

**ОЦЕНКА РОЛИ КОРТИКОСТЕРОНА В РЕАЛИЗАЦИИ
ИММУНОСУПРЕССИВНЫХ ЭФФЕКТОВ ПРИ СОЧЕТАННОМ
ДЕЙСТВИИ ДИХЛОРЕТАНА И ТЯЖЕЛОЙ МЕХАНИЧЕСКОЙ
ТРАВМЫ**

П. Ф. Забродский, Д.Ю. Иванов

Саратовский государственный медицинский университет
Саратовский военный институт радиационной, химической и
биологической защиты

В экспериментах на беспородных крысах установлено, что при сочетанном действии 1,2-дихлорэтана и тяжелой механической травмы суммация их иммуносупрессорных эффектов в существенной степени зависит от повышения в плазме крови крыс кортикостерона (КС) вследствие постинтоксикационной и посттравматической стресс-реакции.

Ключевые слова: дихлорэтан, тяжелая механическая травма, кортикостерон, иммуносупрессия, сочетанный эффект

**THE ESTIMATE OF A ROLE OF CORTICOSTERONUM IN
REALIZATION IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECTS AT COMBINED
ACTIVITY OF ETHYLENE DICHLORIDE AND HEAVY MECHANICAL
TRAUMA**

P. F. Zabrodskii, D.U. Ivanov

Saratov state medical university

Saratov Military Institute of Radiation, Chemical and Biological Defense

It was established in experiments on noninbred rats that combined action of 1,2-dichloethane in a single dose 0,8 LD₅₀ and heavy mechanical trauma the summation them immunosuppressive effects in an essential degree depends on magnifications of concentration of corticosteronum in a blood plasma of rats owing to postintoxication and posttraumatic stress-response.

Keywords: 1,2-dichloethane, heavy mechanical trauma, corticosteronum, immunosuppression, combined activity

Известно, что в реализации иммунотоксических эффектов при отравлениях токсичными химическими веществами (ТХВ) и тяжелой механической травме (ТМТ) существенную роль играют кортикостероиды (КС), высокие концентрации которых в крови вследствие стресс-реакции способны вызывать супрессию гуморальных и клеточных иммунных реакций [3]. Ряд авторов снижение гуморального и клеточного иммунного ответа при острых отравлениях ТХВ связывают с действием преимущественно КС [6,7,11,12]. Роль КС в редукции иммунных реакций при ТМТ также считают весьма существенной [1,2]. Значение иммуносупрессивного эффекта КС в реализации иммунотоксических свойств ТХВ, в частности, 1,2-дихлорэтана (ДХЭ), в сочетании с действием ТМТ не исследована. В промышленности и быту ДХЭ применяется как растворитель лаков и красок, в военном деле – в качестве средства для растворения хлорсодержащих дегазаторов и экстракции отравляющих веществ (ОВ) при их индикации, в качестве растворителя ряда токсичных химикатов - ТХ (боевых ОВ) [2,4]. Групповые и массовые острые отравления ДХЭ в сочетании с ТМТ возможны в процессе уничтожения ТХ, а также при аварийных ситуациях на химических предприятиях. Информация о роли КС в формировании комбинированного постинтоксикационного и посттравматического иммунодефицитного состояния необходима для патогенетического обоснования средств его профилактики и лечения.

Целью настоящего исследования являлось определение роли иммуносупрессорного эффекта КС в снижении иммунных реакций при сочетанном остром отравлении ДХЭ и ТМТ.

