

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ ОТСРОЧЕННЫХ ПОСЛЕДСТВИЙ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ЭТИЛЕНГЛИКОЛЕМ

М. М. Любишин, К. В. Сивак, Т. Н. Саватеева-Любимова¹

В экспериментах на крысах самцах показано формирование отсроченных последствий острого отравления этиленгликолем (ЭГ), заключающихся в хронической почечной недостаточности и вторичном иммунодефицитном состоянии комбинированного типа, протекающих по типу “порочного” круга. Показана необходимость фармакологической коррекции выявленных нарушений в ранние сроки после отравления ЭГ. Экспериментальная терапия, включающая применение иммуномодуляторов с различным механизмом действия, приводила к восстановлению неспецифической резистентности, клеточного и гуморального звеньев иммунитета; купированию развития нарушений функционального состояния мочевыделительной системы.

Ключевые слова: острое отравление этиленгликолем, антидотная терапия, ацидоз, гипоксия, цитокины, иммунная система, мочевыделительная система, циклоферон, тимоген

ВВЕДЕНИЕ

Совершенствование методов терапии острой интоксикации спиртами является одной из актуальных задач токсикологии и фармакологии, так как в структуре отравлений они занимают значительную часть, что связано с широким их использованием в быту и промышленности [3, 12]. В патогенезе острого отравления этиленгликолем (ЭГ) большую роль играют ацидоз и гипоксия. Механизм их развития обусловлен действием кислых метаболитов, разобщающих процессы окисления и фосфорилирования, что влечет за собой повреждение органов-мишеней, прежде всего почек, и приводит к развитию токсической нефропатии 2-й и 3-й степени тяжести [2 – 4, 13]. Наряду с этим ЭГ обладает неспецифическим иммунотоксическим действием, которое ряд исследователей связывает с влиянием его метаболитов на ферменты иммунокомпетентных клеток [6, 9, 11]. Сказанное диктует необходимость разработки комплексного подхода к терапии острого отравления ЭГ, который бы включал, помимо стандартного антидота ЭГ — этанола, цитопротекторы, метаболические корректоры, иммуностимулирующие препараты. В литературе присутствуют данные, подтверждающие эффективность иммуностимулирующей терапии для устранения постинтоксикационного иммунодефицитного состояния [8, 11], однако, отсутствуют сведения о том, как они влияют на развитие ацидоза, гипоксии и функциональное состояние мочевыделительной системы. Целью ис-

следования явилось изучение влияния иммуностимулирующих препаратов (тимоген и циклоферон), включенных в схему стандартной терапии острого отравления ЭГ, на течение клинической картины интоксикации в токсикогенной и соматогенной фазах.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на 150 крысах самцах линии Вистар массой тела 200 – 220 г. Опыты проведены в соответствии с правилами гуманного обращения с животными в биологических экспериментах [17]. Для моделирования острой интоксикации этиленгликоль вводили внутривенно через металлический атравматический зонд в дозе 6,6 г/кг (LD₅₀) однократно. Этанол вводили по схеме, обеспечивающей его концентрацию в крови не менее 25 ммоль/л: 2 мл/кг внутривенно в виде 30 % раствора через 1, 4, 6, 12, 18 ч после применения токсиканта [1]. Для коррекции ацидоза крысы получали 4 % раствор натрия гидрокарбоната внутривенно — 6 мл/кг 3 раза в первые сутки после интоксикации. Экспериментальные животные были разделены на 5 групп: интактные животные; первая опытная группа (контроль модели) — животные, получавшие вместо терапии физиологический раствор; вторая группа — животные, получавшие этанол и 4 % натрия гидрокарбонат по схеме — стандартная антидотная терапия (САТ); третья группа животных, помимо САТ, получала циклоферон, начиная со 2-х суток после введения этиленгликоля, внутривенно в дозе 10 мг/кг (на 2, 3, 5, 7, 9, 12, 15, 18, 21-е сутки после острой интоксикации); четвертая группа, помимо САТ, получала тимоген, начиная со 2-х суток после введения ЭГ, внутривенно в дозе 0,01 мг/кг 1 раз в сутки в течение всего пе-

¹ Лаборатория лекарственной токсикологии (зав. — Т. Н. Саватеева-Любимова) Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “ИНСТИТУТ ТОКСИКОЛОГИИ” федерального медико-биологического агентства, 192019, Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, 1.

