

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЕ ДЕЙСТВИЕ ПИРИДОКСИНА, ФОЛАТА И КОБАЛАМИНА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМАХ АНЕМИИ

И. Л. Бровкина¹, А. А. Конопля¹, **Б. С. Утешев²**, В. Н. Рыбников³

Кровопотеря и токсические поражения кроветворной ткани угнетают развитие различных форм иммунного ответа, индуцируют появление иммуносупрессирующих свойств у легких эритроцитов и не влияют на иммунологическую активность тяжелых эритроцитов. Иммуномодулирующий эффект пиридоксина, фолата и кобаламина при различных формах анемии наблюдается при совместном (но не при раздельном) применении двух витаминных препаратов; наиболее выраженное повышение иммунной реактивности имеет место при сочетанном введении кобаламина и фолата.

Ключевые слова: строма эритроцитов, иммуностимуляция, фолат, кобаламин, пиридоксин

ВВЕДЕНИЕ

Кровопотеря и поступление в организм токсических соединений, вызывающих поражение кроветворной ткани, приводит к снижению концентрации макроэргических соединений и активности ферментов антиоксидантной системы, повышению содержания продуктов перекисного окисления в эритроцитах [4, 5]. Различные формы анемии характеризуются нарушением функции всех звеньев иммунной системы. Развитие иммунологической недостаточности при кровопотерях и токсических формах анемии в определенной степени обусловлено появлением в крови эритроцитов, обладающих иммуносупрессорными свойствами [6, 12]. Вероятно, это обусловлено выходом в сосудистое русло из кроветворной ткани функционально измененных эритроцитов или возникновением метаболических нарушений в циркулирующих клетках. Принимая во внимание изложенное, научный и практический интерес представляет изучение иммуномодулирующего действия пиридоксина, фолата и кобаламина, стимулирующих костномозговой эритропоэз, за счет усиления синтеза гема, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в ретикулоцитах [10, 11].

Целью работы было изучение иммуномодулирующего действия пиридоксина, фолата и кобаламина, а также выяснение роли эритроцитов в реализации иммуномодулирующего действия этих препаратов при

анемии, вызванной кровопотерей, введением фенилгидразина и натрия нитритом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены на крысах Вистар массой 180 – 200 г. Постгеморрагическую анемию вызывали удалением под легким эфирным наркозом из бедренной артерии крыс 3 % крови (от массы тела) [4]. Гемолитическую анемию вызывали однократным внутрибрюшинным введением фенилгидразина в дозе 80 мг/кг [8], гемическую гипоксию — однократным внутрибрюшинным введением натрия нитрита в дозе 70 мг/кг [9].

Пиридоксин, фолат и кобаламин вводили внутримышечно 5-кратно с интервалом 24 ч в дозах равных 2,5, 1 и 1,5 мг/кг соответственно. При совместном применении препаратов вводили 0,5 указанных доз.

Развитие гуморального иммунного ответа (ГИО) и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) индуцировали внутрибрюшинным введением эритроцитов барана — ЭБ (однократно в дозе 10^8 кл./кг). Иммунизацию проводили одновременно с первой инъекцией препаратов. Для оценки выраженности ГИО через 5 сут после иммунизации в селезенке определяли количество антитело- и розеткообразующих клеток (АОК и РОК) [3, 7]. При оценке выраженности ГЗТ через 4 сут после внутрибрюшинной инъекции в подушечку задней конечности вводили разрешающую дозу ЭБ (10^6 клеток) и спустя 24 ч определяли разницу массы и количества кариоцитов в регионарном и контралатеральном лимфатических узлах (РМЛ и РКЛ) [13]. Функционально-метаболическую активность (ФМА) полиморфноядерных лейкоцитов (ПЯЛ) и иммуномодулирующие свойства эритроцитов определяли через 1 ч после кровопотери или введения токсикантов. О поглотительной активности ПЯЛ судили по

¹ Кафедра спортивной медицины (зав. — проф. И. Л. Бровкина) Курский государственный медицинский университет, Курск, 305033, ул. К. Маркса, 3.

² Кафедра фармакологии (зав. — проф. Б. С. Утешев) Российский государственный медицинский университет, Москва, 117487, ул. Островитянова, 1.