Материал и методы исследования

Опыты проводили на беспородных крысах самцах массой 180-250 г. ДХЭ вводили в растворе оливкового масла внутривентрально в дозе 0,8 ЛД₅₀ (ЛД₅₀ ДХЭ для крыс самцов составляла $0,95 \pm 0,14$ г/кг). Крысы подвергались действию ТМТ через 1 ч после введения ДХЭ. Контрольным животным вводили 0,5 мл оливкового масла внутривентрально. Иммунные реакции оценивали общепринятыми в иммунотоксикологии и экспериментальной иммунологии методами [2]. Гуморальный иммунный ответ к тимусзависимому (эритроцитам барана-ЭБ) и тимуснезависимому (Vi-Ag) антигенам оценивали через 5 суток по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке после действия ДХЭ в сочетании с ТМТ. Иммунизацию крыс данными антигенами проводили соответственно в дозах $2 \cdot 10^8$ клеток и 8 мкг/кг через 2 ч после введения ДХЭ. Данные тесты отражают синтез IgM В-клетками селезенки с участием Т-хелперов типа 1 - Th1 (тимусзависимый иммунный ответ) и без них. Формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), отражающей функцию клеточного иммунитета, в частности, активности Th1-лимфоцитов, определяли у крыс по приросту массы стопы задней лапы. При этом животных иммунизировали ЭБ в дозе 10^8 клеток внутривентрально через 2 ч после введения ДХЭ. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз задней лапы через 4 суток. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 часа. Естественную цитотоксичность (ЕЦ), характеризующую функцию естественных клеток-киллеров (ЕКК), определяли у животных через 24 часа после введения исследуемых веществ спектрофотометрически, используя их спленоциты, по числу оставшихся неразрушенными в ходе цитотоксического теста клеток-мишеней. Антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), характеризующую функцию К-клеток, исследовали через 5 суток после иммунизации крыс ЭБ в дозе 10^8 клеток (внутривентрально), используя их спленоциты, спектрофотометрическим методом. Концентрацию КС определяли через 2, 6 и 12 ч после ТМТ флюорометрическим методом [9]. Для определения дозы

КС, которая обеспечивала бы приблизительно такую же концентрацию его в плазме крови, как и действие исследованных токсикантов, данный гормон (ICN Pharmaceuticals, Inc.) вводили подкожно двукратно с интервалом 2 ч в дозах 4 и 6 мг/кг, учитывая особенности его фармакокинетики [8] и данные литературы о характере изменения концентрации КС в плазме крови после интоксикации ТХВ и действии ТМТ [5,11]. Концентрацию КС в плазме крови определяли в такие же сроки, как и у животных, у которым вызывали ТМТ после введения ДХЭ. Определение содержания в плазме крови крыс КС через 2-12 ч соответствовало светлomu периоду суток. Для оценки роли КС в постинтоксикационном и посттравматическом изменении иммунных реакций, они исследовались после введения КС в концентрациях, соответствующих его уровню в плазме крови после острой интоксикации ДХЭ и действии ТМТ.

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

Результаты исследований

Под влиянием ДХЭ и ТМТ происходила супрессия исследованных показателей гуморального и клеточного звеньев иммунитета (табл. 1). Сочетанное воздействие ДХЭ и ТМТ в большей степени снижали тимусзависимый гуморальный иммунный ответ, что свидетельствует о редукции синтеза IgM и активности регулирующих этот синтез Th1 [10]. Сочетанное действие факторов приводило к суммации их иммуносупрессивных эффектов.

При определении концентрации КС в плазме крови крыс при остром отравлении ДХЭ, действии ТМТ и их сочетания установлено (табл.2) существенное увеличение его концентрации через 2, 6 и 12 ч. При этом максимальное увеличение концентрации КС отмечалось через 2 ч. Так, действие ДХЭ, ТМТ и их сочетания увеличивали концентрацию гормона соответственно в 5,85; 7,06 и 9,83 раза ($p < 0,05$). Через 12 ч концентрации КС

при действии исследованных повреждающих факторов существенно не отличались от контрольного значения. Введение КС вызывало увеличение

Таблица 1

Влияние острой итоксикации ДХЭ (0,8 ЛД₅₀), ТМТ и их сочетания на гуморальные и клеточные иммунные реакции крыс (M±m, n = 8-11)

Исследованный показатель	Контроль	ДХЭ	ТМТ	ДХЭ+ТМТ
АОК к ЭБ, $\times 10^3$	38,5±3,5	19,2±2,1*	17,0±2,2*	10,2±1,0**
АОК к Vi-Ag, $\times 10^3$	31,1±2,8	20,1±2,0*	18,3±1,9*	11,4±1,2**
Реакция ГЗТ, %	35,2±2,7	20,4±1,8*	23,3±2,4*	13,5±1,7**
ЕЦ, %	29,1±3,3	13,3±2,4*	15,5±3,3*	8,8±1,5**
АЗКЦ, %	13,2±1,8	7,5±1,1*	8,4±1,6*	4,1±0,7**

Примечание: * - различия с контролем - $p < 0,05$; ** - различия с контролем и показателями при изолированном действии ДХЭ и ТМТ - $p < 0,05$.

