

П.Ф. Забродский, С.В. Балашов

**Иммунопатология острой интоксикации
тетрахлорметаном (четырёххлористым
углеродом). Фармакологическая коррекция**

МОНОГРАФИЯ

© П.Ф. Забродский, 2012

© В.А. Балашов, 2012

ISBN 978–5 –91272-254-70

УДК 612.014.46:616–045
ББК 52.84+52.54+52.8 Я 21
3–123

САРАТОВ – 2012

ОГЛАВЛЕНИЕ

Перечень сокращений.....	5
Введение.....	6
Глава 1. Токсикологические свойства тетрахлорметана. Нарушения физиологической регуляции иммуногенеза	
Глава 2. Материал и методы исследований.....	15
2.1. Объект исследования и применяемые препараты.....	35
2.1.1. Сывороточная активность лизоцима.....	37
2.1.2. Тромбоцитарный катионный белок сыворотки крови.....	37
2.1.3. Определение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов.....	38
2.1.4. Определение содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови.....	40
2.1.5. Исследование гуморального звена иммунного ответа.....	41
2.1.6. Оценка кооперации т- и в- лимфоцитов ex vivo и in vitro.....	42
2.1.7. Исследование функции th1- лимфоцитов.....	43
2.1.8. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности.....	44
2.1.9. Оценка активности естественных клеток-киллеров.....	47
2.1.10. Исследование функции надпочечников, активности эстераз т-клеток, моноцитов, макрофагов и перекисного окисления липидов.....	49
2.3. Методы статистической обработки результатов исследований ...	50
Глава 3. Влияние тетрахлорметана на физиологические механизмы регуляции доиммунных механизмов защиты от	52
	54
	58

инфекций.....	
3.1. Сывороточная активность лизоцима при остром действии тхм....	
3.2. Активность тромбоцитарного катионного белка в сыворотке крови	59
3.3. Фагоцитарная активность нейтрофилов.....	
Резюме.....	59
Глава 4. Влияние тетрахлорметана на физиологические механизмы регуляции системы иммунитета.....	63
4.1. Изменение содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета.....	65
4.2. Влияние тхм на тимусзависимый гуморальный иммунный ответ...	
4.2.1. Оценка воздействия тетрахлорметана на антителообразование к тимусзависимому антигену в динамике по титру антител в крови.....	67
4.2.2. Исследование действия острого отравления тхм на число антителообразующих клеток в селезенке.....	72
4.2.3. Оценка влияния острого отравления тхм на число антителообразующих клеток в селезенке, синтезирующих Ig.....	74
4.2.4. Нарушение кооперации Т- и В- клеток в формировании антителообразования <i>ex vivo</i> и <i>in vitro</i>	80
4.3. Влияние ТХМ на тимуснезависимый гуморальный иммунный ответ.....	84
4.4. Оценка влияния тхм на клеточный иммунный ответ.....	86
4.4.1. Изучение функции Th1-клеток.....	86
4.4.2. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности.....	88

4.4.3. Воздействие острой интоксикации ТХМ на функцию естественных клеток-	92
киллеров.....	94
Резюме	
Глава 5. Механизмы нарушения физиологической регуляции иммунного гомеостаза при отравлении	95
тетрахлорметаном.....	
5.1. Исследование редукции функции th1- th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов в супрессии иммунных реакций.....	95
5.2. Роль кортикостероидов и ПОЛ в супрессии иммунного ответа При отравлении	
тетрахлорметаном.....	
5.3. Оценка действия тетрахлорметана на активность ацетилхолинэстеразы Т-клеток.....	99
Резюме.....	101
Глава 6. Коррекция нарушений физиологической регуляции иммунного гомеостаза при остром отравлении	
тетрахлорметаном.....	107
6.1. Влияние антидотов, индукторов и ингибиторов р-450-зависимых монооксигеназ при отравлении тетрахлорметаном на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и параметры системы	110
иммунитета.....	112
6.2. Исследование действие ингибитора р-450-зависимых монооксигеназ 2-диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетата (SKF-525a) при остром отравлении тетрахлорметаном на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и иммунный	133
ответ.....	135
6.3. Обоснование иммунокоррекции нарушений физиологической регуляции иммунного гомеостаза после острого отравления	136

тетрахлорметаном

6.4. Влияние имунофана и полиоксидония на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и показатели иммунного ответа при острой интоксикации тетрахлорметаном с применением антидотов.....

Резюме.....

Заключение.....

Выводы.....

Практические рекомендации.....

Литература.....

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

АЗКЦ - антителозависимая клеточная цитотоксичность

АХЭ - ацетилхолинэстераза

АОК - антителообразующие клетки

АОС – антиоксидантная система

ГГАС – гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система

ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа

ЕКК - естественные клетки-киллеры

ЕЦ - естественная цитотоксичность

ИКК - иммунокомпетентные клетки

ИЛ-1 (2 и т.д.) - интерлейкин-1 (2 и т.д.)

ИФН- γ – γ - интерферон

К-клетки - клетки-киллеры (лимфоциты, определяющие АЗКЦ)

КС - кортикостерон

МАН – малоновый диальдегид

МС – микросомальная система

ОДЛТА – отрицательный двоичный логарифм титра антител

ПОЛ - перекисное окисление липидов

СПР – суммарная продукция радикалов

ТКБ – тромбоцитарный катионный белок

ТХМ - тетрахлорметан

Th1-(Th2)-лимфоциты - Т-лимфоциты-хелперы типа 1 и 2

ФМАН – фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов

ЭК – эритроциты кур

ЭБ - эритроциты барана

LD₅₀ (ЛД₅₀) - средняя смертельная доза, вызывающая смертельный исход у 50% отравленных

Vi-антиген (Vi-Ag) - тимуснезависимый Vi-антиген брюшнотифозной вакцины

ВВЕДЕНИЕ

Исследование острого действия ксенобиотиков на доиммунные факторы защиты организма от инфекций (неспецифическую резистентность организма) и систему иммунитета и возможностей коррекции его нарушений при помощи перспективных иммуностимуляторов является одной из наиболее актуальных проблем физиологии, токсикологии и иммунологии [Забродский П.Ф. и соавт., 2007]. Это определяется применением в Вооруженных Силах Российской Федерации разнообразных токсикантов, возможными авариями на химических объектах, вероятностью террористических актов с применением высокотоксичных соединений, возрастанием интоксикаций различными соединениями, вызывающих постинтоксикационные иммунодефицитные состояния, различные инфекционные заболевания [Забродский П.Ф. и соавт., 1998, 2002, 2007; Агапов В.И. и соавт., 2004; Miller K., 1985; Descotes J., 1986; Luster M. J. et al., 1987; Sullivan J. B., 1989; Kimber I., 1996; Manibusan M.K., et al., 2007].

Тетрахлорметан (ТХМ) широко используется в промышленности как растворитель масел, жиров, каучука, битумов и смол; для экстрагирования жиров и алкалоидов из костей и семян; при производстве фреонов; для чистки и обезжиривания одежды в быту и производственных условиях [Тиунов Л.А., 1990; Wernke M.J., Schell J.D., 2004]. В последние годы частота острых интоксикаций хлорированными углеводородами, и, в частности ТХМ и показатель смертельных исходов от отравлений не уменьшаются [Забродский П.Ф. и соавт., 2007; Rusinski P., Kolasinski Z., 2003]. Несмотря на относительно небольшую частоту острых интоксикаций данными соединениями (до 5%), они характеризуются весьма высокой смертностью отравленных (20-96%) [Курашов О.В., Троцевич В.А., 1992; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Пациенты с отравлениями ТХМ составляют до 60% всех больных с токсическим поражением печени [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Венгеровский А.И., Седых И.М., Саратиков

А.С., 1993]. Особую опасность ТХМ может представлять при аварийных ситуациях на химических объектах, в частности, в процессе уничтожения химического оружия, когда в силу его высокой летучести ингаляционным отравлениям может подвергаться большое количество людей. Продукты термической деструкции ТХМ (данное соединение может быть использован для пожаротушения) образуют наряду с многочисленными токсикантами отравляющее вещество фосген. Нельзя исключить употребление ТХМ в качестве суррогата алкоголя или с суицидальными целями [Курашов О.В., Троцевич В.А., 1992; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 2007].

Одной из причин высокой смертности после острого отравления ТХМ [Кожемякин Л.А. и соавт., 1992] могут являться инфекционные осложнения и заболевания, связанные с формированием вторичного иммунодефицита. При этом влияние ТХМ на систему иммунитета нуждается в дальнейшем изучении [Забродский П.Ф. и соавт., 2002, 2007; Descotes J., 1986; Luster M.I. et al., 1987; Streets K.L., Wustefeld T., 2001; Louis H. et al., 2003].

Изучение действия ТХМ на доиммунные факторы защиты организма и систему иммунитета имеют как теоретическое значение, раскрывая неизвестные механизмы регуляции неспецифической резистентности организма и иммуногенеза, так и практическое, позволяя проводить научно обоснованные профилактику и лечение возникающих при отравлениях данным токсикантом инфекционных, аллергических, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний [Хаитов Р. М. и соавт., 1995; Ратькин А.В. и соавт., 2005; Забродский П.Ф., 1993, 2002, 2007; Loose L.D., 1985; Miller K., 1985; Descotes J., 1986; Luster M. I. et al., 1987; Georgiev V. S, Yamaguuchi H., 1993; Kimber I., 1996; Popp W., 1996; Gobba F. et al., 1997; Plaa G.L., 2000; Sell S., 2000; Luster M.I., Simeonova P.P., 2001; Weber L.W. et al., 2003; Wernke M.J., Schell J.D., 2004; Rosenberg Y.J., 2005; Masuda Y., 2006]. Следует отметить, что вопрос о медикаментозной коррекции нарушений иммунного гомеостаза под влиянием ТХМ в постинтоксикационном периоде

до сих пор изучен недостаточно [Забродский П.Ф. и соавт., 2007].

Таким образом, учитывая достаточно широкое распространение и использование в промышленности, технике и быту ТХМ, высокую летальность при отравлении им, недостаточно изученные особенности его действия на физиологические механизмы регуляции системы иммунитета, следует заключить, что проблема изучения нарушения иммунного гомеостаза при остром отравлении ТХМ, обоснование фармакологической коррекции его нарушений в постинтоксикационный период важна как в теоретическом, так и в практическом отношении.

Целью исследования являлось изучение неспецифической резистентности организма и иммунного статуса при отравлении тетрахлорметаном и разработать обоснованные направления фармакологической коррекции выявленных нарушений.

ГЛАВА 1

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ТЕТРАХЛОРМЕТАНА. НАРУШЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИММУНОГЕНЕЗА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Четыреххлористый углерод (тетрахлорметан, ТХМ, перхлорметан, фреон–10, хладон–10) относится к хлорпроизводным метана. Это бесцветная жидкость с ароматическим запахом (сходным с хлороформом). Не воспламеняется. При соприкосновении с пламенем или нагретыми предметами разлагается, образуя фосген. Молекулярная масса 153,84, температура кипения $76,8^{\circ}\text{C}$, температура плавления -23°C , хорошо растворим в жирах. Коэффициент растворимости паров в воде 1,04 (20°C), 0,73 (30°C). Химическая формула: CCl_4 [Тиунов А.Л., 1990]. Смешивается с большинством органических растворителей. ТХМ практически нерастворим в воде. Хорошо растворяет жиры и масла, канифоль, многие натуральные и синтетические смолы, а также серу, желтый фосфор и галогены. В отсутствии влаги не действует на металлы. При нагревании выше 1000°C образуется тетрахлорэтилен и хлор, при неполном гидролизе водяным паром – фосген: $\text{CCl}_4 + \text{H}_2\text{O} = \text{COCl}_2 + 2\text{HCl}$ [Тиунов А.Л., 1990].

ТХМ широко используется в промышленности как растворитель масел, жиров, каучука, битумов и смол; для экстрагирования жиров и алкалоидов из костей и семян; при производстве фреонов; благодаря трудной воспламеняемости и высокой плотности используется в огнетушителях в тех случаях, когда неприменимо тушение водой (при пожарах нефтепродуктов, на электроустановках и т.д.), тушение огня ТХМ в закрытом помещении представляет опасность ввиду токсичности его паров и образующихся газов; для чистки и обезжиривания одежды в быту и производственных условиях. В медицине применялся в качестве противоглистного средства, т.к. он

эффективен при заражении анкилостомами, аскаридами, острицами, ленточными глистами [Тиунов А.Л., 1990].

В настоящее время ТХМ исключен из номенклатуры лекарственных средств в связи с тем, что появились более безопасные и обладающие большей противоглистной активностью [Машковский М.Д., 2001].

Первый случай ингаляционного отравления ТХМ отмечен во Франции в 1938 году. Долгие годы наблюдались преимущественно производственные ингаляционные отравления. Описано много профессиональных отравлений, среди них немало смертельных. Часто наблюдаются отравления на мелких предприятиях, при дегельминтизации животных. Причиной пероральных отравлений часто бывает употребление этого препарата с целью опьянения. Ингаляционные отравления возникают на производстве при несоблюдении правил техники безопасности, в быту при чистке одежды в небольших, плохо проветриваемых помещениях. Возможны отравления при длительном контакте ТХМ с кожей. Случай массового отравления с 20 смертельными исходами описан при употреблении внутрь средства для мытья волос, содержащего 1,4% ТХМ (остальное спирт). ТХМ - один из самых сильных гепатотропных ядов [Тиунов Л.А., 1990; Rusinski P., Kolasinski Z., 2003].

Для мышей при двухчасовой экспозиции тетрахлометана CL_{50} составляет 34500 ± 7100 мг/м³, для крыс при шестичасовой - 46 000 мг/м³ [Тиунов Л.А., 1990]. Летальные дозы при внутрижелудочном введении составляют для крыс и мышей соответственно 7700-11000 и 6000–8500 мг/кг, для морских свинок и кроликов от 5760 до 7564 мг/кг [Тиунов Л.А., 1990; Manibusan M.K. et al., 2007; Weiler-Normann C. et al., 2007].

Интоксикация ТХМ оказывает наркотическое действие, поражает центральную нервную систему, печень, почки, обладает местным раздражающим действием. ТХМ вызывает мутагенные, канцерогенные, эмбриотропные и гонадотропные эффекты [Tomenson J.A. et al., 1995; Zimmerman H.J. Lewis J.H., 1995; Calabrese E.J., Mehendale H.M., 1996; Laskin D.L., 1996; Lynge E. et al., 1997; Masuda Y., 2006]. Высококумулятивное

соединение [Тиунов Л.А., 1990]. Вызывает фиброз в тканях печени [Pereira-Filho G. et al., 2008; Salazar-Montes A. et al., 2008]. Ингаляционное воздействие ТХМ на крыс при экспозициях 1, 2, 3 и 6 ч в концентрациях 1350, 2500, 3400 и 6900 (ppm) млн⁻¹ сопровождалось во всех случаях поражением печени [Тиунов Л.А., 1990; Farkas D., Tannenbaum S.R., 2005].

У кроликов наркоз не развивается даже при ингаляции смертельных концентраций. Сгибательный рефлекс замедляется при действии 1500 мг/м³. Для крыс пороговая концентрация по интегральным показателям при 4-ч воздействии составляет 1200 мг/м³. У мышей при действии 134 300 мг/м³ в течение 90 с тормозится выработка условной реакции пассивного избегания [Чиркова В.М., 1983; Тиунов Л.А., 1990].

При остром действии тетрахлорметана активность глутаматоксалацетаттрансаминазы возрастала, достигая максимума через 24 ч после воздействия, затем постепенно снижалась. Однократная ингаляция 6300 мг/м³ при экспозиции 15 мин вызывала у кошек патологические изменения в печени, появление в ней жира, увеличение относительной массы органа [Тиунов Л.А., 1990; Farkas D., Tannenbaum S.R., 2005].

У мышей, крыс, морских свинок и кроликов при ингаляции ТХМ снижение содержания белка и нарушение соотношений белковых фракций в крови, увеличение активности в сыворотке аминотрансфераз, альдолазы, аргиназы, ксантиноксидазы, глутаминазы, как следствие нарушения клеточных мембран гепатоцитов [Tomenson J.A. et al., 1995; Sell S., 2000]. В митохондриях печени крыс усиливается перекисное окисление липидов, меняется хемилюминесценция ткани печени [Spoo W., 2001; Weber L.W. et al., 2003; Salazar-Montes A. et al., 2008; Botsoglou N.A. et al., 2008].

При однократном внутрижелудочном введении ТХМ в дозе 2 мл/кг у крыс на протяжении последующих 14 сут развивались фазовые изменения окислительного фосфорилирования в митохондриях печени [Тиунов Л.А., 1990]. При дозе 3 мл/кг структурные нарушения в печени и торможение

репаративных реакций были сильнее выражены. Доза 0,15 мл/кг вызвала развитие изменений уровня гистонов в ядрах клеток печени. При 0,5-3,0 мл/кг через 24 ч ухудшались показатели свертываемости и фибринолитической активности крови [Gobba F. et al., 1997; Sell S., 2000].

При подкожном введении ТХМ крысам в дозе 2,5 мл/кг увеличивалась активность аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке крови. У морских свинок подкожное введение 1 мл/кг ТХМ вызывало в различные сроки после воздействия (через 6 ч, 1,3, 5, 7, 10, 15 сут) снижение содержания общего и восстановленного глутатиона, аскорбиновой кислоты, активности карбоангидразы в крови и печени [Тиунов Л.А., 1990]. Аналогичные данные получены при исследовании крыс, получавших ТХМ внутрибрюшинно. Так, доза ТХМ, составляющая 0,2 мл/кг, через 24 и 72 ч после введения повышала активность аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в плазме крови, увеличивала содержание в печени малонового диальдегида, снижала уровень глутатиона-SH и активности глутатиона-SH-пероксидазы и глутатиона глутатиона-S-трансферазы. Максимальный эффект регистрировался через 24 ч после воздействия [Botsoglou N.A. et al., 2008; Tasduq S.A. et al., 2008; Mehmeicic G. et al., 2008].

У мышей и крыс внутрибрюшинное введение ТХМ в дозах 200, 500, 1000, 2000 мг/кг через 48 ч изменяло митотический индекс тимуса, его массу, общее число клеток тимуса и пахового лимфатического узла [Тиунов Л.А., 1990; Лим В.Г., 2006; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Интенсивность изменений по мере увеличения дозы приближалась к экспоненте. Внутрибрюшинное введение крысам ТХМ в дозе 0,25 мл/кг вызывало жировое перерождение печени, переходящее в фиброз, изменения в центральных лобулярных областях, снижение скорости синтеза белка, увеличение уровня триглицеридов и кальция в крови [Тиунов Л.А., 1990; Lieber C.S., 1999; Moyer E.S. et al., 2001]. ТХМ при внутрибрюшинном введении в дозах 0,1; 0,3 и 1 мл/кг усиливал у крыс

процессы перекисного окисления липидов и стимулировал выделение этана с выдыхаемым с воздухом на протяжении 6 ч с 15 нмоль/кг до 30, 40 и 110 нмоль/кг соответственно [Huang X. et al., 2008].

При дозе ТХМ, составляющей 1 мл/кг нарушалась микроциркуляция в печени, активизировались процессы гемолимфодинамики в начальный период интоксикации и ингибировались в поздние сроки [Plaа G.L., 2000].

У цыплят после внутрибрюшинного введения ТХМ (5 мл/кг через 1, 3, 6 и 24 ч) в печени снижалось содержание цитохрома Р-450 и угнеталась активность аминопирин-N-деметилазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы [Wasser S., Tan C.E., 1999].

Подкожное введение мышам ТХМ в дозе 0,2 мл в 40 % растворе персикового масла вызывало дистрофические изменения гепатоцитов. Через 12-14 ч уменьшалось содержание гликогена, развиваются мутное набухание и жировая дистрофия печеночных клеток. Затем появляются участки некроза с локализацией в центральных отделах долек. В сохранившихся клетках — вакуольная, ацидофильная жировая дистрофия различной степени выраженности. Угнетается синтез РНК в гепатоцитах, но не в эндотелии. При электронной микроскопии: набухание митохондрий, просветление их матриц, дезорганизация крипт, расширение канальцев эндоплазматического ретикулума, уменьшение числа рибосом. Через 48 ч наблюдалось усиление синтеза ДНК в ядре, развитие компенсаторных реакций. При дозе 2 мл/кг у мышей усиливается способность печени реагировать повышением митотической активности в ответ на частичную гепатэктомию. Изменения интенсивности митотической реакции в ответ на гепатэктомию сохраняются в течение 1,5 мес. В перипортальных прослойках появлялись инфильтраты из лимфоцитарных клеток и гистиоцитов. Дистрофические изменения исчезали к 7 дню после интоксикации [Тиунов Л.А., 1990]. Аналогичные данные получены J.A. Tomenson et al. (1995), A. Dalu, H.M. Mehendale (1996), K. Neubauer, S.T. Eichhroost (1998), N. Brautbar, J. Williams 2nd (2002).

Ежедневное ингаляционное воздействие на морских свинок ТХМ в концентрации 7300 мг/м^3 при 7-ч экспозиции вызывало гибель всех животных в течение 6 дней, при 300 мг/м^3 развивались цирротические изменения в печени, дегенеративные изменения в надпочечниках, зрительном нерве [Brautbar N., Williams J. 2nd, 2002]. При 14, 41, 460 мг/м^3 по 4 ч ежедневно в течение 8 дней наблюдались нарушения функции нервной системы после нагрузки этанолом, изменения количества холевой кислоты в печени, угнетение функции щитовидной железы, увеличение адренокортикотропной активности гипофиза, изменение длительности движения сперматозоидов [Saracyn M., 2002].

У мышей при подкожном введении 0,2 мл 40 % раствора ТХМ (1, 2 или 3 раза в неделю в течение 6 недель) через 14-21 день отмечались выраженные дистрофические и некротические изменения в печени, особенно после первых 2—3 введений. Повторные введения сопровождались интенсификацией репаративной регенерации. Митотический индекс не увеличивался. Четырехкратное подкожное введение ТХМ через день кроликам в дозе $0,5 \text{ мг/кг}$ вызвало увеличение белка в сыворотке крови, изменение альбуминов и глобулинов. Включение метионина, меченного по сере, в глобулины увеличивалось, а в альбумины уменьшалось. Введение внутрижелудочно мышам по 200 мг/кг в течение 8 дней нарушало лимфопоэз [Тиунов Л.А., 1990].

В настоящее время существенную роль в патогенезе поражения печени ТХМ придают изопростанам. Печень являлась самым важным в нашем понимании физиологии и биологии источником F2-изопростанов. Открытие F2-изопростанов существенно изменило понимание развития поражения печени при интоксикациях [Moore K., 2003; Basu S., 2003].

При хроническом отравлении у крыс при ингаляции ТХМ в концентрациях, составляющих 300, 1250, 2500 мг/м^3 по 8 ч в день 5 раз в неделю в течение 15 мес. отмечалась дегенерация нервных волокон, некротический нефроз. Доза 600 мг/м^3 вызывала цирротические изменения в

печени. Максимальная концентрация вызывала гибель части животных через 20 недель. При концентрациях 21-26 мг/м³ по 5 ч в день на протяжении 5 мес. у крыс отмечалось изменение гексеналовой пробы (активация Р-450-зависимых монооксигеназ), явления белковой дистрофии печени, отставание в приросте массы тела, фазовые колебания уровня артериального давления, изменение синтеза белка [Тиунов Л.А., 1990; Moore K., 2003; Mehendale H.M., 2005; Roskams T., Cassiman D., 2004].

При круглосуточной ингаляции ТХМ в концентрациях 300, 100, 5 мг/м³ и сроках от 24 до 219 сут у крыс развиваются морфофункциональные изменения печени, прогрессирующие при увеличении срока ингаляции [Тиунов Л.А., 1990].

Ингаляция крысами ТХМ в монотонном и интермиттирующем режимах в течение 1 мес. при одинаковой средневзвешенной концентрации 210 мг/м³ вызывала изменения функции печени, почек, надпочечников, нервной системы, лимфоидной ткани, которые были более выражены в случае прерывистого воздействия. Иные данные получены при непрерывной ингаляции (500 мг/м³) в течение 10 сут и интермиттирующем действии в течение 40 дней. Скорость развития и выраженность интоксикации по критериям активности щелочной фосфатазы, холинэстеразы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, содержанию уробилина, β -липопротеидов, тиоловых групп в сыворотке крови и выведению гиппуровой кислоты с мочой была в 4 раза выше при непрерывном воздействии яда. Однако по критерию полиплоидизации гепатоцитов разница между группами отсутствовала. Развитие полиплоидизации гепатоцитов зависело не столько от режима интоксикации, сколько от суммарной дозы ТХМ, полученной крысами за время опыта [Farkas D., Tannenbaum S.R., 2005].

У крыс, подвергавшихся воздействию ТХМ в концентрации 20 мг/м³ в течение 6 месяцев, на 2, 4, 12 день опыта отмечено повышение содержания катехоламинов, ускорение превращения ДОФА в дофамин, активация

симпатоадреналовой системы. Кролики при ингаляции 8600 мг/м^3 8 ч в день гибли после 1-3 затравок, при 4600 мг/м^3 погибала лишь часть животных, при 63 мг/м^2 по 7 ч в день в течение 6 месяцев, не было зарегистрировано признаков интоксикации. У кроликов, которые 6 месяцев по 2 ч ежедневно вдыхали 400 мг/м^3 ТХМ, в начальной стадии хронической интоксикации наряду с жировой инфильтрацией печени и лейкоцитозом обнаруживались резкое угнетение агглютининообразования, изменения активности холинэстеразы и уровня ацетилхолина [Тиунов Л.А., 1990].

Морские свинки переносят без существенных изменений ингаляцию ТХМ в концентрации 32 мг/м^3 в течение 6 месяцев по 7 ч в день. У обезьян, подвергавшихся воздействию ТХМ в концентрациях 300 и 1250 мг/м^3 по 8 ч в день 5 раз в неделю в течение 1,5 месяцев, отмечены слабые признаки жировой инфильтрации печени. При действии большей концентрации обнаружены явные дегенеративные изменения в зрительном и седалищном нервах. Ежедневное в течение 6 мес. семичасовое вдыхание ТХМ в концентрации 160 мг/м^3 переносилось без проявления токсического действия [Тиунов Л.А., 1990; Masuda Y. , 2006].

Введение ТХМ подкожно крысам каждые 2 недели в течение 40 недель в дозе 0,25 мл приводило к развитию цирроза печени на 15 неделе опыта. Внутривенное введение крысам в дозе 150 мг/кг ежедневно приводило через 6 мес. к изменениям морфологического состава крови, содержания тиоловых групп, мочевины, протромбинового времени, копропорфирина в моче. Нарушалась функция печени. Изменялась взаимосвязь процессов возбуждения и торможения в коре больших полушарий головного мозга. При уменьшении дозы в 10 раз (15 мг/м^3) признаки поражения не развивались. Введение кроликам ТХМ в дозе 100 мг/кг в течение 8 мес. вызывало на 1-2 месяце увеличение экскреции 17-кетостероидов с мочой на 59 %, на 5 месяце эти изменения нормализовались, а затем экскреция гормонов вновь возрастала. Хроническая интоксикация кроликов ТХМ сопровождается повышением уровня возбудимости лобной доли коры,

гипокампа, ретикулярной формации среднего мозга [Тиунов Л.А., 1990; Tomenson J.A. et al., 1995; Roskams T., Cassiman D., 2004; Weiler-Normann C. et al., 2007].

При хроническом отравлении (внутрижелудочное и внутрибрюшинное введение) у крыс и мышей развивались опухоли печени. При подкожном введении появлялись опухоли молочных желез у крыс [Lieber C.S., 1997; Popp W., 1996; Luster M.I., Simeonova P.P., 2000; 2001].

Гепатотоксичность некоторых из растворителей признана [Brautbar N. et al., 2002]. Исследовалось действие ТХМ на печень крыс Вистар различного возраста в течение 1-1,5 лет. У крысят жировая дистрофия развивалась уже в течение первых 20 дней, очаговые некрозы через 3-4 дня после начала воздействия. Цирротические изменения возникали на 70-90 день. Регенерация протекала интенсивно, изменения в печени нормализовались через 6—8 мес. У крыс среднего возраста прецирротические изменения развивались на 3—4 мес., а цирроз на 9—11 мес. Цирротические изменения исчезали через 1—1,5 года. У старых крыс дегенеративные процессы в печени развивались медленно, регенерация протекала вяло и нормализации структуры не наступало [Тиунов Л.А., 1990].

ТХМ поступает в организм через легкие, внутрижелудочно, через кожу (как в виде жидкости, так и в парообразном состоянии). После 30-мин контакта кожи рук с ТХМ он выделяется с выдыхаемым воздухом ($0,693\text{—}100,5\text{ мг/м}^3$) в течение 5 ч [Тиунов Л.А., 1990; Wasser S., Tan C.E., 1999].

При ингаляционном поступлении у животных и человека абсорбируется 20—35 % от вдыхаемого количества. В течение 3 ч ингаляции ТХМ абсорбция у кроликов с 35 % упала до 5 % [Weiler-Normann C. et al., 2007]. При приеме внутрь в течение первого часа в желудке человека всасывается 30 % ТХМ, остальное всасывается в тонкой кишке. Всасывание ускоряется при приеме ТХМ с алкоголем и жирами. При введении ТХМ внутрибрюшинно или подкожно кроликам в дозах 0,2—2 мг/кг макси-

мальное накопление яда в печени отмечается через 24—48 ч после интоксикации. Сохраняется в печени в течение 12 дней после введения. Максимальная концентрация в крови ТХМ отмечается в течение 2-4 ч после приема. Через 6 ч большая часть яда переходит в жировую ткань, печень, мозг. Жировая ткань играет роль временного депо; содержание в ней ТХМ в 8-20 раз больше, чем в крови. При проникновении через кожные покровы («выстриженная кожа») обезьян паров ТХМ в концентрации 3000 и 7200 мг/м³ содержание его в крови через 4 ч составляла соответственно 0,012 мг% и 0,03 мг%. В организме распределялся неравномерно. У обезьян после 300-мин ингаляции меченного по углероду ТХМ в концентрации 300 мг/м³ основная масса яда содержалась в жировой ткани, затем (по степени убывания) в печени, костном мозге, крови, головном мозге, почках, сердце, селезенке, мышцах, легких, костной ткани. При введении подкожно крысам ТХМ также в максимальной степени концентрировался в жировой ткани. В крови концентрация токсиканта составляла 0,005— 0,01 % от введенной дозы. В эритроцитах уровень ТХМ в 2,5 раза выше, чем в плазме [Тиунов Л.А., 1990; Plaa G.L., 2000].

Таким образом, в виду выраженной липотропности ТХМ быстро всасывается в кровь. В экспериментах на животных наибольшая концентрация яда наблюдается в жировой ткани (примерно в 8 раз больше, чем в крови). Наиболее высокая концентрация ТХМ в крови достигается в течение 2-4 часов, а через 6 часов его большая часть переходит в жировую ткань, печень, мозг. При ингаляционных отравлениях токсикокинетические процессы протекают в 2-3 раза быстрее.

В организме ТХМ частично очень медленно разрушается, выделяется в течение длительного времени (до 70 дней) через дыхательные пути, в неизмененном виде (до 50-60%) - через почки и кишечник. В почках не концентрируется. На первой стадии биотрансформации ТХМ подвергается одноэлектронному восстановлению в системе цитохрома Р-450 до С1⁻ иона и радикала СС1₃. ТХМ подвергается метаболическому разложению в

мембранах эндоплазматического ретикулума печени при участии Р-450-зависимых монооксигеназ. ТХМ активируется цитохромами 2E1, CYP2B1 или CYP2B2, и возможно CYP3A [Weber L.W. et al., 2003]. В результате происходит образование свободных радикалов (CCl_3^+ ; $\text{O}-\text{O}-\text{CCl}$; $\text{HO}-\text{OCCCl}_3$; $\text{HO}-\text{CCl}_3$), из которых высокую активность имеет CCl_3^+ . Этот радикал занимает центральное место в метаболизме ТХМ. Его превращение идет по трем путям: через одноэлектронное восстановление при участии цитохрома Р-450 до радикала CCl_2 , который под действием H_2O переходит в HCl и CO ; через окислительные превращения с образованием радикала $\text{O}-\text{O}-\text{CCl}$, затем $\text{HO}-\text{OCCCl}_3$, который взаимодействует с восстановленным глутатионом и дает $\text{HO}-\text{CCl}_3$, переходящий в фосген; через восстановление до хлороформа. Хлороформ подвергается биотрансформации до CO_2 , HCl и 2-оксотиазолидин-4-карбамата. [Weber L.W. et al., 2003].

Свободные радикалы действуют на функциональные группы белков, внутриклеточных мембран и ферментов, выполняют роль инициаторов реакции перекисного окисления ненасыщенных жирных кислот в мембранах, ингибируют биосинтез белка, вызывают диссоциацию полисом, рибосом, разрушение РНК. Кроме того, радикал CCl_3^+ может вступать во взаимодействие с эндогенными липидами, в первую очередь биомембран, давая цепь реакций перекисного окисления. В процессе метаболизма фосген превращаются в диоксид углерода, оксид углерода, хлористый водород и воду. Метаболизму подвергается 20% от введенной дозы ТХМ [Weber L.W. et al., 2003; Fu Q.S., 2008].

ТХМ выделяется через легкие (50-60%), почки и кишечник. Через легкие в течение 1 ч выводится 33% от дозы. В дальнейшем выделение продолжается на более низком уровне. При введении крысам подкожно ТХМ в дозе 40-1000 мг до 90 % от дозы выделяется за 73-98 ч. В первые 8 ч выделялось 44,2 % от выдыхаемого количества. Выделение происходило по экспоненциальной кривой. У обезьян через легкие выделялось 50 % от

адсорбируемой дозы. Выделение продолжалось до 75 дней после прекращения экспозиции. У собак в выдыхаемом воздухе после ингаляционного отравления ТХМ обнаруживались продукты его биотрансформации: CO_2 и хлороформ. Выделение CO_2 за 18 ч составило 10 % от поглощенной дозы. Незначительное количество продуктов биотрансформации ТХМ обнаруживается также в моче и кале [McGregor D., Lang M., 1996; Plaa G.L., 2000].

У человека минимально ощутимая по запаху концентрация для наиболее чувствительных людей составляет $11,5 \text{ мг/м}^3$, максимально неощутимая - $9,3 \text{ мг/м}^3$; минимально действующая концентрация на световую чувствительность глаз - 8 мг/м^3 , максимально недействующая - 6 мг/м^3 ; минимальная концентрация, оказывающая рефлекторное воздействие, определяемое методом ЭЭГ по выработке условного электрокортикального рефлекса, для наиболее чувствительных лиц — 6 мг/м^3 , не действующая на выработку рефлекса - 4 мг/м^3 [Тиунов Л.А., 1990].

В клинической токсикологии отравления ТХМ встречаются довольно часто, пациенты с данной патологией составляют до 60% всех больных с токсическим поражением печени [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Венгеровский А.И., Седых И.М., Саратиков А.С., 1993]. Летальность при пероральных отравлениях составляет 30%, при ингаляционных – 15 – 20%. Летальная доза при пероральном поступлении для человека составляет 20 – 40 мл. Вдыхание паров ТХМ в концентрации 15 мг/л через 10 минут, а в концентрации 2 мг/л – через 30 минут приводит к появлению головной боли, тошноты, рвоты, учащению пульса. У рабочих при 8 часовом воздействии ТХМ в концентрации, составляющей 1,2 мг/л, наблюдается усталость, сонливость. Смертельная концентрация ТХМ для человека равна 50 мг/л при вдыхании в течение 1 ч. Для появления симптомов отравления достаточно приема внутрь 2 – 4 мл токсиканта [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989].

Смертельная концентрация ТХМ для человека при вдыхании в течение 1 ч составляет $50\,000\text{ мг/м}^3$. При внутрижелудочном поступлении ТХМ смертельная доза для человека составляет от 20-40 мл. Минимальная доза, вызывающая поражение печеночных клеток составляет 5-10 мл, 30-50 мл вызывают тяжелую и смертельную интоксикацию. Однако известны случаи выздоровления после приема 100 мл [Тиунов Л.А., 1990]. В то же время смертельными дозами могут быть для взрослого человека 2-4 мл. При ингаляционных отравлениях средней и тяжелой степени клинические признаки появляются после скрытого периода, который может составлять 1-2 сут. Развивается недомогание, озноб, повышение температуры тела до $37-39^{\circ}\text{C}$. Позже присоединяются желудочно-кишечные расстройства, тошнота, рвота. На 2-5 сут после отравления ТХМ формируется токсическая гепатопатия, к 3-7 сут - нефротоксическое действие. При легких отравлениях возникает головная боль, головокружение, спутанность сознания, сонливость, тошнота, рвота, раздражение верхних дыхательных путей. При крайне тяжелых отравлениях - потеря сознания и смерть. Отравление может протекать с явлениями возбуждения, с развитием эпилептиформных судорог. Описаны клинические формы отравления в виде энцефаломиеелита, мозжечковой дегенерации, периферических невритов, невритов зрительного нерва, кровоизлияний и жировой эмболии мозга. К числу ранних признаков отравления относится изменение активности ряда ферментов крови: в первые часы после воздействия изменяется активность аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы в плазме крови, меняется изоферментный спектр этих энзимов. Степень гиперферментемии зависит от тяжести отравления [Тиунов Л.А., 1990].