³ Кафедра акушерства и гинекологии (зав. — проф. М. Г. Газзян) Курский государственный медицинский университет, Курск, 305033, ул. К. Маркса, 3.

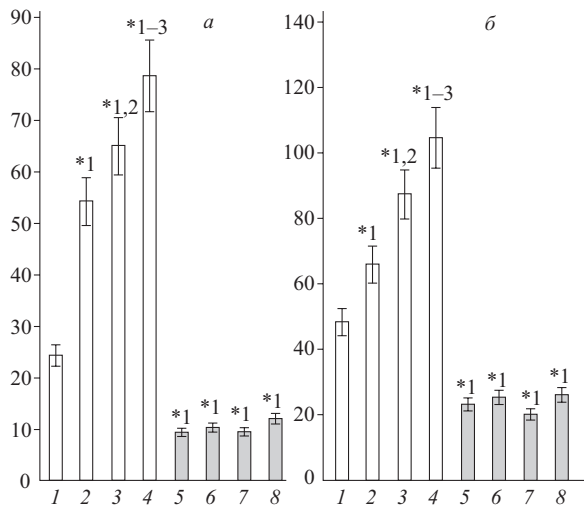


Рис. 1. Влияние введения витаминов на развитие гуморального иммунного ответа в норме и после кровопотери.

По оси абсцисс: 1 — контроль (без витаминов); 2 — пиридоксин; 3 — фолат; 4 — кобаламин; 5 — кровопотеря (без витаминов); 6 — кровопотеря, пиридоксин; 7 — кровопотеря, фолат; 8 — кровопотеря, кобаламин. По оси ординат: а — АОК, 10³/селезенку; б — РОК, 10⁶/селезенку. Здесь и на рис. 2–4: * — $p < 0,05$, цифры рядом со звездочкой указывают по отношению к показателю какой группы различия достоверны.

величинам фагоцитарного числа (ФЧ) и фагоцитарного индекса, окислительную активность ПЯЛ оценивали с помощью спонтанного и индуцированного зимозаном НСТ-теста (НСТсп и НСТинд) [14].

Эритроциты выделяли по E. Beutler [15] и фракционировали в градиенте плотности яичного альбумина [2]. Получали легкую ($d < 1,079$) и тяжелую ($d > 1,117$) фракции.

Иммуномодулирующие свойства эритроцитов устанавливали путем трехкратного (с 12-часовым интервалом) введения 10⁸ кл./кг аллогенным интактным животным с последующей иммунизацией их ЭБ.

Результаты исследований подвергали статистической обработке параметрическими и непараметрическими методами. Различия средних величин оценивали по Стьюденту и Вилкоксоу-Манну-Уитни [1].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Пиридоксин, фолат и кобаламин при введении интактным животным стимулировали развитие ГИО, но не влияли на выраженность ГЗТ. Наиболее выраженный стимулирующий эффект вызывал кобаламин, так как количество иммунных АОК и РОК у крыс, получавших этот препарат, было выше, чем у контрольных животных в 3,5 и 2,1 раза соответственно (рис. 1).

Потеря 3 % крови угнетала развитие ГИО и ГЗТ. После кровопотери количество АОК и РОК снижалось в 2,4 и 2,1 раза соответственно, а РМЛ и РКЛ — в 3,5 и 3,1 раза. Раздельные инъекции препаратов витаминов не оказывали влияния на развитие ГИО и ГЗТ у крыс с потерей крови (рис. 1). Учитывая это, изучено имму-

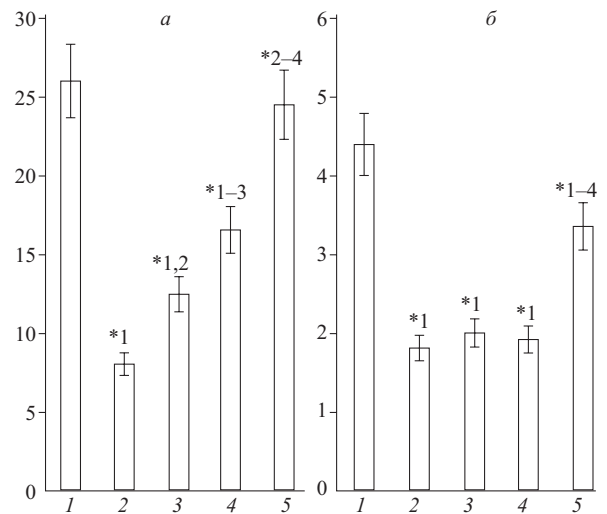


Рис. 2. Влияние введения парных сочетаний пиридоксина, фолата и кобаламина на развитие иммунного ответа после кровопотери.