концентрации этого гормона в крови прямо пропорционально его дозе через 2 и 6 ч. При сравнении содержания КС в плазме крови крыс при его экзогенном поступлении в различных дозах после острого отравления ДХЭ, действия ТМТ и их сочетания установлено, что увеличение концентрации гормона под влиянием ДХЭ и ТМТ приблизительно соответствует двукратному введению этого гормона в дозе 4 мг/кг, а повышение содержания КС в крови при сочетанном действии факторов соответствует двукратному введению этого гормона в дозе 6 мг/кг.

Таблица 2

Концентрация кортикостерона (нг/мл) в плазме крови крыс при его подкожном введении, остром отравлении ДХЭ, действии ТМТ и их сочетания (M±m, n = 8-11)

Серии опытов		Время исследования после введения, ч		
		2	6	12
Контроль	1	35,1±5,1	40,2±6,1	38,8±5,9
ДХЭ	2	205,3±17,5	139,0±18,0	40,0±5,2
ТМТ	3	247,8±15,6	162,5±14,0	29,8±5,7

ДХЭ+ТМТ	4	345,0±20,2	238,0±19,6	44,0±5,2
КС, 4 мг/кг х 2	5	245,6±19,0	143,3±16,4	33,3±5,5
КС, 6 мг/кг х 2	6	379,5±25,1	215,2±20,8	31,5±4,0
Уровень достоверности p<0,05		1-2, 1-3, 1-4,1-5; 1-6; 2-4; 2-6; 3-4; 3-6; 5-6	1-2; 1-3; 1-4;1-5; 1-6; 2-4; 2-6; 3-4; 3-6; 5-6	

Примечание: КС вводили двукратно с интервалом 2 ч.

Введение КС в дозах 4 и 6 мг/кг с интервалом 2 ч двукратно (табл. 3) вызывало снижение тимусзависимого ($p<0,05$) и тимуснезависимого антителообразования ($p<0,05$), а также активности ЕКК и АЗКЦ ($p<0,05$). Полученные результаты после проведения соответствующих расчетов свидетельствуют о том, что редукция показателей системы иммунитета под влиянием экзогенного КС в концентрациях соизмеримых с содержанием гормона в крови после действия ДХЭ, ТМТ и их сочетания в целом меньше, чем при действии химического, физического фактора соответственно в 1,60 раза (на 37,5%) и 1,68 раза (на 40,9%), а их сочетанного эффекта – в 1,20 раза (на 16,6%).

Таблица 3

Влияние кортикостерона (в дозах 4 и 6 мг/кг двукратно с интервалом 2 ч) на показатели системы иммунитета ($M\pm m$, $n = 7-9$)

Показатели	Контроль	Кортикостерон, мг/кг	
		4	6
АОК к ЭБ, $\times 10^3$	37,4±3,2	27,0±2,5*	19,1±1,2*
АОК к Vi-Ag, $\times 10^3$	29,5±2,6	22,3±2,0*	18,5±1,3*
Реакция ГЗТ, %	36,7±2,9	27,8±2,5*	23,0±1,8*
ЕЦ, %	30,1±3,1	20,8±2,9*	16,5±1,4*
АЗКЦ, %	12,2±1,3	8,3±1,2*	6,5±0,8*

Примечание: * - различия с контролем - $p<0,05$;

Проведенные эксперименты позволяют рассчитать эффект КС в % в реализацию супрессии функции любого показателя системы иммунитета при остром отравлении ДХЭ, действии ТМТ (доза КС – 4 мг/кг) и их сочетанном эффекте (доза КС – 6 мг/кг) по формуле:

Эффект КС = $(1 - \text{ПИО}_{\text{КС}}/\text{ПИО}_{\text{К}}) \cdot 100$, где

ПИО_К, ПИО_{КС} - показатель иммунного ответа соответственно в контроле и при действии кортикостерона в концентрации соизмеримой с действием факторов или их сочетания [2].

