

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

НАРУШЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ 1,2-ДИХЛОРЕТАНОМ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПОЛИОКСИДОНИЕМ

П. Ф. Забродский, М. С. Громов, И. Х. Яфарова¹

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что хроническая интоксикация дихлорэтаном (30 сут, суммарная доза — 0,9 LD₅₀; 0,03 мг/кг ежедневно, однократно) вызывает редукцию иммунных реакций, уменьшение активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) Т-лимфоцитов, концентрации в крови цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, не влияя на содержание ИЛ-10, в большей степени поражает Th1-клетки по сравнению с Th2-лимфоцитами. Применение полиоксидония (150 мкг/кг в течение 7 сут, ежедневно, однократно) частично восстанавливало иммунный статус, активность АХЭ Т-лимфоцитов и содержание цитокинов в крови.

Ключевые слова: дихлорэтан, Th1-, Th2-лимфоциты, иммунотоксичность, цитокины, полиоксидоний

ВВЕДЕНИЕ

Острые отравления 1,2-дихлорэтаном (ДХЭ), который широко используется в органическом синтезе, также как экстрагентом, средства чистки и обезжиривания одежды, растворителем отравляющих веществ [1], характеризуются высокой смертностью (до 90 %) [2]. Данное соединение способно создавать очаги групповых и даже массовых острых отравлений при авариях на химических объектах. Это может сопровождаться попаданием токсиканта в почву, воздух и воду. При этом, а также в процессе работы с ДХЭ, могут происходить хронические интоксикации людей [1].

Нарушения функции иммунной системы, в частности, Th1- и Th2-лимфоцитов, изменение активности в Т-клетках ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и синтеза ими и другими клетками крови цитокинов при хроническом отравлении ДХЭ практически не исследованы [1, 2, 13]. Существует необходимость оценки влияния хронической интоксикации ДХЭ на иммунные реакции и возможности фармакологической коррекции постинтоксикационных нарушений иммунного гомеостаза [1].

Данные литературы позволяют предполагать, что применение азоксимера бромида (полиоксидония — ПО, являющегося сополимером N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксо)-1,4-этиленпиперазиния бромида), обладающего иммуностимулирующим действием в отношении преимущественно Т-лимфоцитов [3], а также антиоксидантными, детоксикационными и мембраностабилизирующими свойствами [6], способно обеспечить восстановление показателей системы иммунитета после отравления ДХЭ.

Целью исследования являлась оценка хронического действия ДХЭ на иммунные реакции, активность АХЭ Т-лимфоцитов, содержание цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 в крови и возможности фармакологической коррекции нарушений применением полиоксидония.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на беспородных 87 белых крысах обоего пола массой 180 – 240 г. ДХЭ (“Sigma-Aldrich”) вводили подкожно ежедневно в течение 30 сут в дозе 0,03 LD₅₀. LD₅₀ ДХЭ при подкожном введении составляла $0,68 \pm 0,10$ г/кг. ПО вводили внутримышечно в течение 7 сут в дозе 150 мкг/кг (ежедневно, однократно) на 24 сут после первого введения ДХЭ. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми в экспериментальной иммунологии и иммунологии методами [1, 4] после хронической интоксикации ДХЭ через 30 сут после первой инъекции токсиканта. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому антигену (эритроцитам барана - ЭБ), характеризующую способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции плазматическими клетками IgM, определяли по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке через 4 сут после иммунизации (пик продукции IgM), которую проводили внутрибрюшинно в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток на 26 сут после первого введения ДХЭ. Функцию Th1-лимфоцитов оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Формирование ГЗТ исследовали у животных по приросту массы стопы задней лапы в процентах. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут после иммунизации, которую проводили внутрибрюшинно на 26 сут после первого введения ДХЭ. Реакцию ГЗТ

¹ Саратовский филиал Самарского медицинского института “РЕАВИЗ”, 410076, Саратов, Дегтярная площадь, 1-А.