Гепатотоксическое действие проявляется в желтушности, гепатомегалии, в нарушении синтетической функции (страдает синтез глюкуронидов, билирубина, белков сыворотки крови). Снижается уровень протромбина в крови, развивается геморрагический синдром.

Нефротоксическое действие проявляется в олигурии, а в тяжелых случаях - в анурии. В крови повышается уровень небелкового азота, снижается содержание хлоридов, кальция, белков. Развивается метаболический ацидоз. В моче появляется белок, кровь, цилиндры. Повышается артериальное давление, развиваются подкожные и висцеральные отеки. Наступает уремия. Возможен отек легких. В благоприятных случаях после анурии - обильный диурез, нормализация состава мочи, восстановление функции почек [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Савлуков А.И. и соавт., 2004; Spoo W., 2001; Brautbar N., Williams J. 2nd, 2002; Saracyn M., 2002].

Последствиями острого ингаляционного отравления ТХМ могут быть: язва двенадцатиперстной кишки, некроз поджелудочной железы, анемия, лимфопения, изменения в миокарде, острый психоз. Возможна желтая атрофия печени, ее цирроз. Смертность при острых ингаляционных отравлениях ТХМ составляет 15-20 % [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Маркова И.В. и соавт., 1998; Савлуков А.И. и соавт., 2004; Brautbar N., Williams J. 2nd, 2002; Saracyn M., 2002].

Ранними признаками интоксикации при пероральном отравлении являются острый гастроэнтерит с тошнотой, рвотой желчью, схваткообразными болями в животе, частым жидким стулом. На 2-3 сут отмечается желтушность склер и кожных покровов, увеличение печени, печеночная колика, геморрагический синдром с кровоизлияниями под конъюнктиву, носовые и желудочно-кишечные кровотечения. Токсическая гепатопатия может закончиться острой печеночной недостаточностью. В крови значительно повышается активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ₅, ЛДГ₄), АЛТ, АСТ. Возрастает уровень билирубина. В 85 % случаев присоединяется почечная недостаточность с олигурией, азотемией, гипергидратацией, повышением артериального давления. Нарушаются все основные показатели функции почек. Повышается уровень креатинина, снижается клубочковая фильтрация и

почечный плазмоток, угнетается канальцевая реабсорбция. При благоприятном исходе концентрационный индекс креатинина и канальцевая реабсорбция воды может не восстанавливаться в течение нескольких месяцев. Отравление может сопровождаться энцефалопатией и нервно-психическими нарушениями. К последствиям перенесенной интоксикации, которые могут проявляться на протяжении 9 месяцев после отравления, относят, помимо возможных нарушений функций желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы, импотенцию со снижением либидо [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Маркова И.В. и соавт., 1998; Савлуков А.И. и соавт., 2004; Spoo W., 2001; Brautbar N., Williams J. 2nd, 2002; Saracyn M., 2002; Rusinski P., Kolasinski Z., 2003].

Описаны случаи опухолей печени у людей с циррозом печени, развившимся под воздействием ТХМ. У рабочих предприятий химчистки, где используется ТХМ отмечается повышенное число случаев рака дыхательной системы, шейки матки, лейкозов. По степени канцерогенности ТХМ относится к группе 2Б—возможный канцероген для человека [Тиунов Л.А., 1990]. В настоящее время выраженная канцерогенность ТХМ для животных и человека доказана [Wernke M.J., Schell J.D., 2004].

ТХМ вызывает дерматиты, экземы, крапивницу. Эритема возникает после 30-мин контакта кожи руки с ТХМ. В этом случае местные явления проходят через 1-2 ч. Постоянный контакт с кожей ТХМ может вызвать полиневрит. Ежедневная аппликация 0,1 мл на эпилированную кожу кроликов в течение 10 сут увеличивала толщину кожной складки на 217 %. Тормозился прирост массы тела. У человека такое 10-дневное нанесение на кожу ТХМ не вызывало признаков интоксикации [Yodaiken R.E., Babcock J.R., 1973; Spoo W., 2001; Brautbar N., Williams J. 2nd, 2002; Saracyn M., 2002].

При патоморфологическом исследовании обнаруживают тяжелые повреждения печени в виде массивных центролобулярных некрозов и пигментного цирроза, при ингаляционном отравлении некротические изменения менее выражены. Считают, что изменения в печени максимальны

в ранние сроки отравления. При более поздней гибели в ткани печени регистрируются регенеративные процессы. Изменения в почках проявляются картиной выделительного нефроза, гидropической дистрофией эпителия извитых канальцев. При ранней гибели эти изменения менее выражены. Характерны множественные кровоизлияния под эпикардом, эндокардом, плеврой, слизистой оболочкой желудочно-кишечного тракта. В случаях быстрой смерти на вскрытии отмечается только кровоизлияния и отек мозга. При гистологическом исследовании – признаки энцефаломиелита, дегенеративные изменения нервных клеток, периферические невриты, неврит зрительного нерва, кровоизлияния, жировая эмболия мозга [Тиунов Л.А., 1990; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000;].

В тканях трупа ТХМ может сохраняться до 17-20 дней после отравления [Тиунов Л.А., 1990].

Таким образом, при отравлении ТХМ поражается центральная нервная система, желудочно-кишечный тракт, печень и почки, свертывающая система крови, сердечно-сосудистая и дыхательная системы. При действии на кожу ТХМ вызывает дерматиты, иногда экзему, крапивницу. Основная причина смерти больных - острая печеночно-почечная недостаточность и ее осложнения (массивные кровотечения, пневмония). Прием алкоголя способствует более тяжелому течению ингаляционных отравлений [Тиунов Л.А., 1990; Маркова И.В. и соавт., 1998; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Куценко С.А. и соавт., 2004].

Описано, что под влиянием острого отравления ТХМ *in vitro* при концентрации 3 мМ происходит подавление гуморального иммунного ответа на эритроциты барана (ЭБ), динитрофиколл и липополисахарид [Kaminski N. E., Stevens W.D., 1992]. Отмечается снижение активности В-лимфоцитов и угнетение супрессорной функции Т-лимфоцитов [Брызгина Т.М., 1990]. Под влиянием ТХМ наблюдают угнетение функции В-клеток, особенно в ранние сроки после поражения, вследствие чего снижается их способность к кооперации с Т-клетками. Это приводит к снижению

иммунного ответа на тимусзависимый антиген ЭБ [Ильичевич Н.В. и соавт. 1984; Брызгина Т.М., 1989]. Аналогичные данные (снижение в несколько раз числа АОК в селезенке мышей) получены при остром токсическом гепатите, вызванном введением животным ТХМ [Хабибуллаев Б.Б., 2005].

Изменение гуморального иммунитета на тимусзависимый антиген ЭБ у кроликов и мышей в условиях острого поражения печени ТХМ в значительной степени обусловлено активностью иммунорегуляторных клеток - антигеннеспецифических хелперов и супрессоров. В настоящее время доказано, что клетками-супрессорами могут являться CD4⁺ Т-лимфоциты или Th3-клетки (хелперы 3-го типа), Th2-клетки (хелперы 2-го типа) или CD4⁺/CD8⁺ лимфоциты, продуцирующие интерлейкины, ингибирующие рецепторы Т-лимфоцитов (CTLA-4), особые Т-лимфоциты-киллеры и В-клетки [Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Активность клеток-супрессоров проявляется вследствие того, что они вырабатывают супрессорный фактор, который неспецифически подавляет тимусзависимый иммунный ответ [Конопля А.И. и соавт., 1985; Прокопенко Л.Г., 1985; Смахтин М.Ю. и соавт., 1994; 1995].

При остром отравлении ТХМ усиление хелперной активности характерно для периодов большего повреждения печени и менее выраженной регенерации, а усиление супрессорной - для периодов интенсивной регенерации и меньшего повреждения печени [Прокопенко Л.Г. и соавт., 1987; Мартынова Т.В. и соавт., 1991]. По всей вероятности, поражение печени, с одной стороны, создает предпосылки для активации иммунного ответа на различные антигены, с другой - активация иммунного ответа может свидетельствовать о запуске аутоиммунных механизмов повреждения печени. У потомства крыс с хроническим аутоиммунным повреждением печени отмечалось повышение иммунологической реактивности, о чем свидетельствовало увеличение в их селезенках Ig M, продуцируемого антителообразующими клетками [Прокопенко Л.Г. и

соавт., 1982; Прокопенко Л.Г., Кедровская Н.Н., 1983; Брюхин Г.В., Михайлова Г.И., 1989].

При хроническом действии ТХМ нарушение функции иммунной системы связывают с изменениями содержания фосфолипидов, гликолипидов в тканях печени и органах системы иммунитета, при этом регистрировалось изменение фракций фосфолипидов и гликолипидов на мембранах гепатоцитов, клеток селезенки, тимуса и костного мозга [Холмухамедова Н.М. и соавт., 1991]. Введение крысам ТХМ вызывало снижение функциональной активности Т-лимфоцитов крови в реакции бласттрансформации в ответ на фитогемоагглютинин, особенно в ранние сроки исследования [Брызгина Т.М., Мартынова Т.В., 1985]. Аналогичные результаты получены в более поздних исследованиях, где показано, что содержание Т-лимфоцитов в селезенке и лимфоузлах (после введения ТХМ крысам) уменьшалось, а содержание В-лимфоцитов не изменялось [Брызгина Т.М. и соавт., 1990]. Дальнейшие исследования показали, что под влиянием ТХМ наблюдалось увеличение активности как Т-хелперов, так и Т-супрессоров, причем активность последних была выше [Брызгина Т.М. и соавт., 1992]. Показано снижение ГЗТ под влиянием ТХМ [Брюхин Г.В., Михайлов Г.И., 1990]. Потомство крыс с хроническим поражением печени ТХМ характеризовалось депрессией клеточного иммунитета, проявлявшейся уменьшением количества Т-клеток ГЗТ, а также редукцией антителообразования и снижением интенсивности Fc-зависимого фагоцитоза перитонеальных макрофагов и моноцитов крови [Брюхин Г.В., Михайлов Г.И., 1989; Брюхин Г.В., Грачев А.Ю., 1991; Брызгина Т.М. и соавт., 1992].

Кратковременное действие ТХМ оказывало стимулирующий эффект на фагоцитоз лейкоцитов и активацию естественных клеток-киллеров, тогда как продолжительное введение обуславливало противоположное действие [Halaskova M. et al., 1993].

Влияние ТХМ на факторы доиммунной защиты организма от инфекций практически не изучено.

Показано, что при действии ТХМ и высокой внешней температуры (40°C по 40 мин ежедневно в течение 3 сут) отмечается выраженное снижение Т-зависимого иммунного ответа [Конопля Е.Н., Прокопенко Л.Г., 1994]. Комбинированное действие этанола и ТХМ вызывало суммацию иммуносупрессивных эффектов ядов [Смахтин М.Ю. и соат., 1994].

Интересно отметить, что витамин С предохраняет от действия ТХМ [Ademuyiwa O. et al., 1994], а витамин А вызывает усиление его токсического эффекта [Elsisi A.E. et al., 1986]. Однако имеются данные, вызывающие сомнение в таком выводе. Так, экстракт из моркови обладает гепатопротективными свойствами при окислительном стрессе, вызванном ТХМ [Bishayee A., Chatterjee M., 1993]. Вероятно, у β -каротина и витамина А при поражении ТХМ реализуются противоположные эффекты. При острых интоксикациях ТХМ в опытах на мышах показано иммуностимулирующее действие лейкинферона [Кузнецов В.П. и соавт., 1992].

Существуют основания считать, что в супрессии иммуногенеза при отравлении ТХМ определенную роль играет нарушение продукции адренокортикотропного гормона гипофизом, приводящее к увеличению массы надпочечников.

Данные, полученные А.И. Венгеровским и соавт. (1993), свидетельствуют о снижении числа лимфоцитов в тимусе, увеличении их в селезенке, активации гуморального иммунного ответа, оцениваемого по числу АОК в селезенке крыс и содержанию в крови IgM и IgG под влиянием ТХМ, который вводили внутривентрикулярно крысам в дозе 2 мг/кг (приблизительно 1/3 ЛД₅₀) 2 раза в неделю в течение 1 месяца. На наш взгляд, активация антителообразования при столь высоких дозах ТХМ маловероятна и противоречит данным, полученным другими исследователями.

Исследования последних лет показали существенную роль цитокинов, особенно TNF α , ИЛ-6 и ИЛ-10 в формировании цирроза печени и аутоиммунных реакциях [Schumann J., Tiegs G., 1999; Luster M.I., Simeonova P.P., 2000, 2001; Roberts R.A. et al., 2001; Streets K.L., Wustefeld T., 2001; Weber L.W. et al., 2003; Louis H. et al., 2003], а также, уже упомянутых изопростанов [Moore K., 2003] и остеопонтина [Ramaiah S.K., Ritting S., 2008].

Таким образом, исследованные в настоящее время иммунотоксические свойства ТХМ свидетельствуют о том, что он способен изменять физиологическую регуляцию иммуногенеза. Анализ имеющихся данных показывает, что в танатогенезе после острого отравления ТХМ существенную роль играют нарушения регуляции иммунного гомеостаза. Острое и хроническое отравление ТХМ вызывает снижение показателей системы иммунитета. В настоящее время данные в отношении антителообразования под влиянием ТХМ противоречивы, практически не исследованы роль Т- и В-клеток, состояние ПОЛ, ГГАС, эстеразная активность Т-лимфоцитов в формировании иммунодефицита после действия ТХМ, а также действие токсиканта на показатели доиммунных факторов защиты организма от инфекции. Уточнение результатов изучения иммунотоксичности ТХМ и получение новых данных о влиянии его на иммунный гомеостаз позволит разработать и патогенетически обосновать оптимальную медикаментозную коррекцию нарушений механизмов его регуляции для профилактики постинтоксикационных инфекционных осложнений, заболеваний и смертельных исходов.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объект исследования и применяемые препараты

Исследования проводили на 712 беспородных крысах, крысах Вистар и на 68 беспородных белых мышах и мышах линии СВА обоего пола. Масса крыс и мышей составляла соответственно 180-240 и 18-22 г.

ТХМ вводили внутрь в растворе оливкового масла в дозах 0,25, 0,50 и 0,75 LD₅₀. Для оценки эффективности средств специфической терапии и иммуностимуляторов токсикант применяли в дозах 1,0 LD₅₀. Среднелетальная доза ТХМ для мышей и крыс составляла соответственно 8,3±0,7 и 6,5±0,6 г/кг. ТХМ применяли в дозе 1/4 DL₅₀ в течение 4 сут и 1/13 DL₅₀ в течение 13 сут для оценки соответственно функции Th1- и Th2-лимфоцитов.

Концентрацию цитокина ИФН-γ исследовали в плазме крови крыс через 4 сут после первой инъекции ТХМ, а интерлейкин ИЛ-4 – через 13 сут после первого введения ТХМ методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) [Ройт А. и соавт., 2000], используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int. Сроки определения цитокинов в крови соответствовали особенностям иммуногенеза при иммунизации эритроцитами барана (ЭБ).

При изучении влияния специфической терапии унитиолом [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000] при остром отравлении ТХМ на показатели иммунной системы препарат вводили крысам внутримышечно по общепринятой схеме: в первые сутки – 15 мг/кг 3 раза с интервалом 6 ч, во вторые сутки – по 15 мг/кг 2 раза с интервалом 8 ч; в последующие 3 сут - по 15 мг/кг 2 раза в сут. Токоферола ацетат вводили крысам внутримышечно по 2 мл 30% раствора 4 раза в сутки в течение 4-х дней. Первую дозу антидотного средства животные получали через 10 мин после введения ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀. Обратимый ингибитор цитохрома Р-450, участвующего в

биотрансформации ТХМ, 2-диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетат (SKF-525A) вводили внутривентрально в дозе 50 мг/кг за 1 сут до применения ТХМ. Кроме того, в течение трех суток до острой интоксикации ТХМ крысам внутривентрально вводили индукторы цитохрома Р-450 фенобарбитал в дозе 50 мг/кг, а также 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана в растворе оливкового масла в дозе 0,8 мг/кг.

В качестве иммуностимуляторов использовали в эквивалентных дозах имунофан (20 мкг/кг) и полиоксидоний (700 мкг/кг), которые применяли в течение 4-х суток. Первую дозу вводили через 5-30 мин после применения ТХМ. Дозы иммуностимуляторов для животных обоснованы данными литературы [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005] и расчетными методами [Рыболовлев Ю.Р., 1982].

Для определения роли кортикостерона в формировании иммунных реакций его применяли подкожно в дозе соответствующей его увеличению в крови после интоксикации ТХМ (3,0 и 1,5 мг/кг соответственно с интервалом 6 ч в изотоническом растворе хлорида натрия) [Dhabhar F. S. et al., 1996].

Эксперименты проводили в светлое время суток (с 9.00. до 15.00 ч), характеризующееся минимальным содержанием кортикостерона (КС) в плазме крови крыс [Dhabhar F.S. et al, 1996].

Кровь для исследования титра антител получали из подъязычной вены животных. Лимфоидные органы извлекали у животных после цервикальной дислокации в различные сроки после интоксикации.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Женевской конвенции "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" (Geneva, 1990).

2.2. Методы исследования

2.2.1 Сывороточная активность лизоцима

Использование показателя лизоцимной активности для оценки неблагоприятного действия химических факторов на организм свидетельствует о высокой чувствительности данного теста [Сидельникова Н.М., 2004; Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Как правило, химические соединения вызывают снижение лизоцимной активности сыворотки крови [Агапов В.И. и соавт., 2004; Василенко О.А., 2004; Забродский П.Ф., 2002; 2007]. Однако свидетельством отрицательного воздействия ксенобиотиков на организм может являться также и повышение содержания лизоцима в крови.

Содержание сывороточного лизоцима определяли методом О. В. Бухарина (1971) [Ремезов П.И., Башмаков Г.А., 1976], основанным на способности лизоцима растворять индикаторный микрококк (*Micrococcus lysodeicticus*), измеряя при этом оптическую плотность опытной и контрольной суспензии микроорганизмов. Взвесь суточной агаровой культуры микрококка на 1/15 М фосфатном буфере (рН 6,2) стандартизировали по левому барабану ФЭК до оптической плотности 0,66. В опытную пробирку вносили 0,4 мл фосфатного буфера, 0,1 мл исследуемой сыворотки и 2 мл стандартной взвеси микрококка. Смесь выдерживали при 37⁰С 30 мин, после чего измеряли ее оптическую плотность на ФЭК по правому барабану в кювете №2 с зеленым светофильтром. Для количественной характеристики лизоцима в исследуемой сыворотке с использованием кристаллического лизоцима строили калибровочную кривую, исходя из активности фермента 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 50 мкг в пробе. Во все пробирки с различным содержанием лизоцима вносили с интервалом 30 с по 2 мл стандартизированной суспензии микрококка. Смесь инкубировали при 37⁰С 30 мин и в каждой пробирке, начиная с первой, измеряли оптическую плотность. Каждое последующее измерение выполняли через 30 с после предыдущего. С помощью калибровочной кривой находили

количества лизоцима в исследуемой сыворотке, выраженное в абсолютных единицах. Для удобства расчетов зависимость между оптической плотностью микробной взвеси в опыте и контроле, а также содержанием лизоцима в исследуемой сыворотке использовали таблицу [Ремезов П.И, Башмаков Г.А., 1976].

2.2.2. Тромбоцитарный катионный белок сыворотки крови

Метод определения активности тромбоцитарного катионного белка основан на избирательной чувствительности к его бактерицидному действию индикаторной культуры - *B. subtilis*. Тромбоцитарный катионный белок сыворотки крови (β -лизин) определяли фотонейфелометрическим ускоренным методом по О.В. Бухарину, Б.А. Фролову и А.П. Луда (1972) [Ремезов П.И., Башмаков Г. А., 1976], учитывая изменение оптической плотности раствора сахарозы при росте в ней индикаторной культуры. Учет результатов проводили по формуле:

$$\% \text{ лизиса} = \frac{D_1 - D_2}{D_2} \times 100, \text{ где}$$

D_1 - оптическая плотность опытных проб до инкубации;

D_2 - оптическая плотность опытных проб после инкубации.

Определение оптической плотности проводили на фотоэлектроколориметре.

2.2.3. Определения фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов

Кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита оценивают чаще всего в НСТ-тесте (тест восстановления нитросинего тетразолия)

[Nouragargh S., Holt J.R.S., 1986], а кислороднезависимые микробоцидные системы фагоцита - в лизосомально-катионном тесте [Elsbach P., Weise J., 1985].

Использованный нами метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов основан на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерасворимый диформаза́н под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции. НСТ-тест, как уже указывалось, интегрально характеризует кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита. В исследованиях применялся цитохимический вариант этого метода [Забродский П.Ф. и соавт., 2007] без стимуляции зимо́заном (спонтанный тест) и с его использованием (индуцированный тест). Учет результатов проводился путем подсчета в каждой мазке 100 нейтрофилов, среди которых определялся процент клеток, содержащих отложения диформа́зана (НСТ - позитивные нейтрофилы). Далее рассчитывался индекс активности нейтрофилов (ИАН) по формуле:

$$\text{ИАН} = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3}{100}, \text{ где}$$

A - количество клеток, не содержащих диформа́зоновых отложений или содержащий их в виде пылевидных немногочисленных включений;

B - количество клеток, в которых площадь отложений диформа́зана не превышает 1/3 площади ядра;

C - количество клеток, в которых названные отложения занимают от 1/3 до всей величины площади ядра;

D - количество клеток с диформа́зановыми отложениями, по площади превосходящими площадь ядра.

Кроме того оценку фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов (ФМАН) проводили общепринятыми методами [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995] по содержанию микробных клеток в нейтрофиле, то есть определяли число поглощенных микробных тел по отношению к общему числу клеток – фагоцитарный показатель, и среднее число поглощенных микроорганизмов фагоцитом – фагоцитарное число.

2.2.4. Определение содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови

Содержание лимфоцитов в лимфоидных органах после различных воздействий отражает, во-первых, процесс их перераспределения между органами системы иммунитета вследствие стресс-реакции (активации ГГАС) [Ройт А. и соавт., 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 2007], во-вторых, характер их апоптоза (запрограммированной гибели), на который оказывают влияние кортикостероиды и различные химические ксенобиотики [Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Мутускина Е.А. и соавт., 2001; Claman H. N., 1972].

Содержание Т-клеток в тимусе крыс определяли общепринятым методом подсчета ядросодержащих клеток в органе, учитывая то обстоятельство, что лимфоциты в вилочковой железе представлены в основном их Т-популяцией (до 90%) [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. Лимфоциты в селезенке, лимфатических узлах и костном мозге (исследовали клетки костного мозга бедренной кости) подсчитывали, исходя из их относительного содержания в мазках данного органа, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Для определения содержания в лимфоидных органах лимфоцитов клеточные суспензии из тимуса, селезенки, костного мозга и паховых лимфоузлов крыс готовили после интоксикации ТХМ через 1, 6 и 9 сут. Содержание лимфоцитов в крови крыс определяли через 1, 3 и 6 сут после воздействия ТХМ, а содержание Т- и В-лимфоцитов в органах

системы иммунитета мышей – через 2 и 12 сут общепринятыми методами [Василенко О.А., 2004; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

2.2.5. Исследование гуморального звена иммунного ответа

Для оценки гуморальных иммунных реакций в качестве антигенов применяли эритроциты барана (ЭБ) и брюшнотифозный Vi-антиген (Vi-Ag). Использование данных антигенов позволяло сравнить редуцирующее действие ТХМ на тимусзависимый или тимуснезависимый иммунный ответ. Анализ полученных данных позволяет определить влияние ТХМ на Т-хелперы в реализации гуморального звена иммунного ответа [Утешев Б.С., 1984; Descotes J., 1986; Jeurissen A., Bossuyt X., 2004]. Данный подход широко используется для оценки действия химических соединений на систему иммунитета [Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 2000; Германчук В.Г., 2000; Беликов В.Г., 2001; Сидельникова Н.М., 2004].

Исследование показателей тимусзависимого гуморального иммунного ответа проводили на 5, 8, 14 и 20 сут после острой интоксикации ТХМ. Иммунизацию ЭБ проводили путем их внутрибрюшинного введения в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Титры антител к ЭБ определяли в реакции гемолиза эритроцитов в присутствии комплемента. Все реакции проводились на стерильных пластиковых микропланшетах. Гуморальный иммунный ответ оценивали по отрицательному двоичному логарифму титра антител (ОДЛТА). Данный тест отражает способность органов системы иммунитета синтезировать IgM на 5 сут и IgG на 8 и 14 сут [Ройт А. и соавт., 2000].

Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому и Т-независимому антигенам оценивали также на 5 сут по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке [Белокрылов Г.А. и соавт., 1980; Jerne N.K., Nordin A.A., 1963] после воздействия ТХМ с одновременной внутрибрюшинной

иммунизацией крыс ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия и Vi-Ag в дозе 8 мкг/кг (использованный тест отражал синтез IgM В-клетками селезенки). АОК, характеризующие продукцию IgG, определяли в селезенке на 14 сутки после иммунизации ЭБ [Ройт А. и соавт., 2000].

Кроме того, при оценке тимусзависимого антителообразования по числу АОК в селезенке животных подвергали воздействию ТХМ через 3 сут после иммунизации. При этом практически одновременная иммунизация ЭБ с действием ТХМ позволяла оценить его влияние на индуктивную фазу гуморального иммунного ответа. Действие ТХМ через 3 сут после иммунизации характеризовало продуктивный период антителогенеза [Ройт А. и соавт., 2000; Сидельникова Н.М., 2004; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Deskotes J., 1986; Friedman H. et al., 2003].

2.2.6. Оценка кооперации Т- и В-лимфоцитов *ex vivo* и *in vitro*

Исследование кооперации Т- и В-лимфоцитов *ex vivo* проводили на мышцах линии СВА. Для получения Т-клеток использовали метод фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату («Нитрон») [Ширшев С.В., 1998]. Для выделения В-лимфоцитов применяли реакцию комплемент-зависимого масс-цитоллиза. В качестве цитотоксической сыворотки использовали моноклональные антитела против Thy 1.2 антигенов Т-лимфоцитов мыши (Cedarlane Laboratories Limited; London, Canada) [Marshak-Rothstein A. et al., 1979]. Из суспензии спленоцитов макрофаги удаляли методом негативной селекции, используя их способность прилипать к стеклянной поверхности [Ширшев С.В., 1998]. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим (она составляла 95-98%). Инкубируемая по методу J.K. Thomas, T. Imamura (1986) культура содержала 10^6 и $5 \cdot 10^5$ В- и Т-клеток соответственно, 10^7 эритроцитов барана в 0,15 мл среды Хенкса. Т- и В-лимфоциты с целью обеспечения сингенности клеток для

каждого опыта получали из суспензии спленоцитов одной мыши. Антителообразующие клетки (АОК), число которых характеризует эффект кооперации Т- и В-лимфоцитов, подсчитывали в инкубационных камерах через 4 суток [Thomas J.K., Imamura T., 1986]. Данный тест отражает синтез IgM В-клетками селезенки при участии Th1-лимфоцитов.

Кооперацию Т- и В-лимфоцитов оценивали *ex vivo* после извлечения через 1 сут Т- или В-лимфоцитов из селезенки мышей, подвергавшихся действию ТХМ. При этом соответственно В- или Т-клетки для исследования реакции получали от интактных сингенных животных. Используемая экспериментальная модель позволяла сравнить повреждающий эффект ТХМ на Т- или В-клетки.

При изучении кооперации Т- и В-лимфоцитов использовали лимфоциты неинбредных мышей. Проводили оценку функции этих популяций иммуноцитов *in vitro* по формированию АОК к ЭБ [Thomas J.K., Imamura T., 1986]. Удельный вес Т- и В-клеток в обеспечении антителопродукции определяли путем сравнения числа АОК после инкубации той или иной популяции лимфоцитов в течение 2 ч с различными концентрациями ТХМ и его метаболитов. Кооперацию Т- и В-лимфоцитов можно рассматривать как механизм на уровне взаимодействия клеток, определяющий антителопродукцию. В модели *in vitro* роль клеток, представляющих антиген Т-лимфоцитам, вместо макрофагов выполняют В-клетки [Ройт и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

2.2.7. Исследование функцию Th1-лимфоцитов

Для оценки влияния ТХМ на функцию Th1-лимфоцитов исследовали формирование ГЗТ в модели, не использующей перенос сингенных иммуноцитов, в также в адоптивной модели [adopt (англ.) – принимать, усваивать], связанной с введением ИКК животным-реципиентам. ГЗТ оценивали у крыс Вистар после иммунизации внутривенным введением $2 \cdot 10^8$

эритроцитов барана (ЭБ) в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия одновременно с действием ТХМ. Разрешающую (вызывающую реакцию) дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$ в 0,05 мл изотонического раствора хлорида натрия) вводили под апоневроз задней лапы через 4 сут после иммунизации. Оценку реакции осуществляли через 24 часа по приросту массы стопы задней лапы крыс по сравнению с контрольной [Забродский П.Ф. и соавт., 2007].

При исследовании формирования ГЗТ у крыс-реципиентов в адоптивной модели осуществлялся перенос им спленоцитов ($5 \cdot 10^8$), иммунизированных 10^8 ЭБ сингенных доноров. При этом реципиентов через 1 ч сенсibilизировали внутривенным введением 10^8 ЭБ. Через 4 сут под апоневроз стопы реципиентов вводили разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) с последующей оценкой реакции через 24 ч. Спленоциты получали через 5 сут после иммунизации доноров. В данном эксперименте формирование ГЗТ отражало влияние ТХМ на вторичный иммунный ответ в модели адоптивной реакции, связанной с переносом иммунных спленоцитов крысам-реципиентам. Доноры подвергались воздействию ТХМ через 30 мин после иммунизации [Забродский П.Ф., Мышкина А.К., 1990; Германчук В.Г., 2000].

2.2.8. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности

Антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), характеризующую функцию К-клеток [Фримель Х., Брок Й., 1986], определяли по методу Ю.И. Зимина, В.Ф. Ляхова (1985) через 5 сут после иммунизации, осуществляемой через 30 мин после введения ТХМ (оценка действия яда в индуктивной фазе иммуногенеза). Кроме того, ТХМ применяли через 3 сут после иммунизации ЭБ (оценка действия токсиканта в продуктивной фазе иммуногенеза).

Крыс иммунизировали ЭБ ($5 \cdot 10^8$ клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия), ТХМ применяли через 2 сут после иммунизации. Через 5 суток извлекали селезенку и тимус, готовили клеточные суспензии в

растворе Хенкса, который затем фильтровали через капроновую сетку. Суспензии клеток дважды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия по 10 мин при 400g. Жизнеспособность клеток определяли методом суправитальной окраски 0,1% раствором трипанового синего. В качестве клеток-мишеней использовали трижды отмытые по 10 мин при 400g ЭБ, которые в 2,5% суспензии смешивали с равным объемом гипериммунной антисыворотки кролика в субаглютинирующем разведении (1:5000). Смесь инкубировали 30 мин при 37°C, а затем отмывали 3 раза раствором Хенкса и доводили до необходимой концентрации (1:5000). Используемую антисыворотку предварительно инактивировали в течении 30 мин при 56°C. Спленоциты (тимоциты) смешивали с ЭБ в соотношении 20 : 1 (абсолютные значения составляли соответственно $20 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^6$) в 2 мл раствора Хенкса без фенолового красного и инкубировали 4 ч при 37°C. После инкубации смесь клеток центрифугировали 20 мин при 200g, собирали супернатант. Цитопатогенность киллеров оценивали спектрофотометрическим методом по выходу гемоглобина из лизированных эритроцитов. Контролем служили пробы, содержащие эффекторы и интактные ЭБ. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 412 нм на спектрофотометре СФ-46. Уровень АЗКЦ оценивали по индексу цитотоксичности (ИЦ) по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_0 - E_k}{E_{\max}} \times 100, \text{ где}$$

E_0 — оптическая плотность проб, содержащих эффекторные клетки и сенсibilизированные клетки мишени;

E_k — оптическая плотность супернатантов проб, содержащих эффекторные клетки и интактные эритроциты;

E_{\max} — оптическая плотность при максимальном гемолизе соответствующего числа эритроцитов (гемолиз проводили дистиллированной водой).

2.2.9. Оценка активности естественных клеток-киллеров

Оценка естественной цитотоксичности осуществлялась спектрометрическим методом [Гордиенко С.М., 1983], где клетками-эффекторами служили спленоциты белых крыс (*in vivo*) и мышей (*in vitro*), а клетками-мишенями – эритроциты кур [Белокрылов Г.А. и соавт., 1980]. Очищенную взвесь лимфоцитов получали, удаляя прилипающие клетки инкубацией в колонках с нейлоновой ватой. Эффекторные клетки взвешивали в концентрации 10^7 клеток в 1 мл питательной среды следующего состава: среда № 199 с добавлением до 10% истощенной эритроцитами кур эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина (300 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и пенициллина (100 Ед/мл). В ходе опыта обеспечивали соотношение эффектор-мишень 10:1, при этом концентрация клеток-мишеней (эритроциты кур) составляла 10^6 в 1 мл питательной среды. Цитотоксический тест ставили в пластиковых камерах «Linbro» (76-013-05) с круглым дном. Результаты реакции учитывали по спектрофотометрическому определению концентрации гемоглобина, выделившегося из неразрушенных эритроцитов кур. В опытные лунки добавляли по 0,1 мл взвеси эффекторных клеток и по 0,1 мл взвеси эритроцитов кур. Проводили 3 контроля: эффекторные клетки в питательной среде без эритроцитов кур; питательная среда; взвесь эритроцитов кур в питательной среде без эффекторов. В конце инкубации содержимое лунок осторожно ресуспендировали и камеры центрифугировали 5 мин при 100g. 0,2 мл надосадка переносили в другие свободные ряды микропластины, а к осадку приливали 0,2 мл 0,25% раствора додецилсульфата натрия для лизиса эритроцитов кур, оставшихся неразрушенными в ходе цитотоксической реакции. Оптическую плотность осадков измеряли в специально изготовленных микрокуветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 0,1 мл на СФ-46 при длине волны 413 нм.

Определяли количество гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЕКК ЭК, путем лизиса осадка 0,25% ДСН. Индекс цитотоксичности (ИЦ) определяли по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_k - E_0}{E_k} \times 100, \text{ где}$$

E_k - оптическая плотность лизированного осадка ЭК контрольной пробы без эффекторов против лизирующего раствора;

E_0 - оптическая плотность лизированных оставшихся в осадке опытной пробы неразрушенных ЭК против лизированного осадка эффекторных клеток без ЭК;

Функцию ЕКК оценивали через 1, 3, 6 и 9 сут после интоксикации ТХМ у крыс. *In vitro* активность ЕКК изучалась на белых мышах при концентрациях ТХМ, составляющих 1; 10 и 50 мМ.

2.2.10. Исследование функции надпочечников, активности эстераз Т-клеток, моноцитов, макрофагов и перекисного окисления липидов

Оценку уровня кортикостерона в плазме крови крыс после действия ТХМ, характеризующего состояние ГГАС, проводили флюорометрическим методом. Определяли уровень неконъюгированных 11-оксикетостероидов по методу В.В. Давыдова (1970), в частности, кортикостерона (КС) через 1, 6 и 12 ч после интоксикации ТХМ.

Экстракция кортикостерона из анализируемых образцов плазмы крови проводилась четыреххлористым углеродом. Для удаления пигментов плазмы и нестероидных соединений экстракты промывались с помощью 0,1% раствора NaOH и дистиллированной воды. Затем верхний слой, включающий в себя кортикостерон, переносился, выпаривался и повторно экстрагировался 6 мл метиленхлорида или хлороформа. Для образования флюоресцентных комплексов использовалась смесь концентрированной

серной кислоты и этанола в соотношении 3:1. После развития флюоресценции растворы исследовались на флюориметре с использованием интерферентных фильтров: первичного с пропусканием волн длиной 470 нм и вторичного – 540 нм.

Различные эстеразы, как и кислые фосфатазы, являются лизосомальными ферментами и играют важную роль в реализации киллерной функции Т-лимфоцитов [Ледванов М.Ю., Киричук В.Ф., 1996; Ferluga J. et al., 1972; Li C.G. et al., 1983]. Изменение эстеразной активности в клетках отражает, с одной стороны, функциональную активность иммуноцитов, с другой – может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983].

Активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах крысы определяли методом G.M. Ellman et al. (1961), выделяя клетки путем фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату («Нитрон») [Ширшев С.В., 1998]. В 1,5 мл суспензии, содержащей $5 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл 0,1 молярного фосфатного буфера (pH=8,0), добавляли 20 мкл 0,075 моль ацетилхолин-иодида и 50 мкл 0,01 моль дитио-бис-нитробензойной кислоты. После 20 мин инкубации при 25⁰С реакция останавливалась добавлением 100 мкл 1,5-дифтор-2,4-динитробензола и регистрировали увеличение оптической плотности спектрофотометрически (420 нм) [Szelenyi J.G. et al., 1982]. За единицу активности ацетилхолинэстеразы принимали мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл суспензии, содержащей 10^9 Т-лимфоцитов [Kutty K.M. et al., 1976]. Активность ацетилхолинэстеразы определяли через 4 сут после отравления ТХМ.