Расчеты показывают, что при действии ДХЭ, ТМТ и их сочетанном влиянии эффект КС, обуславливающий реализацию супрессии тимусзависимого гуморального иммунного ответа (синтеза IgM), составляет соответственно 27,8 и 48,9%. Интегральный эффект КС в супрессии всех иммунных реакций при действии ДХЭ, ТМТ и их сочетания составляет соответственно 27,9 и 43,6%.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о суммации супрессивных эффектов в отношении гуморальных и клеточных иммунных реакций под влиянием острого отравления ДХЭ и ТМТ, при этом повышение концентрации в плазме крови кортикостерона под влиянием изолированного действия ДХЭ, ТМТ и их сочетанного эффекта определяет вклад КС в реализацию редукции иммунных реакций, составляющий в среднем соответственно 27,9 и 43,6%.

Литература

1. Аскалонов, А.А. Активность клеток-супрессоров при травматическом переломе костей / А.А. Аскалонов, С.М. Гордиенко, О.Е. Авдюничева // Иммунология. -1985, № 1. -С. 62-64.
2. Забродский, П.Ф. Иммуотропные свойства ядов и лекарственных средств / П.Ф. Забродский. – Саратов, изд. Саратовского мед. ун-та, 1998.-214 с.
3. Забродский, П.Ф. Механизмы иммуотропных эффектов фосфорорганических соединений / П.Ф. Забродский // Бюл. эксперим. биол. и мед. -1993.-Т.166, №8.- С. 181-183.
4. Забродский, П.Ф. Изменение неспецифической и иммунологической резистентности организма при остром отравлении дихлорэтаном / П.Ф.

- Забродский, В.Ф. Киричук, А.В. Грызунов // Бюлл. exper. биол. и мед. - 1997. т.123, N 1.-С. 51-53.
5. Иванова, А.С. Характер вовлечения эндокринной системы в стресс ответе на отравления нейротропными средствами / А.С. Иванова // Токсикол. вестник.-1998.-№4.-С. 16-19.
 6. Хусинов, А.А. Нейроэндокринная система и специфические факторы иммунитета при отравлении пестицидами / А.А Хусинов, Д.С. Хайдарова, Г.В. Гущин М.П. Лесникова // Бюл. эксперим. биол. -1991.- №12.- С. 623-624.
 7. Casale, G.P. The effects of organophosphate-induced cholinergic stimulation on the antibody response to sheep erythrocytes in inbred mice / G.P. Casale, S.D.Cohen, R.A. DiCapva // Toxicol. and Appl. Pharmacol. - 1983. - Vol.68, N 2. - P.198-205.
 8. 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, R.L. Spenser // J. Immunol. - 1996. – Vol.157. – N 4. - P.1638-1644.
 9. Moor, P. The specificity of fluorometric corticoid determination / P. Moor, P. Osinski, R. Deckx, O. Steeno // Clin. Chim. acta. - 1962. -Vol.7, N 4. - P.475-480.
 10. Pfeifer, C. Selective activation of Th1- and Th2-like cells in vivo: Response to human collagen IV / C. Pfeifer, J. Murrey, J. Madri, K. Bottomly // Immunol. Rev. – 1991. - Vol.123, N 2. - P. 65-84.
 11. Pruet, S.B. Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol / S.B. Pruet, R. Fan, Q. Zheng // Toxicol. Sci.- 2003. Vol. 75, N 10. - P. 343 - 354.
 12. Tiefenbach, B. Zum Mechanismus der akuten Wirkungen phosphororganischer Pestizide auf das Immunsystem / B.Tiefenbach, G. Hennighausen, P. Lange // Zbl. Pharm. - 1983. - Bd.122, N 2. - S.156.