Таблица 1. Влияние хронической интоксикации ДХЭ (суммарная доза 0,9 LD₅₀, 30 сут) и полиоксидония при данном отравлении на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов белых крыс ($M \pm m$, $n = 9 - 11$)

Серия опытов	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК 10^3 к ЭБ (IgM)	ГЗТ, %	АОК 10^3 к ЭБ (IgG)
Контроль	42,5 ± 4,4	33,2 ± 3,4	49,9 ± 5,1
ДХЭ	23,2 ± 2,5 ^a	17,7 ± 1,9 ^a	35,6 ± 3,4 ^a
ДХЭ + ПО	35,9 ± 3,6 ^b	26,4 ± 2,5 ^c	47,3 ± 4,3 ^c

Примечание. Здесь и в табл. 2: ПО — полиоксидоний; ^a — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^b — $p < 0,05$ по сравнению с контролем и показателем после интоксикации; ^c — $p < 0,05$ по сравнению с показателем после интоксикации.

оценивали через 24 ч. Функцию Th2-лимфоцитов исследовали по числу АОК, синтезирующие IgG к ЭБ, в селезенке на пике продукции данного иммуноглобулина (на 14 сут после иммунизации) методом непрямого локального гемолиза в геле [4]. При этом крыс иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток на 17 сут после первого введения ДХЭ. При оценке всех иммунных реакций животные получали суммарную дозу ДХЭ, составляющую 0,9 LD₅₀.

Активность АХЭ в Т-лимфоцитах крысы определяли через 30 сут, выделяя клетки путем фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату (“Нитрон”) [7], и проводя расчеты по описанному методу [1]. За единицу активности АХЭ (ЕД) принимали мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл суспензии, содержащей 10^9 Т-лимфоцитов.

Концентрацию цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 исследовали в плазме крови крыс через 30 сут после первой инъекции ДХЭ методом ферментного иммуносорбентного анализа (ЕИISA), используя наборы (ЕИISA Kits) фирмы BioSource Int. При этом ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10 определяли через 4 сут после иммунизации ЭБ, а ИЛ-4 — на 14 сут. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Хроническая интоксикация ДХЭ (табл. 1) через 30 сут вызывала снижение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (по числу АОК к ЭБ в селезенке через 4 сут после иммунизации), характеризующему функцию Th1-лимфоцитов и синтез IgM, по сравнению с контрольным уровнем в 1,83 раза ($p < 0,05$).

После хронической интоксикации ДХЭ отмечалось также существенное уменьшение активности Th1-лимфоцитов, оцениваемое по реакции ГЗТ, в 1,88 раза ($p < 0,05$). Через 30 сут после интоксикации ДХЭ отмечалась редукция синтеза IgG (по числу АОК в селезенке на 14 сут после иммунизации ЭБ), отражаю-

Таблица 2. Влияние хронической интоксикации ДХЭ (суммарная доза 0,9 LD₅₀, 30 сут) и полиоксидония при данном отравлении на содержание цитокинов в плазме крыс, пг/мл ($M \pm m$, $n = 8$)

Серия опытов	ИФН- γ	ИЛ-4	ИФН- γ /ИЛ-4
Контроль	1140 ± 109	112 ± 12	10,1 ± 1,1
ДХЭ	530 ± 51 ^a	75 ± 7 ^a	7,1 ± 0,8 ^a
ДХЭ + ПО	839 ± 83 ^b	81 ± 8 ^a	10,3 ± 1,0 ^c

щая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, в 1,40 раза ($p < 0,05$).

Показатели, характеризующие клеточную и гуморальную иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, после хронического воздействия ДХЭ в среднем снижались соответственно в 1,86 и 1,40 раза. Это свидетельствует о том, что под влиянием ДХЭ в большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов.

ПО частично восстанавливал иммунные реакции, характеризующие функцию Th1- и Th2-лимфоцитов. При этом данные параметры были существенно ниже контрольных значений ($p < 0,05$) только при оценке функции Th1-лимфоцитов по числу АОК к ЭБ, характеризующему синтез IgM.

Данные в отношении большей супрессии активности Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-лимфоцитами после хронической интоксикации ДХЭ подтверждается оценкой концентрации цитокинов в крови крыс (табл. 2). После интоксикации ДХЭ через 30 сут выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ (на 5 сут после иммунизации ЭБ) в 2,15 раза ($p < 0,05$), а ИЛ-4 (на 14 сут после иммунизации ЭБ) — в 1,49 раза ($p < 0,05$). Это свидетельствует о том, что по сравнению с ИЛ-4 концентрация ИФН- γ в крови под влиянием ДХЭ снижается в большей степени.

Уменьшение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 характеризует большее снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [4, 5]. Так, установлено, что при действии ДХЭ соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 было существенно ниже контрольного уровня равного $10,1 \pm 1,1$ и было равно $7,1 \pm 0,8$ ($p < 0,05$).

