

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

СУПРЕССИЯ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ, СВЯЗАННЫХ С ФУНКЦИЕЙ В-КЛЕТОК, TH1- И TH2-ЛИМФОЦИТОВ И ПРОДУЦИРУЕМЫХ ИМИ ЦИТОКИНОВ, И ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ ЭТИХ НАРУШЕНИЙ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ МЕТАНОЛОМ

П. Ф. Забродский¹, В. Г. Мандыч¹, В. Ф. Киричук², В. В. Серов², И. А. Плахута²

В экспериментах на крысах Вистар установлено, что при остром отравлении метанолом (0,75 DL₅₀) супрессия клеточных и гуморальных реакций и снижение концентрации в крови интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4) с увеличением соотношения ИЛ-2/ИЛ-4 свидетельствует, что редукция функции Th2-лимфоцитов по сравнению с Th1-клетками более выражена. Иммуномодуляторы миелопид и полиоксидоний в дозе 10 мкг/кг при ежедневном применении в течение 4-х суток после острой интоксикации метанолом практически полностью восстанавливают клеточный и гуморальный иммунный ответ, активность естественных клеток-киллеров и синтез интерлейкинов.

Ключевые слова: метанол, иммунотоксичность, Th1-, Th2-лимфоциты, интерлейкины, иммуномодуляторы

ВВЕДЕНИЕ

Метанол (метиловый спирт, карбинол, древесный спирт) применяется в качестве растворителя в химической промышленности, топлива для двигателей, в лабораторной практике, для денатурирования этилового спирта, входит в состав ряда антифризов. Отравления метанолом (М) чаще всего связаны с использованием его вместо этанола с целью опьянения и характеризуются высокой смертностью [1, 15], причем тяжесть течения поражений в значительной степени определяется инфекционными осложнениями, являющимися следствием снижения иммунного статуса больного. Изменения иммунного гомеостаза после острой интоксикации метанолом исследованы недостаточно [1, 12]. Не ясна роль Th1- и Th2-лимфоцитов в реализации супрессии иммунных реакций при отравлении М.

Возникающее после отравления М иммунодефицитное состояние предполагает дальнейшее изучение его иммуотропных эффектов [1, 2, 12] с целью обоснования способов коррекции постинтоксикационного нарушения иммунного гомеостаза [4]. Данные литературы позволяют полагать, что применение миелопида, стимулирующего функциональную активность иммунокомпетентных клеток и способствующего восстановлению ряда показателей гуморального звена иммунитета [5], а также полиоксидония (ПО), обладающего иммуностимулирующим свойством в отношении преимущественно Т-лимфоцитов [6], а также антиокси-

дантным, детоксикационным и мембраностабилизирующим свойствами [10], способно обеспечить восстановление показателей Т- и В-системы иммунитета, а также функции естественных клеток-киллеров (ЕКК) после отравления М.

Целью исследования являлась оценка супрессии иммунных реакций, связанных с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4), а также исследование эффективности иммуностимуляторов (миелопид, полиоксидоний) для коррекции нарушений иммунного гомеостаза при остром отравлении метанолом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на крысах Вистар обоего пола массой 180–240 г. М вводили внутрь в дозе 0,75 DL₅₀ однократно (DL₅₀ метанола при введении внутрь составляла 9,1 ± 1,2 г/кг) через 3 сут после иммунизации Т-зависимым антигеном. При оценке эффективности иммуностимуляторов полиоксидоний (ПО) и миелопид вводили внутримышечно в течение 4 сут в дозе 10 мкг/кг практически одновременно с введением М и иммунизацией. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми в экспериментальной иммунологии методами [3, 14]. Гуморальную иммунную реакцию к Т-зависимому (эритроцитам барана — ЭБ) антигену определяли по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке на 5-е сутки после внутрибрюшинной иммунизации крыс данными антигенами в дозах 2 · 10⁸ клеток. В использованном тесте гуморальная иммунная реакция на введение ЭБ характеризует способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции В-лимфоцитами (плазматическими клетками) IgM [7, 14]. АОК к ЭБ, синтезирующие IgG, определяли в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле на 8-е сутки после иммунизации [7, 9]. Данные литературы позволяют полагать, что данный метод характеризует преимущественно функцию Th2-лимфоцитов и В-клеток, синтезирующих IgG, так как Th1-лимфоциты обеспечивают возможность образования в этот период антителогенеза кроме IgM также и IgG_{2a}, составляющих

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

² Саратовский государственный медицинский университет, Саратов, 410710, ГСП-71, ул. Большая казачья, 112.

