

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

СУПРЕССИЯ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ФУНКЦИЕЙ В-КЛЕТОК, ТН1- И ТН2-ЛИМФОЦИТОВ И ПРОДУЦИРУЕМЫХ ИМИ ЦИТОКИНОВ, И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ЭТИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ МЕТАНОЛОМ

П. Ф. Забродский¹, В.Г. Мандыч,¹ В.В. Серов²,

И.А. Плахута²

Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической защиты²

Саратовский Государственный медицинский университет¹

В экспериментах на крысах Wistar установлено, что при остром отравлении метанолом (0,75 DL₅₀) 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

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

²Саратовский 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 иммунотропных 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 DL₅₀ однократно (DL₅₀ 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 иммунотоксикологии 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 также и IgG_{2a}, 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, производящих IgM, после введения М через 3 сут после внутрибрюшинной иммунизацией крыс данным 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 DL₅₀ 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 действия 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 DL₅₀ 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 контролльном 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 DL₅₀ 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 DL₅₀ 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. Иммунотропные свойства холинергических веществ / Под редакцией П.Ф.Забродского. – Саратов: Издательство «Научная книга», 2005.- 251 с.
4. Забродский П.Ф., Лим В.Г. Трошkin 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. Хайтов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. – 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2002.- 536 с.
10. Хайтов 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 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 LD₅₀) 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