

# ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-1-22-25

## ВЛИЯНИЕ ПОЛИОКСИДОНИЯ НА ГУМОРАЛЬНЫЕ И КЛЕТОЧНЫЕ ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ У МЫШЕЙ С ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИЕЙ ХЛОРИРОВАННЫМИ УГЛЕВОДОРОДАМИ

П. Ф. Забродский, В. В. Масляков, М. С. Громов<sup>1</sup>

В экспериментах на аутбредных белых мышах установлено, что хроническая интоксикация тетрахлорметаном и трихлорэтиленом (45 сут, ежедневно подкожно 0,03 LD<sub>50</sub>), снижала гуморальный и клеточный иммунный ответ, активность Th1- и Th2-лимфоцитов в равной степени, увеличивала содержание в крови провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6), противовоспалительного цитокина ИЛ-10, снижала концентрацию иммунорегуляторного цитокина ИЛ-4. Применение полиоксидония (150 мкг/к, ежедневно 7 сут через 38 сут после первого введения токсиканта) повышало исследованные гуморальные и клеточные иммунные реакции в среднем в 1,4 раза ( $p < 0,05$ ); однако в целом, исследованные показатели системы иммунитета до контрольных значений не восстанавливались.

**Ключевые слова:** тетрахлорметан; трихлорэтилен; иммунотоксичность; цитокины; полиоксидоний; мыши.

### ВВЕДЕНИЕ

Хлорированные углеводороды (ХУВ) — тетрахлорметан (ТХМ, четыреххлористый углерод перхлорметан, фреон-10, хладон-10) и трихлорэтилен (ТХЭ, 1,1,2-трихлорэтилен, 1-хлор-2,2-дихлорэтилен, 1-хлор-2,2-дихлорэтилен, этилентрихлорид, трилен) широко используются в промышленности как растворители масел, жиров, каучука и смол, для химической чистки одежды [2]. Данные хлорированные углеводороды способны влиять практически на все органы и системы организма [2], могут поступать в организм через дыхательные пути (реже через кожу и пищеварительный тракт), обладают аллергическими [6, 11], мутагенными, канцерогенными свойствами [7, 11], поражают почки [2, 6, 7, 8, 11] и печень [2, 5, 11], вызывают аутоиммунные заболевания [2], оказывают иммунотоксическое [2] и психотропное действие [2, 11].

Данные литературы позволяют предполагать, что применение азоксимера бромида — полиоксидония (ПО), являющегося сополимером *N*-окси-1,4-этиленпиперазина и (*N*-карбокси)-1,4-этиленпиперазиния бромида, обладающего иммуностимулирующим действием, а также антиоксидантными, детоксикационными и мембраностабилизирующими свойствами [3], способно обеспечить восстановление показателей системы иммунитета после хронической интоксикации хлорированными углеводородами.

Целью исследования являлась оценка хронического действия ТХМ и ТХЭ в эксперименте при их ежедневном поступлении в организм в дозе 0,03 LD<sub>50</sub> в течение 45 сут на иммунные реакции, на содержание в крови провоспалительных (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6), противовоспалительного (ИЛ-10) и иммунорегуляторного (ИЛ-4) цитокинов, а также определение способности ПО восстанавливать параметры системы иммунитета грызунов.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 209 аутбредных белых мышах обоего пола массой 18 – 24 г, полученных из питомника РАМН (филиал “Столбовая” ГУ НЦБМТ РАМН), после 2-недельного карантина в виварии института. Животных содержали в условиях вивария в соответствии с санитарными нормами, предусмотренными “Правилами лабораторной практики” (приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г № 708 н) при свободном доступе к воде и сбалансированному брикетированному гранулированному комбикорму фирмы “МЭСТ”. Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя.

Контрольная группа животных (группа 1), состоящая из 4 подгрупп для оценки различных параметров системы иммунитета, получала внутривентриально ежедневно в течение 45 сут 0,2 мл кукурузного масла. Мышам второй и третьей групп вводили внутривентриально ежедневно в течение 45 сут в дозе 0,03 LD<sub>50</sub> со-

<sup>1</sup> Саратовский медицинский университет “РЕАВИЗ”, Россия, 410011, Саратов, ул. Верхний рынок, б/н, корп. 10.