По оси абсцисс: 1 — контроль (без кровопотери и препаратов); 2 — кровопотеря; 3–5 — кровопотеря и соответственно пиридоксин с фолатом, пиридоксин с кобаламином и фолат с кобаламином. По оси ординат: а — АОК, 10³/селезенку; б — РМЛ, мг.

номодулирующее действие витаминов при парном введении.

Пиридоксин при введении с фолатом или с кобаламином усиливали развитие ГИО, но не влияли на выраженность ГЗТ. В отличие от этого инъекции фолата с кобаламином нормализовали развитие ГИО и увеличивали (но не нормализовали) выраженность ГЗТ (рис. 2).

После кровопотери в крови животных появлялись легкие эритроциты, обладающие иммуносупрессирующими свойствами. Тяжелые эритроциты иммуноло-

Таблица 1. Влияние фолата, кобаламина и их сочетаний на иммунорегулирующие свойства эритроцитов крыс с потерей крови (КПК)

Условия опыта	Легкие эритроциты	Тяжелые эритроциты
1. Контроль (без введения эритроцитов интактных крыс)	22,4 ± 2,8 48,7 ± 5,3	23,7 ± 2,4 51,6 ± 5,7
2. Введение эритроцитов КПК	9,3 ± 1,1* ¹ 20,8 ± 2,5* ¹	21,8 ± 2,3 46,3 ± 5,2
3. Введение эритроцитов КПК, получавших фолат	11,8 ± 1,5* ¹ 22,7 ± 2,8* ¹	22,4 ± 2,7 48,0 ± 5,1
4. Введение эритроцитов КПК, получавших кобаламин	11,6 ± 1,4* ¹ 24,0 ± 2,7* ¹	24,6 ± 2,7 54,2 ± 5,6
5. Введение эритроцитов КПК, получавших фолат и кобаламин	20,4 ± 2,3* ²⁻⁴ 46,6 ± 4,3* ²⁻⁴	46,2 ± 4,9* ¹⁻⁴ 92,6 ± 9,8* ¹⁻⁴

Примечание. Числитель — АОК, знаменатель — РОК. Здесь и в табл. 2–4: * — $p < 0,05$, цифры рядом со звездочкой указывают по отношению к показателю какой группы различия достоверны.

Таблица 2. Влияние пиридоксина, фолата и кобаламина на ФМА нейтрофилов крыс, отравленных фенилгидразином (ФГ)

Условия опыта	ФИ	ФЧ	НСТсп	НСТинд
1. Контроль (без введения препаратов)	34,1 ± 2,9	1,7 ± 0,2	12,5 ± 1,9	24,6 ± 2,3
2. ФГ	17,2 ± 1,8 ^{*1}	0,7 ± 0,1 ^{*1}	5,3 ± 0,4 ^{*1}	10,7 ± 1,1 ^{*1}
3. ФГ и пиридоксин	16,2 ± 1,7 ^{*1}	0,8 ± 0,1 ^{*1}	5,0 ± 0,5 ^{*1}	10,3 ± 1,2 ^{*1}
4. ФГ и фолат	18,0 ± 1,8 ^{*1}	0,7 ± 0,1 ^{*1}	5,4 ± 0,5 ^{*1}	11,8 ± 1,5 ^{*1}
5. ФГ и кобаламин	17,6 ± 1,7 ^{*1}	0,6 ± 0,1 ^{*1}	5,1 ± 0,4 ^{*1}	10,2 ± 1,4 ^{*1}
6. ФГ, пиридоксин и фолат	26,0 ± 2,2 ^{*1-5}	1,3 ± 0,2 ^{*1-5}	8,8 ± 1,0 ^{*1-5}	17,4 ± 1,6 ^{*1-5}
7. ФГ, пиридоксин и кобаламин	26,3 ± 2,4 ^{*1-5}	1,4 ± 0,2 ^{*1-5}	8,1 ± 0,9 ^{*1-5}	17,7 ± 1,5 ^{*1-5}
8. ФГ, фолат и кобаламин	24,2 ± 2,1 ^{*1-5}	1,2 ± 0,1 ^{*1-5}	8,4 ± 0,9 ^{*1-5}	16,0 ± 1,5 ^{*1-5}