Переокисное окисление 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 в крови спектрофотометрически

[Коробейникова Э.Н., 1989; Клинецвич А.Д. и соавт., 1994; Валеева И.Х. и соавт., 2002].

2.3. Методы статистической обработки результатов исследований

Полученные данные обрабатывались с применением общепринятых статистических методов [Урбах В.Ю., 1975; Гублер Е.В., 1978; Лакин Г.Ф., 1980]. При этом различия между средними значениями в опытной и контрольной группах считались значимыми при $p < 0,05$. Расчеты среднелетальных доз ТХМ проводили по методу А. Миллера и В. Тейтнера [Беленький М.Л., 1963].

В исследованиях использовались параметрические методы анализа с оценкой достоверности различий по t-критерию Стьюдента, определялись коэффициенты корреляции (r) между различными параметрами, а также их средние ошибки [Урбах В.Ю., 1975].

Статистический анализ экспериментальных данных с небольшим числом животных в сериях и при отсутствии нормального распределения показателей осуществлялся с помощью непараметрических методов (Уилкинсон-Манни-Уитни, χ^2). Расчеты проводились на персональном компьютере с использованием пакета программ Statgraphics.

ГЛАВА 3

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАХЛОРМЕТАНА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ ДОИММУННЫХ МЕХАНИЗМОВ ЗАЩИТЫ ОТ ИНФЕКЦИЙ

3.1. Сывороточная активность лизоцима при остром действии ТХМ

Лизоцим (мурамидаза) - один из важных факторов неспецифической защиты организма (доиммунных механизмов защиты). Он был открыт в 1909 г. П.К.Лашенковым и изучен в 1922 г. А.Флемингом. Это термостабильный кристаллический белок типа муколитического энзима молекулярной массой от 10000 до 25000 Д. Содержится во многих секретах, жидкостях и тканях [Диксон М., Уэбб Э., 1982]. Ферментативная специфичность лизоцима заключается в разрушении связи между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в мукополисахариде, образующем оболочку многочисленных микроорганизмов, особенно грамположительных. Образующиеся гликопептиды обладают адьювантной активностью, стимулируют продукцию антител, повышают митотическую активность иммуноцитов, индуцируют гиперчувствительность замедленного типа. Источником лизоцима являются нейтрофильные гранулоциты и моноциты. Некоторые иммунологические реакции связаны с активностью лизоцима. Так, комплекс "IgA-антиген" проявляет антибактериальную и нейтрализующую активность после активации комплементом только в присутствии мурамидазы [Nouragargh S., Holt J.R.S., 1986].

Нами в экспериментах на белых крысах было показано (табл. 3.1), что острая интоксикация ТХМ в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 DL₅₀ дозозависимо снижает активность показателя через 1-9 сут. Так, при действии ТХМ в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 DL₅₀ сывороточная активность лизоцима через 1 сут

снижалась соответственно в 1,82; 2,60 и 3,03 раза ($p<0,05$), через 6 сут – соответственно в 1,65; 2,28 и 2,68 раза ($p<0,05$), а через 9 сут – соответственно в 1,51; 1,57 и 1,75 раза ($p<0,05$).

Таблица 3.1

Изменение активности лизоцима сыворотки крови крыс после острого отравления ТХМ, мг/л ($M\pm m$, $n=16-22$)

Группы	DL ₅₀	Срок наблюдения, сут		
		1	6	9
Контроль	0	9,1 \pm 1,1		
ТХМ	0,25	5,0 \pm 1,0*	5,5 \pm 0,9*	6,0 \pm 0,7*
	0,50	3,5 \pm 0,6*	4,0 \pm 0,7*	5,8 \pm 0,6*
	0,75	3,0 \pm 0,5*	3,4 \pm 0,4*	5,2 \pm 0,5*

Примечание: * - $p<0,05$ по сравнению с контролем.

Следует отметить, что даже к 9 сут после действия ТХМ не отмечалось восстановления лизоцимной активности сыворотки крови до контрольного значения, что, вероятно, обусловлено особенностями токсикокинетики ТХМ, связанными со способностью данного токсиканта к длительному депонированию в органах, богатых липидами [Тиунов Л.А., 1990].

Выраженное снижение активности лизоцима под влиянием ТХМ, вероятно, связано с ингибированием неспецифических эстераз клеток крови, а также вследствие эффекта токсикантов и их метаболитов, ингибирующего многочисленные биохимические реакции [Ефремов А. М., 1976]. Редукция синтеза лизоцима может происходить также вследствие воздействия ТХМ и его продуктов биотрансформации на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Тиунов Л.А., 1990; Tomenson J.A. et al., 1995; Dalu A., Mehendale H.M., 1996; Neubauer K., Eichhroost S.T., 1998; Brautbar N., Williams J. 2nd, 2002]. Кроме того, снижение активности лизоцима может быть обусловлено нарушением функции пируватоксидазной системы нейтрофилов вследствие ингибирования моно- и дитиоловых энзимов, в частности, сульфгидрильных групп липоевой

кислоты [Куценко С.А. и соавт., 2004], а также с инактивацией α -нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983].

Таким образом, под влиянием ТХМ происходит прямо связанное с дозой уменьшение активности лизоцима в сыворотке крови до 9 сут.

3.2. Активность тромбоцитарного катионного белка в сыворотке крови

Одним из факторов сохранения и поддержания неспецифической резистентности организма является тромбоцитарный катионный белок сыворотки крови, ранее известный как β -лизин [Бухарин О. В и соавт., 1998]. β -лизин - бактерицидное вещество сыворотки крови, избирательно активное в отношении грамположительных микроорганизмов и спорообразующих бацилл. Открыт тромбоцитарный катионный белок в 1886 г. G. Nuttal и изучен в 1926 г. A. Pettersson, который назвал его β -лизином в отличие от α -лизина (комплемента). β -лизин обнаружен в сыворотке крови, слюне, секрете слезных желез и других жидкостях организма. Источником β -лизина являются тромбоциты. Существует гипотеза, согласно которой активность β -лизина регулируется гипоталамо-гипофизарной системой [Забродский П.Ф. и соавт., 2007]. Как правило, отмечается угнетение активности данного фактора доиммунной защиты организма от инфекций при острой и хронической интоксикациях [Забродский П.Ф., 2002; Агапов В.И. и соавт., 2004; Сидельникова Н.М., 2004].

Нами экспериментально установлено, что острая интоксикация ТХМ в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 DL_{50} вызывала существенное дозозависимое снижению активности ТКБ через 1-9 сут (табл.3.2). Так, при действии ТХМ в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 DL_{50} сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка через 1 сут снижалась соответственно в 1,45; 1,71 и 1,97 раза ($p<0,05$), через 6 сут – в 1,34; 1,43 и 1,54 раза ($p<0,05$), а через 9 сут - в 1,21; 1,32 и 1,41 раза ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 3.2

Изменение активностъ тромбоцитарного катионного белка сыворотки крови крыс после острого отравления ТХМ, % ($M \pm m$, $n=16-22$)

Группы	DL ₅₀	Срок наблюдения, сут		
		1	6	9
Контроль	0	68,8 \pm 4,0		
ТХМ	0,25	47,3 \pm 4,1*	51,3 \pm 3,7*	56,8 \pm 3,9*
	0,50	40,3 \pm 3,8*	48,2 \pm 3,5*	52,0 \pm 3,8*
	0,75	35,0 \pm 3,3*	44,6 \pm 3,4*	48,9 \pm 3,2*

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Супрессия сывороточной активности ТКБ может быть связано с действием ТХМ и его метаболитов на синтез и выделение ТКБ тромбоцитами [Бухарин О.В., 1998; Забродский П.Ф., 1998; 2002; Сидельникова Н.М., 2004; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Механизм супрессии активности ТКБ, видимо, обусловлен нарушением функции тромбоцитов в результате взаимодействия с сульфгидрильными и аминокеттогруппами ферментов высокотоксичных продуктов биотрансформации ТХМ (CCl_3^+ ; O-O-CCl_3 ; HO-OCCCl_3 ; HO-CCl_3^+ и др.), ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [Голиков С.Н. и соавт., 1986], инициацией перекисного окисления липидов [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2000, 2007; Василенко О.А., 2004]. Нарушение продукции ТКБ, вероятно, наряду с действием ТХМ и его метаболитов на клеточном уровне может быть обусловлено изменением активности гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы [Бухарин О.В. и соавт., 1998; Забродский П.Ф., 2002; 2007].

Таким образом, под влиянием ТХМ происходит прямо связанное с дозой уменьшение активности ТКБ в сыворотке крови до 9 сут.

3.3. Фагоцитарная активность нейтрофилов

Фагоцитоз относится к доиммунным факторам защиты организма от инфекций [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Процесс фагоцитоза осуществляется микрофагами (гранулоцитами) и макрофагами (моноцитами крови, клетками пульпы селезенки, эндотелиоцитами кровеносных сосудов, полибластами, гистиоцитами и др.) [Хаитов М.Р. и соавт., 2002]. В настоящее время фагоцитоз рассматривается как сложный многоступенчатый процесс, начинающийся с захвата фагоцитом чужеродной субстанции и кончающийся ее перевариванием (хемотаксис; адгезия; пиноцитоз; формирование фагосомы; слияние фагосомы с гранулами цитоплазмы, приводящее к активированию гидролаз, пироксидаз, протеиназ; гибель и переваривание объекта фагоцитоза, выброс продуктов деградации) [Гребенюк А.Н., 1998; Киричук В. Ф., 1999; Ройт А. и соавт., 2000; Nouragargh S., Holt J.R.S., 1986;]. Помимо действия ферментов уничтожение чужеродной клетки может осуществляться путем "дыхательного" (кислородного) взрыва [Хаитов М.Р. и соавт., 2002]. В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что в фагоцитарной реакции активное участие принимает радикал оксида азота (NO^\bullet); макрофаги, продуцирующие ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и $\text{TNF-}\alpha$ (α -фактор некроза опухоли); простагландины, лейкотриен B_4 (LTB_4), фактор, активирующий тромбоциты. Нейтрофилы синтезируют и выделяют в кровь $\text{TNF-}\alpha$ и ИЛ-12, а также хемокин ИЛ-8 [Гребенюк А.Н., 1998; Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. При остром действии токсикантов, как правило, отмечается снижение функции макрофагов и нейтрофилов [Забродский П.Ф. 1998; Агапов В.И. и соавт., 2004]. Однако, в ряде случаев отмечается кратковременная активация фагоцитарной активности [Забродский П.Ф., 1998, 2002], в частности, увеличение катионных белков в нейтрофилах крыс после острой интоксикации хлорированными углеводородами в дозе 0,1 ЛД₅₀ [Давыдова Е.В. и др., 2004]. Функция макрофагов (а активность

нейтрофилов прямо коррелирует с ней) включает не только фагоцитоз, но и представление переработанного (модифицированного) в лизосомах антигена Т-лимфоцитам. Взаимодействие макрофагов, резэкспрессирующих в модифицированном виде антиген на клеточной мембране, Т- и В-клеток обеспечивает синтез антител на тимусзависимые антигены. Макрофаги секретируют лизоцим, компоненты комплемента (С1, С2, С3, С4, С5, С6, фактор В), интерферон, эстеразы и пр. [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

В экспериментах на крысах нами установлено (табл. 3.3), что под влиянием ТХМ в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 LD₅₀ происходит дозозависимое снижение активности фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов (ФМАН), оцениваемой в НСТ-тесте, через 1-9 сут. Так, при действии ТХМ в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 LD₅₀ фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов через 1 сут снижалась соответственно в 1,62; 1,91 и 2,47 раза ($p < 0,05$), через 6 сут – в 1,45; 1,68 и 2,10 раза ($p < 0,05$), а через 9 сут – в 1,27; 1,45 и 1,61 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Таблица 3.3

Изменение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов крыс после острого отравления ТХМ, ИАН (индекс активности нейтрофилов) [(M±m, n=16-21)]

Группы	ЛД ₅₀	Срок наблюдения, сут		
		1	6	9
Контроль	0	0,42±0,02		
ТХМ	0,25	0,26±0,02*	0,29±0,03*	0,33±0,03*
	0,50	0,22±0,02*	0,25±0,03*	0,29±0,02*
	0,75	0,17±0,02*	0,20±0,02*	0,26±0,03*

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

В опытах на крысах нами показано (табл. 3.4), что под влиянием острой интоксикации ТХМ (0,75 ЛД₅₀) фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов (ФМАН) существенно снижалась. Действие ТХМ приводило к существенной редукции всех четырех исследованных

показателей ФМАН (фагоцитарного показателя, фагоцитарного числа; НСТ-теста спонтанного и индуцированного) в течение 1-9 сут. Так, фагоцитарный показатель, фагоцитарное число и показатель активности нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте под влиянием токсиканта через 1 сут снижались соответственно – в 1,55; 2,25 и 2,48 раза ($p<0,05$), а через 9 сут – в 1,32; 1,50 и 1,32 раза ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 3.4

Изменение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов крыс под влиянием острого отравления ТХМ ($0,75 \text{ ЛД}_{50}$) через 1-9 сут ($M \pm m$)

Группы	Показатели	Срок наблюдения, сут			
		1	3	6	9
Контроль	ФП, %	$29,7 \pm 1,8$			
	ФЧ, %	$1,8 \pm 0,2$			
	НСТ сп, иан	$0,42 \pm 0,02$			
	НСТ инд, иан	$0,62 \pm 0,02$			
ТХМ	ФП, %	$19,1 \pm 1,6^*$	$21,3 \pm 1,7^*$	$22,0 \pm 2,0^*$	$22,5 \pm 2,1^*$
	ФЧ, %	$0,8 \pm 0,2^*$	$0,9 \pm 0,2^*$	$1,1 \pm 0,2^*$	$1,2 \pm 0,2^*$
	НСТ сп, иан	$0,17 \pm 0,02^*$	$0,15 \pm 0,02^*$	$0,19 \pm 0,02^*$	$0,25 \pm 0,03^*$
	НСТ инд, иан	$0,25 \pm 0,03^*$	$0,21 \pm 0,03^*$	$0,40 \pm 0,03^*$	$0,47 \pm 0,04^*$

Примечание: ФП, ФЧ – соответственно фагоцитарный показатель, фагоцитарное число; НСТ – НСТ-тест спонтанный (сп) и индуцированный (инд) – индекс активности нейтрофилов (иан); в каждой серии использовалось 8-12 животных; * - различие с контролем достоверно $p<0,05$.

Весьма похожий характер изменений показателей ФМАН был обнаружен в экспериментах с пероральным отравлением дихлорэтаном [Давыдова Е.В. и др., 1995] при обследовании пациентов с отравлениями суррогатами алкоголя [Романенко О.И., Гребенюк А.Н., 1997; Сосюкин А.Е. и соавт., 1997]. Проявление токсичности ТХМ в проведенных нами опытах по сравнению с действием дихлорэтана и суррогатов алкоголя на полиморфноядерные лейкоциты [Гребенюк А.Н., Романенко О.И., 1996; Гребенюк А.Н. и соавт., 1998] было сходным, несмотря на различные механизмы их токсического действия [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. 2000; Куценко С.А., 2004],

Экспериментальные данные, полученные в НСТ-тесте, свидетельствуют, что действие ТХМ на ФМАН реализуется вследствие взаимодействия токсиканта и его метаболитов с НАДФ·Н, НАДФ⁺. Это подтверждают данные литературы [Гребенюк А.Н. и соавт., 1998]. Действие ТХМ и его метаболитов может быть также связано с ингибированием ФАД⁺, ФАД·Н, восстановленным и окисленным убихиноном и цитохромом b₂₄₅ лейкоцитов или иными механизмами нарушения функционирования НАДФ·Н-оксидазного комплекса нейтрофилов. Кроме кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитоза ТХМ и продукты его биотрансформации, вероятно, поражают и кислороднезависимые микробицидные системы фагоцитов [Гребенюк А.Н. и соавт., 1998]. Это доказано в опытах Е.В. Давыдовой и соавт. (2004а, 2004б), результаты которых свидетельствуют о снижении внутриклеточного содержания катионных белков в нейтрофилах крыс после острой интоксикации 1,2-дихлорэтаном в дозе 1,0 ЛД₅₀.

В угнетении ФМАН существенное значение может иметь дисфункция гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, приводящая к изменению чувствительности микро- и макрофагов к микроорганизмам, в результате чего угнетается их цитотоксичность [Брюхин Г. В., Михайлова Г. И., 1990; Гребенюк А.Н. и соавт., 1998]. Так, показано, что глюкокортикоиды снижают суммарную фагоцитарную активность фагоцитов крыс. А также существенную роль в данном феномене играет адреналин [Шилов Ю.И., 2001]. Кроме того, нарушение активности ФМАН может быть связано с мембранотоксическим действием ТХМ, инициацией ПОЛ мембран нейтрофилов, их взаимодействием с сульфгидрильными, гидроксидными и другими группами мембран фагоцитов, нарушением функции ферментов тканевого дыхания митохондрий полиморфноядерных лейкоцитов [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф., 2002]. Не исключено ингибирование α-нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов ТХМ и его метаболитами [Забродский П. Ф. и соавт., 2000; 2007; Li C.G. et al., 1983].

Таким образом, под влиянием ТХМ происходит дозависимое снижение ФМАН в течение 1-9 сут

Резюме

Таким образом, подводя итог данной главе, можно заключить, что острая интоксикация тетрахлорметаном в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 DL₅₀ дозозависимо снижает сывороточную активность лизоцима и тромбоцитарно-катионного белка в течение 1-9 сут. Под влиянием ТХМ происходит также дозозависимое снижение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов, оцениваемой по фагоцитарному показателю, фагоцитарному числу; спонтанному и индуцированному НСТ-тесту через 1-9 сут после интоксикации. Учитывая значимые изменения факторов доиммунной защиты организма и на 9 сут после отравления ТХМ, можно полагать, что снижение НРО под влиянием токсиканта может продолжаться до 15 сут.

ГЛАВА 4

ВЛИЯНИЕ ТЕТРАХЛОРМЕТАНА НА ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РЕГУЛЯЦИИ СИСТЕМЫ ИММУНИТЕТА

4.1. Изменение содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета

Нами установлено, что под влиянием ТХМ (0,75 DL₅₀) снижалось число Т-лимфоцитов в тимусе через 1 и 6 сутки соответственно в 1,58; 1,51 раза ($p < 0,05$), а количество лимфоцитов в селезенке – в 1,43 и 1,55 раза ($p < 0,05$) соответственно. В костном мозге количество лимфоцитов через 1 и 6 сут уменьшалось в 1,26 и 1,24 раза ($p < 0,05$), а в лимфоузлах - в 1,50 и 1,39 раза ($p < 0,05$) соответственно. Число лимфоцитов в органах системы иммунитета оставалось сниженным по сравнению с контролем до 9 сут после отравления (табл. 4.1).

Таблица 4.1

Изменение содержания лимфоцитов ($\cdot 10^7$) в органах системы иммунитета
крыс под влиянием острого отравления ТХМ
(0,75 ЛД₅₀) через 1-9 сут ($M \pm m$)

Срок наблюдения, сут	Тимус	Костный мозг	Селезенка	Лимфоузлы
Контроль	35,4 \pm 3,1	4,39 \pm 0,30	82,7 \pm 6,2	2,30 \pm 0,19
1	22,4 \pm 2,3*	3,49 \pm 0,22*	58,0 \pm 5,1*	1,53 \pm 0,13*
6	23,5 \pm 2,2*	3,55 \pm 0,21*	53,3 \pm 5,2*	1,65 \pm 0,12*
9	26,1 \pm 3,2*	3,53 \pm 0,20*	64,4 \pm 6,1*	1,72 \pm 0,18*

Примечание: в каждой серии использовалось от 8 до 12 крыс; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Исследование содержания лимфоцитов в тимусе и селезенке после острого отравления ТХМ показало дозозависимое снижение их количества через 1 сут (табл. 4.2). Так, при действии ТХМ в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 DL₅₀ число лимфоцитов в тимусе снижалось соответственно в 1,28; 1,47 и 1,58 раза ($p < 0,05$), а в селезенке – в 1,25; 1,33 и 1,43 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Содержание лимфоцитов в тимусе и селезенке, как свидетельствуют данные литературы, является показателем, характеризующим способность

данных органов обеспечивать иммуногенез, то есть реализацию клеточных и гуморальных иммунных реакций [Ройт А. и соавт., 2000; Молотков А.О., 2002; Сидельникова Н.М., 2004].

Таблица 4.2

Изменение содержания лимфоцитов ($\cdot 10^7$) в тимусе и селезенке крыс после острого отравления ТХМ в зависимости от дозы через 1 сут ($M \pm m$)

Доза, DL_{50}	Тимус	Селезенка
Контроль	35,4 \pm 3,1	82,7 \pm 6,2
0,25	27,6 \pm 2,0*	65,9 \pm 5,0*
0,5	24,0 \pm 2,1*	62,0 \pm 5,0*
0,75	22,4 \pm 2,3*	58,0 \pm 5,1*

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 9 крыс; *- различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

При изучении содержания Т- и В-лимфоцитов под влиянием ТХМ в органах системы иммунитета белых мышей установлено (табл. 4.3), что токсикант через 2 сут уменьшал содержание Т-лимфоцитов в тимусе и В-клеток в селезенке.

Таблица 4.3

Влияние острого отравления ТХМ (0,75 LD_{50}) на содержание Т- и В-лимфоцитов в лимфоидных органах мышей через 2 и 12 сут ($\cdot 10^6$) [$M \pm m$]

Серии опытов	Время после интоксикации, сут	Орган	Т-лимфоциты	В-лимфоциты
Контроль	–	Тимус	59,3 \pm 3,2	–
		Селезенка	68,2 \pm 4,5	72,3 \pm 4,0
		КМ	–	3,5 \pm 0,3
		ЛУп	1,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
ТХМ	2	Тимус	44,9 \pm 3,9*	–
		Селезенка	58,3 \pm 3,4*	60,2 \pm 4,1*
		КМ	–	2,7 \pm 0,2*
		ЛУп	1,4 \pm 0,1*	0,3 \pm 0,1*
	12	Тимус	55,0 \pm 3,3	–
		Селезенка	66,0 \pm 4,1	70,1 \pm 4,1
		КМ	–	3,2 \pm 0,2
		ЛУп	1,6 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1

Примечание: КМ – костный мозг, ЛУп – паховые лимфоузлы; в каждой серии использовалось от 9 до 11 мышей; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

При этом в тимусе содержание Т-клеток уменьшается в 1,32 раза ($p<0,05$), а Т- и В-лимфоцитов в селезенке – в 1,17 и 1,20 ($p<0,05$) соответственно. В костном мозге число Т-клеток уменьшалось в 1,30 раза ($p<0,05$), в лимфоузлах содержания Т- и В-лимфоцитов снижалось соответственно в 1,21 и 1,67 ($p<0,05$). Через 12 сут исследованные показатели восстанавливались до контрольных значений.

Снижение содержания в органах системы иммунитета лимфоцитов под влиянием ТХМ возможно в результате реализации стресс-реакции (действие кортикостерона, инициирующего механизмы апоптоза), а также вследствие усиления апоптоза под влиянием ксенобиотика [Мутускина Е.А. и соавт., 2001; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Stephen B. et al., 2003; Li Q., Kawada T., 2006].

Под влиянием ТХМ в дозе 0,75 ЛД₅₀ через 1 сут снижение содержания лимфоцитов в крови белых мышей не зарегистрировано, а через 3 сут их содержание уменьшалось в 1,11 раза по сравнению с контролем. Через 6 сут значимого снижения лимфоцитов в крови не выявлено (рис. 4.1).

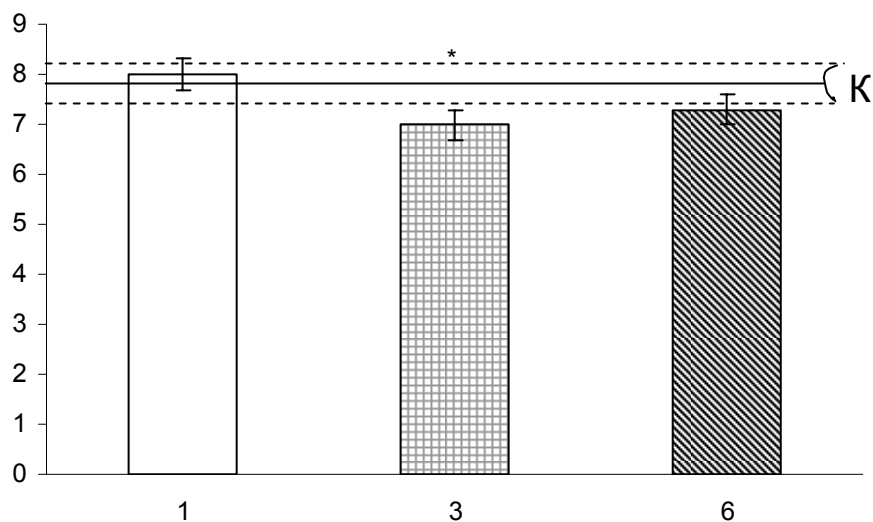


Рис 4.1. Содержание лимфоцитов в крови мышей под влиянием острого отравления тетрахлорметаном (0,75 LD₅₀) через 1-6 сут.

По оси абсцисс: сутки после введения тетрахлорметана; по оси ординат: концентрация лимфоцитов 10⁹/л; К – контроль; в каждой серии использовалось от 7 до 9 животных; * - различие с контролем достоверно $p<0,05$.

Редукцию лимфоцитов в крови и органах системы иммунитета можно объяснить поражением лимфоидной стволовой кроветворной клетки, а также зрелых лимфоцитов реализацией следующих механизмов: подавление пролиферации иммуноцитов в результате ингибирования ферментов тканевого дыхания митохондрий ИКК [Забродский П.Ф. и соавт., 2007], а также инактивации ТХМ многочисленных ферментных систем лимфоцитов, повреждением мембран клеток [Куценко С. А. 2004].

Механизмы, определяющие снижение лимфоцитов в органах иммунной системы после интоксикации ТХМ, кроме того, могут быть связаны с изменением функции гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (ГГАС) [Забродский П.Ф. и соавт., 2002, 2007], холинергической и симпатoadреналовой системы [Денисенко П.П., 1980], с действием ТХМ на ферменты иммуноцитов, инициацией ПОЛ. Эти изменения могут вызывать нарушение гемопоэза и гибель иммуноцитов (апоптоз) [Ройт А. и др., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Мутускина Е.А. и др., 2001; Забродский, 2002; Молотков А.О., 2002; Хаитов Р.М. и др., 2002; Madden K. S., Livnat S., 1991; Li Q., Kawada T., 2006].

При воздействии ТХМ снижение содержания лимфоцитов в лимфоидных органах происходит, вероятно, и вследствие их общетоксического эффекта – подавление пролиферации иммуноцитов в результате ингибирования ферментов тканевого дыхания митохондрий иммунокомпетентных клеток [Забродский П.Ф. и соавт., 1998; 2007]. Кроме того, токсиканты способны нарушать процесс позитивной (положительной) селекции Т-лимфоцитов [Fink P.J., Bevan M.J., 1995].

Следует отметить, что миграция лимфоцитов из органов системы иммунитета весьма динамичный процесс, зависящий от времени суток [Dhabhar F. S. et al., 1996] и различных физических и химических факторов, в частности, от изменения функционального состояния органов системы иммунитета под влиянием гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, в

частности, от кортикостероидов [Dhabhar F. S. et al., 1996], катехоламинов [Madden K. S., Livnat S., 1991], а также изменения состояния холинергической системы [Забродский П.Ф. и соавт., 2001; 2007].

Таким образом, под влиянием острого отравления ТХМ в прямой зависимости от дозы снижается содержание лимфоцитов в органах системы иммунитета крыс и мышей. При остром отравлении в дозе 0,75 ЛД₅₀ ТХМ вызывал уменьшение Т- и В-лимфоцитов в крови и органах иммунной системы соответственно до 6 и 9-12 сут.

4.2. Влияние ТХМ на тимусзависимый гуморальный иммунный ответ

4.2.1. Оценка воздействия ТХМ на антителообразование к тимусзависимому антигену в динамике по титру антител в крови

В экспериментах на белых крысах оценивали действие острого отравления ТХМ в дозах 0.25, 0.5 и 0.75 DL₅₀ на иммунный ответ к тимусзависимому антигену - ЭБ по титру антител через 5, 8, 14 и 20 сут при иммунизации ЭБ, проводившейся одновременно с интоксикацией за 3 сут до отравления. Через 5 сут после введения ЭБ отмечается пик иммунного ответа, связанный с синтезом IgM; через 8 сут титр антител отражает синтез преимущественно IgG, и в меньшей степени – IgM, а через 14 и 20 сут - титр антител характеризует продукцию В-клетками (плазмócитами) только IgG [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Известно, что Th1-лимфоциты участвуют в продукции IgM, IgG2a, а Th2-лимфоциты способствуют синтезу IgG1, IgA, IgE [Ройт А. и соавт., 2000]. Таким образом, использованный метод исследования гуморального звена иммунитета дает представление о функциональной активности как Th1-, так и Th2-лимфоцитов [Fleisher T.A., Oliveira J.B., 2004; Maekawa Y., Yasutomo K., 2005].

Нами показано (табл. 4.4), что под влиянием острого действия ТХМ в индуктивной фазе иммунного ответа (введение яда одновременно с иммунизацией ЭБ) статистически значимо снижался ОДЛТА ($-\log_2$ титра антител) к ЭБ через 5, 8, 14 и 20 сут после иммунизации. Так, острая интоксикация ТХМ в дозах 0,25, 0,50 и 0,75 DL_{50} приводила к редукции ОДЛТА через 5 сут соответственно в 1,50, 1,58 и 1,63 раза ($p<0.05$), а через 8 сут - в 1,50, 1,67 и 1,82 раза ($p<0.05$), через 14 сут - в 1,23, 1,36 и 1,49 раза ($p<0.05$), через 20 сут - в 1,20; 1,26 и 1,29 раза ($p<0.05$) по сравнению с контрольными показателями соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что при остром действии ТХМ иммуносупрессивные эффекты прямо связаны с дозой яда.

Таблица 4.4

Влияние острого действия ТХМ на ОДЛТА у крыс к ЭБ в индуктивной фазе антителогенеза (ТХМ вводили одновременно с иммунизацией), $-\log_2$ титра антител ($M \pm m$)

Доза, DL_{50}	Время после интоксикации, сут			
	5	8	14	20
Контроль	4,9 \pm 0.2	6,0 \pm 0.2	6,4 \pm 0.2	4,9 \pm 0.2
0,25	3,5 \pm 0.2*	4,0 \pm 0.3*	5,2 \pm 0.3*	4,1 \pm 0.3*
0,50	3,1 \pm 0.2*	3,6 \pm 0.3*	4,7 \pm 0.2*	3,9 \pm 0.2*
0,75	3,0 \pm 0.3*	3,3 \pm 0.2*	4,3 \pm 0.2*	3,8 \pm 0.2*

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 11 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p<0.05$.

Кроме того, можно констатировать, что ТХМ при остром воздействии дозозависимо снижает синтез IgM до 8 сут и IgG до 20 сут [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Острое отравление ТХМ вызывает редукцию активности как Th1, так и Th2-лимфоцитов, так как Th1-лимфоциты участвуют в синтезе IgM (оценка ОДЛТА на 5 сут), а Th2-лимфоциты способствуют синтезу IgG1 и других

иммуноглобулинов [Ройт А. и соавт., 2000; Fleisher T.A., Oliveira J.B., 2004; Maekawa Y., Yasutomo K., 2005].

Таким образом, острая интоксикация ТХМ через 5-20 сут вызывала дозозависимое снижение антителообразования, оцениваемое по отрицательному двоичному логарифму титра антител, свидетельствующее о супрессии активности как Th1, так и Th2-лимфоцитов.

4.2.2. Исследование действия острого отравления ТХМ на число антителообразующих клеток в селезенке

Нами установлено (рис. 4.2), что число АОК в селезенке к ЭБ у белых крыс через 5 сут после острой интоксикации ТХМ (при введении яда одновременно с ЭБ) дозозависимо снижалось.

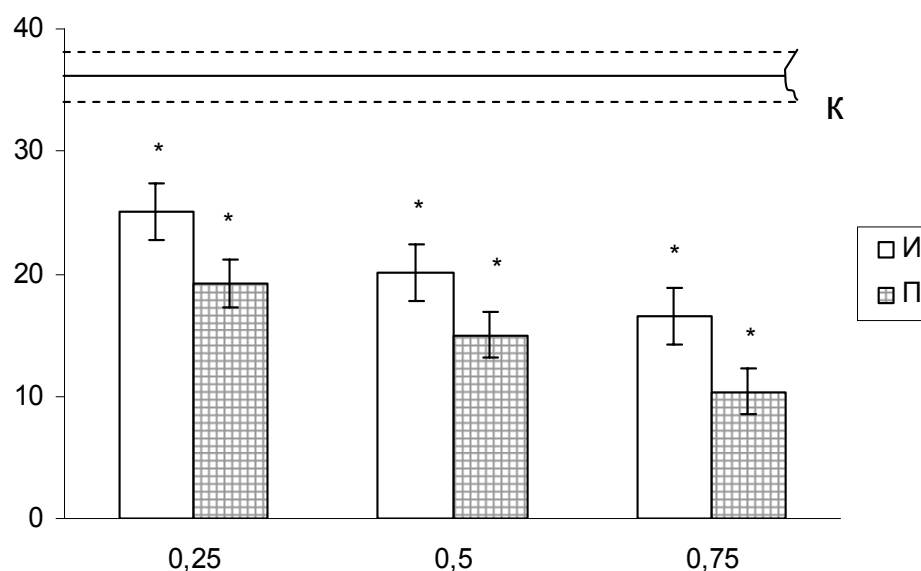


Рис. 4.2. Влияние острого действия тетрахлорметана на число АОК к эритроцитам барана ($\times 10^3$), синтезирующие IgM в селезенке крыс через 5 суток после иммунизации ($M \pm m$).

По оси абсцисс: доза (LD₅₀); по оси ординат: число АОК к эритроцитам барана 10^3 , К – контроль; И, П – соответственно, индуктивная и продуктивная фаза иммуногенеза; в каждой серии использовалось от 7 до 9 животных; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Так, при дозах ТХМ, составляющих 0,25, 0,50 и 0,75 DL₅₀, показатель снижался в 1,45, 1,80 и 2,19 раза ($p < 0,05$) соответственно. Более выраженные изменения числа АОК к ЭБ были обнаружены при введении ТХМ через 3 сут после иммунизации. Так, в продуктивную фазу антителогенеза число АОК в селезенке при дозах ТХМ, составляющих 0.25, 0.50 и 0.75 DL₅₀, уменьшалось соответственно в 1,88, 2,41 и 3,48 раза ($p < 0,05$).

Супрессия показателя в продуктивную фазу гуморальной иммунной реакции (введение ТХМ через 3 сут после ЭБ) по сравнению с индуктивной (введение ТХМ одновременно с ЭБ) вполне объяснима. Данный феномен обусловлен более выраженным действием на пролиферацию, дифференцировку и синтез иммуноглобулинов В-клеток (плазмоцитов), перераспределением лимфоцитов между органами системы иммунитета в период максимальной антителопродукции – синтеза IgM (3-5 сут после иммунизации) в продуктивной фазе антителообразования по сравнению с воздействием ТХМ на распознавание антигена макрофагами, их переработку и представление Т- и В- клеткам, кооперацию макрофагов, Т- И В-лимфоцитов, а также клональную селекцию Т- и В-клеток в индуктивной фазе антителопродукции [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Не исключено, что при одинаковом по интенсивности редуцирующем эффекте на указанные процессы действие в продуктивный период антителогенеза обуславливает усиление апоптоза клеток органов иммунитета, занимающихся антителопродукцией, что приводит к ингибированию синтеза антител [Liao W.T. et al., 2004]. При этом на восстановительные процессы к моменту оценки действия ТХМ (через 2 сут после его введения) остается меньше времени, чем при его действии в индуктивную фазу антителогенеза. Кроме того, следует учитывать ингибирующее синтез антител действие кортикостероидов [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Maslinski W. et al., 1992], концентрация которых в крови при действии различных токсикантов увеличивается [Stephen B. et al., 2003]. Данные литературы свидетельствуют,

что стресс-реакция вследствие психоэмоционального напряжения может приводить к снижению АОК в селезенке мышей в 4 раза [Идова В.Г. и соавт., 2004] вследствие увеличения содержания в крови глюкокортикоидов [Свирид В.Д., 2002]. Можно полагать, что постинтоксикационный стресс оказывает существенное влияние на супрессию гуморального иммунного ответа.