ответственно ТХЭ и ТХМ (Sigma-Aldrich) на кукурузном масле (Sigma-Aldrich) в 0,2 мл [8] (из расчета 0,2 мл масла, содержащего 0,03 LD<sub>50</sub> на 20 г массы мыши). LD<sub>50</sub> ТХЭ и ТХМ для мышей при внутривенном введении составляет (2,5 ± 0,2) и (6,1 ± 0,3) г/кг, соответственно. Суммарная доза хлорированных углеводов, полученная мышами, составляла 1,35 LD<sub>50</sub>. ПО (НПО Петровакс Фарм) мыши групп 4 и 5 получали внутримышечно в течение 7 сут в дозе 150 мкг/кг в 0,5 мл физиологического раствора (ежедневно, однократно) через 38 сут (на 39 сут) после первого введения ХУВ (ТХМ или ТХЭ). Группы мышей 1 – 3 через 37 сут (на 38 сут) после первого введения масла или ХУВ получали в течение 7 сут 0,5 мл физиологического раствора внутримышечно (ежедневно, однократно).

Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии и иммунологии [1, 2] после хронической интоксикации ХУВ через 45 сут после первой инъекции токсиканта. Гуморальный иммунный ответ к Т-зависимому антигену (эритроцитам барана — ЭБ), характеризующую способность Th1-клеток участвовать в продукции плазматическими клетками IgM, определяли по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке через 4 сут после иммунизации (пик продукции IgM), которую проводили внутривенно (в ретроорбитальный синус) в дозе 2 · 10<sup>8</sup> ЭБ (Научный центр молекулярно-генетических исследований — ДНКМ, РФ) в 0,5 мл физиологического раствора через 41 сут (на 42 сут) после первого введения ХУВ. Аналогично оценивали гуморальную иммунную реакцию к Т-независимому брюшнотифозному Vi-антигену (Vi-Ag), отражающую синтез IgM В-клетками (плазмодитами) селезенки крыс. При этом проводили внутривенную иммунизацию крыс Vi-Ag (ДНКМ) в дозе 8 мкг/кг (0,5 мл физиологического раствора) через 41 сут после первого введения ХУВ.

Функцию Th1-лимфоцитов оценивали также по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Формирование ГЗТ исследовали у животных по приросту массы стопы задней лапы в %. Разрешающую дозу ЭБ (5 · 10<sup>8</sup>) вводили под апоневроз стопы задней лапы на 4 сут после иммунизации, которую проводили введением ЭБ (2 · 10<sup>8</sup> клеток) внутривенно

(в ретроорбитальный синус) через 40 сут (на 41 сут) после первого введения токсиканта. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч. Функцию Th2-лимфоцитов определяли по содержанию IgG к ЭБ (числу АОК в селезенке) через 7 сут после иммунизации ЭБ (2 · 10<sup>8</sup> клеток) методом непрямого локального гемолиза в геле [1, 2]. При этом животных иммунизировали ЭБ (2 · 10<sup>8</sup> клеток) через 37 сут (на 38 сут) после первого введения токсиканта.

Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) определяли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 413 нм через 45 сут после первого введения токсикантов [1, 2].

Оценивали количество гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЕКК (эффektорами) эритроцитов курицы (ЭК, мишени), лизисом осадка 0,25 % додецилсульфатом натрия (Merck KGaA). Активность ЕКК оценивали по индексу цитотоксичности (ИЦ) по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_k - E_o}{E_k} \cdot 100,$$

где  $E_k$  — оптическая плотность лизированного осадка ЭК контрольной пробы без эффекторов (ЕКК) против лизирующего раствора;  $E_o$  — оптическая плотность лизированных оставшихся в осадке опытной пробы неразрушенных ЭК против лизированного осадка эффекторных клеток без ЭК.

Иммунизацию мышей в соответствующих контрольных подгруппах проводили внутривенным введением антигенов (ЭБ; Vi-Ag) в 0,5 мл ФР. Контрольных подгрупп было 4: определение АОК к ЭБ в селезенке (IgM) и реакции ГЗТ; АОК к Vi-Ag; АОК к ЭБ в селезенке (IgG) к ЭБ; оценка активности ЕКК и концентрация в крови цитокинов. В экспериментальных группах 2 – 5 (ТХМ, ТХЭ, ТХМ и ПО, ТХЭ и ПО) исследование параметров было объединено так же, как в 4 контрольных подгруппах.

Концентрацию ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 исследовали в плазме крови через 45 сут после начала инъекций ХУВ (ТХМ, ТХЭ) методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int.