Таблица 1. Лабораторные показатели функции почек крыс в соматогенную фазу интоксикации ($M \pm m$)

Показатель	Сроки, сут	Экспериментальные группы				
		Интактные	ЭГ	ЭГ+ САТ	ЭГ + САТ + Т	ЭГ + САТ + ЦФ
<i>Кровь</i>						
Мочевина, ммоль/л	3	4,60 ± 0,24	5,05 ± 0,24	4,78 ± 0,31	5,10 ± 0,22	4,85 ± 0,32
	21	3,98 ± 0,31	5,72 ± 0,06*	5,90 ± 0,24*	4,01 ± 0,53 ^{^#}	4,28 ± 0,29 ^{^#}
Креатинин, мкмоль/л	3	81,6 ± 4,8	80,3 ± 6,9	77,4 ± 3,9	83,6 ± 4,4	87,4 ± 3,8
	21	67,6 ± 6,5	138,0 ± 25,0*	169,0 ± 26,6*	71,4 ± 1,2 ^{^#}	65,1 ± 8,1 ^{^#}
Калий, ммоль/л	3	4,08 ± 0,06	5,76 ± 0,33*	5,22 ± 0,63	5,44 ± 0,37*	5,51 ± 0,27*
	21	4,09 ± 0,10	5,61 ± 0,07*	6,37 ± 0,19 ^{*^}	5,27 ± 0,41*	4,86 ± 0,23 ^{*^#}
<i>Моча</i>						
Диурез, мл/сут	3	14,20 ± 1,10	24,15 ± 3,62*	21,32 ± 4,81*	23,51 ± 2,39*	22,68 ± 3,10*
	21	13,71 ± 0,94	4,17 ± 0,49*	7,02 ± 0,78 ^{*^}	13,5 ± 1,18 ^{^#}	8,77 ± 1,21 ^{*^&}
Cl _{Cr} , мл/мин	3	0,99 ± 0,12	1,48 ± 0,53	1,57 ± 0,42	1,39 ± 0,28	1,41 ± 0,39
	21	1,07 ± 0,06	0,44 ± 0,09*	0,66 ± 0,10*	0,99 ± 0,08 ^{^#}	0,69 ± 0,10 ^{*^&}
Белок, г/ммоль креатинина	3	0,17 ± 0,06	0,67 ± 0,42	0,77 ± 0,31	0,61 ± 0,22	0,69 ± 0,27
	21	0,23 ± 0,02	1,84 ± 0,28*	0,88 ± 0,11*	0,40 ± 0,08 ^{^#}	0,61 ± 0,11 ^{*^}
Лейкоциты, клеток/мкл	3	7,8 ± 1,9	237,6 ± 39,4*	261,3 ± 34,5*	285,5 ± 49,5*	248,7 ± 32,5*
	21	10,3 ± 5,0	429,2 ± 95,8*	308,3 ± 111,5*	141,7 ± 81,3 [^]	183,3 ± 77,4*

Примечание. Различия достоверны по сравнению: * — с интактной группой ($p < 0,05$); ^ — с контролем (ЭГ) ($p < 0,05$); # — с группой, получившей этанол ($p < 0,05$); & — с группой, получившей помимо САТ тимоген.

риода наблюдения. Изучаемые показатели регистрировали в динамике у выживших животных на 3, 7, 14, 21-е сутки, на 6-ти животных в каждый срок во всех экспериментальных группах. Кровь забирали путем мгновенной декапитации крыс под легким наркозом [17].