Редукция функции тимусзависимого антителообразования под влиянием ТХМ может быть связана с реализацией различных механизмов иммунотоксических эффектов: на уровне систем – с активацией гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, на уровне взаимодействия клеток – со снижением кооперации Т- и В-лимфоцитов, на субклеточном уровне – с инициацией перекисного окисления липидов, мембранотоксическим действием, в частности, с повреждением мембраны лизосом иммунокомпетентных клеток и высвобождением и активацией кислых гидролаз, на молекулярном уровне – с ингибированием ферментов тканевого дыхания митохондрий иммуноцитов [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2002; 2007].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации ТХМ происходит прямо связанная с дозой редукция тимусзависимого антителообразования в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителогенеза.

4.2.3. Оценка влияния острого отравления ТХМ на число антителообразующих клеток в селезенке, синтезирующих IgG

Изучение антителообразования по числу антителообразующих клеток в селезенке мышей, синтезирующих IgG, через 14 сут после иммунизации при остром действии ТХМ показало (рис. 4.3), что данный токсикант снижает

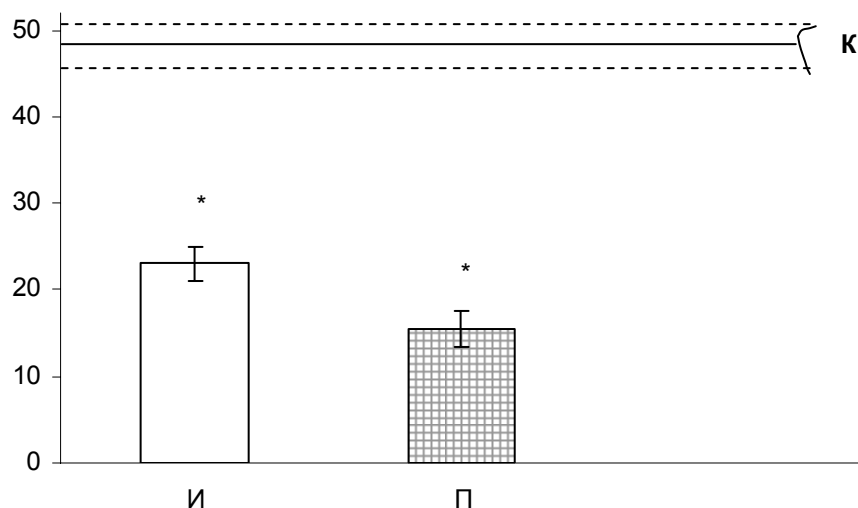


Рис. 4.3. Влияние острого отравления тетрахлорметаном ($0,75 LD_{50}$) на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана 10^3 , синтезирующим IgG в селезенке мышей через 14 сут в индуктивной и продуктивной фазах антителогенеза ($M \pm m$).

По оси абсцисс: фазы антителогенеза; по оси ординат: число антителообразующих клеток в селезенке 10^3 ; И, П – соответственно, индуктивная и продуктивная фаза иммуногенеза; К – контроль ($n = 9$); в каждой серии использовалось от 8 до 9 животных; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

исследованный показатель в индуктивной (ТХМ применяли одновременно с иммунизацией) и продуктивной фазах антителогенеза (ТХМ вводили на 8 сут после иммунизации) через соответственно в 2,04 и 3,03 раза ($p < 0,05$). Следует отметить, что продуктивный период синтеза IgG наступает после иммунизации ЭБ через 8 сут [Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Использованный метод оценки гуморальной иммунной реакции характеризует преимущественно функцию Th2-лимфоцитов и В-клеток, обеспечивающих синтез IgG1, составляющих около 70% общего числа молекул данного класса [Ройт А. и соавт., 2000].

К факторам, супрессирующим синтез IgG (как и IgM, о чем упоминалось в предыдущем разделе) при острой интоксикации ТХМ (это относится и к другим ядам, не ингибирующим синтез гормонов надпочечниками), вероятно, относится эффект кортикостероидов

[Забродский П.Ф. и соавт., 2000; 2007; Szelenyi J.G. et al., 1982; Tiefenbach B. et al., 1985].

Снижение синтеза IgG под влиянием ТХМ, по всей видимости, обусловлено ингибированием многочисленных энзимов, в том числе неспецифических эстераз Th2-лимфоцитов и макрофагов как самими токсикантами, так и их метаболитами [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983; Ройт А. и соавт., 2000; Забродский П. Ф. И соавт., 2007]. Кроме ингибирования эстераз данных клеток редукция антителообразования может быть обусловлена снижением процессов тканевого дыхания вследствие взаимодействия метаболитов ТХМ с различными компонентами тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий ИКК [Забродский П. Ф. и соавт., 2002, 2007].

Таким образом, под влиянием ТХМ снижается Т-зависимое антителообразование, в частности, синтез IgG, что свидетельствует о снижении функции Th2-лимфоцитов.

4.2.4. Нарушение кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования *ex vivo* и *in vitro*

При изучении кооперации Т- и В-лимфоцитов мышей СВА *in vitro* оценка функции этих популяций иммуноцитов в данной реакции осуществлялась по формированию АОК к ЭБ. Удельный вес Т- и В-клеток в обеспечении антителопродукции определяли путем сравнения числа АОК после инкубации той или иной популяции лимфоцитов в течение 2 ч с различными концентрациями ТХМ. Кооперацию Т- и В-лимфоцитов можно рассматривать, как механизм на уровне взаимодействия клеток, определяющий антителопродукцию. В модели *in vitro* роль клеток, представляющих антиген Т-лимфоцитам, вместо макрофагов выполняют В-клетки [Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. В модели *ex vivo* изучение данного

процесса предусматривал забор Т- или В-клеток через 1 сут от сингенных доноров после воздействия на них ТХМ. В последующем кооперация этих клеток соответственно с В- или Т-лимфоцитами интактных животных исследовалась *in vitro*

В наших исследованиях показано (табл. 4.5), что ТХМ в концентрациях 1, 10 и 50 мМ в прямой зависимости от дозы уменьшает функцию Т- и В-клеток в кооперации соответственно с В- и Т-лимфоцитами. В большей степени под влиянием ТХМ поражались Т-клетки. Так, при концентрации 10 мМ ТХМ снижал активность В- и Т-клеток соответственно в 1,62 и 1,78 раза ($p < 0,05$), а при концентрации 50 мМ - в 2,45 и 3,27 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Таблица 4.5

Влияние ТХМ на кооперацию Т- и В-лимфоцитов мышей *in vitro* (число АОК на 10^6 В-клеток) [$M \pm m$, $n=7-8$]

Серии опытов	Концентрация ТХМ, мМ		
	1	10	50
$B^0 + T$	$306 \pm 35^*$	$250 \pm 24^*$	$165 \pm 15^*$
$B + T^0$	$287 \pm 27^*$	$227 \pm 25^*$	$124 \pm 13^{**}$

Примечание: контроль: $B + T$ - 405 ± 35 на 10^6 В-клеток; B^0 , T^0 - В- и Т-клетки в течение 2 ч до добавления ЭБ инкубировали с ТХМ; * - различие с контролем ($B + T$) достоверно – $p < 0,05$; ** $p < 0,05$ по сравнению с $B^0 + T$.

При исследовании кооперации Т- и В-клеток после выделения их у мышей через 1 сут после введения им ТХМ в дозах 0,25 и 0,75 DL_{50} установлено (рис. 4.4), что в прямой зависимости от дозы ТХМ поражал в большей степени Т-клетки по сравнению с В-лимфоцитами. Зарегистрировано существенное снижение активности Т-лимфоцитов в эффекте кооперации клеток после действия ТХМ в дозе 0,25 DL_{50} в 2,02 раза, а В-клеток - в 1,77 раза. В дозе 0,75 DL_{50} отмечалась супрессия функции Т-лимфоцитов в 2,96 раза, а В-клеток - в 2,27 раза соответственно.

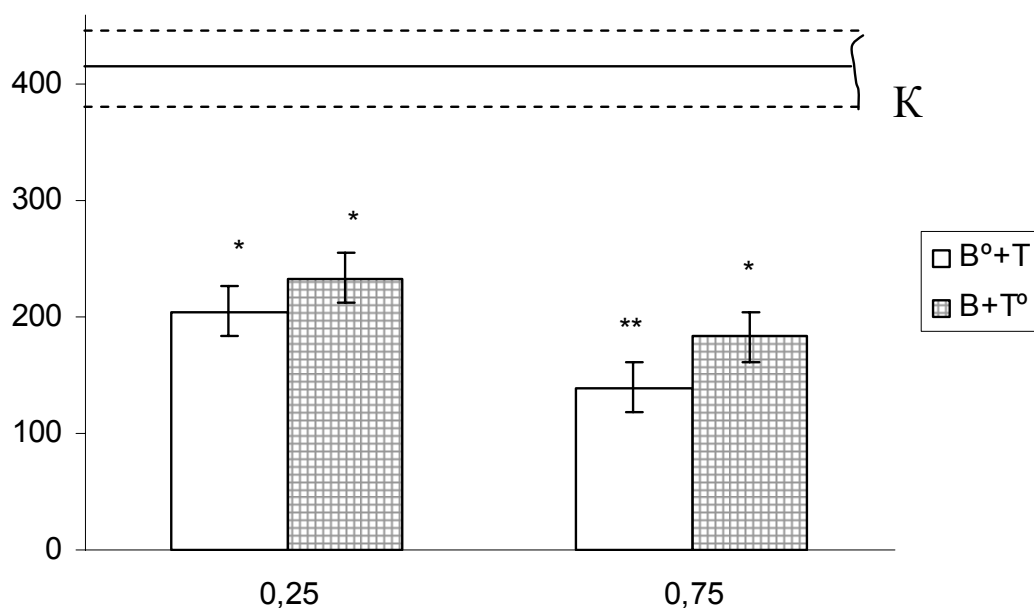


Рис.4.4. Влияние острого отравления ТХМ через 1 сут на кооперацию Т- и В-лимфоцитов мышей *ex vivo* [$M \pm m$, $n=7-8$]

По оси абсцисс: доза (LD₅₀); по оси ординат: число АОК на 10⁶ – В - клеток; В⁰, Т⁰ - В⁰, Т⁰ – клетки получали через 1 сут от мышей, подвергавшихся действию ТХМ; К – контроль (В+Т - 415±35 на 10⁶ В-клеток); * - различие с контролем (В+Т) достоверно – $p < 0,05$; ** - $p < 0,05$ по сравнению с В⁰+Т.

Снижение активности Т- и В-клеток в процессе их кооперации, вероятно, связано с нарушением их функции как в результате прямого мембранотоксического эффекта ТХМ [Голиков С.Н и соавт., 1986], так и вследствие взаимодействия с сульфгидрильными и аминокеттогруппами ферментов лимфоцитов высокотоксичных продуктов их биотрансформации, ингибирования ими тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования и синтеза белков [Забродский П.Ф. и соавт., 2007], уменьшения активации Т- и В-лимфоцитов вследствие снижения продукции циклических нуклеотидов и секреции Т-клетками ИЛ-2 и ИЛ-4 [Козлов В.А. и соавт., 2001; Шуршалина А.В. и соавт., 2001], а также в результате повреждения метаболитами ТХМ мембраны лизосом иммуноцитов с высвобождением и активацией кислых гидролаз [Ахматова М.А. и др., 1982].

Более высокую чувствительность Т-клеток к большинству ксенобиотиков доказывают многочисленные исследования [Смирнов В.С и соавт., 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 2001, 2004, 2007; Descotes G., 1986].

Таким образом, ТХМ вызывает прямо связанную с дозой и концентрацией редукцию кооперации Т- и В-клеток *ex vivo* и *in vitro* (при действии токсиканта преимущественно на Т-клетки по сравнению с В-лимфоцитами).

4.3. Влияние ТХМ на тимуснезависимый гуморальный иммунный ответ

Нами установлено, что при оценке содержания АОК к Vi-Ag в селезенке у крыс после острой интоксикации ТХМ в индуктивной и продуктивной фазах антителогенеза через 5 суток после иммунизации данный показатель снижался соответственно в 1,37 и 1,76 раза - $p < 0,05$ (рис. 4.5).

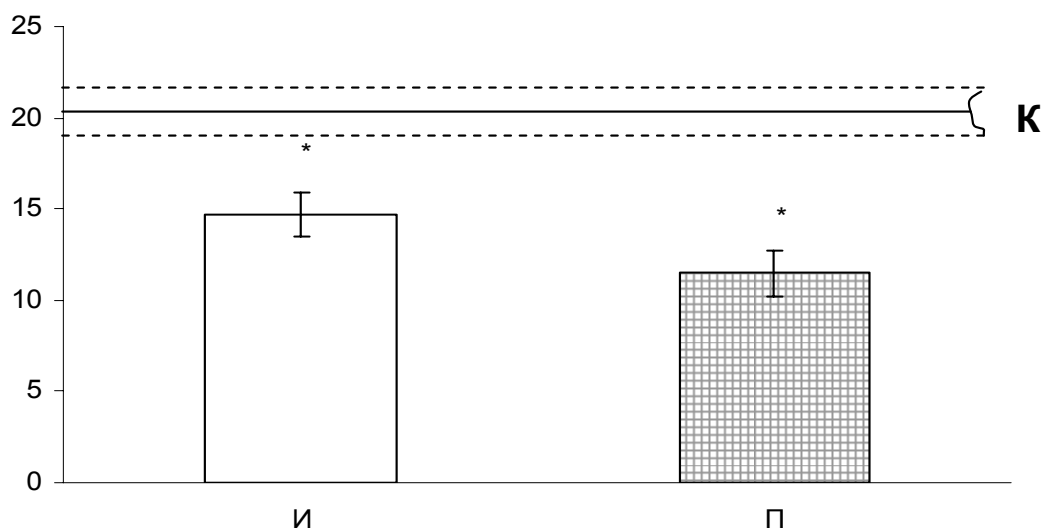


Рис 4.5 Влияние острого отравления ТХМ ($0,75 \text{ LD}_{50}$) на число антителообразующих клеток к Vi-Ag (10^3), синтезирующим IgM, в селезенке белых мышей через 5 сут в индуктивной и продуктивной фазах антителогенеза, ($M \pm m$)

По оси абсцисс: И, П – соответственно, индуктивная и продуктивная фаза иммуногенеза; по оси ординат: число антителообразующих клеток к Vi-Ag, 10^3 ; К –

контроль); в каждой серии использовали от 7 до 10 крыс; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$

Таким образом, под влиянием ТХМ в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом происходит более выраженная редукция функции В-клеток (плазмоцитов) селезенки, синтезирующих IgM [Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Исследование Т-независимого гуморального иммунного ответа после острого отравления ТХМ в индуктивной фазе иммуногенеза показало прямо связанное с дозой его снижение (рис. 4.6).

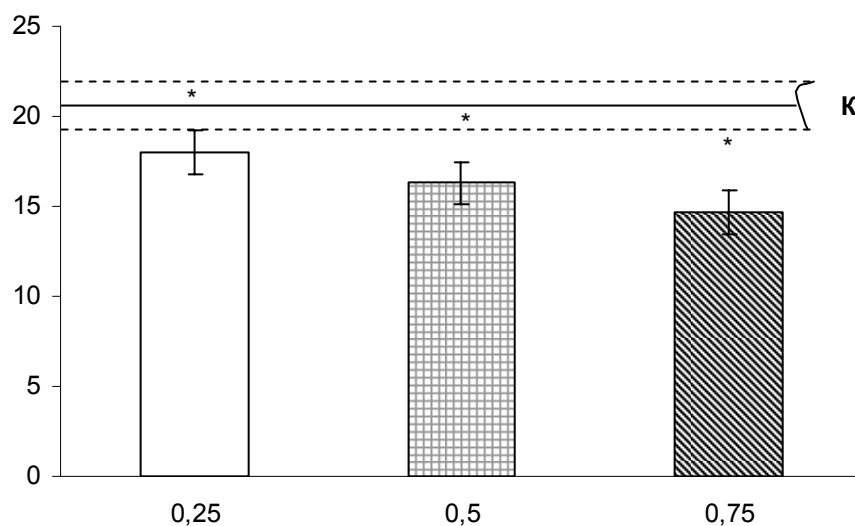


Рис. 4.6. Изменение содержания числа антителообразующих клеток к Vi-Ag (10^3), синтезирующим IgM, в селезенке белых крыс через 5 сут после острого отравления ТХМ в зависимости от дозы в индуктивной фазе иммуногенеза, ($M \pm m$)

По оси абсцисс: доза (LD_{50}); по оси ординат: число антителообразующих клеток к Vi-Ag, 10^3 ; К – контроль ($n = 10$); в каждой серии использовалось от 7 до 10 мышей; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Сравнительная оценка влияния ТХМ на Т-зависимое и Т-независимое антителообразование показывает, что под влиянием токсиканта наблюдается преимущественное нарушение Т-зависимой антителопродукции. Это обусловлено, наряду с другими механизмами, действием ТХМ одновременно на макрофаги, В-лимфоциты и Т-клетки (в использованной нами

экспериментальной модели на субпопуляцию Th1), участвующие в реализации данной иммунной реакции, в то время как Т-независимый гуморальный иммунный ответ обеспечивается в основном функцией В-клеток, активируемых антигеном в присутствии ИЛ-1, секретируемом макрофагами [Ройт и соавт., 2000]. Вполне естественно, что иммунотоксическое действие на три элемента, взаимодействующих в процессе антителообразования, проявляется большим его угнетением, чем при поражении одного или двух элементов, если нет оснований предполагать реализацию селективного иммуотропного эффекта. Следует отметить, что ТХМ не способен избирательно поражать только Т-лимфоциты. Оказывая максимальный повреждающий эффект на эти клетки по сравнению с В-лимфоцитами, он, как показали наши эксперименты, действует и на В-клетки.

Снижение числа АОК, синтезирующих IgM и IgG под влиянием ТХМ свидетельствует о нарушении функции как Th1-, так и Th2-лимфоцитов (Т-хелперов первого и второго типа) [Romagnani S., 1997].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации ТХМ происходит дозозависимое снижение Т-независимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период антителогенеза по сравнению с индуктивной фазой антителопродукции.

4.4. Оценка влияния ТХМ на клеточный иммунный ответ

4.4.1. Исследование функции Th1-клеток

Действие ТХМ на функцию Th1-лимфоцитов и косвенно на продукцию ими γ -интерферона, β -фактора некроза опухоли и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора лимфоцитов и других цитокинов, а также на участвующие в реализации гиперчувствительности IV типа Т-клетки памяти и макрофагов и моноциты позволяет оценить реакцию

гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в модели, не связанной с переносом клеток [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Шуршалина А.В. и соавт., 2001; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Kimber I., 1996]. В адоптивной реакции (связанной с переносом клеток, to adopt – принимать, присваивать) существует возможность оценить действие ТХМ на вторичный клеточный иммунный ответ, формирование Th1-лимфоцитов в селезенке.

В экспериментах на крысах популяции Вистар нами показано (рис. 4.7), что при острой интоксикации ТХМ ($0,75 \text{ LD}_{50}$) происходит снижение

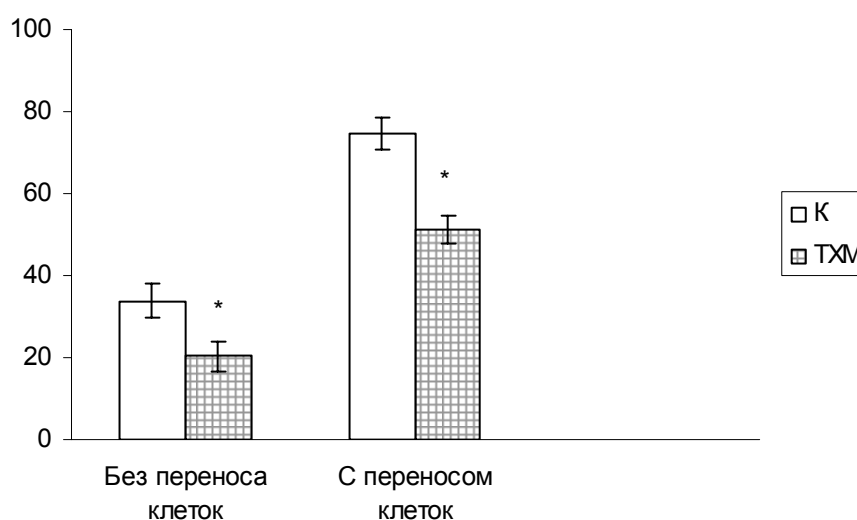


Рис. 4.7. Влияние острого отравления ТХМ ($0,75 \text{ LD}_{50}$) на функцию Th1-лимфоцитов по реакции ГЗТ, % ($M \pm m$)

По оси абсцисс: экспериментальная модель иммуногенеза; по оси ординат: выраженность реакции ГЗТ, %; К – контроль; в каждой серии использовалось от 7 до 9 крыс; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

реакции ГЗТ (без переноса клеток) в 1,67 раза ($p < 0,05$), а при переносе спленоцитов крысам-реципиентам от крыс-доноров - в 1,46 раза. ($p < 0,05$).

При переносе спленоцитов крыс-доноров крысам-реципиентам реакция ГЗТ отражает формирование вторичного клеточного иммунного ответа, так как после введения этих клеток крысы-реципиенты за 4 суток до введения разрешающей дозы антигена (ЭБ) получали его путем внутрибрюшинной

иммунизации. В этой реакции основную роль играют Th1-лимфоциты спленоцитов доноров после действия на них токсиканта.

Изменения формирования ГЗТ, выявленные нами в различных моделях, позволяют заключить, что ТХМ вызывает супрессию Th1-лимфоцитов как в первичном, так и во вторичном клеточном иммунном ответе. Учитывая, что Th1-лимфоциты обеспечивают реализацию реакции ГЗТ путем активации моноцитов и макрофагов [Хаитов Р.М. и соавт., 2002], можно полагать, что ТХМ снижает функцию и этих клеток.

Оценка реакции ГЗТ после острого отравления ТХМ показала прямо связанное с дозой ее снижение (рис. 4.8).

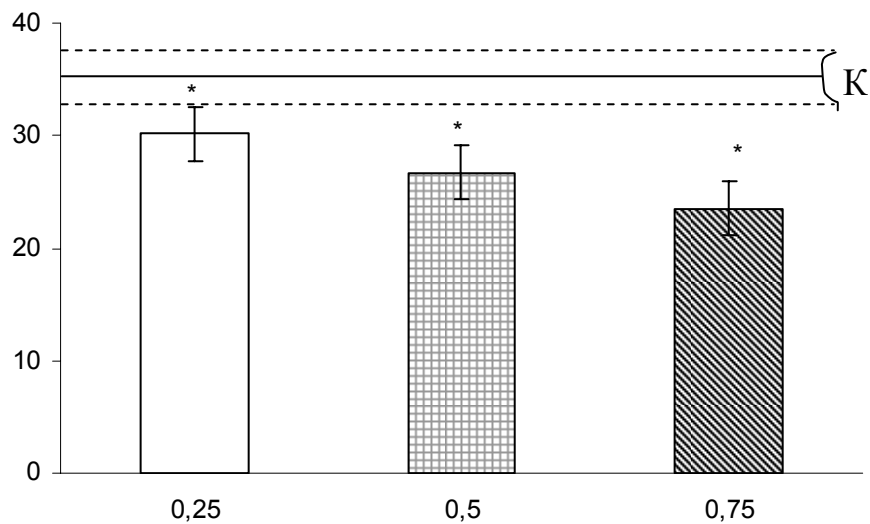


Рис.4.8. Изменение функции Th1-лимфоцитов (без переноса клеток) у крыс после острого отравления ТХМ в зависимости от дозы по реакции ГЗТ, % (M±m)

По оси абсцисс: доза (LD₅₀); по оси ординат: выраженность реакции ГЗТ, %; К – контроль; в каждой серии использовалось от 7 до 9 крыс; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Снижение функции Т-лимфоцитов обусловлено при отравлении ТХМ ингибирующим действием кортикостероидов [Tiefenbach V. et al., 1985; Stephen B. et al., 2003], а также иммунотоксическим эффектом метаболитов ТХМ, связанным с инактивацией многочисленных ферментов Т-лимфоцитов, и другими эффектами [Забродский П.Ф. и соавт., 2007].

Редукция активности Т-клеток может быть обусловлена снижением процессов тканевого дыхания и нарушением окислительного фосфорилирования метаболитами ТХМ [Забродский П.Ф. и соавт., 2007]. Существенную роль в иммунотоксическом эффекте ТХМ играет также активация ими перекисного окисления липидов мембран иммуноцитов, повреждение мембран и органелл иммуноцитов, увеличение апоптоза клеток системы иммунитета [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф., 2002, 2007; Spoo W., 2001; Weber L.W. et al., 2003; Salazar-Montes A. et al., 2008; Botsoglou N.A. et al., 2008].

Механизм действия ТХМ, возможно, реализуется также вследствие ингибирования эстераз, которые локализованы преимущественно в Т-хелперах (Th1- и Th-2 лимфоцитах) [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983].

Таким образом, острая интоксикация ТХМ дозозависимо снижает функцию Th1-лимфоцитов как в первичном, так и вторичном клеточном иммунном ответе.

4.4.2. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности

Система, которая получила название антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), включает, так называемые, К-клетки, которые являются естественными клетками киллерами (ЕКК), использующие для усиления реакции антитела (IgG) [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lanier L. L., 2003; Lee J. C. et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Естественные клетки-киллеры, активированные связанными с клеткой-мишенью (например, клеткой, пораженной вирусом) антителами, уничтожают ее. При этом антитела (IgG) привлекают своим Fc-хвостом ЕКК, имеющие для этого соответствующий FcγRIII. Возникает комплекс клетка-мишень – антитело – ЕКК, в котором ЕКК реализует свою киллерную функцию в отношении клетки-мишени [Хаитов Р. М. и соавт., 2000;

Klingemann H.G., Martinson J., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

В систему АЗКЦ помимо ЕКК входят полиморфноядерные лейкоциты – базофилы, эозинофилы, сегментоядерные лейкоциты, а также моноциты и другие фагоцитирующие и нефагоцитирующие миелоидные клетки [Ройт А. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003].

При действии ТХМ в дозе 0,75 ЛД₅₀ на АЗКЦ селезенки крыс (рис. 4.9) при иммунизации ЭБ одновременно с интоксикацией (индуктивный период

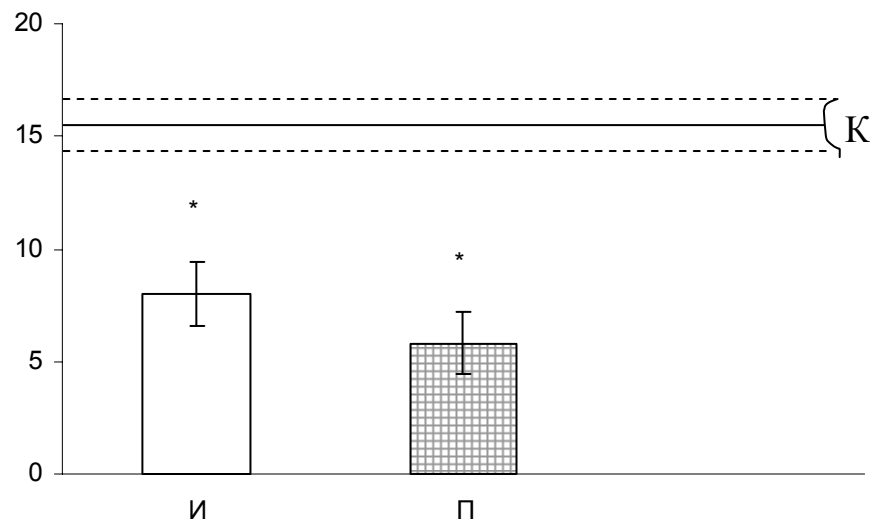


Рис. 4.9. Влияние острого отравления ТХМ (0,75 LD₅₀) в индуктивной и продуктивной фазах иммуногенеза на антителозависимую клеточную цитотоксичность спленоцитов крыс через 5 сут, % (M±m)

По оси абсцисс: И, П – соответственно, индуктивная и продуктивная фаза иммуногенеза; по оси ординат: антителозависимая клеточной цитотоксичность спленоцитов; %; в каждой серии использовалось от 8 до 9 крыс; К – контроль; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

иммуногенеза) и через 3 сут после нее (продуктивный период) происходило статистически значимое уменьшение исследованного показателя при остром отравлении ТХМ соответственно в 1,96 и 2,71 раза ($p < 0,05$) через 5 сут после иммунизации.

Исследование АЗКЦ после острого отравления ТХМ в индуктивной фазе иммуногенеза показало прямо связанное с дозой ее снижение (рис. 4.10).

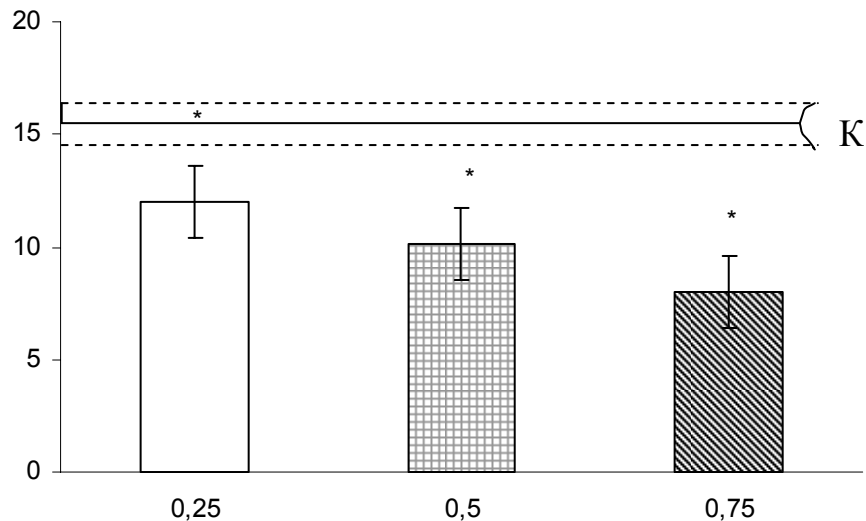


Рис. 4.10. Изменение антителозависимой клеточной цитотоксичности крыс через 5 сут после острого воздействия ТХМ в индуктивной фазе иммуногенеза в зависимости от дозы, % ($M \pm m$)

По оси абсцисс: доза (LD₅₀); по оси ординат: антителозависимая клеточная цитотоксичность спленоцитов, %; К – контроль; в каждой серии использовалось от 8 до 9 крыс; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Наряду с описанными в предыдущих разделах (разд. 4.1, 4.2, 4.3, 4.4) общими механизмами иммунотоксичности ТХМ, по-видимому, способен уменьшать АЗКЦ вследствие нарушения электролитного обмена клетки (перекисное окисление липидов мембран К-клеток, нарушение их проницаемости), приводящего к изменению соотношения цАМФ/цГМФ [Lanier L. L., 2003] и увеличению интенсивности процессов, связанных с апоптозом К-клеток [Li Q., Kawada T., 2006].

Существуют основания полагать, что ТХМ снижает АЗКЦ вследствие нарушения связывания IgG (FcγR) с Fc рецепторами К- клеток. [Delves P.J., Roitt I.M., 2000; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Таким образом, острое отравление ТХМ дозозависимо снижает АЗКЦ спленоцитов преимущественно в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с его индуктивным периодом.

4.4.3. Воздействие острой интоксикации ТХМ на функцию естественных клеток-киллеров

К ЕКК, открытым в 1976 году, относятся клетки, не имеющие антигенных маркеров Т- и В-лимфоцитов (так называемые, О-клетки). Предполагают, что ЕКК происходят из предшественников Т-лимфоцитов [Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Поверхность ЕКК имеет маркерные молекулы CD16, CD56, CD57 и CD94 (преимущественно ЕКК представлены клетками с маркерами CD16 и CD56) [Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lanier L. L., 2003].

ЕКК не обладают способностью к фагоцитозу [Lanier L. L., 2003; Garrity D. et al., 2005]. Цитолиз клетки-мишени осуществляется проникновением ферментов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (порообразование перфорином) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; Lee J. C. et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Кроме того, ЕКК способны обеспечивать уничтожение чужеродной клетки путем реализации "дыхательного взрыва" (поражение активными радикалами кислорода, гидроксильного радикала и т.п.), а также индукцией апоптоза. Активность ЕКК повышается интерферонами, интерлейкинами (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Шуршалина А.В. и соавт., 2001].

При контакте с клетками опухоли, клетками, пораженными вирусами или паразитами, ксеногенными клетками ЕКК способны уничтожать их без предварительного контакта с антигенами, находящимися на их поверхности. Они узнают определенные структуры высокомолекулярных гликопротеидов, которые экспрессируются на мембране инфицированных вирусом клеток. [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M.,

2000; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

На ЕКК локализованы киллер-активизирующие рецепторы, которые распознают множество различных молекул на поверхности всех ядерных клеток. На ЕКК находятся и киллер-ингибирующие рецепторы, распознают молекулы главного комплекса гистосовместимости класса I, которые также обычно присутствуют на всех ядерных клетках. Если активизирующие естественные клетки-киллеры «включаются», запускается команда, реализующая «киллинг» (уничтожение чужеродной для естественных клеток-киллеров клетки). Этот сигнал обычно отменяется запрещающим сигналом, который посылает ингибирующий рецептор при распознавании им молекулы главного комплекса гистосовместимости класса I. Эта система используется естественными клетками-киллерами для того, чтобы распознать нормальные клетки и клетки, испытывающие на своей поверхности недостаток молекул главного комплекса гистосовместимости класса I. Киллер-активизирующие рецепторы распознают множество молекул, представленных на поверхности нормальных ядерных клеток, и в отсутствии подавляющего сигнала от киллер-ингибирующих рецепторов киллер-активизирующие рецепторы реализуют сигнал естественных клеток-киллеров атаковать и уничтожить другую клетку. Цитотоксические гранулы естественных клеток-киллеров, которые содержат перфторин и гранзимы, поляризуются на границе с клеткой-мишенью и затем проникают в клетку-мишень [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lee J. C. et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

Исследование влияния на естественные клетки-киллеры (естественную цитотоксичность) ТХМ показало (табл. 4.6), что происходило статистически значимое уменьшение их активности через 1, 3, 6 и 9 сут соответственно в 3,28; 2,67; 2,34 и 1,41 раза ($p < 0,05$).

Длительное (до 9 сут) снижение активности естественных клеток-киллеров обусловлено особенностями токсикодинамики этого соединения,

связанными со способностью ТХМ к длительному депонированию в органах, богатых липидами [Тиунов Л.А., 1990] .

Таблица 4.6

Влияние острого отравления ТХМ (0,75 ЛД₅₀) на активность естественных клеток-киллеров крыс, ЕЦ % (M±m)

Группы	Время после интоксикации, сут			
	1	3	6	9
Контроль	30,2±3,1			
ТХМ	9,2±1,7*	11,3±2,2*	12,8±2,4*	21,4± 2,7*

Примечание: в каждой серии использовалось от 8 до 10 крыс; *- различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Кроме того, учитывая то, что печень является органом, в котором образуется большая часть естественных клеток-киллеров [Хаитов Р.М. и соавт., 2000], а ТХМ обладает максимальным гепатотропным эффектом из хлорированных углеводородов, спиртов и других токсикантов [Тиунов Л.А., 1990; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Куценко С.А. и соавт., 2004], выраженная редукция активности естественных клеток-киллеров ТХМ вполне объяснима.

Исследование активности естественных клеток-киллеров (по естественной цитотоксичности) после острого отравления ТХМ при введении его в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 DL₅₀ через 3 сут показало прямо связанное с дозой ее снижение (рис. 4.11).

Снижение активности ЕКК под влиянием ТХМ может быть связано с эффектами кортикостероидов и катехоламинов вследствие активации токсикантом гипоталамо-гипофзарно-адреналовой и симпато-адреналовой систем и увеличения концентрации в крови кортикостероидов и катехоламинов [Madden K.S., Livnat S., 1991; Claman H.N., 1993; Stephen B. et al., 2003].

Вероятно, ТХМ и его метаболиты способны снижать активность естественных клеток-киллеров вследствие поражения механизмов

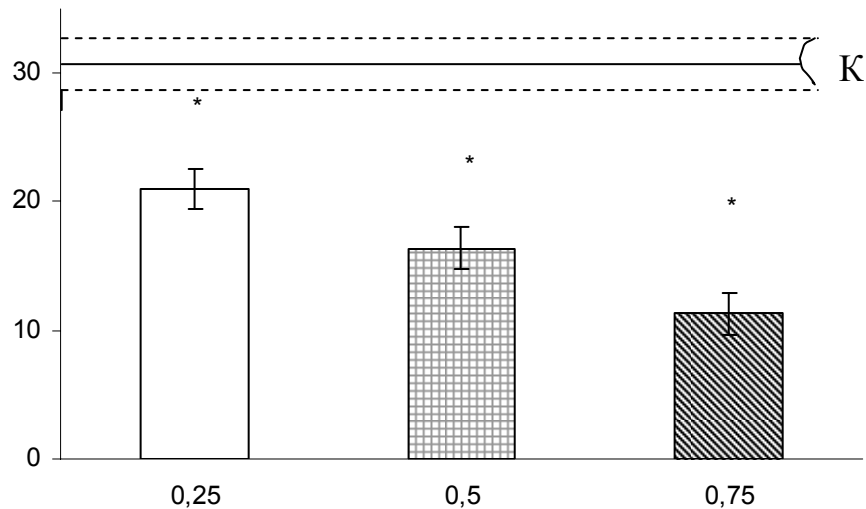


Рис. 4.11. Изменение естественной цитотоксичности крыс через 3 сут после острого воздействия ТХМ в зависимости от дозы, % (M±m)

По оси абсцисс: доза (LD₅₀); по оси ординат: изменение естественной цитотоксичности крыс, %; К – контроль; в каждой серии использовалось от 7 до 10 мышей; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

порообразования перфорином и выделения в клетки мишени гранзимов (или снижением их синтеза), а также индукцией апоптоза естественных клеток-киллеров [Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Garrity D. et al., 2005; Li Q., Kawada T., 2006; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006; Timmons B.W. et al., 2006].

