукция функции Th2-лимфоцитов по сравнению с Th1-клетками более выражена. Иммуномодуляторы миелопид и полиоксидоний в дозе 10 мкг/кг при ежедневном применении в течении четырех суток после острой интоксикации метанолом практически полностью восстанавливают клеточный и гуморальный иммунный ответ, активность естественных клеток-киллеров и синтез интерлейкинов.

---

**Ключевые слова:** метанол, иммунотоксичность, Th1, Th2-лимфоциты, интерлейкины, иммуномодуляторы

## **ВВЕДЕНИЕ**

Метанол (метиловый спирт, карбинол, древесный спирт) применяется в качестве растворителя в химической промышленности, топлива для двигателей, в лабораторной практике, для денатурирования этилового спирта, входит в состав ряда антифризов. Отравления метанолом (М) чаще всего связаны с использованием его вместо этанола с целью опьянения и характеризуются высокой смертностью [1,15], причем тяжесть течения

---

<sup>1</sup>Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической защиты, 410037, Саратов, ул. 50 лет Октября, 5

<sup>2</sup>Саратовский государственный медицинский университет, 410710, Саратов, ГСП-71, ул. Большая казачья, 112

поражений в значимой степени определяется инфекционными осложнениями, являющимися следствием снижения иммунного статуса больного. Изменения иммунного гомеостаза после острой интоксикации метанолом исследованы недостаточно [1,12]. Не ясна роль Th1- и Th2-лимфоцитов в реализации супрессии иммунных реакций при отравлении М.

Возникающие после отравления М иммунодефицитное состояние предполагают дальнейшее изучение его иммуотропных эффектов [1,2,12] с целью обоснования способов коррекции постинтоксикационного нарушения иммунного гомеостаза [4]. Данные литературы позволяют полагать, что применение миелопида, стимулирующего функциональную активность иммунокомпетентных клеток и способствующего восстановлению ряда показателей гуморального звена иммунитета [5], а также полиоксидония (ПО), обладающего иммуностимулирующим действием в отношении преимущественно Т-лимфоцитов [6], а также антиоксидантными, детоксикационными и мембраностабилизирующими свойствами [10], способно обеспечить восстановление показателей Т- и В-системы иммунитета, а также функции естественных клеток-киллеров (ЕКК) после отравления М.

Целью исследования являлась оценка супрессии иммунных реакций, связанных с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4), а также исследование эффективности иммуностимуляторов (миелопида и полиоксидония) для коррекции нарушений иммунного гомеостаза при остром отравлении метанолом.

## **МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксперименты проводились на крысах Wistar обоего пола массой 180-240 г. М вводили перорально в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> однократно (DL<sub>50</sub> метанола при пероральном введении составляло 9,1±1,2 г/кг) через 3 сут после иммунизации Т-зависимым антигеном. При оценке эффективности иммуностимуляторов полиоксидоний (ПО) и миелопид вводили

внутримышечно в течение 4 сут в дозе 10 мкг/кг практически одновременно с введением М и иммунизацией. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми в экспериментальной иммунологии методами [3,14]. Гуморальную иммунную реакцию к Т-зависимому (эритроцитам барана - ЭБ) антигену определяли по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке на 5 сут после внутрибрюшинной иммунизацией крыс данными антигенами в дозах  $2 \cdot 10^8$  клеток. В использованном тесте гуморальная иммунная реакция на введение ЭБ характеризует способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции В-лимфоцитами (плазматическими клетками) IgM [7,14]. АОК к ЭБ, синтезирующие IgG, определяли в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле на 8 сут после иммунизации [7,9]. Данные литературы позволяют полагать, что данный метод характеризует преимущественно функцию Th2-лимфоцитов и В-клеток, синтезирующих IgG, так как Th1-лимфоциты обеспечивают возможность образования в этот период антителогенеза кроме IgM так же и IgG<sub>2a</sub>, составляющих не более 20% от всех подклассов IgG [7,11]. Введение М через 3 сут после иммунизации (в продуктивный период иммуногенеза) обеспечивало приблизительно одинаковый эффект на синтез В-лимфоцитами IgM и IgG с участием Th1- и Th2-лимфоцитов через 5 и 8 сут после иммунизации ЭБ.