не более 20 % от всех подклассов IgG [7, 11]. Введение М через 3 сут после иммунизации (в продуктивный период иммуногенеза) обеспечивало приблизительно одинаковый эффект на синтез В-лимфоцитами IgM и IgG с участием Th1- и Th2-лимфоцитов через 5 и 8 сут после иммунизации ЭБ.

Для оценки функции В-клеток исследовали гуморальный иммунный ответ к Т-независимому (Vi-Ag) антигену через 5 сут по числу АОК в селезенке, продуцирующим IgM, после введения М через 3 сут после внутрибрюшинной иммунизации крыс данным антигеном в дозе 8 мкг/кг.

Активность ЕКК определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) через 4 сут после иммунизации спектрофотометрически. Формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), характеризующую функцию Th1-лимфоцитов [7, 9], определяли у животных по приросту массы стопы задней лапы в процентах. При этом крыс внутрибрюшинно иммунизировали 10^8 ЭБ через 30 мин после введения М. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч.

Для оценки изменения функции лимфоцитов Th1- и Th2-типа под влиянием М наряду с исследованием Т-зависимых гуморальных иммунных реакций, формирования ГЗТ и связанной с продукцией Th1-лимфоцитами ИЛ-2 активности ЕКК [7, 9, 11] определяли концентрацию интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4) в периферической крови крыс через 4 и 7 сут после иммунизации методом иммуноферментного анализа по протоколам, указанным в инструкции по применению наборов (BioSource Int. ELISA Kits).

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под влиянием М (табл. 1) происходило снижение гуморального иммунного ответа через 4 сут после иммунизации к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез В-клетками IgM и функцию Th1-лимфоцитов, по сравнению с контрольным уровнем в 1,8 раза ($p < 0,05$).

Через 7 сут после иммунизации отмечалось уменьшение продукции IgG (по числу АОК в селезенке) в 2,24 раза ($p < 0,05$), свидетельствующее о супрессии преимущественно функции Th2-лимфоцитов, а также В-клеток. При отравлении М отмечалась также существенная редукция активности ЕКК и реакции ГЗТ соответственно в 1,87 раза ($p < 0,05$) и в 1,53 раза ($p < 0,05$).

Как уже указывалось, согласно данным литературы, число АОК к ЭБ через 4 сут после иммунизации характеризует синтез IgM В-лимфоцитами и функцию Th1-клеток. Активность ЕКК и формирование ГЗТ также свидетельствует о способности Th1-лимфоцитов влиять на данные реакции, а число АОК к ЭБ в ре-

акции непрямого локального гемолиза в геле через 7 сут после иммунизации отражает синтез IgG и функцию Th2-лимфоцитов [7, 11]. Показатели, характеризующие различные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии М в среднем снижались соответственно в 1,73 и 2,24 раза. Это свидетельствует о том, что М в большей степени поражает функцию Th2-лимфоцитов или связанную с ними продукцию В-клетками IgG по сравнению действием яда на Th1-лимфоциты и/или на В-лимфоциты, синтезирующие IgM, а также на ЕКК.

Исследование действия М на Т-независимое антителообразование (число АОК к Vi-Ag), характеризующее функцию В-клеток, свидетельствует о снижении данного показателя под влиянием спирта по сравнению с контролем в 2,05 раза ($p < 0,05$).

Применение миелопида увеличивало число АОК к ЭБ на 5 и 8 сут, число АОК к Vi-Ag, активность ЕКК, реакцию ГЗТ при действии М по сравнению с показателями при интоксикации соответственно в 1,57; 1,81; 1,95; 1,7 и 1,39 раза ($p < 0,05$), а использование полиоксидония — в 1,69; 1,72; 1,59; 1,95 и 1,58 раза ($p < 0,05$) соответственно. Таким образом, ПО по сравнению с миелопидом оказывал на функцию Th1-лимфоцитов больший активирующий эффект, а на Т-независимую продукцию IgM В-клетками — в 1,22 раза меньшее стимулирующее действие.