ТХМ может снижать активацию естественных клеток-киллеров вследствие редукции синтеза ИЛ-2 Th 0 -лимфоцитами и γ -интерферона Th1-клетками [Сухих Г.Т. и соавт., 1984; Ройт А. и соавт., 2000, Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Таким образом, острая интоксикация ТХМ дозозависимо снижает активность естественных клеток-киллеров в течение 9 сут.

При изучении действия ТХМ в концентрациях, составляющих 1; 10 и 50 мМ, на активность естественных клеток-киллеров белых мышей *in vitro* установлено (табл. 4.7) снижение исследованного параметра соответственно в 1,41; 2,13; 3,59 ($p < 0,05$) раза.

Необходимо заметить, что в отличие от воздействия ТХМ на ЕКК *in vivo* его эффект *in vitro* обусловлен действием преимущественно неметаболизированной молекулы яда.

При исследовании функции ЕКК у мышей *in vitro* под влиянием ТХМ выявлено, что редукция их активности была прямо связана с концентрацией токсиканта.

Таким образом, супрессирующее действие ТХМ на активность ЕКК прямо зависит от дозы (*in vivo*) и концентрации (*in vitro*).

Таблица 4.7

Влияние ТХМ на активность ЕКК у белых мышей *in vitro*, % ($M \pm m$)

Группы	Концентрация, мМ		
	1	10	50
Контроль	$30,5 \pm 2,3$		
ТХМ	$21,5 \pm 2,2^*$	$14,3 \pm 1,7^*$	$8,5 \pm 1,6^*$

Примечание: спленоциты в течение 1 ч инкубировали с ТХМ; в каждой серии использовали от 8 до 10 крыс; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Резюме

Подводя итог представленным данным, можно заключить, что под влиянием острого отравления ТХМ в прямой зависимости от дозы снижается содержание лимфоцитов в органах системы иммунитета крыс и мышей. При остром отравлении в дозе $0,75 \text{ ЛД}_{50}$ ТХМ вызывал уменьшение количества Т- и В-лимфоцитов в крови и органах иммунной системы соответственно до 6 и 9-12 сут.

Острая интоксикация ТХМ через 5-20 сут вызывала дозозависимое снижение антителообразования, оцениваемое по ОДЛТА, свидетельствующее о супрессии активности как Th1, так и Th2-лимфоцитов.

Под влиянием острой интоксикации ТХМ происходит прямо связанная с дозой редукция тимусзависимого антителообразования в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителогенеза. ТХМ снижает Т-зависимое антителообразование, в частности, синтез IgG, что свидетельствует о снижении функции Th2-лимфоцитов.

ТХМ вызывает прямо связанную с дозой и концентрацией редукцию кооперации Т- и В-клеток *ex vivo* и *in vitro* (при действии токсиканта преимущественно на Т-клетки, по сравнению с В-лимфоцитами).

Под влиянием острой интоксикации ТХМ происходит дозозависимое снижение Т-независимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период антителогенеза по сравнению с индуктивной фазой антителопродукции.

Острая интоксикация ТХМ дозозависимо снижает функцию Th1-лимфоцитов как в первичный, так и во вторичном клеточном иммунном ответе.

ТХМ дозозависимо снижает АЗКЦ спленоцитов преимущественно в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с его индуктивным периодом. Острая интоксикация ТХМ дозозависимо снижает активность ЕКК в течение 9 сут. Супрессирующее действие ТХМ на активность ЕКК *in vitro* прямо зависит от концентрации.

ГЛАВА 5

МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ ОТРАВЛЕНИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

5.1. Исследование редукции функции Th1- Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов в супрессии иммунных реакций

От соотношения активности лимфоцитов Th1-, Th2-типа (парадигма двух видов хелперов - Th1/Th2 [Romagnani S., 1997] может зависеть вероятность возникновения соответственно вирусных или микробных инфекций [Asquith B., 2007], также формирование контактной или респираторной гиперчувствительности.

ТХМ применяли в дозе 1/4 DL₅₀ в течение 4 сут и 1/13 DL₅₀ в течение 13 сут для оценки соответственно функции Th1- и Th2-лимфоцитов. При оценке всех иммунных реакций животные получали суммарную эквивалентную дозу ТХМ (1,0 DL₅₀). Как уже упоминалось, концентрацию ИФН- γ исследовали в плазме крови крыс через 4 сут после первой инъекции ТХМ, а цитокины ИЛ-4 – через 13 сут после первого введения ТХМ методом ферментного иммуносорбентного анализа.

При исследовании концентрации цитокинов в плазме крови крыс (табл. 5.1). под влиянием подострого действия ТХМ установлено уменьшение содержания ИФН- γ на 5 сут и ИЛ-4 на 14 сут после отравления ТХМ соответственно в 2,50 и 1,58 раза ($p < 0,05$).

Очевидно, что снижение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 под влиянием ТХМ в 4,2 раза по сравнению с контролем (6,6) свидетельствует о большей супрессии активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [Сухих Г.Т. и соавт., 1984].

При воздействии ТХМ (табл. 5.2) отмечалось уменьшение гуморального иммунного ответа через 4 сут к Т-зависимому антигену (по числу АОК в

Таблица 5.1

Влияние интоксикации ТХМ на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ($M \pm m$, $n = 7$)

Цитокины	Контроль	ТХМ
ИФН- γ	987 \pm 78	395 \pm 37*
ИЛ-4	150 \pm 22	95 \pm 10*
ИФН- γ /ИЛ-4	6,6	4,2

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

селезенке), характеризующему синтез IgM В-клетками и функцию Th1-лимфоцитов, по сравнению с контрольным уровнем в 2,57 раза ($p < 0,05$). При подостром отравлении ТХМ на 5 сут отмечалась существенная супрессия реакции ГЗТ (функция Th1-клеток) соответственно в 2,27 раза ($p < 0,05$). Через 13 сут после иммунизации (пик иммунного ответа, оцениваемый по IgG) отмечалось уменьшение продукции IgG (по числу АОК в селезенке) в 1,42 раза ($p < 0,05$), свидетельствующее о редукции функции Th2-лимфоцитов.

Таблица 5.2

Влияние интоксикации ТХМ на функцию Th1- и Th2-лимфоцитов у крыс ($M \pm m$, $n = 9-11$)

Группы	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10^3	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10^3
Контроль	43,5 \pm 4,0	38,8 \pm 3,3	52,8 \pm 5,4
ТХМ	16,9 \pm 2,1*	17,1 \pm 2,2*	37,2 \pm 3,8*

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Характеризующие иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1-лимфоцитов параметры при действии ТХМ в среднем снижались в 2,42 раза. Установлена значительно меньшая редукция иммунного ответа, который обеспечивается функцией Th2-лимфоцитов (и В-клеток), при

отравлении ТХМ (соответствующее редуции числа АОК, синтезирующих IgG). Полученные данные подтверждают выявленную особенность поражения функции Th1-лимфоцитов под влиянием ТХМ в большей степени по сравнению с супрессией активности Th2-лимфоцитов.

Снижение активности Th1-клеток ТХМ может быть обусловлена существенным увеличением в крови концентрации кортикостерона вследствие подострой интоксикации [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], к которому в большей степени чувствительны лимфоциты Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000], антихолинэстеразным эффектом ТХМ и его метаболитами [Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 2004] и, вероятно, большим содержанием эстераз на наружной мембране и в цитозоле Th1-клеток.

Таким образом, подострое действие тетрахлорметана существенно снижает концентрацию в крови цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4), уменьшает соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 по сравнению с контролем. ТХМ вызывает большее поражение Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами.

5.2. Роль кортикостероидов и ПОЛ в супрессии иммунного ответа при отравлении тетрахлорметаном

Активация гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы при острой интоксикации ксенобиотиками вызывает увеличение в крови кортикостероидов. Существуют основания полагать, что глюкокортикоиды при различных отравлениях способны вызывать иммуносупрессивные эффекты [Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., 1998, 2002; Tiefenbach B. et al., 1985; Dhabhar F.S. et al., 1996; Stephen B.P. et al., 2003].

Процессы перекисного окисления липидов до сих пор привлекают внимание многих исследователей и интенсивно изучаются при отравлениях ксенобиотиками [Абдрашидова Н.Ф., Романов Ю.А., 2001; Бурмистров С.О. и соавт., 2002] и самых различных патологических состояниях [Лукьянова

Л.Д. и соавт., 2001; Зарубина И.В., Миронова О.П., 2002; Плужников Н.Н. и соавт., 2003]. Существуют доказательства тесной взаимосвязи ПОЛ с формированием постинтоксикационного иммунодефицитного состояния [Забродский П.Ф., 1998, 2002, 2007].

При определении концентрации кортикостерона (КС) в плазме крови крыс при остром отравлении ТХМ установлено (рис. 5.1.) существенное увеличение его концентрации через 1-12 ч. При этом максимальное увеличение концентрации гормона отмечалось через 1 ч. Так, концентрация КС в плазме крови через 1, 6, 12 ч увеличивалась соответственно в 9,35; 3,69 и 2,23 раза ($p < 0,05$).

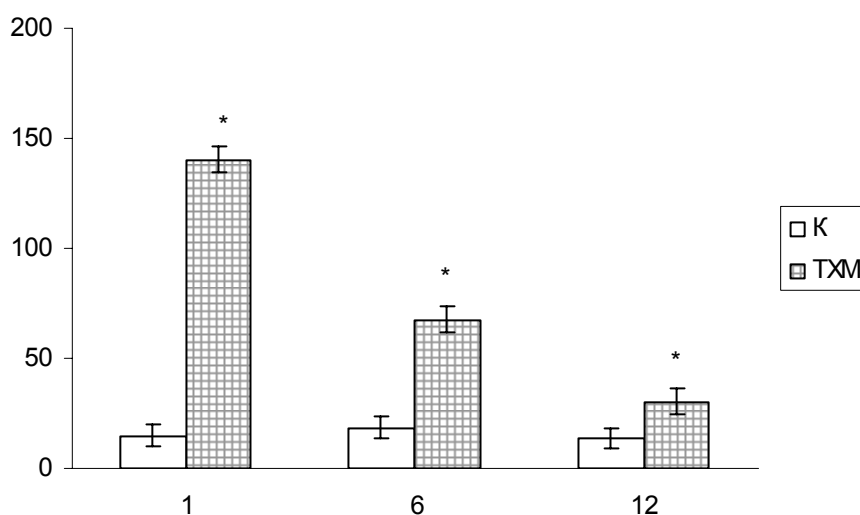


Рис. 5.1. Изменение концентрации кортикостерона в плазме крови крыс при остром отравлении ТХМ в дозе 0,75 LD₅₀, нг/мл ($M \pm m$)

По оси абсцисс: сутки после интоксикации; по оси ординат: концентрация кортикостерона в плазме крови крыс, нг/мл; К – контроль (n = 10); в каждой серии использовалось 9-11 крыс; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Через 24 ч концентрация кортикостерона при действии ТХМ существенно не отличалась от контрольного значения.

Наши эксперименты позволили установить (табл. 5.3), что под влиянием двукратного введения кортикостерона в дозах 3,0 и 1,5 мг/кг соответственно с интервалом 6 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 $150,4 \pm 7,5$

Таблица 5.3

Влияние кортикостерона в дозах 3,0 и 1,5 мг/кг соответственно с интервалом 6 ч) на показатели системы иммунитета у крыс

Показатели	Контроль	Действие КС
АОК к ЭБ, 10^3	$37,4 \pm 3,2$	$25,6 \pm 2,0^*$
АОК к Vi-Ag, 10^3	$25,0 \pm 2,1$	$19,2 \pm 1,7^*$
Реакция ГЗТ, %	$33,5 \pm 2,6$	$24,8 \pm 2,4^*$
ЕЦ, %	$32,7 \pm 3,5$	$20,0 \pm 1,7^{**}$
АЗКЦ, %	$14,3 \pm 1,4$	$8,3 \pm 0,8^*$

Примечание: ЕЦ и АЗКЦ определяли соответственно через 1 и 5 сут; в каждой серии опытов использовалось 6-7 животных; *- различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

нг/мл ($n=5$) (контроль составлял $16,7 \pm 4,0$ нг/мл), а через 6 ч – до $60,3 \pm 4,5$ нг/мл (контроль $20,1 \pm 5,0$ нг/мл). Данные концентрации в целом соответствовали содержанию кортикостерона в плазме крови после острой интоксикации ТХМ в дозе $0,75 \text{ DL}_{50}$.

Снижение 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 КС в дозах 3,0 и 1,5 мг/кг, которые вводили с интервалом 6 ч, составило по сравнению с контролем соответственно в 1,46; 1,30; 1,35; 1,64 и 1,72 ($p < 0,05$).

При вычислении коэффициента корреляции между концентрацией кортикостерона в крови через 1 ч и АОК к ЭБ (см. раздел 4.2.2) при остром отравлении крыс ТХМ установлено, что он составляет $-0,705$ ($p < 0,05$). Коэффициент корреляции при остром отравлении ТХМ между концентрацией кортикостерона в крови через 1 ч и реакцией ГЗТ (см. раздел 4.4.1) составляет $-0,701$ ($p < 0,05$).

Проведенные опыты доказывают существенную роль кортикостерона в супрессии основных иммунных реакций при остром отравлении ТХМ.

Нами установлено, что острое отравление ТХМ вызывало инициацию ПОЛ (табл. 5.4). Это характеризовалось уменьшением под влиянием ТХМ активности каталазы и пероксидазы, характеризующих антиоксидантную систему, соответственно в 1,95 и 1,98 раза ($p < 0,05$). Основным продуктом ПОЛ малоновый диальдегид при остром отравлении ТХМ существенно повышался в 1,51 раза ($p < 0,05$), а суммарная продукция радикалов - в 3,44 раза ($p < 0,05$). Изменения показателей ПОЛ в крови отражают процесс свободнорадикального окисления липидов как всех клеток организма, так и органов системы иммунитета и, в частности, лимфоцитов [Арчаков А.И., 1993]. Активация ПОЛ под влиянием ТХМ может являться одним из механизмов, приводящим к формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Таблица 5.4

Действие острой интоксикации ТХМ ($0,75 \text{ ЛД}_{50}$) на показатели перекисного окисления липидов у крыс через 3 сут ($M \pm m$)

Группы	Суммарная продукция радикалов, усл. ед.	Каталаза, ммоль/мин/л	Пероксидаза, мкмоль/мин/л	Малоновый диальдегид, нмоль/мл
Контроль	$20,4 \pm 5,9$	$264,5 \pm 27,5$	$39,7 \pm 3,9$	$6,54 \pm 0,51$
Тетрахлорметан	$70,2 \pm 9,0^*$	$135,7 \pm 20,7^*$	$20,1 \pm 2,0^*$	$9,89 \pm 0,64^*$

Примечание: в каждой серии использовалось от 9 до 12 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Повреждающий эффект ПОЛ в отношении иммунокомпетентных клеток при действии ТХМ может быть обусловлен действием продуктов распада гидроперекисей фосфолипидов, взаимодействующих со свободными аминогруппами мембранных белков иммуноцитов, образуя межмолекулярные сшивки и инактивируя эти белки. Кроме того, активация ПОЛ вызывает окисление сульфгидрильных групп иммуноцитов до

сульфонов. Это приводит к инактивации мембраносвязанных ферментов и увеличению проницаемости мембран иммунокомпетентных клеток [Зарубина И.В., Миронова О.П., 2002; Плужников Н.Н. и соавт., 2003].

Инициация ПОЛ ТХМ, возможно, реализуется в результате активации ПОЛ метаболитами токсиканта свободными радикалами (CCl_3^+ ; O-O-CCl_2 ; HO-OCCCl_2 ; HO-CCl_2) в сочетании с высокой концентрацией кортикостероидов, обусловленной эффектом стресс-реакции на действие яда.

При вычислении коэффициентов корреляции между числом АОК к ЭБ при остром отравлении ТХМ и содержанием каталазы и пероксидазы в крови крыс установлено, что они составляли соответственно 0,741 ($p < 0,05$) и 0,753 ($p < 0,05$). Коэффициент корреляции при остром отравлении ТХМ между числом АОК к ЭБ и содержанием малонового диальдегида в крови составлял -0,697 ($p < 0,05$). Значение r между реакцией ГЗТ при остром действии ТХМ и активностью пероксидазы было равно 0,701 ($p < 0,05$). Коэффициент корреляции между содержанием МДА в крови и реакцией ГЗТ при действии ТХМ составил -0,696 ($p < 0,05$).

Таким образом, увеличение концентрации кортикостерона и инициация ПОЛ при острой интоксикации ТХМ являются факторами, способствующими формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

5.3. Оценка действия тетрахлорметана на активность ацетилхолинэстеразы Т-клеток

Роль ацетилхолинэстеразы на поверхности Т-лимфоцитов [Kutty K. M. et al., 1976; Szelenyi J.G. et al., 1982] до сих пор не ясна. Возможно, она регулирует влияние ацетилхолина на холинореактивные структуры Т-лимфоцитов [Забродский П.Ф. и соавт., 2001; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1989]. Данные литературы позволяют предполагать, что иммунотоксичность может быть обусловлена ингибированием эстеразы Т-клеток [Хейхоу Ф. Г.

Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П.Ф. и соавт., 2001; Newcombe D.S., 1991]. Можно полагать, что ТХМ и его метаболиты способны снижать активность эстераз в Т-лимфоцитах.

Проведенные нами опыты показали (рис. 5.2), что под влиянием ТХМ активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в Т- лимфоцитах тимуса и селезенки у крыс через 4 сут снижается соответственно в 1,44 и 1,46 раза ($p < 0,05$).

Данные литературы свидетельствуют, что инактивация эстераз в моноцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, интактных и активированных лимфокинами ЕКК ксенобиотиками ослабляет эффекторные функции Т-клеток. Развитие лимфомы часто связано с присутствием вируса Эпштейна-Барра и человеческого герпесвируса-6, иммунитет к которым зависит от функции моноцитов, Т-лимфоцитов и ЕКК. Инактивация активности эстераз иммунокомпетентных клеток, вызываемая токсикантами, подавляет иммунитет к герпесвирусам, способствующим развитию лимфом [Newcombe D.S., 1991]. Учитывая изложенное предположение, можно считать, что ТХМ, обладающий антихолинэстеразным эффектом, может вызывать лимфомы вследствие его способности ингибировать эстеразы Т-клеток.

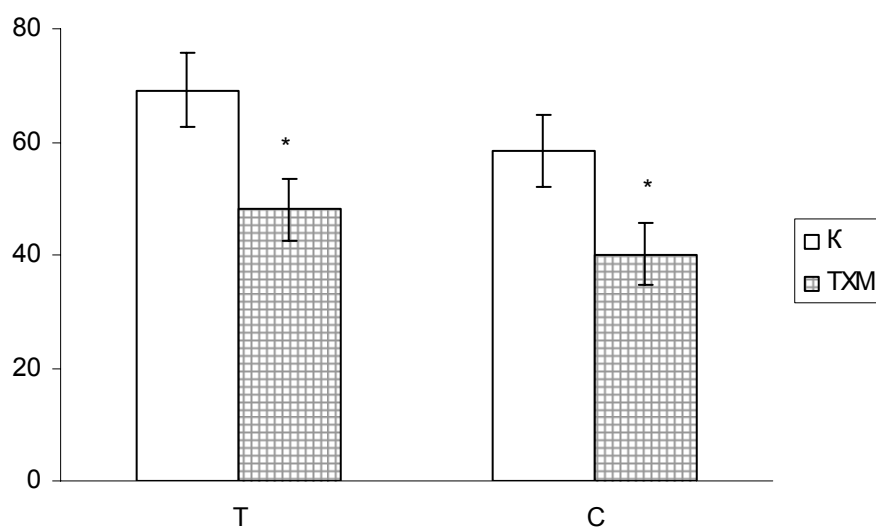


Рис.5.2. Влияние острого отравления ТХМ ($0,75 \text{ LD}_{50}$) на активность ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах тимуса и селезенки у крыс ($\text{мЕд}/10^9$) через 4 сут ($M \pm m$)

По оси абсцисс: Т и С соответственно, тимус и селезенка; по оси ординат: активность ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах, $\text{мЕд}/10^9$; К – контроль; в каждой серии использовалось от 6 до 7 крыс; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Коэффициент корреляции между активностью ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса крыс и АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ при остром отравлении крыс ТХМ составляли соответственно 0,715 ($p < 0,05$) и 0,707 ($p < 0,05$).

Таким образом, острое отравление ТХМ в дозе $0,75 \text{ LD}_{50}$ вызывает существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса и селезенки, которое прямо связано с редукцией иммунных реакций.

Резюме

Подострое действие тетрахлорметана существенно снижает концентрацию в крови цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4), уменьшает соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 по сравнению с контролем. ТХМ вызывает большее поражение Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами.

Увеличение концентрации кортикостерона и инициация ПОЛ при острой интоксикации ТХМ являются факторами, способствующими формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Острое отравление ТХМ в дозе $0,75 \text{ LD}_{50}$ вызывает существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса и селезенки, которое прямо связано с редукцией иммунных реакций.

ГЛАВА 6

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ТЕТРАХЛОРМЕТАНОМ

6.1. Влияние антидотов, индукторов и ингибиторов Р-450-зависимых монооксигеназ при отравлении тетрахлорметаном на фагоцитарно- метаболическую активность нейтрофилов и параметры системы иммунитета

Нами в экспериментах на крысах (табл. 6.1) после острой интоксикации ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀ применялись средства специфической терапии (антидоты: токоферола ацетат и унитиол). Унитиол вводили крысам внутримышечно: в первые сутки – 15 мг/кг 3 раза с интервалом 6 ч, во вторые сутки – по 15 мг/кг 2 раза с интервалом 8 ч; в последующие 3 сут - по 15 мг/кг 2 раза в сут.

Таблица 6.1

Влияние токоферола ацетата на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов, гуморальные и клеточные иммунные реакции крыс при остром отравлении ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀ (M \pm m)

Группы	ФМАН, иан	АОК к ЭБ, 10 ³	Функция Th1- клеток, %	Активность ЕКК (ЕЦ), %
Контроль	0,43 \pm 0,02	39,3 \pm 2,9	37,5 \pm 2,5	34,5 \pm 3,2
ТХМ	0,18 \pm 0,02*	18,0 \pm 2,0*	20,8 \pm 2,0*	12,0 \pm 2,3*
ТХМ+ТФА	0,26 \pm 0,03**	25,2 \pm 2,2**	24,3 \pm 2,1*	16,7 \pm 2,5*
ТХМ+унитиол	0,29 \pm 0,04**	26,1 \pm 2,3**	25,0 \pm 2,3*	18,3 \pm 2,4*
ТХМ+ ТФА+унитиол	0,33 \pm 0,03**	30,3 \pm 2,4**	27,5 \pm 2,4**	20,0 \pm 3,3**

Примечание: ТФА – токоферола ацетат; в каждой серии использовалось от 8 до 10 крыс; * - p<0,05 по сравнению с контролем; ** - p<0,05 по сравнению с контролем и показателем после интоксикации ТХМ без применения антидотов.

Токоферола ацетат вводили крысам внутримышечно по 2 мл 30% раствора 4 раза в сутки в течение 4-х дней. Первую дозу антидотного средства животные получали через 10 мин после введения ТХМ. При этом на 5 сут после отравления исследовались наиболее поражаемые факторы доиммунной защиты организма и системы иммунитета после отравления ТХМ (ФМАН, оцениваемая по индексу активности нейтрофилов в спонтанном НСТ-тесте, гуморальный иммунный ответ - АОК к ЭБ, клеточный иммунный ответ - функция Th1-клеток, активность ЕКК).

Установлено, что токоферола ацетат и унитиол, а также их комбинация при острой интоксикации ТХМ частично восстанавливали ФМАН, гуморальные и клеточные иммунные реакции (показатели системы иммунитета после применения средств специфической терапии оставались ниже, чем в контроле). Так, токоферола ацетат и унитиол увеличивали гуморальный иммунный ответ (АОК к ЭБ) по сравнению с показателями после интоксикации ТХМ соответственно в 1,40 и 1,45 раза ($p < 0,05$), а комбинация токоферола ацетата и унитиола увеличивала ФМАН, гуморального иммунного ответа к тимусзависимому (ЭБ) антигену, активности Th1-клеток и ЕКК - соответственно в 1,83; 1,67; 1,32 и 1,66 раза ($p < 0,05$).

Таким образом, унитиол, токоферола ацетат и их комбинация при использовании их в качестве антидотов при остром отравлении ТХМ частично снижает вызванную им редукцию ФМАН, тимусзависимого гуморального иммунного ответа, активности Th1-лимфоцитов и ЕКК.

Одним из способов терапии отравлений ксенобиотиками, в частности, фосфорорганическими соединениями, является использование индукции цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ барбитуратами, зиксорином и другими средствами [Каган Ю.С. и соавт., 1983; Забродский П.Ф. 1993]. Монооксигеназная система – (система цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ) тесно связана с иммунологическими механизмами в системе

поддержания химического гомеостаза [Саприн А.Н. и соавт., 1982; Забродский П.Ф., 1998]. Ферменты МС содержатся в основном в печени, кроме того, в меньших количествах они находятся и в других тканях (лимфоидных органах, почках, коже). Барбитураты и другие соединения, индуцируя энзимную активность МС, увеличивают ее способность осуществлять биотрансформацию ксенобиотиков в десятки раз [Козлов В.А. и соавт., 1991]. В лимфоидной ткани животных и человека идентифицированы следующие формы цитохрома Р-450: Р-450РВ-1, Р-450РВ-4, Р-450МС-1 α , Р-450МС-1 β , а также бензпиренгидроксилаза, этоксирезорифин-О-деэтилаза, аминопирин-н-деметилаза [Козлов В.А. и соавт., 1991].

Данные литературы свидетельствуют о том, что под влиянием индукторов МС токсичные химические вещества могут оказывать как иммуносупрессивное, так и иммуностимулирующее действие [Саприн А.Н. и соавт., 1982; Забродский П.Ф., 1998]. Возможно, индукция ксенобиотиками системы цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ может, как усиливать реализацию иммунотоксических эффектов токсикантов, образующих высокотоксичные продукты биотрансформации («летальный синтез»), так и снижать ее при детоксикации МС большинства химических соединений.

Известно, что ТХМ метаболизируется цитохром-Р-450-зависимыми монооксигеназами [Weber L.W. et al., 2003]. Нами исследовалось влияние индуктора Р-450-зависимых монооксигеназ фенобарбитала [Каган Ю.С. и соавт., 1983] на иммунотоксичность ТХМ. В течение трех суток до острой интоксикации метанолом в дозе 1,0 ЛД₅₀ крысам внутрижелудочно вводили фенобарбитал в дозе 50 мг/кг. Кроме того, использовалось соединение 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирин в растворе оливкового масла в дозе 0,8 мг/кг в течение 3 сут до введения токсиканта. У данного вещества предполагалось наличие способности индуцировать цитохром-Р-450-зависимыми монооксигеназы

Применение фенобарбитала приводило (табл. 6.2) к снижению ФМАН, гуморального иммунного ответа к тимусзависимому антигену, активности Th1-лимфоцитов и ЕКК соответственно в 1,50; 1,35; 1,34 и 1,17 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателем после интоксикации ТХМ. Аналогичное действие оказывал и 2,4,6-трифенил-4Н-селенопиран.

Таблица 6.2

Влияние фенобарбитала и 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов, гуморальные и клеточные иммунные реакции крыс при остром отравлении ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀ ($M \pm m$)

Группы	ФМАН, иан	АОК к ЭБ, 10 ³	Функция Th1- клеток, %	Активность ЕКК (ЕЦ), %
Контроль	0,43±0,02	39,3±2,9	37,5 ± 2,5	34,5±3,2
ТХМ	0,18±0,02*	19,0±2,0*	22,1±2,2*	12,0±2,3*
ТХМ+ФБ	0,12±0,03*	14,1±1,5*	16,5±1,5**	10,3±1,5*
ТХМ+ ТФСП	0,11±0,04*	13,0±1,2**	14,6±1,4**	11,4±1,6*

Примечание: ФБ – фенобарбитал; ТФСП - 2,4,6-трифенил-4Н-селенопиран; в каждой серии использовалось от 8 до 10 крыс; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p < 0,05$ по сравнению с контролем и показателем после интоксикации ТХМ без применения ФБ и ТФСП.

Данные литературы [Каган Ю.С. и соавт., 1983; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Козлов В.А. и соавт., 1991] позволяют полагать, что увеличение редукции показателей системы иммунитета под влиянием фенобарбитала и 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана при отравлении ТХМ обусловлено действием на молекулы мембран, цитозоля, органелл иммунокомпетентных клеток и продукцию лимфокинов, регулирующих их функцию, высокотоксичных продуктов биотрансформации ТХМ, которая под влиянием индукторов цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ существенно усиливается.

Полученные данные свидетельствуют о том, что редукция параметров иммунного статуса под влиянием ферментиндуцирующих средств (индукторов Р-450-зависимых монооксигеназ) фенобарбитала и 2,4,6-

трифенил-4Н-селенопирана после острой интоксикации ТХМ, метаболизирующегося до более токсичных соединений (феномен «летального синтеза»), более выражена, чем при изолированном действии ТХМ.

6.2. Исследование действия ингибитора Р-450-зависимых монооксигеназ 2-диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетата (SKF-525A) при остром отравлении тетрахлорметана на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и иммунный ответ

Влияние ингибиторов цитохрома Р-450 на иммунотоксические свойства токсикантов, метаболизирующихся в организме монооксигеназной системой до высокотоксичных соединений, в частности, на ТХМ, в настоящее время не исследовано [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. К числу обратимых и необратимых ингибиторов цитохрома Р-450 относятся многочисленные соединения различной химической природы (эфир, спирты, фенолы, производные бензола, гидразины, SKF-525A, полигалогенизированные алканы, ингибиторы белкового синтеза и др.) [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

Существуют основания предполагать, что обратимый ингибитор цитохрома Р-450 2-диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетат (SKF-525A), при последующем действии на организм ТХМ, образующего высокотоксичные метаболиты (свободные радикалы - CCl_3^+ ; O-O-CCl ; HO-OCCCl_3 ; HO-CCl_3), под влиянием монооксигеназной системой может снижать его иммунотоксические эффекты.

После острого отравления ТХМ в дозе 1,0 DL_{50} отмечалась (табл. 6.3) существенная редукция ФМАН, гуморального иммунного ответа к тимусзависимому антигену, активности Th1-клеток и ЕКК соответственно в 2,39; 2,07; 1,24; и 2,89 раза ($p < 0,05$). После использования SKF-525A внутриперитонеально в дозе 50 мг/кг за 1 сут до введения ТХМ

иммуносупрессивные эффекты токсиканта статистически значимо уменьшались ($p < 0,05$). Так, острое отравление ТХМ после введения SKF-525A приводило к увеличению ФМАН, гуморального иммунного ответа к тимусзависимому антигену, активности Th1-клеток и ЕКК по сравнению с показателями после действия токсиканта соответственно в 1,61; 1,38; 1,30; 2,13 раза ($p < 0,05$). При этом все показатели оставались существенно ниже, чем в контроле ($p < 0,05$). Препарат SKF-525A на исследованные показатели системы иммунитета существенного влияния не оказывал.

Таблица 6.3

Влияние SKF-525A при остром отравлении ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀ на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и показатели системы иммунитета у крыс (M \pm m)

Группы	ФМАН, иан	АОК к ЭБ, 10 ³	Функция Th1-клеток, %	Активность ЕКК (ЕЦ), %
Контроль	0,43 \pm 0,02	39,3 \pm 2,9	37,5 \pm 2,5	34,5 \pm 3,2
SKF-525A	0,40 \pm 0,03	37,5 \pm 1,7	34,3 \pm 2,3	30,3 \pm 3,0
ТХМ	0,18 \pm 0,02*	19,0 \pm 2,0*	22,1 \pm 2,2*	12,0 \pm 2,3*
ТХМ+ SKF-525A	0,29 \pm 0,03**	26,2 \pm 2,1**	28,7 \pm 2,0**	25,6 \pm 2,4**

Примечание: ФБ – фенобарбитал; ТФСП - 2,4,6-трифенил-4Н-селенопиран; в каждой серии использовалось от 8 до 10 крыс; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p < 0,05$ по сравнению с контролем и показателем после интоксикации ТХМ без применения SKF-525A.

Данные литературы позволяют считать, что биотрансформация ТХМ может происходить не только в печени, но и в лимфоцитах. Так, доказано, что витамин А, левамизол, фенобарбитал и другие вещества способны индуцировать цитохром-Р-450 в Т-лимфоцитах, ЕКК и повышать их активность [Саприн А.Н. и соавт., 1982].

Ингибирование SKF-525A монооксигеназной системы печени и лимфоидной ткани, значительно снижая биотрансформацию ТХМ, вероятно, уменьшает образование его высокотоксичных свободных радикалов - CCl_3^+ ; $O-O-CCl$; $HO-OCCCl_3$; $HO-CCl_3$ метаболитов.

Таким образом, использование ингибитора цитохрома Р-450 препарата SKF-525А (диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетата) до острого отравления белых крыс ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀, метаболизирующегося в организме до соединений с более высокой токсичностью (феномен «летального синтеза»), вызывает частичную редукцию иммунотоксических свойств ТХМ.

6.3. Обоснование иммунокоррекции нарушений физиологической регуляции иммунного гомеостаза после острого отравления тетрахлометаном

Полученные нами результаты исследования свидетельствуют о том, что для снижения иммунотоксических эффектов ТХМ могут быть использованы унитиол, токоферола ацетат и их комбинация, а также, ингибитор цитохрома Р-450 препарат SKF-525А (диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетат). Следует отметить, что унитиол и токоферол ацетат являются обязательными для использования при оказании медицинской помощи отравленным ТХМ [Лужников Е.А. и Костомарова Л.Г., 2000]. Исследованные нами иммуотропные эффекты препарата SKF-525А (диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетата) при отравлении ТХМ представляют в настоящее время только теоретическое значение, так как данное соединение в Российской Федерации для лечения отравлений ТХМ не используется в связи с недостаточной изученностью его побочных эффектов и противопоказаний.

Учитывая то, что унитиол, токоферола ацетат и их комбинация полностью не восстанавливают сниженные ТХМ показатели доиммунной защиты организма, гуморальные и клеточные иммунные реакции, вполне оправдано применение иммуностимуляторов последнего поколения для восстановления показателей системы иммунитета.

Для обоснования коррекции нарушений регуляции иммуногенеза при острой интоксикации ТХМ в условиях применения средств специфической терапии унитиола и токоферола ацетата необходимо кратко рассмотреть широко используемые в настоящее время для профилактики и лечения вторичных иммунодефицитных состояний иммуностимуляторы [Германчук В.Г., 2000; Беликов В.Г., 2001; Молотков А.О., 2002; Василенко О.А., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Нестерова И.В., 2005].

По основным функциональным признакам иммуностимуляторы подразделяются на препараты, стимулирующие преимущественно доиммунные факторы защиты организма (продигиозан, метилурацил, пентоксил, нуклеинат натрия), клеточный иммунитет (тималин, Т-активин, тимоптин, тимоген, молграмостин, леакадин) [Ройт А. и соавт., 2000; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Georgiev V.St. et al; 1993], В-систему иммунитета (миелопид, спленин), а также оказывающие влияние практически на все звенья иммунного ответа и доиммунные механизмы защиты (имунофан, полиоксидоний) [Виноградов В.М. и соавт., 1986; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Данная классификация не является общепринятой. К современным препаратам, восстанавливающим функционирование фагоцитов, ЕКК и дефекты гуморального иммунитета относят ликолипид и полиоксидоний, восстанавливающим гуморальный иммунитет – миелопид, а функционирование Т-клеточного звена – Т-активин (тактивин), тимоген, имунофан, бестим и т.д. [Нестерова И.В., 2005].