Для оценки функции В-клеток исследовали гуморальный иммунный ответ к Т-независимому (Vi-Ag) антигену через 5 сут по числу АОК в селезенке, продуцирующих IgM, после введения М через 3 сут после внутрибрюшинной иммунизацией крыс данными антигеном в дозе 8 мкг/кг.

Активность ЕКК определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) через 4 сут после иммунизации спектрофотометрически. Формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), характеризующую функцию Th1-лимфоцитов [7,9], определяли у животных по приросту массы стопы задней лапы в %. При этом крыс внутрибрюшинно иммунизировали  $10^8$  ЭБ через 30 мин после введения

М. Разрешающую дозу ЭБ ( $5 \cdot 10^8$ ) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч.

Для оценки изменения функции лимфоцитов Th1- и Th2-типа под влиянием М наряду с исследованием Т-зависимых гуморальных иммунных реакций, формирования ГЗТ и связанной с продукцией Th1-лимфоцитами ИЛ-2 активности ЕКК [7,9,11] определяли концентрацию интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4) в периферической крови крыс через 4 и 7 сут после иммунизации методом иммуноферментного анализа по протоколам, указанным в инструкции по применению наборов (BioSource Int. ELISA Kits).

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под влиянием М (табл. 1) происходило снижение гуморального иммунного ответа через 4 сут после иммунизации к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез В-клетками IgM и функцию Th1-лимфоцитов, по сравнению с контрольным уровнем в 1,80 раза ( $p < 0,05$ ).

Таблица 1. Влияние острой интоксикации метанолом в дозе  $0,75 \text{ DL}_{50}$  и фармакологической коррекции миелопидом и полиоксидонием (ПО) на показатели системы иммунитета крыс

Серии опытов	АОК к ЭБ (IgM), $10^3$	АОК к ЭБ (IgG), $10^3$	АОК к Vi-Ag, (IgM), $10^3$	ЕЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	$34,2 \pm 3,4$	$16,1 \pm 1,5$	$27,7 \pm 2,5$	$32,4 \pm 3,3$	$31,4 \pm 2,7$
Метанол	$19,0 \pm 1,7^*$	$7,2 \pm 1,0^*$	$13,5 \pm 1,9^*$	$17,3 \pm 2,1^*$	$20,5 \pm 2,0^*$
Метанол + миелопид	$29,8 \pm 3,0$	$14,2 \pm 1,6$	$26,3 \pm 2,3$	$25,7 \pm 2,4$	$26,2 \pm 2,5$
Метанол + ПО	$32,1 \pm 3,1$	$12,4 \pm 1,3$	$21,9 \pm 2,4$	$29,5 \pm 2,7$	$32,4 \pm 2,6$

**Примечание:** в каждой серии использовалось 7-11 животных; \* - отличия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Через 7 сут после иммунизации отмечалось уменьшение продукции IgG (по числу АОК в селезенке) в 2,24 раза ( $p < 0,05$ ), свидетельствующее о супрессии преимущественно функции Th2-лимфоцитов, а также В-клеток.

При отравлении М отмечалась также существенная редукция активности ЕКК и реакции ГЗТ соответственно в 1,87 раза ( $p<0,05$ ) - в 1,53 раза ( $p<0,05$ ).

Как уже указывалось, согласно данным литературы число АОК к ЭБ через 4 сут после иммунизации характеризует синтез IgM В-лимфоцитами и функцию Th1-клеток. Активность ЕКК и формирование ГЗТ также свидетельствует о способности Th1-лимфоцитов влиять на данные реакции, а число АОК к ЭБ в реакции непрямого локального гемолиза в геле через 7 сут после иммунизации отражает синтез IgG и функцию Th2-лимфоцитов [7,11]. Показатели, характеризующие различные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии М в среднем снижались соответственно в 1,73 и 2,24 раза. Это свидетельствует о том, что М в существенно большей степени поражает функцию Th2-лимфоцитов или связанную с ними продукцию В-клетками IgG по сравнению действием яда на Th1-лимфоциты и/или на В-лимфоциты, синтезирующие IgM, а также на ЕКК.