Таблица 3. Влияние пиридоксина, фолата и кобаламина на развитие ГИО и ГЗТ крыс, отравленных фенилгидразином (ФГ)

Условия опыта	АОК	РОК	РМЛ	РКЛ
1. Контроль (без введения препаратов)	25,4 ± 3,0	56,2 ± 6,2	4,8 ± 0,5	5,7 ± 0,6
2. ФГ	8,7 ± 0,9 ^{*1}	26,7 ± 3,1 ^{*1}	2,3 ± 0,3 ^{*1}	2,9 ± 0,3 ^{*1}
3. ФГ и пиридоксин	9,1 ± 1,0 ^{*1}	24,9 ± 2,7 ^{*1}	2,2 ± 0,3 ^{*1}	2,8 ± 0,3 ^{*1}
4. ФГ и фолат	8,6 ± 0,9 ^{*1}	27,5 ± 3,2 ^{*1}	2,4 ± 0,3 ^{*1}	3,1 ± 0,4 ^{*1}
5. ФГ и кобаламин	8,9 ± 0,8 ^{*1}	26,0 ± 2,7 ^{*1}	2,1 ± 0,3 ^{*1}	2,9 ± 0,4 ^{*1}
6. ФГ, пиридоксин и фолат	16,5 ± 1,8 ^{*1-5}	43,5 ± 4,2 ^{*1-5}	3,5 ± 0,4 ^{*1-5}	4,4 ± 0,5 ^{*1-5}
7. ФГ, пиридоксин и кобаламин	16,2 ± 1,6 ^{*1-5}	44,5 ± 4,9 ^{*1-5}	3,4 ± 0,4 ^{*1-5}	4,4 ± 0,6 ^{*1-5}
8. ФГ, фолат и кобаламин	17,9 ± 2,1 ^{*1-5}	46,2 ± 4,1 ^{*1-5}	3,7 ± 0,4 ^{*1-5}	4,1 ± 0,5 ^{*1-5}

Таблица 4. Иммуномодулирующие свойства эритроцитов крыс, получавших инъекции эритроцитов крыс, получавших фенилгидразин (ФГ), пиридоксин, фолат и кобаламин

Условия опыта	АОК	РОК	РМЛ	РКЛ
1. Контроль (без введения эритроцитов)	27,4 ± 3,2	58,3 ± 6,4	4,7 ± 0,5	5,6 ± 0,6
<i>Введение легких эритроцитов крыс, получавших ФГ и витамины</i>				
2. ФГ	9,8 ± 1,1 ^{*1}	24,8 ± 3,2 ^{*1}	1,7 ± 0,2 ^{*1}	2,0 ± 0,3 ^{*1}
3. ФГ и пиридоксин	9,3 ± 1,0 ^{*1}	22,6 ± 3,0 ^{*1}	1,9 ± 0,2 ^{*1}	2,3 ± 0,3 ^{*1}
4. ФГ и фолат	9,6 ± 1,0 ^{*1}	21,9 ± 2,8 ^{*1}	2,0 ± 0,3 ^{*1}	2,1 ± 0,3 ^{*1}
5. ФГ и кобаламин	10,2 ± 1,2 ^{*1}	23,0 ± 2,9 ^{*1}	1,8 ± 0,3 ^{*1}	2,4 ± 0,3 ^{*1}
6. ФГ, пиридоксин и фолат	16,3 ± 1,8 ^{*1-5}	41,3 ± 4,6 ^{*1-5}	3,2 ± 0,4 ^{*1-5}	3,7 ± 0,4 ^{*1-5}
7. ФГ, пиридоксин и кобаламин	18,2 ± 1,9 ^{*1-5}	44,5 ± 4,8 ^{*1-5}	3,5 ± 0,4 ^{*1-5}	4,0 ± 0,4 ^{*1-5}
8. ФГ, фолат и кобаламин	18,6 ± 1,6 ^{*1,7}	45,0 ± 4,1 ^{*1,7}	3,9 ± 0,2 ^{*1,7}	4,2 ± 0,3 ^{*1,7}
<i>Введение тяжелых эритроцитов крыс, получавших ФГ и витамины</i>				
9. ФГ	28,2 ± 2,3	55,6 ± 6,3	4,5 ± 0,5	5,5 ± 0,6
10. ФГ и пиридоксин	26,0 ± 2,5	57,1 ± 6,2	4,7 ± 0,5	5,7 ± 0,6
11. ФГ и фолат	27,4 ± 3,0	60,2 ± 6,8	4,9 ± 0,6	6,2 ± 0,7
12. ФГ и кобаламин	26,3 ± 2,7	59,6 ± 6,3	4,4 ± 0,5	6,0 ± 0,6
13. ФГ, пиридоксин и фолат	26,4 ± 2,8	57,8 ± 6,1	4,6 ± 0,5	5,8 ± 0,6
14. ФГ, пиридоксин и кобаламин	51,2 ± 5,3 ^{*9-13}	74,6 ± 7,8 ^{*1-13}	5,0 ± 0,5 ^{*1-7}	6,3 ± 0,7 ^{*1-7}
15. ФГ, фолат и кобаламин	64,2 ± 6,7 ^{*9-14}	92,5 ± 9,4 ^{*9-14}	6,9 ± 0,7 ^{*9-14}	8,0 ± 0,9 ^{*8-14}