По происхождению иммуностимуляторы подразделяются на продукты жизнедеятельности микроорганизмов, растений и животных (полисахариды, фосфолипиды мембран, гликопептиды, модифицированные токсины, ДНК и РНК микроорганизмов, вакцины и др.) [Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Чекнёв С.Б., Бабаева Е.Е., 2004; Медуницин Н.В., 2005; Хабибуллаев Б.Б., 2005], пептидные эндогенные стимуляторы иммунитета (препараты тимуса, селезенки, костного мозга, интерлейкины, интерфероны

и др.) [Нестерова И.В., 2005; Петров Р.В. и соавт., 2005; Chen J.Y. et al., 2007], синтетические стимуляторы иммунитета (левамизол, леакадин, тимоген) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Singh N., Perfect J.R., 2007], стимуляторы метаболических процессов [экстраиммунная терапия] (анаболические гормоны, рибоксил, плазмол, витамины и др.) [Зарубина И.В., Миронова О.П., 2001; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

В настоящее время число существующих средств коррекции нарушений системы иммунитета включает несколько сотен соединений, однако широко используются лишь несколько десятков из них. Необходимо учитывать, что практически все иммуностимуляторы имеют те или иные нежелательные побочные эффекты. При применении полиоксидония и имунофана они не выявлены [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

При острых и хронических отравлениях ТХМ (как и другими токсикантами) необходимо руководствоваться поставленным иммунологическим диагнозом, то есть характером нарушения комплекса показателей механизмов доиммунной защиты и системы иммунитета. При этом иммунотерапия проводится на фоне мониторингирования иммунного статуса, при необходимости проводится не только моно-, но и комбинированная иммуномодулирующая терапия [Ширинский В.С., Жук Е.А., 1994; Нестерова И.В., 2005].

Полученные нами данные, а также изучение иммуностимулирующих характеристик различных препаратов тимогена, Т-активина, миелопида, имунофана, полиоксидония и др. [Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003; Елизарова Н.Л. и соавт., 2005; Василенко О.А., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Нестерова И.В., 2005; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005; Забродский П.Ф. и соавт., 2005; 2007; Singh N., Perfect J.R., 2007] позволяют считать наиболее приемлемыми для коррекции

постинтоксикационных нарушений, вызванных ТХМ, имунофан и полиоксидоний.

Исследованиями последних лет показано, что имунофан (аргинил-альфа-аспартил-лизил-тирозил-аргинин) – гексапептид с молекулярной массой 836 Да. Препарат относится к синтетическим иммуностимуляторам, обладает иммунорегулирующим, детоксикационным, гепатопротективным действием и вызывает инактивацию свободнорадикальных процессов ПОЛ [Лебедев В.В., 1999; Лебедев В.В., Покровский В.И., 1999; Лебедев В.В. и соавт., 2000]. Имунофан способен оказывать не только иммуностимулирующее влияние на все звенья системы иммунитета, но и обеспечивать детоксицирующий, гепатопротективный и антиоксидантный эффекты. Фармакологическое действие пептидного иммунооксидредуктанта основано на достижении коррекции иммунной и окислительно-антиокислительной систем организма. Действие препарата начинает развиваться в течение 2-3 часов (быстрая фаза) и продолжается до 4 мес (средняя и медленная фазы).

В течение быстрой фазы (продолжительность до 2-3 суток) прежде всего, проявляется детоксикационный эффект – усиливается антиоксидантная защита организма путем стимуляции продукции церулоплазмина, лактоферрина, активности каталазы. Препарат нормализует перекисное окисление липидов, ингибирует распад фосфолипидов клеточной мембраны и синтез арахидоновой кислоты с последующим снижением уровня холестерина крови и продукции медиаторов воспаления. При токсическом и инфекционном поражении печени имунофан предотвращает цитолиз, снижает активность трансаминаз и уровень билирубина в сыворотке крови [Караулов А.В., 2000а, 2000б; Константинов Б.А. и соавт., 2000; Лебедев В.В. и соавт., 2000].

Под влиянием имунофана происходит усиление реакций фагоцитоза и гибели внутриклеточных бактерий и вирусов, восстановление нарушенных показателей клеточного и гуморального иммунитета, увеличение продукции

иммуноглобулинов [Лебедев В.В. и соавт., 2000; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003].

Влияние препарата на продукцию специфических противовирусных и антибактериальных антител эквивалентно действию некоторых лечебных вакцин. В отличие от последних препарат не оказывает существенного влияния на продукцию реактиновых антител класса IgE и не усиливает реакцию гиперчувствительности немедленного типа [Лебедев В.В., 1999; Лебедев В.В., Покровский В.И., 1999].

В связи с установленным нами поражением различных элементов системы иммунитета, нарушением его разнообразных реакций, популяций лимфоцитов под влиянием ТХМ имунофан, возможно, может являться препаратом выбора при остром отравлении ТХМ.. Антиоксидантное действие имунофана предотвращает повреждение ДНК лимфоцитов и гранулоцитов, вызванное химическими факторами окружающей среды (токсикантами) [Караулов А.В. и соавт., 2005].

Полиоксидоний - это физиологически активное соединение с молекулярной массой 100 кДа, обладающее выраженной иммуномодулирующей активностью. По своей химической структуре он является сополимером N-окиси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиния бромидом с молекулярной массой 80 кДа [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Он является иммуномодулятором последнего поколения, обладает иммуностимулирующими, детоксикационными, антиоксидантными, мембраностабилизирующими эффектами и свойствами гепатопротектора [Ратькин А.В. и соавт., 2005; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005]. При совместном введении полиоксидония и CuSO_4 происходит 100%-ная защита животных от действия ядовитого сульфата меди при 100%-ной гибели их в контроле [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005]. Полиоксидоний оказывает активирующее действие на неспецифическую резистентность организма, фагоцитоз, гуморальный и клеточный иммунитет, действует на

все звенья иммунного ответа, а также обладает способностью активировать ЕКК. Повышает функцию ЕКК полиоксидоний только в том случае, если она была исходно понижена. На нормальные уровни цитотоксичности лимфоцитов он влияния не оказывает [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Dyakonova V.A. et al., 2004].

Одним из главных биологических свойств полиоксидония является его способность стимулировать антиинфекционную резистентность организма. Предварительное его введение за 48, 72 и 96 ч может существенно повысить устойчивость животных к заражению несколькими летальными дозами патогенного микроорганизма *S. typhimurium*, вероятно, в связи с его способностью существенно повышать функциональную активность клеток фагоцитарной системы. Полиоксидоний в 1,5-2 раза усиливает способность фагоцитов периферической крови нормальных доноров убивать *S. aureus* и это усиление носит дозозависимый характер. Препарат обладает способностью активировать кислородонезависимые механизмы бактерицидности лейкоцитов. Полиоксидоний подавляет образование внеклеточных, но стимулирует образование внутриклеточных активных форм кислорода, от которых, как отмечалось, зависит гибель бактерии в клетке. Ингибицию образования внеклеточных активных форм кислорода лейкоцитами можно рассматривать как положительный эффект этого иммуномодулятора, так как их избыточное образование лежит в основе повреждающего действия активированных нейтрофилов на различные ткани и органы. Полиоксидоний в определенных дозах обладает способностью стимулировать как спонтанный, так и индуцированный синтез цитокинов, продуцируемых в основном клетками моноцитарно-макрофагальной системы и нейтрофилами: IL-1 β , IL-6, фактора некроза опухоли- α (TNF α), которые являются основными активаторами функциональной активности фагоцитарных клеток [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Dyakonova V.A. et al., 2004]. При этом он ведет себя как истинный иммуномодулирующий препарат, то есть усиливает

образование TNF только у лиц с исходно пониженным или средним уровнем синтеза цитокина и не оказывает влияния или даже несколько понижает продукцию у лиц с исходно повышенным его синтезом. Вероятно, способность ПО индуцировать образование и провоспалительных (IL-1 и TNF), и противовоспалительных цитокинов (IL-6) лежит в основе его иммуномодулирующего эффекта. В условиях *in vivo* ПО обладает выраженной способностью стимулировать гуморальный иммунный ответ. При введении совместно с низкими дозами антигена препарат усиливает антителообразование в 5-10 раз по сравнению с животными, получавшими только один антиген. Важно отметить, что такое усиление можно наблюдать у старых мышей, у которых иммунный ответ по сравнению с молодыми животными существенно снижен [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

Возможность коррекции иммунного гомеостаза полиоксидонием после острых интоксикаций практически не исследована. Предположительно эффективность данного иммуномодулятора для восстановления показателей иммунного статуса при отравлении ТХМ можно оценить как очень высокую.

Таким образом, имунофан и полиоксидоний могут быть использованы для восстановления доиммунных механизмов защиты, клеточного и гуморального иммунного ответа после отравления ТХМ с целью профилактики инфекционных осложнений и заболеваний.

6.4. Влияние имунофана и полиоксидония на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и показатели иммунного ответа при острой интоксикации тетрахлорметаном с применением антидотов

При изучении иммуностимулирующих свойств имунофана и полиоксидония в опытах на крысах после острого отравления ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀ в условиях применения комбинации токоферола ацетатата и унитиола

установлено (табл. 6.4), что (как уже указывалось в разделе 6.1) комбинация ТФА и унитиола увеличивала ФМАН, гуморального иммунного ответа к тимусзависимому (ЭБ) антигену, активности Th1-клеток и ЕКК по сравнению с показателями после интоксикации ТХМ соответственно в 1,83; 1,67; 1,32 и 1,66 раза ($p<0,05$). Кроме того, при введении при остром отравлении ТФА и унитиола, имунофана, полиоксидония, комбинации ТФА, унитиола и имунофана, комбинации токоферола ацетатата, унитиола и полиоксидония летальность белых крыс снижалась соответственно на 30 ($p<0,05$), 10 ($p>0,05$), 15 ($p>0,05$), 35 ($p<0,05$), 40% ($p<0,05$).

Таблица 6.4

Действие имунофана и полиоксидония на летальность животных, ФМАН и показатели иммунного ответа при остром отравлении ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀ при применении средств специфической терапии (М±m)

Серии опытов	Летальность, % (n=20)	ФМАН, иан	АОК к ЭБ, $\times 10^3$	Актив- ность Th1- клеток, %	Актив- ность ЕКК (ЕЦ), %
Контроль	0	0,43±0,02	39,3±2,9	37,5±2,5	34,5±3,2
ТХМ	55±11,1	0,18±0,02*	18,0±2,0*	20,8±2,0*	12,0±2,3*
ТХМ+ ТФА + унитиол	25±9,7*	0,33±0,03°	30,3±2,4°	27,5±2,4°	20,0±3,3°
ТХМ+ имунофан	45±11,1	0,33±0,02°	29,7±2,1°	27,4±2,1°	23,5±2,0°
ТХМ+ ПО	40±10,9	0,44±0,02	31,4±2,2°	30,6±2,0°	26,3±2,1°
ТХМ+ ТФА + унитиол+ имунофан	20±8,9°	0,40±0,03	37,5±3,1	39,4±2,7	35,0±3,4
ТХМ+ ТФА + унитиол+ ПО	15±8,0°	0,45±0,03	40,8±3,3	41,0±2,9	37,4±3,3

Примечание: ТФА – токоферола ацетат; ПО – полиоксидоний; в скобках – число крыс; в каждой группе использовалось 8-10 крыс; * - $p<0,05$ по сравнению с контролем; ° - $p<0,05$ по сравнению с контролем и показателем после интоксикации ТХМ (летальность – χ^2).

Применение имунофана приводило к увеличению данных показателей соответственно в 1,83; 1,65; 1,32 и 1,96 раза ($p < 0,05$), а полиоксидония - 2,44; 1,74; 1,47 и 2,19 раза ($p < 0,05$). Использование комбинации ТФА, унитиола и имунофана (в дозе 20 мкг/кг при ежедневном однократном введении в течение 4 сут), а также ТФА, унитиола и полиоксидония (в дозе 700 мкг/кг однократно, ежедневно в течение 4 сут) полностью восстанавливало ФМАН, гуморальный иммунный ответ, формирование ГЗТ (активности Th1-клеток) и активность ЕКК до контрольных уровней, а также существенно снижало летальность крыс. Следует отметить, что и полиоксидоний также (без применения антидотов ТХМ) полностью восстанавливал ФМАН.

В целом эффективность полиоксидония несущественно превышала стимулирующий эффект имунофана. Так, в среднем имунофан увеличивал исследованные показатели в 1,69 раза по сравнению с параметрами при интоксикации ТХМ, а полиоксидоний – в 1,85 раза.

При тимусзависимом антителообразовании действие имунофана и полиоксидония, вероятно, реализуется путем активации процесса кооперации макрофагов, Т-клеток и В-лимфоцитов, антителопродуцирующих В-клеток, функции Th1-лимфоцитов, секретирующих γ -интерферон, β -фактор некроза опухоли (лимфотоксин), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, и Th2-клеток, продуцирующих ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор [Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Доказанная нами возможность восстановления имунофаном и полиоксидонием основных показателей доиммунной защиты организма от инфекций, гуморального и клеточного иммунитета дает основания предполагать, что механизм их действия может быть связан с неспецифической стимуляцией функций клеток организма, способных к пролиферации. Иммуностимулирующие свойства имунофана и

полиоксидония обусловлены помимо активации зрелых лимфоцитов полипотентных стволовых кроветворных клеток [Лебедев В.В. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003]. Этот механизм, вероятно, при действии имунофана обеспечивается стимуляцией синтеза энзимов и других белков вследствие активации иммуностимуляторами циклического аденозинмонофосфата, РНК-полимеразы, синтеза ДНК (аналогично эффекту тимогена) [Белокрылов Г.А. и соавт., 1999].

Полиоксидоний, вероятно, стимулирует В-клетки (плазмоциты), синтезирующие IgM (в использованном тесте), а также ЕКК после интоксикации ТХМ вследствие способности активировать выработку γ -интерферона Th1-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000]. Этот лимфокин активирует ЕКК и восстанавливает постинтоксикационное нарушение их функции, а также индуцирует экспрессию рецепторов ИЛ-2 на их поверхности [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Имунофан и полиоксидоний, вероятно, активируют Th1-лимфоциты, Th1-клетки памяти и макрофаги вследствие увеличения активности РНК-полимеразы и синтеза ДНК лимфоцитов [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2000, 2002].

Таким образом, снижение летальности животных и полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀ достигается применением комбинации токоферола ацетата, унитиола, имунофана, а также в результате комбинированного эффекта токоферола ацетата, унитиола и полиоксидония .

Резюме

Экспериментальные данные, изложенные в данной главе, позволяют заключить, что токоферола ацетат, унитиол и их комбинация при использовании их в качестве антидотов при остром отравлении ТХМ

частично снижают вызванную им редукцию ФМАН, тимусзависимого гуморального иммунного ответа, активности Th1-лимфоцитов и ЕКК.

Редукция параметров иммунного статуса под влиянием ферментиндуцирующего средства (индуктора Р-450-зависимых монооксигеназ) фенобарбитала и 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана после острой интоксикации ТХМ, метаболизирующегося до более токсичных соединений (феномен «летального синтеза»), более выражена, чем при изолированном действии ТХМ.

Использование ингибитора цитохрома Р-450 препарата SKF-525А (диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетата) до острого отравления белых крыс ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀, вызывает частичное снижение иммунотоксических свойств ТХМ.

В связи с установленным нами поражением различных компонентов системы иммунитета, нарушением его разнообразных реакций, популяций лимфоцитов под влиянием ТХМ имунофан и полиоксидоний могут являться препаратами выбора при остром отравлении ТХМ. Имунофан способен оказывать не только иммуностимулирующее влияние на все звенья системы иммунитета, но и обеспечивать детоксицирующий, гепатопротективный и антиоксидантный эффекты [Лебедев В.В., 1999; Лебедев В.В., Покровский В.И., 1999], а полиоксидоний, кроме того, обладает способностью снижать мембранотоксическое действие ТХМ [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005]. Антиоксидантное действие имунофана и полиоксидония предотвращает повреждение ДНК лимфоцитов и гранулоцитов, вызванное химическими факторами окружающей среды (токсикантами) [Караулов А.В. и соавт., 2005].

Нами доказано, что снижение летальности животных, а также полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀ достигается применением комбинации токоферола ацетата, унитиола, имунофана, а также в результате комбинированного использования токоферола ацетата, унитиола и полиоксидония.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Тетрахлорметан широко используется в промышленности как растворитель масел, жиров, каучука, битумов и смол; для экстрагирования жиров и алкалоидов из костей и семян; при производстве фреонов; для чистки и обезжиривания одежды в быту и производственных условиях. [Тиунов Л.А., 1990; Wernke M.J., Schell J.D., 2004]. В последние годы частота острых интоксикаций хлорированными углеводородами, и, в частности ТХМ и показатель смертельных исходов от отравлений не уменьшаются [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 2007; Rusinski P., Kolasinski Z., 2003]. Исследованные в настоящее время иммунотоксические свойства ТХМ свидетельствуют о том, что он способен изменять физиологическую регуляцию иммуногенеза.

Изучение действия ТХМ на доиммунные факторы защиты организма и систему иммунитета имеют как теоретическое значение, раскрывая неизвестные механизмы регуляции иммуногенеза, так и практическое, позволяя проводить научно обоснованные профилактику и лечение возникающих при отравлениях данным токсикантом инфекционных, аллергических, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний [Забродский П. Ф. и соавт., 2002; 2007; Georgiev V. S, Yamaguuchi H., 1993; Plaa G.L., 2000; Sell S., 2000; Luster M.I., Simeonova P.P., 2001; Weber L.W. et al., 2003; Wernke M.J., Schell J.D., 2004; Rosenberg Y.J., 2005; Masuda Y., 2006]. Следует отметить, что вопрос о медикаментозной коррекции нарушений иммунного гомеостаза под влиянием ТХМ в постинтоксикационном периоде до сих пор изучен недостаточно [Лим В.Г., 2006; Забродский П.Ф. и соавт., 2007].

Анализ данных литературы показывает, что в танатогенезе после острого отравления ТХМ существенную роль играют нарушения регуляции иммунного гомеостаза. В настоящее время данные в отношении антителообразования под влиянием ТХМ противоречивы, практически не

исследованы роль Т- и В-клеток, состояние ПОЛ, функции коры надпочечников, эстеразная активность Т-лимфоцитов в формировании иммунодефицита после действия ТХМ, а также действие токсиканта на показатели доиммунных факторов защиты организма от инфекции. Не изучено поражение субпопуляций Т-лимфоцитов ТХМ, не проведено патогенического обоснования оптимальной коррекции нарушений иммунного гомеостаза для профилактики постинтоксикационных инфекционных осложнений, заболеваний и смертельных исходов.

Под влиянием ТХМ происходит дозозависимая редукция факторов доиммунной защиты организма от инфекций в течение 9 сут. Острая интоксикация ТХМ вызывает прямо связанное с дозой уменьшение активности лизоцима, ТКБ в сыворотке крови, а также ФМАН.

Редукция активности лизоцима под влиянием ТХМ, вероятно, связана с ингибированием неспецифических эстераз клеток крови, а также вследствие эффекта токсикантов и их метаболитов, ингибирующего многочисленные биохимические реакции [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Редукция синтеза лизоцима может происходить также вследствие воздействия ТХМ и его продуктов биотрансформации на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Тиунов Л.А., 1990; Tomenson J.A. et al., 1995; Dalu A., Mehendale H.M., 1996; Neubauer K., Eichroft S.T., 1998; Brautbar N., Williams J. 2nd, 2002]. Кроме того, снижение активности лизоцима может быть обусловлено нарушением функции пируватоксидазной системы нейтрофилов вследствие ингибирования моно- и дитиоловых энзимов, в частности, сульфгидрильных групп липоевой кислоты [Куценко С.А. и соавт., 2004], а также с инактивацией α -нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983].

Снижение сывороточной активности тромбоцитарно-катионного белка может быть связано с действием токсиканта и его метаболитов на синтез и выделение тромбоцитарно-катионного белка тромбоцитами [Забродский П.Ф., 1999; 2002; Сидельникова Н.М., 2004; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г.,

2007]. Редукция сывороточной активности ТБК может быть связана с нарушением функции пируватоксидазной системы нейтрофилов вследствие ингибирования моно- и дитиоловых энзимов, в частности, сульфгидрильных групп липоевой кислоты [Куценко С.А. и соавт., 2004], а также с инактивацией α -нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983]. Механизм супрессии активности ТБК, видимо, обусловлен нарушением функции тромбоцитов в результате взаимодействия с сульфгидрильными и аминокетонами ферментов высокотоксичных продуктов биотрансформации ТХМ (CCl_3^+ ; O-O-CCl ; HO-OSSCl_3 ; HO-CCl_3^+ и др.), ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [Голиков С.Н. и соавт., 1986], инициацией перекисного окисления липидов [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Василенко О.А., 2004]. Нарушение продукции ТБК, вероятно, наряду с действием ТХМ и его метаболитов на клеточном уровне может быть обусловлено изменением активности гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы - ГГАС [Бухарин О.В. и соавт., 1998; Забродский П.Ф., 2002; 2007].

Похожий характер изменений ФМАН был обнаружен в экспериментах с пероральным отравлением дихлорэтаном [Давыдова Е.В. и др., 1995], а также при обследовании пациентов с отравлениями суррогатами алкоголя [Романенко О.И., Гребенюк А.Н., 1997; Сосюкин А.Е. и соавт., 1997]. Несмотря на различные специфические механизмы действия ТХМ и дихлорэтана и суррогатов алкоголя, проявление их токсичности на уровне полиморфно-ядерных лейкоцитов, как и в проведенных нами опытах, было сходным [Гребенюк А.Н., Романенко О.И., 1996; Гребенюк А.Н. и соавт., 1998].

Данные, полученные в НСТ-тесте, свидетельствуют, что действие ТХМ на ФМАН реализуется вследствие взаимодействия токсиканта и его метаболитов с НАДФ·Н, НАДФ⁺. Это подтверждают данные литературы [Брызгина Т. М., 1989]. Действие ТХМ и его метаболитов может быть также связано с ингибированием ФАД⁺, ФАД·Н, восстановленным и окисленным

убихиноном и цитохромом b_{245} лейкоцитов или иными механизмами нарушения функционирования НАДФ·Н-оксидазного комплекса нейтрофилов. Кроме кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитоза ТХМ продукты его биотрансформации, вероятно, поражают и кислороднезависимые микробицидные системы фагоцитов [Гребенюк А.Н. и соавт., 1998]. Это доказано в опытах Е.В. Давыдовой и соавт. (2004а, 2004б), результаты которых свидетельствуют о снижении внутриклеточного содержания катионных белков в нейтрофилах крыс после острой интоксикации 1,2-дихлорэтаном в дозе 1,0 ЛД₅₀.

Существенное значение в угнетении ФМАН может иметь дисфункция гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, приводящая к изменению чувствительности микро- и макрофагов к микроорганизмам, в результате чего угнетается их цитотоксичность [Брюхин Г. В., Михайлова Г. И., 1990; Гребенюк А.Н. и соавт., 1998]. Так, показано, что глюкокортикоиды снижают суммарную фагоцитарную активность фагоцитов крыс, причем существенную роль в данном феномене играют адреналин [Шилов Ю.И., 2001]. Кроме того, нарушение активности ФМАН может быть связано с мембранотоксическим действием ТХМ, инициацией ПОЛ мембран нейтрофилов, их взаимодействием с сульфгидрильными, гидроксидными и другими группами мембран фагоцитов, нарушением функции ферментов тканевого дыхания митохондрий полиморфноядерных лейкоцитов [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 1998, 2002, 2007]. Не исключено ингибирование α -нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы нейтрофилов ТХМ и его метаболитами [Li C.G. et al., 1983].

Под влиянием острого отравления ТХМ в прямой зависимости от дозы снижается содержание лимфоцитов в органах системы иммунитета крыс и мышей. При остром отравлении в дозе 0,75 ЛД₅₀ ТХМ вызывал уменьшение Т- и В-лимфоцитов в крови и органах иммунной системы соответственно до 6 и 9-12 сут.

ТХМ способен снижать содержание в органах системы иммунитета лимфоцитов в результате реализации стресс-реакции (действие гормонов коры надпочечников, в частности, кортикостерона, реализующего механизмы апоптоза) [Мутускина Е.А. и соавт., 2001; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Stephen V. et al., 2003; Durant S., 1986; Li Q., Kawada T., 2006].

Снижение лимфоцитов в крови и органах системы иммунитета можно объяснить поражением лимфоидной стволовой кроветворной клетки, а также зрелых лимфоцитов реализацией следующих механизмов: подавление пролиферации иммуноцитов в результате ингибирования ферментов тканевого дыхания митохондрий ИКК [Забродский П.Ф. и соавт., 1998], а также инактивации ТХМ многочисленных ферментных систем лимфоцитов, повреждением мембран клеток [Куценко С. А. 2004].

Кроме того, механизмы, определяющие снижение лимфоцитов в органах иммунной системы после интоксикации ТХМ, могут быть связаны с изменением функции гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы [Забродский П.Ф., 2002] холинергической и симпатико-адреналовой системы [Денисенко П.П., 1980], с действием ТХМ на ферменты иммуноцитов, инициацией ПОЛ. Эти изменения могут вызывать нарушение гемопоэза и гибель иммуноцитов (апоптоз) (Ройт и др., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Мутускина и др., 2001; Забродский, 2002; Молотков А.О., 2002; Хаитов и др., 2002; Durant S., 1986; Liao et al., 2004; Li Q., Kawada T., 2006]. При действии ТХМ снижение содержания лимфоцитов в лимфоидных органах происходит, вероятно, и вследствие его общетоксического эффекта – подавление пролиферации иммуноцитов в результате ингибирования ферментов тканевого дыхания митохондрий иммунокомпетентных клеток - ИКК [Забродский П.Ф. и соавт., 1998; 2007], а также инактивации ТХМ и его метаболитами многочисленных ферментных систем лимфоцитов [Куценко С. А. 2004]. Кроме того, токсиканты способны нарушать процесс позитивной (положительной) селекции Т-лимфоцитов [Fink P.J., Bevan M.J., 1995].

Необходимо отметить, что миграция лимфоцитов из органов системы иммунитета весьма динамичный процесс, зависящий от времени суток [Dhabhar F. S. et al., 1996] и различных физических и химических факторов, в частности от изменения функционального состояния органов системы иммунитета под влиянием ГГАС, в частности от кортикостероидов [Горизонтов П.Д., 1981; Claman H.N., 1983; Dhabhar F. S. et al., 1996], катехоламинов [Madden K. S., Livnat S., 1991], а также изменения состояния холинергической системы [Забродский П.Ф. и соавт., 2001; 2007].

Острая интоксикация ТХМ через 5-20 сут вызывала дозозависимое снижение антителообразования, оцениваемое по ОДЛТА, свидетельствующее о супрессии активности как Th1, так и Th2-лимфоцитов.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ТХМ при остром воздействии дозозависимо снижает синтез IgM до 8 сут и IgG до 20 сут [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ТХМ вызывает редукцию активности как Th1, так и Th2-лимфоцитов, так как Th1-лимфоциты участвуют в синтезе IgM (оценка ОДЛТА на 5 сут), а Th2-лимфоциты способствуют синтезу IgG1 и других иммуноглобулинов [Ройт А. и соавт., 2000; Abbas A.K. et al., 1996; Fleisher T.A., Oliveira J.B., 2004; Maekawa Y., Yasutomo K., 2005].

Под влиянием острой интоксикации ТХМ происходит прямо связанная с дозой редукция тимусзависимого антителообразования в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителигенеза.

Редукция показателя в продуктивную фазу гуморальной иммунной реакции (введение ТХМ через 3 сут после ЭБ) по сравнению с индуктивной (введение ТХМ одновременно с ЭБ) вполне объяснима. Данный феномен обусловлен более выраженным действием пролиферацию, дифференцировку и синтез иммуноглобулинов В-клетками (плазмócитами), перераспределением лимфоцитов между органами системы иммунитета в

период максимальной антителопродукции – синтеза IgM (3-5 сут после иммунизации) в продуктивной фазе антителообразования по сравнению с воздействием ТХМ на распознавание антигена макрофагами, их переработку и представление Т- и В- клеткам, кооперацию макрофагов, Т- И В-лимфоцитов, а также клональную селекцию Т- и В-клеток в индуктивной фазе антителопродукции [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Не исключено, что при одинаковом по интенсивности редуцирующем эффекте на указанные процессы действие в продуктивный период антителогенеза обуславливает усиление апоптоза (запрограммированную гибель) клеток органов иммунитета, занимающихся антителопродукцией, что приводит к ингибированию синтеза антител [Liao W.T. et al., 2004]. При этом на восстановительные процессы к моменту оценки действия ТХМ (через 2 сут после его введения) остается меньше времени, чем при его действии в индуктивной фазе антителогенеза. Кроме того, следует учитывать ингибирующее синтез антител действие кортикостероидов [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Maslinski W. et al., 1990, 1992], концентрация которых в крови при действии различных токсикантов увеличивается [Stephen B. et al., 2003]. Данные литературы свидетельствуют, что стресс-реакция вследствие психоэмоционального напряжения может приводить к снижению АОК в селезенке мышей в 4 раза [Идова В.Г. и соавт., 2004] вследствие увеличения содержания в крови глюкокортикоидов [Свирид В.Д., 2002]. Можно полагать, что постинтоксикационный стресс оказывает существенное влияние на супрессию гуморального иммунного ответа.

Супрессия функции тимусзависимого антителообразования под влиянием ТХМ может быть связана с реализацией различных механизмов иммуотоксических эффектов: на уровне систем – с активацией гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, на уровне взаимодействия клеток – со снижением кооперации Т- и В-лимфоцитов, на субклеточном уровне – с инициацией перекисного окисления липидов (ПОЛ), мембранотоксическим

действием, в частности, с повреждением мембраны лизосом иммунокомпетентных клеток и высвобождением и активацией кислых гидролаз, [Ахматова М.А. и др., 1982; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2002; 2007], на молекулярном уровне – с ингибированием энзимов тканевого дыхания митохондрий иммуноцитов [Ротенберг Ю.С., 1982].

Под влиянием ТХМ снижается Т-зависимое антителообразование, в частности, синтез IgG, что свидетельствует о снижении функции Th2-лимфоцитов.

Наши исследования убедительно подтверждают данные литературы [Забродский П.Ф. и соавт., 2000; 2007; Szelenyi J.G. et al., 1982; Tiefenbach B. et al., 1985], что к факторам, супрессирующим синтез IgG, как и IgM, при острой интоксикации ТХМ (это относится и к другим ядам, не ингибирующим синтез гормонов надпочечниками), относится эффект кортикостероидов

Проведенные нами исследования подтверждают данные литературы [Забродский П. Ф. и соавт., 2007], что снижение синтеза IgG под влиянием ТХМ обусловлены ингибированием эстераз Th2-лимфоцитов и макрофагов как самими токсикантами, так и их метаболитами. Кроме ингибирования эстераз данных клеток редукция антителообразования может быть обусловлена снижением процессов тканевого дыхания вследствие взаимодействия метаболитов ТХМ с различными компонентами тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования митохондрий иммунокомпетентных клеток [Куценко С.А., 2004; Забродский П. Ф. и соавт., 1998; 2002; 2007].

ТХМ вызывает прямо связанную с дозой и концентрацией редукцию кооперации Т- и В-клеток *ex vivo* и *in vitro* (при действии токсиканта преимущественно на Т-клетки по сравнению с В-лимфоцитами).

Механизм редукции активности Т- и В-клеток в процессе их кооперации, вероятно, связан с нарушением их функции как в результате

прямого мембранотоксического эффекта ТХМ [Голиков С.Н и соавт., 1986], так и вследствие взаимодействия с сульфгидрильными и аминокетогруппами энзимов лимфоцитов высокотоксичных продуктов их биотрансформации, ингибирования ими тканевого дыхания, окислительного фосфорилирования и синтеза белков [Забродский П.Ф. и соавт., 2007], уменьшения активации Т- и В-лимфоцитов вследствие снижения продукции циклических нуклеотидов и секреции ИЛ-2 Т-клетками [Козлов В.А. и соавт., 2001; Parker D.C., 1993] и ИЛ-4 [Шуршалина А.В. и соавт., 2001], а также в результате повреждения метаболитами ТХМ мембраны лизосом иммуноцитов с высвобождением и активацией кислых гидролаз [Ахматова М.А. и др., 1982].

Более высокую чувствительность Т-клеток к большинству ксенобиотиков доказывают многочисленные исследования [Смирнов В.С и соавт., 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 1993, 1998, 2001, 2004, 2007; Descotes G., 1986].

Под влиянием острой интоксикации ТХМ происходит дозозависимое снижение Т-независимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период антителогенеза по сравнению с индуктивной фазой антителопродукции.

Сравнительная оценка влияния ТХМ на Т-зависимое и Т-независимое антителообразование показывает, что под влиянием токсиканта наблюдается преимущественное нарушение Т-зависимой антителопродукции. Это обусловлено, наряду с другими механизмами, действием ТХМ одновременно на макрофаги, В-лимфоциты и Т-клетки (в использованной нами экспериментальной модели на субпопуляцию Th1), участвующие в реализации данной иммунной реакции, в то время как Т-независимый гуморальный иммунный ответ обеспечивается в основном функцией В-клеток, активируемых антигеном в присутствии ИЛ-1, секретируемом макрофагами [Ройт и соавт., 2000; Gillbert K. M. et al., 1985]. Вполне естественно, что иммунотоксическое действие на три элемента,

взаимодействующих в процессе антителообразования, проявляется большим его угнетением, чем при поражении одного или двух элементов, если нет оснований предполагать реализации селективного иммуотропного эффекта. Следует отметить, что ТХМ не способен избирательно поражать только Т-лимфоциты. Оказывая максимальный повреждающий эффект на эти клетки по сравнению с В-лимфоцитами, он, как показали наши эксперименты, действует и на В-клетки.

Снижение числа АОК, синтезирующих IgM и IgG под влиянием ТХМ свидетельствует о нарушении функции как Th1-, так и Th2-лимфоцитов (Т-хелперов первого и второго типа) [Romagnani S., 1997].

Острая интоксикация ТХМ дозозависимо снижает функцию Th1-лимфоцитов как в первичном, так и во вторичном клеточном иммунном ответе.

Снижение функции Т-лимфоцитов обусловлено при отравлении ТХМ ингибирующим действием кортикостероидов [Tiefenbach B. et al., 1985; Ficek W. 1997; Stephen B. et al., 2003], а также иммуотоксическим эффектом метаболитов ТХМ, связанным с инактивацией многочисленных ферментов Т-лимфоцитов, и другими эффектами [Забродский П.Ф. и соавт., 2007]. Это убедительно доказывают результаты наших исследований по оценке роли кортикостерона в супрессии иммунных реакций.

Редукция активности Т-клеток может быть обусловлена снижением процессов тканевого дыхания и нарушением окислительного фосфорилирования метаболитами ТХМ. Существенную роль в иммуотоксическом эффекте ТХМ играет также активация ими перекисного окисления липидов мембран иммуоцитов, повреждение мембран и органелл иммуоцитов, увеличение апоптоза клеток системы иммунитета [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф., 1998; 2002; 2007; Spoo W., 2001; Weber L.W. et al., 2003; Salazar-Montes A. et al., 2008; Botsoglou N.A. et al., 2008]. Значение ПОЛ в супрессии функций Т- и В-

клеток показано нами при исследовании баланса антиоксидантных и прооксидантных факторов под влиянием ТХМ.

Последние исследования в области иммунологии показали, что клетки-киллеры - К-клетки (кроме миелоидных) - это ЕКК, использующие для усиления реакции антитела (IgG) [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2002]. ЕКК, активированные связанными с клеткой-мишенью (например, клеткой, пораженной вирусом) антителами, уничтожают ее. При этом антитела (IgG) привлекают своим Fc-хвостом ЕКК, имеющие для этого соответствующий FcγRIII. Возникает комплекс клетка-мишень – антитело – ЕКК, в котором ЕКК реализует свою киллерную функцию в отношении клетки-мишени [Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. Эта система получила название антителозависимая клеточная цитотоксичность. Помимо ЕКК в эту систему входят полиморфноядерные лейкоциты – базофилы, эозинофилы, сегментоядерные лейкоциты, а также другие фагоцитирующие и нефагоцитирующие миелоидные клетки [Ройт А., 2000; Husband A. I., 1995].

Острое отравление ТХМ дозозависимо снижает АЗКЦ спленоцитов преимущественно в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с его индуктивным периодом.

При острой интоксикации ТХМ дозозависимо снижается активность ЕКК в течение 9 сут.

Снижение активности ЕКК под влиянием ТХМ может быть связано с эффектами кортикостероидов (это доказано нами в процессе проведенных экспериментов) и катехоламинов вследствие активации токсикантом гипоталамо-гипофизарно-адреналовой и симпатико-адреналовой систем и увеличения концентрации в крови кортикостероидов и катехоламинов [Тиунов Л.А., 1990; Claman H.N., 1993; Stephen B. et al., 2003].

Вероятно, ТХМ и его метаболиты способны снижать активность ЕКК вследствие поражения механизмов порообразования перфорином и выделения в клетки мишени гранзимов (или снижением их синтеза), а также индукцией апоптоза ЕКК, а также индукцией апоптоза [Delves P.J., Roitt I.M.,

2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Garrity D. et al., 2005; Li Q., Kawada T., 2006; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006; Timmons B.W. et al., 2006].

ТХМ может снижать активацию ЕКК вследствие редукции синтеза ИЛ-2 Th0-лимфоцитами и γ -интерферона Th1-клетками [Ройт А. и соавт., 2000, Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Учитывая то, что печень является органом, в котором образуется большая часть ЕКК [Хаитов Р.М. и соавт., 2000], а ТХМ обладает выраженным гепатотропным эффектом [Тиунов Л.А., 1990; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Куценко С.А. и соавт., 2004], весьма значительная редукция активности ЕКК данным токсикантом вполне объяснима.

Нами установлено, что супрессирующее действие ТХМ на активность ЕКК *in vitro* прямо зависит концентрации яда.