Исследование действия М на Т-независимое антителообразование (число АОК к Vi-Ag), характеризующее функцию В-клеток, свидетельствует о снижении данного показателя под влиянием спирта по сравнению с контролем в 2,05 раза ( $p<0,05$ ).

Применение миелопида увеличивало число АОК к ЭБ на 5 и 8 сут, число АОК к Vi-Ag, активность ЕКК, реакцию ГЗТ при действии М по сравнению с показателями при интоксикации соответственно в 1,57; 1,81; 1,95; 1,70 и 1,39 раза ( $p<0,05$ ), а использование полиоксидония – в 1,69; 1,72; 1,59; 1,95 и 1,58 раза ( $p<0,05$ ) соответственно. Таким образом, ПО по сравнению с миелопидом оказывал на функцию Th1-лимфоцитов больший активирующий эффект, а на Т-независимую продукцию IgM В-клетками - в 1,22 раза меньшее стимулирующее действие.

После интоксикации М выявлено уменьшение в периферической крови крыс концентрации ИЛ-2 и ИЛ-4 на 5 сут после иммунизации

соответственно в 1,56 и 1,61 раза ( $p < 0,05$ ), а на 8 сут - в 1,46 и 1,57 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (табл. 2).

**Таблица 2. Влияние острой интоксикации метанолом в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> и фармакологической коррекции миелопидом и полиоксидонием (ПО) на содержание интерлейкинов в периферической крови крыс, пг/мл**

Серии опытов		ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-2/ИЛ-4
Контроль		1321±92	116±12	11,4
Метанол	5	846±33*	61±6*	13,8
	8	905±40*	69±7*	13,1
Метанол + миелопид	5	1113±75	83±9*	11,9
Метанол + ПО	5	1279±87	90±11	14,2

**Примечание.** В каждой серии использовалось 6 животных; 5, 8 - время исследования после иммунизации, сут; \* - отличия достоверны ( $p < 0,05$ ) по сравнению с контролем.

Известно, что ИЛ-2 продуцируют Th1-лимфоциты, а ИЛ-4 – Th2-лимфоциты [8,9,11]. Увеличение соотношения ИЛ-2/ИЛ-4 характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th2-типа по сравнению с функцией Th1-клеток [8]. Нами установлено, что соотношение ИЛ-2/ИЛ-4 после отравления М составляло на 5 и 8 сут соответственно 13,8 и 13,1 при контрольном значении 11,4. Это свидетельствует о поражении метанолом Th2-клеток по сравнению с Th1-лимфоцитами в большей степени.

Более выраженный супрессирующий эффект М в отношении иммунной реакции, сопряженной с функцией Th2-лимфоцитов, вероятно, обусловлен нарушением их способности активировать функцию В-клеток. Снижение Т-независимого антителообразования вызвано редукцией синтеза В-лимфоцитами IgM вследствие снижения в них фолиевой кислоты в результате ее усиленного потребления при метаболизме метанола [4,7,13]. Уменьшение активности ЕКК под влиянием М, видимо, связано с уменьшением продукции ИЛ-2 Th1-клетками [7,9,11].

Миелопид повышал концентрацию ИЛ-2 и ИЛ-4 в крови на 5 сут при действия М по сравнению с показателем при интоксикации соответственно в 1,32 и 1,36 раза ( $p < 0,05$ ), а использование полиоксидония – в 1,51 и 1,48 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. При этом соотношение ИЛ-2/ИЛ-4 при применении миелопида составляло 11,9, а при введении ПО – 14,2

(контроль – 11,4), что свидетельствовало о способности ПО активировать Th1-лимфоциты в большей степени, чем Th2-клетки.

## ВЫВОДЫ

1. Острое действие метанола в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> в продуктивный период иммуногенеза (через 3 сут после иммунизации) значительно снижает функцию В-клеток; вызывает супрессию иммунных реакций, обусловленных активностью Th1-лимфоцитов, в меньшей степени по сравнению с иммунным ответом, связанным с функцией Th2-клеток.