гической активности не проявляли. Фолат и кобаламин при раздельном введении не влияли на свойства эритроцитов, совместное их применение устраняло иммуносупрессирующие эффекты легких эритроцитов и индуцировало появление иммуностимулирующих свойств у тяжелых клеток этих животных (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о существенной роли эритроцитов в реализации иммуномодулирующего эффекта сочетанного введения фолата и кобаламина при острой кровопотере и о перспективности клинического изучения эффективности сочетанного применения растительных препаратов этих витаминов

в качестве иммуномодулирующих свойств при кровопотерях.

Фенилгидразин при введении крысам снижал ФМА нейтрофилов периферической крови, угнетал развитие ГИО и ГЗТ. Препараты витаминов по отдельности не влияли, а попарно во всех сочетаниях повышали, но не нормализовали, показатели, характеризующие ФМА лейкоцитов и иммунную реактивность организма отравленных животных (табл. 2 и 3).

Изучение иммуномодулирующих свойств эритроцитов показало, что фенилгидразин индуцировал появление иммуносупрессирующих свойств у легких эритроцитов. Об этом свидетельствовало снижение

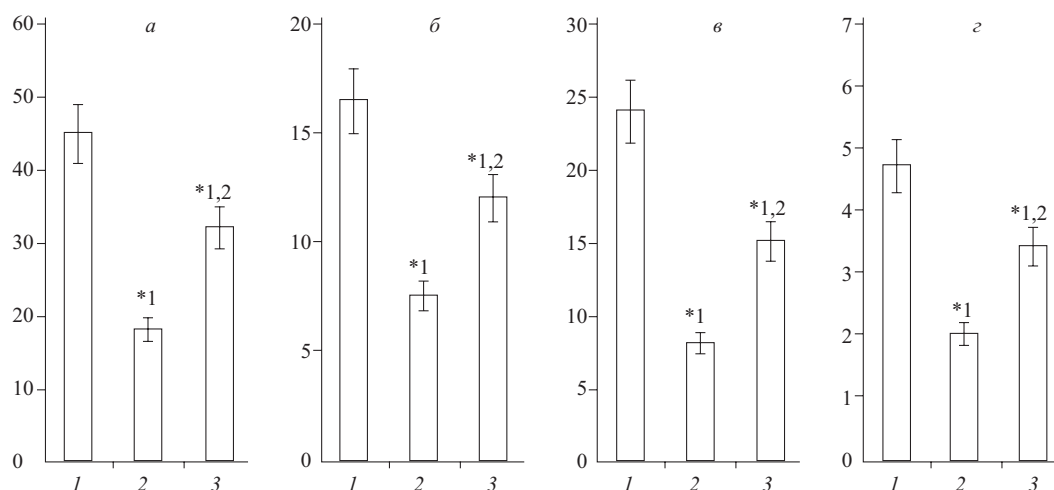


Рис. 3. Влияние фолата и кобаламина на ФМА нейтрофилов, ГИО и ГЗТ крыс, получавших натрия нитрит (НН).