Подострое действие тетрахлорметана существенно снижает концентрацию в крови цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4), уменьшает соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 по сравнению с контролем. ТХМ вызывает большее поражение Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами.

Снижение активности Th1-клеток ТХМ может быть обусловлена существенным увеличением в крови концентрации кортикостерона вследствие подострой интоксикации [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], к которому в большей степени чувствительны лимфоциты Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000], антихолинэстеразным эффектом ТХМ и его метаболитами [Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 2004] и, вероятно, большим содержанием эстераз на наружной мембране и в цитозоле Th1-клеток.

Исследования последних лет показали существенную роль цитокинов в формировании цирроза печени и аутоиммунных реакциях. Анализ источников литературы, посвященных действию патогенезу поражения различными ядами печени, в частности, ТХМ, позволяет считать, что

данный эффект тесно связан с реализацией иммунных (аутоиммунных) реакций и функцией цитокинов [Schumann J., Tiegs G., 1999; Luster M.I., Simeonova P.P., 2000; 2001; Roberts R.A. et al., 2001; Streets K.L., Wustefeld T., 2001; Weber L.W. et al., 2003; Louis H. et al., 2003]. Токсиканты и их метаболиты в результате взаимодействия с протеинами, липидами и нуклеиновыми кислотами гепатоцитов, а также вследствие инициирования ПОЛ приводят к поражению митохондрий и последующему некрозу клеток. Кроме того, реализация повреждений, связанных с «внутриклеточным стрессом» (повреждение различных органелл клеток – ядра, микротрубочек, эндоплазматического ретикулума и др.), вызывает апоптоз гепатоцитов. К апоптозу приводит также сенситизация (увеличение чувствительности) клеток к цитокинам, в частности к факторам некроза опухоли. Являясь гаптенами, а также инициируя их появление вследствие повреждения цитохрома Р-450 и других энзимов, гепатотропные яды активируют иммунные реакции, в частности апоптоз вследствие действия гранзимов ЕКК.

Увеличение концентрации кортикостерона при острой интоксикации ТХМ и активация ПОЛ под влиянием токсикантом является одним из факторов, способствующих формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Можно полагать, что десинхронизация суточных колебаний концентрации кортикостерона под влиянием ТХМ также изменяет физиологическую регуляцию иммунного гомеостаза, что отмечено и другими исследователями [Dhabhar F.S. et al., 1996].

Повреждающий эффект ПОЛ в отношении иммунокомпетентных клеток при действии ТХМ может быть обусловлен действием продуктов распада гидроперекисей фосфолипидов взаимодействующих со свободными аминок группами мембранных белков иммуноцитов, образуя межмолекулярные сшивки и инактивируя эти белки. Кроме того, активация ПОЛ вызывает окисление сульфгидрильных групп иммуноцитов до

сульфонов. Это приводит к инаktivации мембраносвязанных ферментов и увеличению проницаемости мембран иммунокомпетентных клеток [Миронова О.П., 2002; Плужников Н.Н. и соавт., 2003].

Инициация ПОЛ ТХМ, возможно, реализуется в результате активации ПОЛ метаболитами токсиканта свободными радикалами (CCl_3^+ ; O-O-CCl_2 ; HO-OCCCl_2 ; HO-CCl_2) в сочетании с высокой концентрацией кортикостероидов, обусловленной эффектом стресс-реакции на действие яда.

Установлена выраженная соответственно прямая и обратная корреляция между параметрами иммунных реакций и показателями антиоксидантной системы (содержанием каталазы и пероксидазы в крови крыс) и ПОЛ (содержанием малонового диальдегида в крови). В настоящее время известно большое количество препаратов, способных снижать ПОЛ при отравлении ТХМ [Машковский М.Д., 2001], в частности, мелатонин обладает выраженным антиоксидантным действием при поражении печени ТХМ. [Попов С.С. и соавт., 2007].

По нашему мнению, изменения показателей ПОЛ в плазме крови, отражают процесс свободно-радикального окисления липидов, как всех клеток различных органов в целом, так и клеток 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; Лим В.Г., 2006]. Показана, в частности, активация ПОЛ при гипоксической гипоксии [Зарубина И.В., Миронова О.П., 2002]. Следует отметить, что вследствие поражения дыхательной системы ТХМ вызывает этот вид гипоксии [Плужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000].

По данным литературы увеличение катехоламинов в плазме крови под влиянием ТХМ [Лим В.Г., 2006] обусловлено реализацией стресс-реакции, активацией симпатико-адреналовой системы [Wilson S., Mireille D., 1995]. Кроме того, ТХМ вследствие выявленного нами антихолинэстеразного

эффекта приводит к реализации действия ацетилхолина на Н-холинорецепторы мозгового вещества надпочечников, что приводит к последующему выделению адреналина в циркулирующую кровь. В настоящее время доказано наличие на лимфоцитах β -адренорецепторов, на которые способны воздействовать катехоламины, снижая активность ЕКК [Madden K.S., Livnat S., 1991].

Острое отравление ТХМ в дозе 0,75 ЛД₅₀ вызывает существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса и селезенки, которое прямо связано с редукцией иммунных реакций.

Эстеразы являются лизосомальными ферментами. Эти энзимы играют важную роль в реализации киллерной функции Т-лимфоцитов [Ferguson J. et al., 1972; Li C. Y. et al., 1973]. Изменение эстеразной активности в клетках отражает, с одной стороны, функциональную активность иммуноцитов, с другой - может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови, так как именно эта субпопуляция лимфоцитов является эстеразопозитивной [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977]. Роль ацетилхолинэстеразы на поверхности Т-лимфоцитов [Szelenyi J.G. et al., 1982] до сих пор не ясна. Возможно, она регулирует влияние ацетилхолина на холинореактивные структуры Т-лимфоцитов [Забродский П.Ф. и соавт., 2001, 2007; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1989].

Данные литературы свидетельствуют, что инактивация эстераз в моноцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, интактных и активированных ксенобиотиками и лимфокинами ЕКК, ослабляет эффекторные функции Т-клеток. Развитие лимфомы часто связано с присутствием вируса Эпштейна-Барра и человеческого герпесвируса-6, иммунитет к которым зависит от функции моноцитов, Т-лимфоцитов и ЕКК. Инактивация активности эстераз иммунокомпетентных клеток, вызываемая токсикантами, подавляет иммунитет к герпесвирусам, способствующим развитию лимфом [Newcombe D.S., 1991]. Учитывая изложенное предположение, можно

полагать, что ТХМ, обладающий антихолинэстеразным эффектом, способен вызывать лимфомы вследствие его способности ингибировать эстеразы Т-клеток.

Редукция параметров иммунного статуса под влиянием ферментиндуцирующего средства (индуктора Р-450-зависимых монооксигеназ) фенобарбитала и 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана после острой интоксикации ТХМ, метаболизирующегося до более токсичных соединений (феномен «летального синтеза»), более выражена, чем при изолированном действии ТХМ.

Данные литературы [Каган Ю.С. и соавт., 1983; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Козлов В.А. и соавт., 1991] позволяют полагать, что увеличение редукции показателей системы иммунитета под влиянием фенобарбитала и 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана при отравлении ТХМ обусловлено действием на молекулы мембран, цитозоля, органелл иммунокомпетентных клеток и продукцию лимфокинов, регулирующие их функцию, высокотоксичных продуктов биотрансформации ТХМ, которая под влиянием индукторов цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ существенно усиливается.

Использование ингибитора цитохрома Р-450 препарата SKF-525A (диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетата) до острого отравления белых крыс ТХМ в дозе 1,0 DL₅₀, метаболизирующегося в организме до соединений с более высокой токсичностью (феномен «летального синтеза»), вызывает частичное снижение иммунотоксических свойств ТХМ.

Данные литературы позволяют считать, что биотрансформация ТХМ может происходить не только в печени, но и в лимфоцитах. Так, доказано, что витамин А, левамизол, фенобарбитал и другие вещества способны индуцировать цитохром-Р-450 в Т-лимфоцитах, ЕКК и повышать их активность [Саприн А.Н. и соавт., 1982].

Ингибирование SKF-525A монооксигеназной системы печени и лимфоидной ткани, значительно снижая биотрансформацию ТХМ, вероятно,

уменьшает образование его высотоксичных свободных радикалов - CCl_3^+ ; $\text{O}-\text{O}-\text{CCl}$; $\text{HO}-\text{OCCCl}_3$; $\text{HO}-\text{CCl}_3$ метаболитов. Это сопровождается редукцией иммуносупрессивного эффекта ТХМ.

Полученные нами данные, а также изучение иммуностимулирующих характеристик различных препаратов тимогена, Т-активина, миелопида, имунофана, полиоксидония и др. [Семина О.В. и соавт., 1997; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1999; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003; Елизарова Н.Л. и соавт., 2005; Василенко О.А., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Нестерова И.В., 2005; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005; Забродский П.Ф. и соавт., 2005; 2007; Singh N., Perfect J.R., 2007] позволяют считать наиболее приемлемыми для коррекции постинтоксикационных нарушений, вызванных ТХМ, имунофан и полиоксидоний.

Нами показано, что снижение летальности животных, а также полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ТХМ в дозе $1,0 \text{ DL}_{50}$ достигается применением комбинации токоферола ацетата, унитиола, имунофана, а также в результате комбинированного использования токоферола ацетата, унитиола и полиоксидония.

В целом эффективность полиоксидония несущественно превышала стимулирующий эффект имунофана.

Исследованиями последних лет показано, что имунофан (аргинил-альфа-аспартил-лизил-тирозил-аргинин) – гексапептид с молекулярной массой 836 Да. Препарат относится к синтетическим иммуностимуляторам, обладает иммунорегулирующим, детоксикационным, гепатопротективным действием и вызывает инактивацию свободнорадикальных процессов ПОЛ [Покровский В.И. и соавт., 1997; Лебедев В.В. и соавт., 2000]. Имунофан способен оказывать не только иммуностимулирующее влияние на все звенья системы иммунитета, но и обеспечивать детоксицирующий, гепатопротективный и антиоксидантный эффекты [Лебедев В.В., 1999;

Лебедев В.В., Покровский В.И., 1999]. Антиоксидантное действие имунофана предотвращает повреждение ДНК лимфоцитов и гранулоцитов, вызванное химическими факторами окружающей среды (токсикантами) [Караулов А.В. и соавт., 2005].

Полиоксидоний - это физиологически активное соединение с молекулярной массой 100 кДа, обладающее выраженной иммуномодулирующей активностью. По своей химической структуре он является сополимером N-окиси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиния бромида с молекулярной массой 80 кДа [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005]. Он является иммуномодулятором последнего поколения, обладает иммуностимулирующими, детоксикационными, антиоксидантными и мембраностабилизирующими эффектами.

Одним из главных биологических свойств полиоксидония является его способность стимулировать антиинфекционную резистентность организма. Полиоксидоний в определенных дозах обладает способностью стимулировать как спонтанный, так и индуцированный синтез цитокинов, продуцируемых в основном клетками моноцитарно-макрофагальной системы и нейтрофилами: IL-1 β , IL-6, фактора некроза опухоли- α [Пинегин Б.В. и соавт., 2004], которые являются основными активаторами функциональной активности фагоцитарных клеток [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Dyakonova V.A. et al., 2004]. В настоящее время доказано, что полиоксидоний способствует регенерации печени, путем активации Т-лимфоцитов и макрофагов [Юшков Б.Г. и соавт., 2006].

При тимусзависимом антителообразовании действие имунофана и полиоксидония после отравления ТХМ, вероятно, реализуется путем активации процесса кооперации макрофагов, Т-клеток и В-лимфоцитов, антителопродуцирующих В-клеток, функции Th1-лимфоцитов, секретируемых γ -интерферон, β -фактор некроза опухоли (лимфотоксин), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-

КСФ) и и Th2-клеток, продуцирующих ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ГМ-КСФ [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Доказанная нами возможность восстановления имунофаном и полиоксидонием основных показателей доиммунной защиты организма от инфекций, гуморального и клеточного иммунитета дает основания предполагать, что механизм их действия может быть связан с неспецифической стимуляцией функций клеток организма, способных к пролиферации. Иммуностимулирующие свойства имунофана и полиоксидония обусловлены помимо активации зрелых лимфоцитов полипотентных стволовых кроветворных клеток [Лебедев В.В. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003]. Этот механизм, вероятно, при действии имунофана обеспечивается стимуляцией синтеза энзимов и других белков вследствие активации иммуностимуляторами циклического аденозинмонофосфата, РНК-полимеразы, синтеза ДНК (аналогично эффекту тимогена) [Белокрылов Г.А. и соавт., 1999].

Рассматривая стимулирующие свойства имунофана в отношении доиммунных механизмов защиты (в частности, ФМАН) следует упомянуть работы, в которых показано (опыты на мышах), что глутаминовая, аспарагиновая кислоты, треонин, валин стимулируют антителогенез и фагоцитоз. Лизин, пролин, тирозин и лейцин не изменяют гуморальный иммунный ответ, но повышают фагоцитоз, а аргинин угнетает антителогенез, но увеличивает фагоцитарную активность нейтрофилов. Регуляция иммуногенеза аминокислотами (а имунофан – это шесть иммунологически активных аминокислот) является эволюционно древним механизмом, сохранившим свое значение и на более позднем этапе эволюции [Белокрылов Г.А. и соавт., 1991].

Полиоксидоний, вероятно, стимулирует В-клетки (плазмоциты), синтезирующие IgM (в использованном тесте), а также ЕКК после

интоксикации ТХМ вследствие способности активировать выработку γ -интерферона Th1-лимфоцитами [Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993; Ройт А. и соавт., 2000]. Этот лимфокин активирует ЕКК и восстанавливает постинтоксикационное нарушение их функции, а также индуцирует экспрессию рецепторов ИЛ-2 на их поверхности [Ройт А. и соавт., 2000]. Имунофан и полиоксидоний, вероятно, активируют Th1-лимфоциты, Th1-клетки памяти и макрофаги вследствие увеличения активности РНК-полимеразы и синтеза ДНК лимфоцитов [Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Таким образом, острая интоксикация ТХМ в условиях эксперимента на животных в дозах 0,25; 0,50; 0,75 ЛД₅₀ вызывает прямо связанную с дозой супрессию доиммунных факторов защиты организма от инфекций, основных гуморальных и клеточных иммунных реакций. Наиболее чувствительными к действию ТХМ (0,75 ЛД₅₀) являлись фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов, Т-клетки и Th1-лимфоциты. Основными механизмами нарушения физиологической регуляции иммуногенеза и функции Т- и В-звена иммунитета ТХМ, приводящими к постинтоксикационному иммунодефицитному состоянию, являются: снижение иммуноцитов в органах системы иммунитета; нарушение кооперации Т- и В-лимфоцитов; более выраженное поражение Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами, иммуносупрессивный эффект кортикостероидов; ингибирование ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, инициация ПОЛ. Редукция параметров иммунного статуса под влиянием индукторов Р-450-зависимых монооксигеназ (фенобарбитала и 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана) после острой интоксикации ТХМ, более выражена, чем при изолированном действии ТХМ. Ингибитор цитохрома Р-450 препарат SKF-525A (диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетата) частично снижает иммунотоксичность ТХМ. Полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ТХМ в дозе 1,0 ДЛ₅₀ достигается применением комбинации токоферола ацетата, унитиола,

имунофана, а также в результате комбинированного использования токоферола ацетата, унитиола и полиоксидония.

ВЫВОДЫ

1. Тетрахлорметан при остром воздействии дозозависимо снижает содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета, уменьшает кооперацию Т- и В-лимфоцитов, антителопродукцию, клеточный иммунный ответ вследствие эффекта кортикостерона, пероксидации липидов и ингибирования ацтилхолинэстеразы Т-лимфоцитов. Комбинированное применение токоферола ацетата, унитиола, полиоксидония (или имунофана) вызывает полное восстановление нарушений иммунного гомеостаза после острого отравления тетрахлорметаном.

2. Под влиянием тетрахлорметана происходит дозозависимая редукция факторов доиммунной защиты организма от инфекций в течение 9 сут. Острая интоксикация токсикантом вызывает прямо связанное с дозой уменьшение активности лизоцима, тромбоцитарно-катионного белка в сыворотке крови, а также фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов.

3. Острая интоксикация тетрахлорметаном вызывает дозозависимое снижение содержания Т- и В-лимфоцитов в органах системы иммунитета.

4. Под влиянием острого отравления тетрахлорметаном отмечается прямо связанное с дозой редукция тимусзависимого и тимуснезависимого антителообразования, более выраженное в продуктивной фазе иммуногенеза, нарушение функции Т- и В-лимфоцитов в эффекте кооперации клеток (*ex vivo* и *in vitro*). При этом в большей степени поражаются Т-лимфоциты по сравнению с В-клетками, а также Th1-лимфоциты, с функцией которых связан синтез IgM, по сравнению с Th2-клетками, влияющими на продукцию В-лимфоцитами IgG.

5. Под влиянием острого отравления ТХМ в прямой зависимости от дозы снижается функция Th1-лимфоцитов, участвующих в формировании гиперчувствительности замедленного типа в первичном и вторичном

клеточном иммунном ответе, антителозависимая клеточная цитотоксичность, активность естественных клеток-киллеров *in vivo* и *in vitro*.

6. Тетрахлорметан в большей степени поражает Th1-клетки по сравнению с Th2-лимфоцитами. Супрессия иммунных реакций при остром отравлении тетрачлорметаном находится в прямой корреляции с концентрацией кортикостерона в плазме крови, показателями перекисного окисления липидов (содержанием свободной продукции радикалов и малонового диальдегида в крови) и обратной корреляции с показателями антиоксидантной системы (активностью каталазы и пероксидазы), а также с активностью ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов.

7. Средства специфической терапии отравления тетрачлорметаном (токоферола ацетата, унитиол), индукторы Р-450-зависимых монооксигеназ (фенобарбитал и 2,4,6-трифенил-4Н-селенопиран) уменьшают вызванную токсикантом супрессию доиммунных факторов защиты организма (параметров фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов), гуморальных и клеточных иммунных реакций, а ингибитор монооксигеназных энзимов диэтиламиноэтил-2,2-дифенилпропилацетат (препарат SKF-525A), иммуностимуляторы имунофан и полиоксидоний - уменьшает обусловленную тетрачлорметаном редукцию иммунного статуса. Снижение летальности животных и полное восстановление параметров фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов и иммунного статуса после острого отравления токсикантом в дозе 1,0 DL₅₀ достигается применением комбинации токоферола ацетата, унитиола, имунофана, а также в результате комбинированного использования токоферола ацетата, унитиола и полиоксидония.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В экспериментах на животных наиболее информативными показателями для оценки иммуносупрессивных эффектов тетрахлорметана являются тесты, характеризующие фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов, Т-зависимого антителообразования, активность Th1-клеток, естественных клеток-киллеров и ПОЛ.

2. После острого отравления тетрахлорметаном возникает супрессия показателей системы иммунитета, требующая применения фармакологических средств для ее устранения с целью профилактики и лечения возможных инфекционных осложнений и заболеваний.

3. После острого отравления тетрахлорметаном для восстановления иммунных реакций целесообразно наряду со средствами специфической терапии (α -токоферола ацетата, унитиола) применять иммуностимуляторы (полиоксидоний или имунофан).

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдрашитова, Н.Ф. Состояние эритроцитарной системы и ПОЛ-окислительной активности у больных хроническим бронхитом, вдыхавших и не вдыхавших озон / Н.Ф.Абдрашитова, Ю.А.Романов // Бюлл. эксперим. биол. и мед.-2001.- Т. 132.- №9. – С.317-319.
2. Агапов, В.И. Изменение неспецифической и иммунологической резистентности при остром отравлении норборнаном / В.И.Агапов, В.Д.Гладких, В.В.Кириянов// Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты. – СПб.: ООО «Изд. Фолиант», 2004.- С. 74-75.
3. Арчаков, А.И. Оксигенация биологических мембран / А.И.Арчаков. – М.: Медицина, 1993.- С.145-159.
4. Ахматова, М.А. Исследование биологических мембран при регламентировании содержания химических веществ в окружающей среде / М.А.Ахматова, Н.В.Савватеев, Л.А.Тиунов // Гиг. труда и проф. забол. – 1982. - №10. - С.55-57.
5. Бажигитова, Б.Б. Динамика иммунологических показателей у больных с частыми повторными заболеваниями респираторного тракта в результате применения имунофана / Б.Б. Бажигитова, А.А. Шортанбаев // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. - 2003. - Т.5.- №2. – С. 205.
6. Базарный, В.В. Действие некоторых иммуномодуляторов на гемопоэз / В.В.Базарный, А.П. Ястребов // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1993.- Т. 115.- №2. -С. 53-54.
7. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л.Беленький.- 2-е изд. – М.: Медицина, 1963. – 235 с.
8. Беликов, В.Г. Коррекция тимогеном нарушений физиологических механизмов регуляции иммуногенеза при остром отравлении

токсичными химическими веществами: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук / В.Г. Беликов. – Саратов, СГМУ. -2001.- С.83-95.

9. Белокрылов, Г. А. Влияние веществ полипептидной природы, выделенных из тимуса и коры головного мозга, на первичный иммунный ответ у мышей к тимусзависимому и тимуснезависимому антигену / Г.А.Белокрылов, В.Х.Хавинсон, В.Г. Морозов // Журн. микробиол. и эпидемиол. - 1980. -№3. - С.97-99.
10. Белокрылов, Г.А. Левамин и церебролизин как иммуностимуляторы / Г.А.Белокрылов, И.В.Молчанов // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1991.- № 2.- С.165-166.
11. Белокрылов, Г.А. Сходство иммуно-, фагоцитозмодулирующих и антитоксических свойств дипептидов и составляющих их аминокислот / Г.А.Белокрылов, О.Я.Попова, Е.И.Сорочинская // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1999.- Т.127.- № 6.-С. 674-676.
12. Брызгина, Т.М. Изменение бласттрансформации лимфоцитов крови крыс в условиях экспериментального воздействия на печень / Т.М.Брызгина, Т.В. Мартынова // Физиолог. журн. – Киев, 1985. – Т.31.- №3. – С.278 - 281.
13. Брызгина, Т.М. Изменение кооперации Т- и В-лимфоцитов при иммунном ответе на эритроциты барана на фоне поражения печени четыреххлористым углеродом / Т.М. Брызгина // Физиол. журн. –1989. - №1. – С.25-29.
14. Брызгина, Т.М. Роль нарушения процессов кооперации Т- и В-лимфоцитов и активности антигеннеспецифических супрессоров в изменении иммунного ответа на тимусзависимый антиген при токсическом поражении печени / Т.М.Брызгина, Т.В. Мартынова, И.И.Алексеева // Иммунология и аллергология. – 1990. - №24. – С.111-113.
15. Брызгина, Т.М. Активность неспецифических хелперов и супрессоров у кроликов в динамике первичного и вторичного иммунного ответа на

- эритроциты барана в условиях применения четыреххлористого углерода / Т.М. Брызгина, Т.В. Мартынова И.И. Алексеева // Иммунология. – 1992. - №1. – С. 43-45.
16. Брюхин, Г. В. Антителообразующая способность клеток селезенки потомства крыс с хроническими поражениями печени / Г.В.Брюхин, Г. И.Михайлова // Физиол. журн. -1989.-Т. 35.-№2.- С. 97-99.
 17. Брюхин, Г.В. Интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа у потомства крыс с хроническим поражением печени / Г.В.Брюхин, Г.И. Михайлова // Физиол. журн. - Киев, 1990. - Т.36. - № 6. - С.94-100.
 18. Брюхин, Г.В. Интенсивность Fc-зависимого фагоцитоза перитониальных макрофагов и моноцитов крови у потомства крыс с хроническим поражением печени / Г.В.Брюхин, А.Ю. Грачев // Физиол. журн. –1991. – Т.37. - №6. – С.91-94.
 19. Бурмистров, С.О. Нарушение активности свободнорадикальных процессов в ткани яичников и мозга крыс при хронической ингаляции толуолом и диоксином / С.О. Бурмистров, А.В.Арутюнян, М.Г.Степанов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2002. – Т.132.- №9. – С.257-262.
 20. Бухарин, О.В. Способность микроорганизмов к инаktivации бактерицидного действия тромбоцитарного катионного белка (β -лизина) / О. В. Бухарин, К.Г.Сулейманов, О.П.Чернова // Бюл. экспер. биол. и мед.- 1998.- №7.- С.66-67.
 21. Валеева, И.Х. Влияние димесфосфона и ксидифона на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крыс, длительно получавших преднизолон / И.Х. Валеева, Л.Е.Зиганшина, З.А.Бурнашева // Эксперим. и клин. фармакология.- 2002.- Т.65.- №2.- С. 40-43.
 22. Василенко, О.А. Характер и механизмы нарушения неспецифической резистентности организма и специфической иммунной защиты при

- остром отравлении арсенитами: Автореф.дисс. ... канд. мед. наук / О.А. Василенко; СГМУ. – Саратов, 2004.- С.65-73.
23. Венгеровский, А.И. Эффективность ферментиндуцирующих средств при экспериментальном поражении печени тетрахлорметаном / А.И. Венгеровский, И.М.Седых, А.С.Саратиков // Эксперим. и клин. фармакол. - 1993. - Т.56.- № 5. - С. 47-49.
 24. Виноградов, В.М. Фармакология (общая, частная и основы клинической) /В.М.Виноградов, Е.В.Гембицкий, Е.А.Мухин.- Под ред. В.М.Виноградова.- 2 изд., доп. и перераб.– Л.: Изд-во ВМА, 1986. – 515 с.
 25. Германчук, В.Г. Нарушения регуляции физиологических механизмов иммуногенеза при остром отравлении нитрилами: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук / В.Г. Германчук ; СВирХБЗ. - Саратов,2000.- С.76 - 82.
 26. Голиков, С.Н. Общие механизмы токсического действия / С.Н. Голиков, И.В.Саноцкий, Л.А.Тиунов // -М.: Медицина, 1986. –280 с.
 27. Гордиенко, С.М. Приемлемый для клинической практики метод оценки активности естественных и антителозависимых киллерных клеток / С.М. Гордиенко // Лаб. дело.-1983.-№9.-С. 45-48.
 28. Горизонтов, П. Д. Стресс. Система крови в механизме гомеостаза. Стресс и болезни. / П.Д. Горизонтов// Гомеостаз. – М.:Медицина, 1981.- С. 538-573.
 29. Гребенюк, А.Н. Общие механизмы иммуноцитологических реакций при химических воздействиях / А.Н.Гребенюк, О.И.Романенко // Сб. материалов XIII научн. докл. молодых ученых и специалистов военно-медицинской академии. - СПб., 1996.- С. 21-22.
 30. Гребенюк, А.Н. Нейтрофил и экстремальные воздействия / А.Н.Гребенюк, А.Е.Антушевич, В.Ф.Беженарь / Под ред. А.Н. Гребенюка и В.Г. Бовтюшко. – СПб., 1998.- 215 с.
 31. Гублер, Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е. В. Гублер . – Л.: Медицина, 1978.-296 с.

32. Давыдова, Е.В. Состояние лейкоцитарной защиты при экспериментальных отравлениях карбофосом и дихлорэтаном / Е.В.Давыдова, О.И.Романенко, В.В.Шилов // Актуальные проблемы теоретической и прикладной токсикологии: Тез. Докл. 1 Всероссийской конференции токсикологов.- СПб, 1995.- С. 44.
33. Давыдова, Е.В. Состояние нейтрофилов периферической крови в условиях острых воздействий токсикантов различных групп / Е.В.Давыдова, С.М.Алексеев, Е.Ю.Бонитенко.- Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты. – СПб.: ООО «Изд. Фолиант», 2004а. - С.74-75.
34. Давыдова, Е.В. Лейкоцитарная защита при острых отравлениях липофильными ксенобиотиками / Е.В.Давыдова, Е.Ю.Бонитенко, О.И.Романенко.- Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты. – СПб.: ООО «Изд. Фолиант», 2004б. - С. 74-75.
35. Денисенко, П.П. Роль холинореактивных систем в регуляторных процессах / П.П.Денисенко. - М: Медицина,1980.- 296 с.
36. Диксон, М. Ферменты / М.Диксон, Э. Уэбб. Пер. с англ. - М.: Мир, 1982.- Т. 2.- 806 с.
37. Елизарова, Н.Л. Опиоиды в составе Т-активина: β -эндорфин / Н.Л.Елизарова, В.Я.Арион, И.В.Зими́на // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6.- № 2. - С. 204.
38. Елькин, А.И. Эффективность гемосорбции на синтетических сорбентах при отравлении 1,2-дихлорэтаном / Д.П.Елизаров, В.А.Даванков, С.С.Катаев // Токсикол. вестн. - 2004. - №2. – С.6-8.
39. Ефремов, А. М. Исследование биотрансформации нитрила акриловой кислоты в организме животных / А.М.Ефремов // Здравоохран. Белоруссии.- 1976.- №7.- С. 85-86.
40. Забродский, П.Ф. Влияние холинергической стимуляции на формирование гиперчувствительности замедленного типа /

П.Ф.Забродский, А.К.Мышкина // Фармакол. и токсикол.- 1990.-№ 6.- С. 46-48.

41. Забродский, П.Ф. Механизмы иммуотропных эффектов фосфорорганических соединений / П.Ф. Забродский // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1993.-Т 116.-№8.-С. 181-183.
42. Забродский, П. Ф. Изменение показателей неспецифической резистентности организма, гуморальных и клеточных иммунных реакций после острого отравления ацетонитрилом / П. Ф. Забродский, В. Ф. Киричук // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1998.- Т 125.- №5.-С. 548-550.
43. Забродский, П. Ф. Влияние тиосульфата натрия на неспецифическую резистентность организма и иммунные реакции при остром отравлении акрилонитрилом / П. Ф. Забродский, С. А. Ромашенко // Эксперим. и клин. фармакол. – 1998.-Т 61.-№5.-с. 56-58.
44. Забродский, П.Ф. Механизмы иммуотропных эффектов акрилонитрила / П.Ф.Забродский, В.Ф.Киричук, В.Г.Германчук.// Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000.-Т. 129.- №5.-С. 547-549.
45. Забродский, П.Ф. Роль антихолинэстеразного механизма в супрессии антителиобразования при острой интоксикации фосфорорганическими соединениями /П.Ф.Забродский, В.Ф. Киричук, В.Г.Германчук // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001.-Т 131.- №5.-С. 551-553.
46. Забродский, П.Ф. Влияние ксенобиотиков на иммунный гомеостаз. / Общая токсикология. / П.Ф. Забродский// Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. - М.: Медицина, 2002. – С. 352-384.
47. Забродский, П.Ф. Влияние имунофана на показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов после острых отравлений токсичными химическими веществами /П.Ф.Забродский, В.Г.Германчук, М.Л.Нодель // Эксперим. и клин. фармакология.-2004а. – Т. 67 .- № 5.-С. 28-30.

48. Забродский, П.Ф. Влияние тетрахлорметана на показатели системы иммунитета / П.Ф.Забродский, В.Ф. Киричук, В.Г.Германчук // Бюл. эксперим. биол. и мед.. – 2004б.-Т. 137.- №1.-С. 56-58.
49. Забродский, П.Ф. Иммуотропные свойства холинергических веществ Под ред. П.Ф. Забродского / П.Ф.Забродский, В.Г.Лим, Г.М.Мальцева. – Саратов: Изд. «Научная книга», 2005. – 251 с.
50. Забродский, П.Ф. Иммуотоксикология ксенобиотиков / П.Ф.Забродский, В.Г.Мандыч. - Саратов: Изд. СВИБХБ, 2007.- 420 с.
51. Забродский, П.Ф. Нарушения иммунного гомеостаза и антиоксидантной системы при сочетанном действии 1,2-дихлорэтана и тяжелой механической травмы и их коррекция ацетилцистеином и полиоксидонием /П.Ф.Забродский, В.Ф. Киричук, Д.Ю.Иванов// Эксперим. и клин. фармакология. – 2007. – Т. 70.- № 2. – С. 56-58.
52. Зарубина, И.В. Антиоксидантная защита головного мозга при острой гипоксии беметилом /И.В.Зарубина, О.П.Миронова // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.133.- №2. – С. 165-167.
53. Идова, В.Г. Иммунная реакция у мышей при психоэмоциональном напряжении в условиях снижения синтеза серотонина в мозге /В.Г.Идова, М.А.Чайно, Л.В.Девоино // Сб. докл. Акад. наук, 2004. - Т. 398.- №1. – С. 132-134.
54. Ильичевич, Н.В. Иммунологическая реактивность организма в условиях экспериментальных воздействий на печень / Н.В.Ильичевич, И.Н.Алексеева, Т.М.Брызгина// Иммунология. – 1984. - №5. – С.65-67.
55. Каган, Ю.С. Использование индукции цитохрома Р-450 как один из новых принципов терапии отравлений фосфорорганическими инсектицидами / Ю.С Каган., Н.В.Кокшарева, Л.М.Овсянникова, // Вестн. АМН СССР.-1983.-№ 8.-С. 55-57.
56. Караулов, А.В. Молекулярно-биологическое обоснование применения имунофана в клинической практике /А.В.Караулов// Лечащий врач. – 2000. – № 4. - С.46-47.

57. Караулов, А.В. Клинико-иммунологическая эффективность применения имунофана при оппортунистических инфекциях /А.В.Караулов// Лечащий врач. – 2000. - №5-6. - С. 28-29.
58. Караулов, А.В. Оценка различных методов иммуномониторинга при проведении иммунокоррекции /А.В.Караулов, В.Ф.Ликов, И.В.Евстигнеев// Аллергология и иммунология.- 2005. – Т.6.-№2.- С.136-137.
59. Киричук, В.Ф. Физиология крови / В.Ф.Киричук. – Саратов: изд-во Саратовского ГМУ, 1999. - 106 с.
60. Клинецвич, А.Д. Сравнительный анализ изменений белкового обмена, перекисного окисления липидов и системы гемостаза при действии полихлорированных дибензо-п-диоксинов и радиации / А.Д.Клинецвич, С.И.Баулин, В.Ф.Головков // Докл. АН.- 1994.- Т.335.- №3.- С. 378-381.
61. Кожемякин, М.И. Этиопатогенез отравлений компонентами технических жидкостей / М.И.Кожемякин, Ю.Ю.Бонитенко, Л.И. Иванова // Воен.-мед. журн. - 1992. - №9. - С.36-39.
62. Козлов, В.А. Активность цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ и функции иммунокомпетентных клеток /В.А.Козлов, Г.Ю.Любимов, Н.Н.Вольский//Вестн. АМН СССР.-1991.-№ 12.-С. 8-13.
63. Козлов, В.А. Участие интерлейкина-1 в развитии Th1- и Th2-зависимых вариантов хронической реакции «трансплантат против хозяина» / В.А.Козлов, И.В.Сафронов, О.Т.Кадаева // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.132.- №8. – С. 185-187.
64. Конопля, А.И. Изучение иммуномодулирующего фактора выделяемого клетками селезенки при токсическом поражении печени / А.И. Конопля, В.Е. Козлов, В.Е. Ивакин // Пат. физиол. – 1985. - №6. – С.45-50.
65. Конопля, Е.Н. Развитие иммунного ответа при сочетанном действии на организм гепатотропных ядов и высокой внешней температуры /

- Е.Н.Конопля, Л.Г. Прокопенко // Пат. физиол. и эксперим. терап. - 1994.-№12.-С. 27-31.
66. Константинов, Б.А.. Иммунореабилитация в кардиохирургии на примере больных с инфекционным эндокардитом /Б.А.Константинов, Л.И.Винницкий, В.А.Иванов // Inter. J. Immunorehabilitation. – 2000. - Vol. 2.- №1. - Р. 146-151.
67. Корнева, Е.А. Нарушение нейрогуморальной регуляции функций иммунной систем / Е.А.Корнева // Вест. АМН СССР.- 1990.- №11.- С. 36-42.
68. Коробейникова, Э.Н. Фотометрический метод определения малонового альдегида / Э.Н. Коробейникова // Лаб. дело. - 1989. - №7. - С.8-10.
69. Кузнецов, В.П. Коррекция лейкоинфероном иммуно-дефицитных состояний при экспериментальных токсических и медикаментозных гепатитах / В.П.Кузнецов, ДЛ.Беляев, Ю.Г.Сливинская // Тез. докл. I съезда иммунологов России.- Новокузнецк, 1992 г.- С.259.
70. Курашов, О.В. Применение ацетилцистеина в комплексном лечении больных с острым отравлением 1,2-дихлорэтаном / О.В. Курашов, В.А. Троцевич // Врачебное дело. - 1992. - №10. - С.109-111.
71. Куценко, С.А. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита /С.А. Куценко. - СПб.: Изд. «Фолиант», 2004. – 528 с.
72. Лакин, Г.Ф. Биометрия./ Г.Ф. Лакин. - М.: Высш. шк., 1980. - 293 с.
73. Лебедев, В.В. Имунофан - синтетический пептидный препарат нового поколения /В.В.Лебедев, В.И.Покровский// Вестник Российской АМН.- 1999.- №4.- С. 56-61.
74. Лебедев, В.В. Имунофан – синтетический пептидный препарат нового поколения: иммунологические и патогенетические аспекты клинического применения / В.В.Лебедев // Иммунология.-1999.-№1.- С. 25-30.
75. Лебедев, В.В. Фармакологическая иммунореабилитация в системе специфической иммунопрофилактики и вакцинотерапии: современные

- подходы и перспективы развития /В.В.Лебедев, А.В.Данилина, И.В.Сгибова// Inter. J. Immunorehabilitation. – 2000. - Vol. 2.-№1. - Р. 146-151.
76. Ледванов, М. Ю. Введение в клиническую иммунологию. / М. Ю. Ледванов, В. Ф. Киричук. - М: Медицина, 1996.- 141 с.
 77. Лим, В.Г. Нарушение неспецифической резистентности организма и иммунного статуса при острых отравлениях спиртами и хлорированными углеводородами и их коррекция: Автореф. дисс. ... докт. мед. наук / В.Г.Лим ; СГМУ. – Саратов,2006.- 350 с.
 78. Лужников, Е.А. Острые отравления: Руководство для врачей. 1-е изд. / Е.А. Лужников, Л.Г. Костомарова. - М.:Медицина, 1989. – 434 с.
 79. Лужников, Е.А. Острые отравления: Руководство для врачей. 2-е изд., перераб и доп. / Е.А. Лужников, Л.Г. Костомарова.- М.:Медицина. 2000. – 434 с.
 80. Лукьянова, Л.Д. Об особенностях нарушений энергетического обмена при травматическом шоке и возможности их фармакологической коррекции / Л.Д.Лукьянова, Н.Н.Михайлова, Д.В.Фоменко // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.132.- №9. – С. 263-267.
 81. Маркова, И.В. Клиническая токсикология детей и подростков./ И.В. Маркова, В.В.Афанасьева, Э.К.Цыбульский. – СПб: Изд. «Интермедиа», 1998. – 304 с.
 82. Мартынова, Т.В. Изменение активности антигеннеспецифических Т-хелперов и Т-супрессоров у кроликов в условиях поражения печени четыреххлористым углеродом / Т.В. Мартынова, Т.М. Брызгина, С.И.Павлович // Физиол. журн. – 1991. – Т.37.-№1. – С.74-80.
 83. Машковский, М.Д. Лекарственные средства Ч.2. / М.Д. Машковский, 12-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2001. - 205 с.
 84. Медуницин, Н.В. Регуляция вакцинального иммунитета /Н.В.Медуницин // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 2. - С. 137-139.