После интоксикации М выявлено уменьшение в периферической крови крыс концентрации ИЛ-2 и ИЛ-4 на 5 сут после иммунизации соответственно в 1,56 и 1,61 раза ($p < 0,05$), а на 8 сут — в 1,46 и 1,57 раза ($p < 0,05$) соответственно (табл. 2).

Известно, что ИЛ-2 продуцируют Th1-лимфоциты, а ИЛ-4 — Th2-лимфоциты [8, 9, 11]. Увеличение соотношения ИЛ-2/ИЛ-4 характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th2-типа по сравнению с функцией Th1-клеток [8]. Нами установлено, что соотношение ИЛ-2/ИЛ-4 после отравления М составляло на 5 и 8 сут соответственно 13,8 и 13,1 при контрольном значении 11,4. Это свидетельствует о поражении метанолом в большей степени Th2-клеток по сравнению с Th1-лимфоцитами.

Более выраженный супрессирующий эффект М в отношении иммунной реакции, сопряженной с функцией Th2-лимфоцитов, вероятно, обусловлен нарушением их способности активировать функцию В-клеток. Снижение Т-независимого антителообразования

Таблица 1. Влияние острой интоксикации метанолом в дозе 0,75 DL₅₀ и фармакологической коррекции миелопидом и полиоксидонием (ПО) на показатели системы иммунитета крыс

Серии опытов	АОК к ЭБ (IgM), 10^3	АОК к ЭБ (IgG), 10^3	АОК к Vi-Ag, (IgM), 10^3	ЕЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	34,2 ± 3,4	16,1 ± 1,5	27,7 ± 2,5	32,4 ± 3,3	31,4 ± 2,7
Метанол	19,0 ± 1,7*	7,2 ± 1,0*	13,5 ± 1,9*	17,3 ± 2,1*	20,5 ± 2,0*
Метанол + миелопид	29,8 ± 3,0	14,2 ± 1,6	26,3 ± 2,3	25,7 ± 2,4	26,2 ± 2,5
Метанол + ПО	32,1 ± 3,1	12,4 ± 1,3	21,9 ± 2,4	29,5 ± 2,7	32,4 ± 2,6

Примечание. В каждой серии использовали 7–11 животных. * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Таблица 2. Влияние острой интоксикации метанолом в дозе 0,75 DL₅₀ и фармакологической коррекции миелопидом и полиоксидонием (ПО) на содержание интерлейкинов в периферической крови крыс, пг/мл

Серии опытов	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-2/ИЛ-4
Контроль	1321 ± 92	116 ± 12	11,4
Метанол	5 846 ± 33*	61 ± 6*	13,8
	8 905 ± 40*	69 ± 7*	13,1
Метанол + миелопид	5 1113 ± 75	83 ± 9*	11,9
Метанол + ПО	5 1279 ± 87	90 ± 11	14,2

Примечание. В каждой серии использовали 6 животных; 5, 8 — время исследования после иммунизации, сут. * — отличия достоверны ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

вызвано редукцией синтеза В-лимфоцитами IgM вследствие снижения в них фолиевой кислоты в результате ее усиленного потребления при метаболизме метанола [4, 7, 13]. Уменьшение активности ЕКК под влиянием М, видимо, связано с уменьшением продукции ИЛ-2 Th1-клетками [7, 9, 11].

Миелопид повышал концентрацию ИЛ-2 и ИЛ-4 в крови на 5 сут при действии М по сравнению с показателем при интоксикации соответственно в 1,32 и 1,36 раза ($p < 0,05$), а использование полиоксидония — в 1,51 и 1,48 раза ($p < 0,05$) соответственно. При этом соотношение ИЛ-2/ИЛ-4 при применении миелопида составляло 11,9, а при введении ПО — 14,2 (контроль — 11,4), что свидетельствовало о способности ПО активировать Th1-лимфоциты в большей степени, чем Th2-клетки.