По оси абсцисс: 1 — контроль (без НН и витаминов); 2 — НН, 3 — НН, фолат и кобаламин. По оси ординат: а — фагоцитарный индекс, %; б — НСТсп, %; в — АОК, 10³/селезенка; г — РМЛ, мг.

ФМА ПЯЛ и угнетение развития ГИО и ГЗТ у здоровых крыс, получавших инъекции эритроцитов животных, которым вводили фенилгидразин. Примененные отдельно пиридоксин, фолат и кобаламин не влияли на иммуносупрессирующую активность эритроцитов, отравленных фенилгидразином. Введение пиридоксина с фолиевой кислотой ослабляло (но не устраняло) иммуносупрессирующую активность легких эритроцитов и не влияло на свойства тяжелых клеток, а пиридоксин с кобаламином или фолат с кобаламином ослабляли иммуносупрессирующие свойства легких эритроцитов и индуцировали появление иммуностимулирующей активности у тяжелых клеток (табл. 4).

На основании приведенных данных можно заключить, что пиридоксин ослабляет выраженность иммуносупрессирующих свойств у легких эритроцитов, кобаламин индуцирует появление иммуностимулирующих свойств у тяжелых клеток, а фолиевая кислота не влияет на свойства эритроцитов, но потенцирует действие пиридоксина и кобаламина.

Введение натрия нитрита подавляло ФМА ПЯЛ и угнетало развитие ГИО и ГЗТ. Фолат с кобаламином уменьшали выраженность нарушений иммунологических функций (рис. 3).

Под влиянием натрия нитрита легкие эритроциты приобретали иммуносупрессирующие свойства, а тяжелые оставались иммунологически неактивными. Фолат с кобаламином ослабляли иммуносупрессирующую активность легких эритроцитов и не влияли на свойства тяжелых клеток (рис. 4).

Сопоставление данных литературы и результатов проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что коферментные функции пиридоксина, фолата и кобаламина не позволяют дать однозначную трактовку механизма их иммуномодулирующего действия при различных формах анемии. Для объяснения вызываемых препаратами иммуномодулирующих эффектов

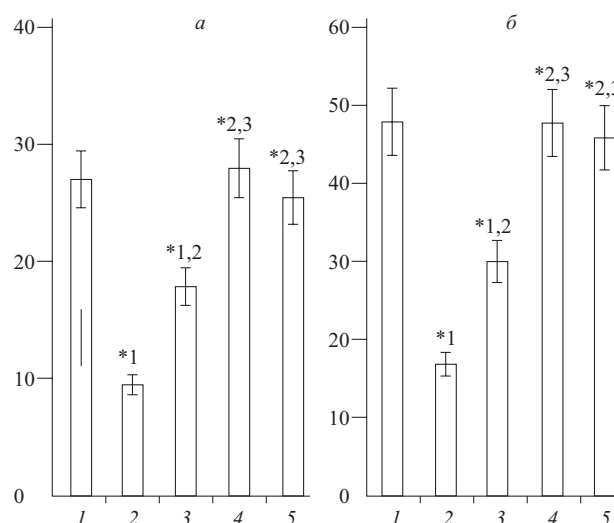


Рис. 4. Иммуномодулирующие свойства эритроцитов крыс, получавших натрия нитрит, фолат и кобаламин.

По оси абсцисс: 1 — контроль (без введения эритроцитов); 2, 3 — влияние легких эритроцитов крыс, получавших соответственно НН, фолат и кобаламин; 4, 5 — влияние тяжелых эритроцитов крыс, получавших соответственно НН, фолат и кобаламин. По оси ординат: а — АОК, 10³/селезенку; б — РОК, 10⁶/селезенку.

необходимо выявление новых функций изученных витаминов.