Применение ПО частично восстанавливало содержание ИФН- γ , ИЛ-4, а соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 — полностью до контрольного уровня. При этом концентрации ИФН- γ и ИЛ-4 были ниже, чем в контроле ($p < 0,05$).

Под влиянием хронической интоксикации ДХЭ активность АХЭ Т-лимфоцитов селезенки белых крыс через 30 сут снижалась в 1,45 раза ($p < 0,05$) (табл. 3).

Ингибирование ацетилхолинэстеразы ДХЭ имеет существенное значение в формировании постинтоксикационного иммунодефицитного состояния [1]. При этом Т-лимфоциты, возможно, существенно утрачивают свои функции, что приводит к редукции Т-зависи-

Таблица 3. Влияние хронической интоксикации ДХЭ (суммарная доза 0,9LD₅₀, 30 сут) и полиоксидония при данном отравлении на активность ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов селезенки белых крыс (мЕд/10⁹ Т-клеток, $M \pm m$; $n = 8$)

Серия опытов	Активность ацетилхолинэстеразы, мЕд/10 ⁹ Т-клеток
Контроль	63,4 ± 6,1
ДХЭ	43,7 ± 4,0 ^a
ДХЭ+ПО	57,7 ± 5,2 ^c

Примечание. ПО — полиоксидоний; ^a — $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ^c — $p < 0,05$ по сравнению с показателем после интоксикации.

мого гуморального иммунного ответа, снижению цитотоксической активности Т-клеток.

Применение ПО восстанавливало активность АХЭ после воздействия ДХЭ ($p < 0,05$) практически до уровня контроля, увеличивая ее в 1,32 раза по сравнению с показателем после интоксикации ($p < 0,05$).

Роль АХЭ на поверхности Т-лимфоцитов до сих пор не вполне ясна. Возможно, она регулирует влияние ацетилхолина на холинореактивные структуры Т-лимфоцитов [1]. ПО несущественно увеличивает ее активность, вероятно, вследствие реализации его антиоксидантного, детоксикационного и мембраностабилизирующего действия [6]. Не исключено, что являясь полимером-поликатионом, ПО “защищает” поверхность Т-клеток (и их АХЭ) от воздействия ДХЭ.

Полученные данные позволяют полагать, что относительное увеличение активности Th2-лимфоцитов по сравнению с функцией Th1-клеток после хронического отравления ДХЭ может приводить к увеличению вероятности вирусных инфекций (по сравнению с микробными) [8].

При исследовании концентрации в плазме крови крыс цитокинов ИЛ-2 и ИЛ-6 (табл. 4) установлено уменьшение их содержания через 30 сут после хронического действия ДХЭ в 1,71 и 1,68 ($p < 0,05$). Концентрация ИЛ-10 в крови после интоксикации ДХЭ практически не изменялась.

Использование ПО частично восстанавливало содержание в крови крыс цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 и не влияло на концентрацию ИЛ-10.

Уменьшение в крови под влиянием ДХЭ ИЛ-2 свидетельствует о снижении его синтеза Т-лимфоцитами, а также супрессии пролиферации Т- и В-клеток, активности естественных клеток-киллеров [4, 9].

Редукция содержания в крови провоспалительного цитокина ИЛ-6 (в определенных условиях этот цитокин проявляет и противовоспалительные свойства) характеризует уменьшение его синтеза макрофагами, Т-клетками и лимфоидными дендритными клетками вследствие их поражения ДХЭ [4, 12].

Концентрация противовоспалительного цитокина ИЛ-10, продуцируемого Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками и снижающего секрецию ИФН- γ Th1-лимфоцитами [1, 10, 11, 14],

Таблица 4. Влияние хронической интоксикации ДХЭ (суммарная доза 0,9LD₅₀, 30 сут) и полиоксидония при данном отравлении на содержание цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10 в плазме крыс (пг/мл, $M \pm m$, $n = 8$)

Серия опытов	ИЛ-2	ИЛ-6	ИЛ-10
Контроль	1298 ± 109	101 ± 10	585 ± 55
ДХЭ	759 ± 78*	60 ± 7*	509 ± 51
ДХЭ + ПО	990 ± 91*	80 ± 8	570 ± 56

Примечание. ПО — полиоксидоний; * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

практически не изменялась при хронической интоксикации ДХЭ. Это, вероятно, связано со значительным снижением ДХЭ синтеза ИФН- γ . При этом в меньшей степени продуцируется ИЛ-10 Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками, так как ИЛ-10 способен усилить супрессию функции Th1-лимфоцитов и снижение синтеза ими ИФН- γ в еще большей степени (проявление реакции, регулирующей функцию Th-лимфоцитов первого типа [1, 10]). По-видимому, проявляется эффект регуляции оптимальной продукции цитокинов различных типов.