Таблица 1. Влияние ПО (150 мкг/кг, ежедневно, 7 сут) на показатели системы иммунитета мышей после хронической интоксикации ТХМ (0,03 LD<sub>50</sub> 45 сут, ежедневно) и ТХЭ (0,03 LD<sub>50</sub> 45 сут, ежедневно) ( $M \pm m$ ,  $n = 9 - 11$ )

Показатель	Контроль	ТХМ	ТХЭ	ТХМ + ПО	ТХЭ + ПО
АОК к ЭБ (IgM), 10 <sup>3</sup>	43,5 ± 4,4	25,1 ± 3,0 <sup>a</sup>	28,8 ± 3,2 <sup>a</sup>	34,4 ± 3,2 <sup>b</sup>	38,5 ± 3,3 <sup>b</sup>
АОК к ЭБ (IgG), 10 <sup>3</sup>	20,9 ± 2,0	12,4 ± 1,4 <sup>a</sup>	15,7 ± 1,6 <sup>a</sup>	17,6 ± 1,5 <sup>b</sup>	18,9 ± 1,5
АОК к Vi-Ag (IgM), 10 <sup>3</sup>	30,0 ± 3,3	16,3 ± 2,5 <sup>a</sup>	20,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	23,8 ± 2,4 <sup>b</sup>	27,5 ± 2,8 <sup>b</sup>
Активность ЕКК, %	29,3 ± 3,0	19,0 ± 2,0 <sup>a</sup>	17,8 ± 1,9 <sup>a</sup>	24,5 ± 2,8	27,6 ± 2,9 <sup>b</sup>
ГЗТ, %	33,2 ± 3,7	19,6 ± 2,1 <sup>a</sup>	21,1 ± 2,2 <sup>a</sup>	27,7 ± 2,7 <sup>b</sup>	30,3 ± 3,1 <sup>b</sup>

Примечание. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , по сравнению с контролем; <sup>b</sup>  $p < 0,05$ , по сравнению с контролем и показателем при интоксикации.

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия достоверности Стьюдента. Различия между параметрами считались достоверными при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроническая интоксикация ТХМ и ТХЭ при ежедневном введении в дозе  $0,03 LD_{50}$  в течение 45 сут вызывала снижение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (АОК к ЭБ, IgM), соответственно, в 1,80 и 1,57 раза ( $p < 0,05$ ), по содержанию IgG к ЭБ (АОК к ЭБ, IgG), соответственно, в 1,69 и 1,33 раза ( $p < 0,05$ ), к Т-независимому антигену (АОК к Vi-Ag, IgM), соответственно, в 1,84 и 1,50 раза ( $p < 0,05$ ), активности ЕКК в 1,54 и 1,65 раза ( $p < 0,05$ ), соответственно, реакции ГЗТ в 1,69 и 1,57 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно (табл. 1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что после хронической интоксикации ХУВ гуморальный и клеточный иммунный ответ снижается в равной степени.

После применения ПО показатели системы иммунитета существенно повышались ( $p < 0,05$ ) по сравнению с параметрами после интоксикации ХУВ в среднем в 1,4 раза (за исключением активности ЕЕК после действия ТХМ и АОК к ЭБ (IgG) после интоксикации ТХЭ, которые возростали статистически не значимо), достоверно не отличаясь от контрольных значений.

После хронической интоксикации ХУВ отмечали редукцию функции Th1- и Th2-лимфоцитов, оцениваемой соответственно по реакции ГЗТ, АОК к ЭБ (IgM) и числу АОК к ЭБ (IgG) [1, 2], в среднем в 1,66 и 1,51 раза, что позволяет полагать, что под влиянием ХУВ функция Th1- и Th2-лимфоцитов поражаются в равной степени [1, 2].

Хроническая интоксикация ТХМ вызывала увеличение в крови концентраций провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ1 $\beta$ , соответственно, в 2,5; 1,99 и 2,37 раза ( $p < 0,05$ ), противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в 1,48 раза ( $p < 0,05$ ) и снижение иммунорегуляторного цитокина ИЛ-4 в 2,07 раза ( $p < 0,05$ ). Действие ТХЭ приводило к возрастанию провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-6 и ИЛ1 $\beta$  соответственно в 2,88; 1,69 и 2,60 раза ( $p < 0,05$ ), противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в 1,43 раз ( $p < 0,05$ ) и

снижение иммунорегуляторного цитокина ИЛ-4 в 2,31 раза ( $p < 0,05$ ) (табл. 2).