ВЫВОДЫ

1. Кровапотеря, введение фенилгидразина и нитрита натрия угнетают развитие различных форм иммунного ответа, индуцируют появление иммуносупрессирующих свойств у легких эритроцитов и не влияют на иммунологическую активность тяжелых клеток.

2. Иммуномодулирующий эффект при различных формах анемии наблюдается при совместном (но не при раздельном) применении двух витаминных препаратов, наиболее выраженное повышение иммунной

реактивности имеет место при сочетанном введении кобаламина и фолата.

3. Совместное применение кобаламина и фолата ослабляет или устраняет иммуносупрессирующие эффекты легких эритроцитов и индуцирует появление иммуностимулирующей активности у тяжелых клеток при кровопускании или введении фенилгидразина.

4. Кобаламин и фолат при сочетанном введении ослабляют иммуносупрессорные эффекты легких эритроцитов, но не индуцируют появление иммуностимулирующей активности у тяжелых клеток при отравлении натрия нитритом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. В. Гублер, *Вычислительные методы анализа в распознавании патологических процессов*, Ленинград (1978).
2. Т. В. Кобозев, *Патология системы крови и кровообращения*, Т. В. Кобозев, Н. А. Троицкая, В. И. Куприенко, О. М. Кобозева (ред.), Симферополь (1978), сс. 49 – 51.
3. Х. Зауэр, *Иммунологические методы*, Москва (1987), сс. 278 – 281.
4. Г. А. Лазарева, *Автореф. дисс... канд. мед. наук*, Курск (2000).

5. Г. А. Лазарева, И. Л. Бровкина, *Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье*, № 7, сс. 52 – 64 (2001).
6. Г. А. Лазарева, Л. Г. Прокопенко, Б. С. Утешев, *Экспер. и клин. фармакол.*, **1**(3), сс. 35 – 39 (2001).
7. К. Мальберг, Э. Зигль, *Иммунологические методы*, Москва (1987) сс. 57 – 72.
8. Д. С. Саркисов, И. П. Ремезов, *Воспроизведение болезней человека в эксперименте*, Москва (1960).
9. М. М. Середенко, *Механизмы развития компенсации при гемической гипоксии*, М. М. Середенко, В. П. Дударев, И. М. Лановенко и др. (ред.), Киев (1987).
10. В. Б. Спиричев, Ю. И. Барашнев, *Врожденные нарушения обмена витаминов*, Москва (1977).
11. А. Уайт, *Основы биохимии*, А. Уайт, Ф. Хендлер, Э. Смит, Р. Хилл, И. Леман (ред.), Т. 3, Москва (1981).
12. Б. С. Утешев, Г. А. Лазарева, Л. Г. Прокопенко, *Экспер. и клин. фармакол.*, **65**(4), сс. 37 – 41 (2002).
13. В. Н. Федосеева, *Руководство по иммунологическим и аллергологическим методам в гигиенических исследованиях*, В. Н. Федосеева, Г. В. Порядин, Л. В. Ковальчук и др. (ред.), Москва (1993).
14. Р. М. Хаитов, *Экологическая иммунология*, Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, Х. И. Истамов (ред.), Москва (1995).
15. E. Beutler, *Brit. J. Haemat.*, **61**, 377 – 384 (1985).

Поступила 23.01.03.

IMMUNOMODULANT ACTION OF PYRIDOXINE, FOLATE, AND COBALAMIN IN CASES OF ANEMIA OF VARIOUS TYPES

I. L. Brovkina¹, A. A. Konoplya¹, B. S. Uteshev², and V. N. Rybnikov³

¹ Department of Sport Medicine, Kursk State Medical University, ul. K. Marksa 3, Kursk, 305033 Russia

² Department of Pharmacology, State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117487 Russia

³ Department Obstetrics and Gynecology, Kursk State Medical University, ul. K. Marksa 3, Kursk, 305033 Russia

Hemorrhage and toxic lesions of hemopoietic tissues inhibit the development of various types of immune response and induce immunosuppressive properties in light erythrocytes, while not influencing the immunological activity of heavy erythrocytes. The immunomodulant action of pyridoxine, folate and cobalamin in various cases of anemia was observed for the joint (but not for separate) administration of two vitamin preparations; the most pronounced increase in the immune reactivity taking place upon the joint administration of cobalamin and folate.