ПО частично восстанавливал содержание интерлейкинов в крови вследствие его иммуностимулирующего действия на все звенья системы иммунитета, а также в результате его детоксицирующего, гепатопротекторного и антиоксидантного эффектов [6].

ВЫВОДЫ

1. После хронической интоксикации 1,2-дихлорэтаном (ДХЭ) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,9 LD₅₀ (по 0,03 LD₅₀ ежедневно), в большей степени снижаются иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. Воздействие ДХЭ снижает концентрацию в крови ИФН- γ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, в большей степени, чем содержание ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками.

2. Хроническая интоксикация ДХЭ снижает активность ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, концентрацию в крови ИЛ-2 и ИЛ-6, не влияет на содержание ИЛ-10.

3. Полиоксидоний (150 мкг/кг в течение 7 сут, ежедневно, однократно) частично восстанавливает иммунный статус, активность ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов и содержание цитокинов в крови.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, *Иммунотоксикология ксенобиотиков*, СВИБХБ, Саратов (2007).
2. П. Ф. Забродский, Д. Ю. Иванов, В. Г. Мандыч, *Экспер. и клин. фармакол.*, **70**(2), 56 – 58 (2007).
3. И. В. Нестерова, *Аллергол. и иммунол.*, **6**(2), 139 – 140 (2005).
4. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, *Иммунология (Пер. с англ.)*, Мир, Москва (2000).

5. Г. Т. Сухих, Н. М. Касабулатов, Л. В. Ванько и др., *Бюл. экпер. биол.*, **140**(12), 622 – 624 (2005).
6. Р. М. Хайтов, Б. В. Пинегин, *Иммунология*, **26**(4), 197 (2005).
7. С. В. Ширшев, *Бюл. экпер. биол.*, **125**(6), 666 – 669 (1998).
8. В. Asquith, Y. Zhang, A. J. Mosley, C. M. de Lara, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**(19), 8035 – 8040 (2007).
9. B. J. Coventry, M. L. Ashdown, *Cancer Manag Res.*, **4**, 215 – 221 (2012).
10. R. Hofmann, A. Rösen-Wolff, G. C. Tsokos, C. M. Hedrich, *Clin. Immunol*, **143**(2), 116 – 127 (2012).
11. H. S. Kim, J. H. Eom, H. Y. Cho, et al., *J. Toxicol. Environ. Health*, **70**(15 – 16), 1278 – 1287 (2007).
12. A. Krook, *Diabetologia*, **51**(7), 1097 – 1099 (2008).
13. C. Li, W. M. Zhang, M. J. Luo, J. Yang, et al., *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi.*, **30**(3), 213 – 216 (2012).
14. D. M. Mosser, X. Zhang, *Immunol. Rev.*, **226**, 205 – 218 (2008).

Поступила 17.12.12

DISTURBANCES OF THE IMMUNE STATUS DURING CHRONIC INTOXICATION WITH 1,2-DICHLOROETHANE AND THEIR TREATMENT BY ADMINISTRATION OF POLYOXIDONIUM

P. F. Zabrodskii, M. S. Gromov, and I. Kh. Yafarova

Saratov Branch of Samara Medical Institute REAVIZ, Degtyarnaya pl. 1-A, Saratov, 410076, Russia

It has been established in experiments on noninbred rats that chronic intoxication with 1,2-dichloroethane (30 days; total dose 0.9LD₅₀; daily dose 0.03 mg/kg body weight) causes a reduction of immune responses, decreases the activity of acetylcholinesterase (AChE) of T-lymphocytes, reduces the concentration of blood cytokines (IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, while not affecting the content of IL-10), and damages to a greater degree Th1 cells as compared to Th2 lymphocytes. The administration of polyoxidonium (daily dose, 150 mg/kg, for 7 days,) partially restored the immune status, the activity of AChE T cells, and the content of cytokines in the blood.

Keywords: 1,2-dichloroethane; Th1 and Th2 lymphocytes; immunotoxicity; cytokines; polyoxidonium