2. Под влиянием метанола в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> в периферической крови концентрация ИЛ-4, продуцируемого Th2-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем концентрация ИЛ-2, синтезируемого Th1-клетками.

3. Применение миелопида и полиоксидония (ежедневно, однократно, в течение 4 сут в дозе 10 мкг/кг) при отравлении метанолом восстанавливало функцию В-клеток, а также практически полностью иммунные реакции и синтез интерлейкинов, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов. Полиоксидоний оказывал на функцию Th1-лимфоцитов, синтез ИЛ-2 и связанные с ними иммунные реакции по сравнению с миелопидом больший активирующий эффект, а на Т-независимую продукцию IgM В-клетками - меньшее стимулирующее действие.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Забродский П. Ф. // Токсикол. вестник.- 1999.-№2.-С.8-11.
2. Забродский П.Ф. // Общая токсикология/ Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова.- М.: Медицина, 2002. – С. 352-384.
3. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Мальцева Г.М., Молотков А.О. Иммуотропные свойства холинергических веществ / Под редакцией П.Ф.Забродского. – Саратов: Издательство «Научная книга», 2005.- 251 с.
4. Забродский П.Ф., Лим В.Г. Трошкин Н.М. // Эксперим. и клиническая фармакология.-2005.-Т. 68, № 4.-С. 46-48.
5. Кирилина Е.А., Михайлова А.А., Малахов А.А. Гурьянов С.А., Ефремов М.А. // Иммунология. - 1998. - № 4. - С.27-29.
6. Нестерова И.В. // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 2. - С. 139-140.
7. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. (Пер. с англ.) - М.: Мир, 2000. – 582 с.

8. Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед.-2005.-Т. 140, № 12.-С. 622-624.
9. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. – 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2002.- 536 с.
10. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. // Иммунология. – 2005.-Т. 26.-№ 4.-С. 197.
11. Georgiev V.St., Albright J.E. // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993. - Vol. 685. – P.284-602.
12. Jeya Parthasarathy N., Sri Kumar R., Sheela Devi R. // J. Immunotoxicol. – 2005. –Vol. 2. P. 115-121.
13. Johlin F.C., Fortman C.S., Nghiem D.D., Tephly T.R. // Mol. Pharmacol. 1987.- Vol. 31.- P. 557-561.
14. Smialowicz R. J., Luebke R.W., Riddle M. M. // Toxicology. - 1992. - Vol.75, №5. - P.235-247.
15. Tephly T.R. // Life Sci. –1991. Vol. 48.-P. 1031-1041.

**SUPPRESSION OF IMMUNE RESPONSES ASSOCIATED WITH  
FUNCTION OF B-CELLS, TH1- AND TH2-LYMPHOCYTES AND  
PRODUCED BY THEM OF INTERLEUKINS, AND  
PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF OF THESE  
INFRINGEMENTS AT ACUTE INTOXICATION OF METHANOL  
P. F. Zabrodskii, V.G. Mandich, V.F. Kirichuk, V.V. Serov, I.A. Plahuta**

*Saratov Military Institute for Radiation, Chemical and Biological Defense, ul. 50 years of  
October, 5, 410037, Saratov, Russia*

*Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, 410710, Saratov, Russia*

It was established in experiments on Wistar rats that acute poisoning methanol (0,75 LD<sub>50</sub>) invoked the suppression of cellular and humoral immune responses and decrease of concentration in a blood interleukins (IL-2, IL- 4) with increase of a relation an IL-2/IL-4. It bears that the reduction of function of Th2-lymphocytes in comparison with Th1-cells is more expressed. The immunomodulators mielopide and polyoxidonium in dose 10 µg/kg by daily administration during of four days after acute poisoning of methanol invokes practically completely restore of cellular and humoral immune responses, the activity of natural killers and synthesis of interleukins.

**Keywords:** methanol, immunotoxicity, Th1, Th2-lymphocytes, interleukins, immunomodulators