Полиоксидоний не восстанавливал до контрольных уровней содержание в крови исследованных цитокинов, но концентрации ИЛ-6 и ИЛ-1 $\beta$  уменьшались, по сравнению с показателями после интоксикации ТХМ, соответственно, в 1,41 и 1,51 раз ( $p < 0,05$ ), а после хронического воздействия ТХЭ — в 1,47 и 1,42 раз ( $p < 0,05$ ), соответственно.

Увеличение концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6 обусловлено увеличением их синтеза макрофагами и моноцитами [1], воспалительными изменениями в этом органе (токсическая гепатопатия) [5, 10, 13] вследствие поражения печени ХУВ и продуктами их метаболизма [2, 15], многие из которых токсичнее ТХМ (хлор, фосген, оксид углерода, и свободные радикалы — двуххлористый углерод;  $CCl_3^+$ ; O-O-CCl; HO-OCCCl $_3$ ; HO-CCl $_3$ ) и ТХЭ (дихлорацетилхлорида, дихлоруксусной кислоты, трихлорацетальдегида, трихлоруксусной кислоты, трихлорэтанола, N-(гидроксиацетил)этанолamina, трихлорэтандиола, щавелевой кислоты) [2, 9].

Повышение концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-10 обусловлено увеличением его синтеза Th2-лимфоцитами, макрофагами и В-лимфоцитами [12] и реализацией компенсаторной реакцией CD4 + CD25 + Foxp3 + регуляторных Т-клеток на поражение ХУВ лимфоцитов, моноцитов и макрофагов [13, 14]. Повышение продукции ИЛ-10 снижает синтез провоспалительных цитокинов [1, 12]. Снижение концентрации в крови ИЛ-4 (иммунорегуляторного и противовоспалительного цитокина) обусловлено поражением ТХМ и ТХЭ преимущественно Th2-лимфоцитов [2, 4].

Таким образом, хроническая интоксикация ТХМ и ТХЭ сопровождается снижением гуморальных и клеточных иммунных реакций, функции Th1- и Th2-лимфоцитами, увеличением синтеза провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6), противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и снижением продукции иммунорегуляторного цитокина ИЛ-4 лимфоцитами и другими клетками крови. Применение ПО повышало большинство исследованных гуморальных и клеточных иммунных реакций, по сравнению с параметрами после интоксикации ХУВ, уменьшало возрастание, связанное с их воздействием, содержания ИЛ-6 и

Таблица 2. Влияние ПО (150 мкг/кг, ежедневно, 7 сут) на концентрацию цитокинов в крови мышей после хронической интоксикации ТХМ ( $0,03 LD_{50}$  в течение 45 сут, ежедневно) и ТХЭ ( $0,03 LD_{50}$  в течение 45 сут, ежедневно) (пг/мл,  $M \pm m$ ,  $n = 9$ )

Цитокин	Контроль	ТХМ	ТХЭ	ТХМ + ПО	ТХЭ + ПО
ФНО $\alpha$	42 $\pm$ 6	105 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	121 $\pm$ 16 <sup>a</sup>	80 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	95 $\pm$ 12 <sup>a</sup>
ИЛ-6	78 $\pm$ 8	155 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	132 $\pm$ 15 <sup>a</sup>	110 $\pm$ 12 <sup>ab</sup>	90 $\pm$ 10 <sup>ab</sup>
ИЛ1 $\beta$	35 $\pm$ 5	83 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	91 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	55 $\pm$ 6 <sup>ab</sup>	64 $\pm$ 7 <sup>ab</sup>
ИЛ-4	155 $\pm$ 17	75 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	67 $\pm$ 9 <sup>a</sup>	91 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	100 $\pm$ 12 <sup>a</sup>
ИЛ-10	435 $\pm$ 45	644 $\pm$ 68 <sup>a</sup>	621 $\pm$ 70 <sup>a</sup>	630 $\pm$ 73 <sup>a</sup>	666 $\pm$ 75 <sup>a</sup>

Примечание. <sup>a</sup>  $p < 0,05$ , по сравнению с контролем; <sup>b</sup>  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и показателем при интоксикации.

ИЛ-1 $\beta$ , однако восстановление исследованных показателей иммунной системы до контрольных уровней не отмечали.

## ВЫВОДЫ

1. Хроническая интоксикация мышей ТХМ и ТХЭ в течение 45 сут в ежесуточной дозе 0,03 LD<sub>50</sub> (суммарная доза — 1,35 LD<sub>50</sub>), уменьшала гуморальные и клеточные иммунные реакции в среднем на 37,2 % ( $p < 0,05$ ), снижала активность Th1- и Th2-лимфоцитами в равной степени.