ВЫВОДЫ

1. Острое действие метанола (0,75 DL₅₀) в продуктивный период иммуногенеза (через 3 сут после иммунизации) значительно снижает функцию В-клеток; вызывает супрессию иммунных реакций, обусловленных активностью Th1-лимфоцитов, в меньшей степени по сравнению с иммунным ответом, связанным с функцией Th2-клеток.

2. Под влиянием метанола концентрация в периферической крови ИЛ-4, продуцируемого Th2-лимфоци-

тами, снижается в большей степени, чем концентрация ИЛ-2, синтезируемого Th1-клетками.

3. Применение миелопида и полиоксидония (ежедневно, однократно, в течение 4 сут в дозе 10 мкг/кг) при отравлении метанолом восстанавливает функцию В-клеток, а также практически полностью иммунные реакции и синтез интерлейкинов, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов. Полиоксидоний оказывал на функцию Th1-лимфоцитов, синтез ИЛ-2 и связанные с ними иммунные реакции по сравнению с миелопидом больший активирующий эффект, а на Т-независимую продукцию IgM В-клетками — меньшее стимулирующее действие.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. Ф. Забродский, *Токсикол. вестник*, № 2, 811 (1999).
2. П. Ф. Забродский, *Общая токсикология*, Б. А. Курляндский, В. А. Филова (ред.), Медицина, Москва (2002), сс. 352 – 384.
3. П. Ф. Забродский, В. Г. Лим, Г. М. Мальцева, А. О. Молотков, *Иммуотропные свойства холинэргических веществ*, П. Ф. Забродского (ред.), Издательство “Научная книга”, Саратов (2005).
4. П. Ф. Забродский, В. Г. Лим, Н. М. Трошкин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(4), 46 – 48 (2005).
5. Е. А. Кирилина, А. А. Михайлова, А. А. Малахов и др., *Иммунология*, № 4, 27 – 29 (1998).
6. И. В. Нестерова, *Аллергол. и иммунол.*, **6**(2), 139 – 140 (2005).
7. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, *Иммунология*. (Пер. с англ.), Мир, Москва (2000).
8. Г. Т. Сухих, Н. М. Касабулатов, Л. В. Ванько и др., *Бюл. экпер. биол.*, **140**(12), 622 – 624 (2005).
9. Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович, *Иммунология*, 2-е изд., перераб. и доп., Медицина, Москва (2002).
10. Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, *Иммунология*, **26**(4), 197 (2005).
11. V. St. Georgiev and J. E. Albright, *Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.*, **685**, 284 – 602 (1993).
12. N. Jeya Parthasarathy, R. Sri Kumar, and R. Sheela Devi, *J. Immunotoxicol.*, **2**, 115 – 121 (2005).
13. F. C. Johlin, C. S. Fortman, D. D. Nghiem, and T. R. Tephly, *Mol. Pharmacol.*, **31**, 557 – 561 (1987).
14. R. J. Smialowicz, R. W. Luebke, and M. M. Riddle, *Toxicology*, **75**(5), 235 – 247 (1992).
15. T. R. Tephly, *Life Sci*, **48**, 1031 – 1041 (1991).

Поступила 28.11.06

SUPPRESSION OF IMMUNE RESPONSE ASSOCIATED WITH B-CELLS, TH1- AND TH2-LYMPHOCYTES FUNCTION AND RELATED INTERLEUKINS, AND PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF THESE DISTURBANCES IN RATS UPON ACUTE INTOXICATION WITH METHANOL

P. F. Zabrodskii¹, V. G. Mandych¹, V. F. Kirichuk², V. V. Serov², and I. A. Plahuta²

¹ Saratov Military Institute for Radiation, Chemical and Biological Defense, ul. 50-Letiya Ocyabrya 5, Saratov, 410037

Russia

² Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410710 Russia

Experiments on Wistar rats showed that acute poisoning with methanol (0.75 LD₅₀) leads to the suppression of cellular and humoral immune responses and decreases the blood concentration of interleukins (IL-2, IL-4) with an increase in the IL-2/IL-4 ratio. These facts indicate that a decrease in Th2 lymphocyte activity is more pronounced in comparison to that of Th1 cells. The immunomodulators mielopide and polyoxidon administered in a daily dose of 10 mg/kg for 4 days upon acute poisoning with methanol virtually completely restore the cellular and humoral immune responses, the activity of natural killers, and the synthesis of interleukins.