85. Меерсон, Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца /Ф.З.Меерсон.- М.: Медицина-1984.- 272 с.
86. Михайлова, М.Н. Использование имунофана для коррекции изменений гематологических показателей, вызванных циклофосфаном / М.Н. Михайлова, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. - 2003. - Т.5. - №2. - С. 230.
87. Михальчик, Е.В. Профилактическое и лечебное действие комплексного антиоксидантного препарата при ожоговой травме у крыс / Е.В. Михальчик, А.В.Иванова, М.В.Ануров // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 2004. - Т.138.- №9. - С.299-301.
88. Молотков, А.О. Нарушения физиологических механизмов регуляции системы иммунитета при остром отравлении фосфорорганическим соединением карбофосом: Автореф. Дисс. ... канд. мед. наук /А.О.Молотков; РГМУ.- М., 2002.-24 с.
89. Мутускина, Е.А. Некоторые показатели стресс-реакции организма на разных этапах постреанимационного периода / Е.А. Мутускина, Л.А. Багдасаров, И.Е. Трубина // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.133.- №1. – С. 38-41.
90. Нестерова, И.В. Стратегия и тактика иммунотерапии вторичных иммунодефицитных состояний с инфекционным синдромом /И.В.Нестерова // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6.- № 2. - С. 139-140.
91. Петров Р.В. Миелопептиды и иммунный статус /Р.В. Петров, А.А.Михайлова, Л.А.Фанина // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6.- № 2. - С. 204.
92. Плужников Н.Н. Некоторые аспекты антирадикальной защиты мембран /Н.Н.Плужников, Л.С.Бакулина. В.И.Легеза // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины / Под общей ред. Н.Н.

Плужникова (Научн. тр./ НИИЦ (МБЗ) ГосНИИИ военной медицины, Т.4). – СПб., 2003. - С. 123-139.

93. Попова, Е.А. Иммунофармакотерапия имунофаном в лечении больных с гнойными менингитами /Е.А.Попова, И.И.Лисун// Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. – 2003.- Т. 5.- №2.- С. 252.
94. Прокопенко, Л.Г. Влияние четыреххлористого углерода на выделение иммуностимулирующего фактора спленоцитами животных / Л.Г. Прокопенко, А.И. Конопля // Фармакол. и токсикол. – 1982. - №6. – С.61-65.
95. Прокопенко, Л.Г. Иммунорегуляторные факторы сыворотки при токсическом поражении печени / Л.Г. Прокопенко, Н.Н. Кедровская // Пат. физиол. и эксперим. терап. – 1983. - №4. – С.56-61.
96. Прокопенко, Л.Г. Изменение функции иммунорегуляторных клеток под влиянием фактора селезенки животных, отравленных гепатотропным ядом / Л.Г. Прокопенко // Пат. физиол. и эксперим. терап. – 1985. - №4. – С.72-76.
97. Прокопенко, Л.Г. Взаимосвязь активности протеолитических ферментов крови и их ингибиторов с образованием медиатора иммунного ответа при токсическом поражении печени / Л.Г. Прокопенко, Н.Н. Кедровская, В.Е. Козлов; Курский ГОС. Мед. институт. – Курск, 1988. – 16 с.- Деп. В ВИНТИ 18.05.87, №3827-В88.
98. Покровский, А.А. Биохимические методы исследования в клинике. Справочник / А.А. Покровский. - М.: Медицина, 1969. - 651 с.
99. Ратькин, А.В. Гепатопротекторы препятствуют токсическому действию циклофосфана на печень крыс при CCl₄-гепатите / А.В.Ратькин, А.С.Саратиков, В.С.Чучалин // Эксперим. и клин. фармакология.-2005.- Т.68.- № 2.- С.47-50.

100. Ремезов, А. И. Методы определения естественной (неспецифической) резистентности организма / А. И. Ремезов, Г. А. Башмаков. - Л.: Медицина, 1976. - 65 с.
101. Ройт, А. Иммунология Пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д.Мейл - М.: Мир, 2000. - 582 с.
102. Романенко, О.И. Лейкоцитарная защита при острых отравлениях /О.И.Романенко, А.Н.Гребенюк // Морской мед. журн. –1997.- Т.4.- №4.- С. 8-11.
103. Ротенберг, Ю.С. Классификация ксенобиотиков по локализации их действия на ферментные системы митохондрий / Ю.С.Ротенберг // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1982.- №9.-С. 42-45.
104. Рыболовлев, Ю.Р. Прогнозирование действия ксенобиотиков на человека / Ю.Р. Рыболовлев // Фармакол. и токсикол. – 1982. - №1. - С.110-114.
105. Саватеев, Н.В. Характеристика токсического действия веществ, представляющих опасность при разрушении промышленных объектов / Н.В. Саватеев, С.А. Куценко. - Л.: ВмедА им. С.М. Кирова, 1982.- 44 с.
106. Саватеев, Н.В. Ядовитые вещества, выделяющиеся при разрушении промышленных объектов, и мероприятия по оказанию медицинской помощи пострадавшим / Н.В. Саватеев, С.А. Куценко // Воен.-мед. журн. – 1993.- №6.-С. 36-40.
107. Савлуков, А.И. Влияние триметил-5-гидроксиурацила и витамина Е на морфологическое состояние печени крыс при отравлении дихлорэтаном Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты / А.И. Савлуков, В.А. Мышкин, Р.Б. Ибатуллина. – СПб.: Изд. «Фолиант», 2004. - С.288-289.
108. Саприн, А.Н. О взаимосвязи активности цитохрома Р-450 в лимфоцитах с их иммунной функцией / А.Н. Саприн., А.В. Караулов, Ю.И. Хроменков // Докл. АН СССР.-1982.-Т. 267.- № 5.-С. 1276-1280.

109. Свирид, В.Д. Синтез специфических белков в клетках некоторых органов белых мышей при действии температурного фактора внешней среды /В.Д.Свирид // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2002. – Т.133.- №3. – С. 331-336.
110. Семина, О.В. Стимуляция тимогеном (GW-дипептидом) восстановления кроветворения у облученных и подвешенных к действию цитостатика мышей /О.В. Семина, В.И. Семенец, В.И. Дейгин// Иммунология.- 1997.-№1.- С.33-35.
111. Сидельникова, Н. М. Характер и механизмы нарушения неспецифической резистентности организма и специфической иммунной защиты при остром отравлении веществом ВЗ: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук / Н.М.Сидельникова; СГМУ – Саратов,2004.- С.19-22..
112. Смахтин, М.Ю. Иммуномодулирующие факторы спленоцитов в условиях воздействия этанола и тетрахлорметана / М.Ю. Смахтин, И.И. Горяйнов, А.И. Конопля // Тез. докл. науч. конф. РАМН. - Москва, 1994. - С.425-426.
113. Смахтин, М.Ю. Влияние тетрахлорметана и этанола на выделение спленocyтocyтocyтами крыс иммуномодулирующих факторов / М.Ю. Смахтин, А.И. Конопля, Г.А. Чалый // Эксперим. и клин. фармакол. - 1995. - №4. - С.48-50.
114. Смирнов, В.С. Иммунотоксические эффекты химических ксенобиотиков / В.С. Смирнов, С.В. Петленко, А.Е. Сосюкин // Иммунодефицитные состояния / Под. ред. В.С. Смирнова и И.С.Фрейдлина.- СПб: «Фолиант», 2000.- С. 337-367.
115. Сосюкин, А.Е. Влияние ксенобиотиков на состояние нейтрофилов / А.Е. Сосюкин, Г.А Софронов, А.Н. Гребенюк // Морской мед журн.- 1997.- Т.4.- №8.-С. 26-31.

116. Сухих, Г.Т. Интерлейкин-2 и его возможная роль в патогенезе стрессорных изменений иммунной системы / Г.Т. Сухих, В.В Малайцев, И.М. Богданова // Докл. АМ СССР.- 1984.-Т. 278.- № 3.-С. 762-765.
117. Тиунов, Л.А. Четыреххлористый углерод. 1,2-дихлорэтан. Хлорпроизводные алканов / Л.А. Тиунов // Вредные химические вещества. Углеводороды. Галогенпроизводные углеводородов; Справ. изд./ Под. ред. В.А. Филова – Л.: Химия, 1990.- С. 337-351.
118. Урбах, В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В. Ю. Урбах. – М.: Медицина, 1975. - 295 с.
119. Утешев, Б. С. О некоторых методологических вопросах скрининга иммуотропных средств / Б. С. Утешев // Фармакол. и токсикол. - 1984. - №3. - С.5-13.
120. Фримель, Х. Основы иммунологии Пер. с нем. / Х. Фримель, Й. Брок. – М.: Мир, 1986. - 254 с.
121. Хабибуллаев, Б.Б. Коррекция вторичных иммунодефицитов с помощью металлсодержащих соединений хитозана / Б.Б. Хабибуллаев // Аллергол. и иммунол. – 2005. – Т.6.- № 2. - С.207.
122. Хаитов, Р. М. Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса / Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин // Иммунология. – 1995а.- №4.- с. 3-8.
123. Хаитов, Р.М. Экологическая иммунология / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов. - М.: Изд-во ВНИРО, 1995б.- 219 с.
124. Хаитов, Р. М. Иммунология / Р.М. Хаитов, Г.А.Игнатьева, И.Г.Сидорович. – М.: Медицина, 2000. - 430 с
125. Хаитов, Р.М. Иммунология. / Р.М. Хаитов, Г.А.Игнатьева, И.Г.Сидорович. – 2-е изд., перераб. и доп. -М.: Медицина, 2002.- 536 с.
126. Хаитов, Р.М.. Экологическая иммунология / Р.М.Хаитов, Б.В.Пинегин, Х.И. Истамов. - М.: Изд-во ВНИРО, 2005.- 219 с.
127. Хейхоу, Ф. Г. Дж. Гематологическая цитохимия / Ф. Г. Дж. Хейхоу, Д.Кваглино. – М.: Медицина, 1983.- 319 с.

128. Холмухамедова, Н.М. Фосфо- и гликолипидный спектр органов иммунной системы при экспериментальном хроническом токсическом гепатите / Н.М. Холмухамедова, А.И. Николаев, З.К. Зиямутдинова // Мед. журн. Узбекистана. - 1991. - № 3. - С.56-61.
129. Чекнёв, С.Б. Активность лимфоцитов человека в присутствии соединений, содержащих углеводные компоненты /С.Б.Чекнев, Е.Е.Бабаева // Бюл. эксперим. биологии и мед.-2004.-Т. 138.- №11.-С. 555-558.
130. Чиркова, В.М. Четыреххлористый углерод / В.М. Чиркова.—Л.: Химия, 1983.- 20 с.
131. Шилов, Ю.И. Влияние гидрокортизона на функции фагоцитирующих клеток брюшной полости крыс в условиях блокады β -адренорецепторов / Ю.И.Шилов, Д.В.Ланин // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.131.- №10. – С.439-442.
132. Ширинский, В.С.. Проблемы иммуностимулирующей терапии /В.С.Ширинский, Е.А.Жук // Иммунология.-1991.-№ 3.-С. 7-10.
133. Ширшев, С.В. Зависимость внутриклеточного уровня цАМФ интактных спленоцитов от популяционного состава клеточной суспензии и активности циклооксигеназы / С.В. Ширшев // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1998. - №6. - С.666-669.
134. Шуршалина, А.В.. Соотношение уровней цитокинов при генитальном герпесе в различные фазы инфекционного процесса /А.В.Шуршалина, В.Н.Верясов, Г.Т.Сухих // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.132.- №7. – С. 59-61.
135. Щеглова, М.Ю. Клиническая эффективность применения иммунофана у больных бронхиальной астмой /М.Ю.Щеглова, Г.А.Макарова // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. – 2003.- Т. 5.- №2.- С. 222.

136. Юшков, Б.Г. Влияние иммуностимуляторов на регенерацию печени /Б.Г.Юшков, И.Г.Данилова, Ю.С.Храмцов// Эксперим. и клин. фармакол.- 2006.-Т.69. - №1. - С.53-55.
137. Abbas, A.K. Functional diversity of helper T-lymphocytes / A.K. Abbas, K.M Murphy, A. Sher // Nature. – 1996. – Vol.383. – P.787–793.
138. Ademuyiva, O. Vitamin C in CCl₄ hepatotoxicity / O. Ademuyiva, O.Adesanya, O.R. Ainwon // Hum. and Exp. Toxicol. - 1994. - Vol.13.- №2. – P.107-109.
139. Aquith, B. In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection / B. Aquith, Y. Zhang, A.J. Mosley, C.M. de Lara // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-2007.- Vol. 104.- № 19. – P. 8035-8040.
140. Basu, S. Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients / S. Basu // Toxicology. – 2003. -.Vol. 189. - № 1-2. – P. 113-127.
141. Bishayee, A. Carrot aqueous extract protectijn against hepatic oxidative stress and lipid peroxidation induced by acute carbon tetrachloride intoxication in mice / A. Bishayee, M. Chatterjee // Fitoterapia. - 1993. - Vol.64.- №3. - P.261-265.
142. Botsoglou, N.A. Effect of long-term dietary administration of Oregano on the alleviation of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in rats / N.A. Botsoglou, I.A. Taitzoglou, E. Botsoglou // J. Agric. Food Chem. – 2008.- Vol. 28.- № 7.- P. 110-115.
143. Brautbar, N. Industrial solvents and liver toxicity: risk assessment, risk factors and mechanisms / N. Brautbar, J. Williams 2nd // Int. J. Hyg. Environ. Health. – 2002. -.Vol. 205.- № 6. – P. 479-491.
144. Calabrese, E.J. A review of the role of tissue repair as an adaptive strategy: why low doses are often non-toxic and why high doses can be fatal / E.J. Calabrese, H.M. Mehendale // Food Chem. Toxicol. –1996. -.Vol. 34.- № 3. – P. 301-311.

145. Chen, G. J. Ethanolmodulation of tumor necrosis factor and gamma interferon production by murine splenocytes and macrophages / G. J. Chen, D. S. Huang, B. Watzl // *Life Sci.* – 2007. - Vol. 52.- № 3.- P. 1319–1326.
146. Claman, H.N. Corticosteroids as immunomodulators. Immunomodulation drugs/ H.N. Claman // *Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* – 1993.-Vol. 685. –P. 288-292.
147. Dalu, A. Efficient tissue repair underlies the resiliency of postnatally developing rats to chlordecone + CCl₄ hepatotoxicity / A. Dalu, H.M. Mehendale // *Toxicology.* –1996. -.Vol. 117. - № 1-3. – P. 29-42.
148. Delves, P.J. The immune system (Part 1) / P.J. Delves, I.M. Roitt // *N. Engl. J. Med.* - 2000. – Vol.343.- №2. – P.37-49.
149. Descotes, J. Immunotoxicology of drugs and chemicals /J.Descotes. – Amsterdam-N. Y-. Oxford: Elsvier, 1986. – 400 p.
150. Dhabhar, F. S. Stress –induced in blood leukocyte distribution: A role of adrenal steroid hormones / F. S. Dhabhar, A. H. Miller, B. S. Mc Even // *J. Immunol.* - 1996. – Vol.157. - №4. - P.1638-1644.
151. Durant, S. In vivo effects of catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis / S. Durant // *Cell Immunol.* - 1986. - Vol.102.- №1. - P.136-143.
152. Dyakonova, V.A. Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells / V.A. Dyakonova, V.A Dambaeva., S.V. Dambaeva // *Int. Immunopharmacol.* – 2004.- Vol. 154.- №13. – P. 1615-1623.
153. Elsbach, P. Oxygendependent and oxygenindependent mechanisme of microbiological activity of neutrophilis / P. Elsbach, J. Weise // *Immunol.*- 1985.- Vol. 11.- № 3-4. - P. 159-163.
154. Elsisi, A.E. Vitamin A potentiates the hepatotoxicity of carbon tetrachloride and allyl alcohol /A.E. Elsisi, D. Earnest, I.G. Sipes// *Toxicologist.*-1986.- Vol. 6.- N 1.- P. 111-118.
155. Farkas, D. In vitro methods to study chemically - induced hepatotoxicity: a

- literature review / D. Farkas, S.R. Tannenbaum. // *Curr. Drug. Metab.* – 2005. – Vol. 6.- №2. – P. 111-125.
156. Ferluga, J. The effect of organophosphorus inhibitors, p-nitrophenol and cytocholasin-B on cytotoxic killing of tumor cells and the effect of shaking / J. Fergula, G. L. Ashercon, E. L. Becker // *Immunol.* - 1972.- Vol. 23.- N 4. – P. 577 - 590.
 157. Ficek, W. Changes in biological processes in lymphatic cells and tissues after loading with by glycocorticoids / W. Ficek // *Bioche. Arch.*- 1997.- Vol. 13.- № 1. - P. 1 – 6.
 158. Fink, P.J. Positive selection of thymocytes / P.J. Fink, M.J. Bevan // *Adv. Immunol.* – 1995. - Vol.59 - №5. - P.99 – 133.
 159. Fleisher, T.A. Functional and molecular evaluation of lymphocytes / T.A.Fleisher, J.B. Oliveira// *J. Allergy Clin. Immunol.* – 2004. – Vol. 114. - №4. –P.227-234.
 160. French, A. R. Natural killer cells and viral infuction / A. R. French, W. M. Yokoyama // *Curr. Opin. Immunol.* - 2003. - Vol. 15. - P. 45- 99.
 161. Friedman, H. Microbial Infections, Immunomodulation, and Drugs of Abuse / H. Friedman, C. Newton, T.W. Klein// *Clin. Microb. Rev.* - 2003.- Vol. 16.- №2. - P. 209-219.
 162. Fu, Q.S. Simple menaquinones reduce carbon tetrachloride and iron (III) / Q.S.Fu // *Biodegradation.* – 2008. - Vol. 26. - № 7. - P. 225-231.
 163. Garrity, D. The activating NK/C2D receptors assembles in membrane with twosignaling dimmers into hexameric structure / D. Garrity, M.E. Call, J. Feng // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 2005. - Vol. 102. - P.7641-7646.
 164. Georgiev, V.St. Immunomodulation drugs / V.St. Georgiev, H. Yamaguchi // *Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* – 1993. - Vol.685. – 816 p.
 165. Georgiev, V.St. Cytokines. Immunomodulation drugs / V.St. Georgiev, J.E. Albright // *Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* – 1993. - Vol.685. – P.284-602.

166. Gilbert, R.V. cAMF is essential signal in the induction of antibody production by B cells but inhibits helper function of T cells / R.V. Gilbert, M.K. Hoffmann // J. Immunol. - 1985. - Vol.135. - №3. - P.2084-2089.
167. Gobba, F. The urinary excretion of solvents and gases for the biological monitoring of occupational exposure: a review / F. Gobba, S. Ghittori, M.Imdriani // Sci. Total. Environ. – 1997. - Vol. 199. - № 1-2. – P. 3-12.
168. Halaskova M. Immunotoxic effects of carbonium tetrachloride-morphological and functional changes in mice: / M. Halaskova, D. Jirova, I. Sperlirgova // Funct. and Dev. Morphol. - 1993. - Vol.3. - №1. - P.37.
169. Huang X. A metabonomic characterization of CCl(4)-induced acute liver failure using partial least square regression based on the GC/MS metabolic profiles of plasma in mice / X.Huang, L.Shao, Y.Gong // J. Chromatogr.B. Analit. Technol. Life Sci. – 2008. - Vol. 870. - № 2. - P. 178-185.
170. Husband, A. I. The immune system and integrated homeostasis. / A. I. Husband //Immunol. and Cell Biol.- 1995.- Vol. 73.- №4. - P. 377-382.
171. Iokobsen, D. Glikolat caused the acidosis in the ethylen glycol poisoning. /D. Iokobsen// Acta Med. Skand. - 1984.-Vol.216. - № 3. - P. 409-416.
172. Jerne N. K., Plaque formation in agar by single antibody producing cells / N. K. Jerne, A. A. Nordin // Sceince. - 1963. - Vol.140. - №4. - P.405.
173. Jeurissen A. T cell-dependent and -independent responses / A. Jeurissen, X. Bossuyt // J. Immunol. – 2004. – Vol. 172. - №5. – P. 2728-2729.
174. Kaminski N.E., The role of metabolism in carbon tetrachloridemediated immunosuppression. In vitro studies /N.E. Kaminski, W.D. Stevens// Toxicology. - 1992. - Vol.75. - №2. - P.175-188.
175. Kullenkampff, J. Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T-lymphocytes. / J. Kullenkampff, G. Janossy, M.F. Greanes // Brit. J. Haemat.-1977.-Vol. 36. - № 2.- P. 231-240.
176. Kimber, I. Chemical – Induced Hypersensitivity / I. Kimber // Exper. Immun.- Boca Raton; New York; London; Tokyo, 1996. - P.391-417.

177. Klingemann, H.G. Ex vivo expansion of natural killer cells for clinical applications / H.G. Klingemann, J. Martinson // *Cytotherapy*.– 2004. – Vol. 6. – P. 15-22.
178. Kutty, K. M Acetylcholinesterase in erythrocytes and lymphocytes: its contribution to cell membrane structure and function / K. M. Kutty, R. K. Chandra, S.Chandra // *Experientia*. - 1976. - Vol.32. - №3. - P.289.
179. Lanier, L. L. Natural killer cell receptor signaling / L.L.Lanier // *Curr.. Opin. Immunol.* - 2003. - Vol. 15. - P. 308-314.
180. Laskin, D.L. Sinusoidal lining cells and hepatotoxicity / D.L. Laskin // *Toxicon Pathol.* –1996. -.Vol. 24. - № 1. – P. 112-118.
181. Li, C. G. Esterases in human leucocytes / C. G. Li, R. W. Lam, L. T. Gam // *J. Histochem. Cytochem.* - 1983. - Vol.21. - №1. - P.1-12.
182. Lee, J. C. Elevated TGF- β secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired of NK cytotoxicity in cancer patients / J. C. Lee, K. M. Lee, D.W. Kim // *J. Immunol.* - 2004. -Vol. 172. - P. 7335-7340
183. Liao, W.T., Arsenic induces human keratinocyte apoptosis by the FAS/FAS ligand pathway, which correlates with alterations in nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activity / W.T. Liao., K.L. Chang, C.L. Yu // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*–2004. – Vol. 198. - №3.-P. 283-290.
184. Li, C. Y. Esterases in human leucocytes / C. Y. Li, R. W. Lam, L. T. Gam // *J. Histochem. Cytochem.* - 1973. - Vol. 21. - №1. - P. 1-12.
185. Li, Q. The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells / Q Li, T.Kawada // *Cell. Mol. Immunol.* – 2006. - Vol. 3. - №3. – P. 171-178.
186. Lieber, C.S. Pathogenesis and treatment of liver fibrosis in alcoholics: 1996 update / C.S. Lieber // *Dig. Dis.* –1997. -.Vol. 15. - № 1-2. – P. 42-66.
187. Lieber, C.S. Prevention and treatment of liver fibrosis based on pathogenesis / C.S. Lieber // *Alcohol. Clin. Exp. Res.* –1999. -.Vol. 23. - № 5. – P. 944-949.
188. Loose, L.D. Immunotoxicology-1985 / L.D. Loose // *Year Immunol*, 1985-1986. - Vol.2. - 1986. - P.365-370.

189. Louis, H. Modulation of liver injury by interleukin-10 / H. Louis, O. Le Moine, M. Goldman // *Acta Gastroenterol. Belg.* – 2003. - Vol. 66. - № 1. – P. 7-14.
190. Luster, M. J. Molecular and cellular basis of chemically induced immunotoxicity / M. J. Luster, J. A. Blank, J. H. Dean // *Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol.* - Vol.27. - 1987. - P.23-49.
191. Luster, M.I. Immunotoxicology: role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity / M.I. Luster, P.P. Simeonova // *Int. J. Immunopharmacol.* – 2000. -.Vol. 22. - № 12. – P. 1143-1147.
192. Luster, M.I. Immunotoxicology: role of inflammation in chemical-induced hepatotoxicity / M.I. Luster, P.P. Simeonova // *Toxicol. Lett.* – 2001. -.Vol. 120. - № 1-3. – P. 317-321.
193. Lynge, E. Organic solvents and cancer / E. Lynge, A. Anttila, K. Hemminki // *Cancer Causes Control.* –1997. -.Vol. 8. - № 3. – P. 406-419.
194. MacFarlane, A.W. Signal transduction in natural killer cells / A.W. MacFarlane, K.S. Campbell // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* - 2006. - Vol. 298. - P. 3-57.
195. Madden, K. S. Catecholamine action and immunologic reactivity /K. S. Madden, S. Livnat// *Psychoneuroimmunology*, Second Edition.- Academic Press, Inc,1991.- P. 283-310.
196. Maekawa, Y. Antigen-driven T-cell repertoire selection /Y. Maekawa, K. Yasutomo// *Crit. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 25. - № 5. – P. 59-74.
197. Manibusan, M.K. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review / M.K. Manibusan, D.A. Eastmond // *J. Environ. Sci. Health C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* – 2007. -Vol. 25. - № 3. – P. 185-209.
198. Marshak – Rothstein, A. Properties and application of monoclonal antibodies directed against determinants of the Thy – 1 locus / A. Marshak – Rothstein, P.Fink, T.GrilPay // *J.Immunol.*-1979. - Vol. 122. - P.2491-2497.

199. Maslinski, W. Muscarinic antagonist binding to intact rat thymocytes /E. Grabczewska, T. Bartgai, J. Rysewski // *Acta chem. scand.* -1990. - Vol.44. - №2. - P.147-151.
200. Masuda, Y. Learning toxicology from carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity / Y. Masuda // *Yakugaku Zasshi.* – 2006. -Vol. 126. - № 10. – P. 885-899.
201. McGregor, D. Carbon tetrachloride: genetic effects and other modes of action / D. McGregor, Lang M. // *Mutat. Res.* –1996. -.Vol. 336. - № 3. – P. 181-195.
202. Mehendale, H.M. Tissue repair: an important determinant of final outcome of toxicant-induced injury /H.M. Mehendale// *Toxicol. Pathol.* – 2005. – Vol. 33. - № 1. – P. 41-51.
203. Mehmeicic, G. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress /G.Mehmeicic, G. Ozdemirler, N. Kocak-Toker // *Exp. to col. Pathol.* –2008. - Vol. 46. - №6. - P. 135-141.
204. Miller, K. Immunotoxicology / K. Miller // *Clin. and Exp. Immunol.* - 1985. - Vol 61. - №2. - P.219-223.
205. Moore, K. Isoprostanes and the liver / K. Moore // *Chem. Phys. Lipids.* – 2003. -.Vol. 128. - № 1-2. – P. 125-133.
206. Moyer, E.S. Carbon tetrachloride replacement compounds for organic vapor air-purifying respirator cartridge and activated carbon testing a review /E.S. Moyer, S.J. Smith, G.O. Wood // *AIHAJ.* – 2001. -.Vol. 62. - № 4. – P. 494-507.
207. Neubauer, K. Sinusoidal intercellular adhesion molecule-1 up-regulation precedes the accumulation of leukocyte function antigen-1-positive cells and tissue necrosis in a model of carbontetrachloride-induced acute rat liver injury / K. Neubauer, Eichhrost S.T. // *Lab. Invest.* –1998. -.Vol. 78. - № 2. – P. 185-254.

208. Newcombe, D.S. Immune surveillance, organophosphorus exposure, and lymphomagenesis / D.S. Newcombe // *Lancet*. - 1991. - №8792. - P.539-541.
209. Nouragargh, S. Ingibition of human neutrophil degranulation by forskolin in the presence phosfodiesterases inhibitors / S. Nouragargh, J.R.S. Holt // *Eur. J. Pharmacol.* - 1986. - Vol. 222. - № 2.- P. 205-212.
210. Parker, D.C. T cell dependent B cell activation / D.C. Parker // *Annu. Rev. Immunol.* - 1993. - Vol. 11. - № 2. - P. 331-360.
211. Pereira-Filho, G. Role of N-acetylcysteine on fibrosis and oxidative stress in cirrhotic rats / G. Pereira-Filho, C. Ferreira, A. Schwengber // *Arq. Gastroenterol.* -2008. - Vol. 45. - № 2. - P. 156-162.
212. Plaa, G.L. Chlorinated methanes and liver injury: highlights of the past 50 years / G.L. Plaa // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2000. -.Vol. 40. - № 1. – P. 42-65.
213. Popp, W. New data on syncarcinogenesis in tumors of exogenous origin / W. Popp // *Zentralbl. Hyg. Umweltmed.* –1996. -.Vol. 198. - № 5. – P. 407-428.
214. Richman, D.P. Nicotinic acetylcholine receptor: evidence for a functionally distinct receptor on human lymphocytes / D.P. Richman, B.G.W. Arnason // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*-1989.-Vol. 76.- №9.-P. 4632-4635.
215. Roberts, R.A. Role of cytokines in non-genotoxic hepatocarcinogenesis: cause or effect? / R.A. Roberts, N.H. James, S. Cosulich // *Toxicol. Lett.* – 2001. -.Vol. 120. - № 1. – P. 301-306.
216. Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm / S. Romagnani // *Immunol. Today.* – 1997. - Vol. 18. - №6. - P. 263-266.
217. Rosenberg, Y.J. A pretreatment or post exposure treatment for exposure to a toxic substance by pulmonary delivery (inhaler) of a bioscavenger / Y.J. Rosenberg // *PCT Int. Appl. WO 2005000195 A2.* –2005. - Vol. 6. - №1. - P.22.
218. Roskams, T. Neuroregulation of the neuroendocrine compartment of the liver / T. Roskams, D. Cassiman // *Anat. Rec. Deskoy Mol. Cell Evol. Biol.* – 2004. -.Vol. 280. - № 1. – P. 910-923.

219. Rusinski, P. Acute poisoning with selected hepatotoxic agents: biochemistry of toxic effect, clinical symptoms and treatment / P. Rusinski, Z. Kolasinski // *Przegl. Lek.* – 2003. -.Vol. 60. - № 4. – P. 210-217.
220. Salazar-Montes, A. Potent antioxidant role of Pirfenidone in experimental cirrhosis / A. Salazar-Montes, L. Ruiz-Corro, A. Lopez-Reyes // *Eur. J. Pharmacol.* –2008. - Vol. 29.-№ 8. - P. 119-124.
221. Saracyn, M. Hepatorenal syndrome in view of experimental studies / M. Saracyn // *Pol. Mercur. Lekarski.* – 2002. -Vol. 13. - № 77. – P. 417-420.
222. Schumann, J. Pathophysiological mechanisms of TNF during intoxication with natural or man-made toxins / J. Schumann, G. Tiegs // *Toxicology.* – 1999. -.Vol. 138. - № 2. – P. 103-126.
223. Sell, S. Heterogeneity and plasticity of hepatocyte lineage cells / S. Sell // *Hepatology.* – 2000. -.Vol. 33. - № 3. – P. 738-750.
224. Singh, N. Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses / N. Singh, J.R. Perfect // *Lancet Infect. Dis.* –2007. - Vol. 7. - № 6. - P. 395-401.
225. Spoo, W. Industrial chemicals and the horse / W. Spoo // *Vet. Clin. North. Am. Equine Pract.* – 2001. -.Vol. 17. - № 3. – P. 501-515.
226. Stephen, B. P. Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol / B. P. Stephen, F. Ruping, Z. Qiang // *Toxicol. Sci.*, 2003. - Vol. 75. - №10.-P. 343-354.
227. Streets, K.L. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver / K.L. Streets, T. Wustefeld // *Cell. Mob. Biol.* – 2001. -.Vol. 47.-№ 4. – P. 661-673.
228. Sullivan, J. B. Immunological alterations and chemical exposure / J. B. Sullivan // *J. Toxicol-Clin. Toxicol.* - 1989. - Vol.27. - №6. - P.311-343.
229. Szelenyi, J.G. Acetylcholinesterase activity of lymphocytes: an enzyme characteristic of T-cells / J.G. Szelenyi, E. Bartha, S.R. Hollan // *Brit. J. Haematol.* - 1982. - Vol. 50. - № 2. - P. 241-245.

230. Tasduq, S.A. Negundoside, an irridiod glycoside from leaves of Vitex negundo, protects human liver cells against calcium-mediated toxicity induced by carbon tetrachloride / S.A. Tasduq, P.J. Kaiser, B.D. Gupta // World J. Gastroenterol. – 2008. - Vol. 14. - № 23. - P. 3693-3709.
231. Thomas, I.K. Immunosuppressive effect of an impurity of malathion: inhibition of murine side effect of an impurity of malathion inhibition of murine T and B lymphocyte responses by O,O,S-trimethyl phosphorothioate / I.K. Thomas, T. Imamura // Toxicol. and Appl. Pharmacol.-1986a.-Vol. 83.- № 3.-P. 456-464.
232. Tiefenbach, B. Dosisabhängigkeit und Mechanismus der acuten Wirkung von Methamidophos auf das Immunsystem der Maus / B. Tiefenbach, S. Wichner // Z. gesamte Hyg. und Grenzdeb. - 1985. - Bd.31, №4. - S.228-231.
233. Timmons, B.W. Sex-based effects on the distribution of NK cell subsets in response to exercise and carbohydrate intake in adolescents / B.W. Timmons, M.A. Tarnapolsky, O. Bar-Or // J. Appl. Physiol.- 2006.- Vol. 100.- №5.- P.1513-1519.
234. Tomenson, J.A. Hepatic function in workers occupationally exposed to carbon tetrachloride / J.A. Tomenson, C. E. Baron, J.J. O'Sullivan // Occup. Environ. Med. – 1995. - Vol. 52. - № 8. – P. 508-514.
235. Wasser, S. Experimental models of hepatic fibrosis in the rat / S. Wasser, Tan C.E. // Ann. Acad. Med. Singapore. –1999. -.Vol. 28. - № 1. – P. 109-111.
236. Weber, L.W. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model / L.W. Weber, M. Boll, A. Stampfl // Crit. Rev. Toxicol. – 2003. - Vol. 33. - № 2. – P. 105-136.
237. Weiler-Normann, C. Mouse models of liver fibrosis / C. Weiler-Normann, J. Herkel, A.W. Lohse // Z. Gastroentgerol. – 2007. -Vol. 45. - № 1. – P. 43-50.
238. Wernke, M.J., Solvents and malignancy / M.J. Wernke, J.D. Schell // Clin. Occup. Environ. Med. – 2004. -.Vol. 4. - №3. – P. 513-527.

239. Wilson, S. Immune – neuroendocrine interactions / S. Wilson, D. Mireille // Immunol. Today. - 1995. - Vol. 16. - № 7. - P. 318-322.
240. Yodaiken, R.E. 1,2-dichloroethane poisoning / R.E. Yodaiken, J.R. Babcock // Arch. environ. Health. – 1973. – Vol.26. - №3. – P.281-284.
241. Zimmerman, H.J. Chemical- and toxin-induced hepatotoxicity /H.J. Zimmerman, J.H. Lewis // Gastroenterol. Clin. North. Am. – 1995. - Vol. 24. - № 4. – P. 1027-1045.