2. После хронического воздействия ТХМ и ТХЭ увеличивались концентрации провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, соответственно, в 2,50; 1,99 и 2,37 раза ( $p < 0,05$ ), противовоспалительного цитокина ИЛ-10 в 1,48 раз ( $p < 0,05$ ), и снижалось содержание иммунорегуляторного ИЛ-4 в 2,31 раза ( $p < 0,05$ ) в крови у мышей.

3. ПО (150 мкг/кг, ежедневно, 7 сут) повышал исследованные гуморальные и клеточные иммунные реакции у мышей по сравнению с параметрами после интоксикации ТХМ и ТХЭ, предупреждал возрастание, связанное с их воздействием, концентрации ИЛ-6 и ИЛ-1 $\beta$ ; в целом, исследованные показатели системы иммунитета до контрольных значений не восстанавливались.

## ЛИТЕРАТУРА

1. П. Ф. Забродский, *Иммунотоксикология фосфорорганических соединений*, Саратов (2016).
2. П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, *Иммунотоксикология ксенобиотиков*, СВИБХБ, Саратов (2007).
3. Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, *Иммунология*, **26**(4), 197 (2005).
4. K. L. Becker, E. S. Nylen, J. C. White, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**(4), 1512 – 1525 (2004).
5. Y. Dong, Y. Liu, X. Kou, et al., *Cell Biosci.*, **6**, 8 (2016).
6. M. Ferencik, L. Ebringer, *Folia Microbiol. (Praga)*, **48**(3), 417 – 426 (2003).
7. A. M. Hashmi, Z. Butt, M. Umair, *J. Pak. Med. Assoc.*, **63**(7), 899 – 906 (2013).
8. S. Kim, J. Y. Na, K. Song, J. Kwon, *Exp. Toxicol. Pathol.*, **68**(10), 553 – 558. (2016).
9. L. H. Lash, W. A. Chiu, K. Z. Guyton, I. Rusyn, *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.*, **762**, 22 – 36 (2014).
10. H. Louis, O. Le Moine, M. Goldman, J. Devière, *Acta Gastroenterol. Belg.*, **66**(1), 7 – 14 (2003).
11. M. K. Manibusan, M. Odin, D. A. Eastmond, J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev., **25**(3), 185 – 209 (2007).
12. D. M. Mosser, X. Zhang, *Immunol. Rev.*, **226**, 205 – 218 (2008).
13. E. A. Said, L. Trautmann, F. Dupuy, et al., *Nat. Med.*, **16**(4), 452 – 459 (2010).
14. A. J. Smith, S. E. Humphries, *Cytokine Growth. Factor Rev.*, **20**(1), 43 – 59 (2009).
15. L. J. Zhang, J. P. Yu, D. Li, et al., *World J. Gastroenterol.*, **10**(1), 77 – 81 (2004).

Поступила 18.02.18

## INFLUENCE OF POLYOXIDONIUM ON THE HUMORAL AND CELLULAR IMMUNE RESPONSES IN MICE AFTER CHRONIC INTOXICATION WITH CHLORINATED HYDROCARBONS

P. F. Zabrodskii, V. V. Maslyakov, and M. S. Gromov

Medical Institute "REAVIZ" (Saratov Branch), ul. Verkhniy Rynok, str. 10, Saratov, 410011 Russia

Experiments on albino outbred mice established that chronic intoxication with carbon tetrachloride and trichloroethylene (45 days, daily subcutaneous injection, 0.03 LD<sub>50</sub>), reduced the humoral and cell-mediated immune responses and the activity of Th1 and Th2 lymphocytes (equally), increased blood levels of proinflammatory cytokines (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) and anti-inflammatory cytokine IL-10, and decreased the concentration of immunoregulatory cytokine IL-4 in the blood. Administration of polyoxidonium (150  $\mu$ g/kg, daily, 7 days after 38-day intoxication) increased the humoral and cellular immune responses on the average 1.4 times ( $p < 0.05$ ) as compared to the values observed after intoxication with chlorinated hydrocarbons. However, on the whole, parameters of the immune system were not fully restored on the initial (control) level.

**Keywords:** carbon tetrachloride; trichloroethylene; immunotoxicity; cytokines; polyoxidonium; mice.