Изучаемые показатели: уровень глюкозы, лактата, 3-гидроксимасляной кислоты, активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в сыворотке крови (с помощью на-

боров “Ольвекс диагностикум”, наборов реагентов фирмы “Randox” (Великобритания); уровень мочевины, креатинина и калия в сыворотке крови (с помощью наборов “Ольвекс диагностикум”); суточный диурез, уровень белка и креатинина в моче (с помощью наборов “Ольвекс диагностикум”), содержание лейкоцитов (микроскопия); фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов [10], индекс ConA индуцированной миграции лейкоцитов [10], уровень цир-

Таблица 2. Влияние тимогена и циклоферона на некоторые иммунологические показатели в разные сроки после отравления этиленгликолем ($M \pm m$)

Показатель	Сроки, сут	Экспериментальные группы				
		Интактные	ЭГ	ЭГ + САТ	ЭГ + САТ + Т	ЭГ + САТ + ЦФ
Фагоцитоз	3	0,242 ± 0,015	0,223 ± 0,01	0,234 ± 0,010	0,248 ± 0,016	0,237 ± 0,012
	21	0,233 ± 0,034	0,037 ± 0,013*	0,060 ± 0,014*	0,25 ± 0,025 ^{^#}	0,15 ± 0,016 ^{^#&}
РТМЛ, индекс стим./спонт.	3	0,44 ± 0,05	0,68 ± 0,05*	0,71 ± 0,05*	0,74 ± 0,04*	0,65 ± 0,03*
	21	0,43 ± 0,04	1,08 ± 0,05*	0,96 ± 0,04*	0,49 ± 0,04 ^{^#}	0,50 ± 0,04 ^{^#}
ЦИК малой молекулярной массы, у. е.	3	76,3 ± 14,8	97,4 ± 18,5	60,7 ± 8,3	58,4 ± 13,6	59,3 ± 4,0
	21	59,5 ± 3,5	119 ± 5,2*	149 ± 15,1*	107 ± 23,9	70,3 ± 4,5 ^{^#}
ИЛ-1α, пг/мл	3	35,0 ± 6,1	130 ± 10,2*	254 ± 52,4 ^{*^}	116 ± 18,4 ^{*#}	70,9 ± 8,5 ^{*^#&}
	21	34,8 ± 6,3	24,3 ± 6,0	78,0 ± 24,6	24,8 ± 3,7	54,8 ± 20,1
ИЛ-6, пг/мл	3	35,4 ± 2,2	66,5 ± 13,9*	88,7 ± 44,7	250 ± 84,7 ^{*^}	86,1 ± 32,6
	21	36,8 ± 3,2	41,8 ± 5,1	70,7 ± 24,0	32,7 ± 0,7	47,9 ± 9,2
ИЛ-4 (Th2), пг/мл	3	1,9 ± 0,1	1,90 ± 0,15	3,19 ± 0,82	4,20 ± 0,66 ^{*^}	3,11 ± 0,65
	21	1,8 ± 0,1	2,76 ± 0,62	2,14 ± 0,36	2,27 ± 0,39	2,13 ± 0,53
ИНФγ (Th1), пг/мл	3	52,3 ± 9,4	88,3 ± 34,8	74,9 ± 27,1	78,3 ± 25,8	120 ± 17,3*
	21	53,5 ± 9,9	303 ± 55,6*	122 ± 48,6 [^]	82,7 ± 23,6*	128 ± 26,6 ^{*^}

Примечание: * — различия достоверны по сравнению с интактной группой ($p < 0,05$); ^ — различия достоверны по сравнению с контролем (ЭГ) ($p < 0,05$); # — различия достоверны по сравнению с группой, получившей этанол ($p < 0,05$); & — различия достоверны по сравнению с группой, получившей помимо САТ тимоген.

кулирующих иммунных комплексов (ЦИК) малой молекулярной массы [10], содержание интерферона- γ (ИФН- γ), интерлейкина-1 α (ИЛ-1 α), интерлейкина-4 (ИЛ-4), интерлейкина-6 (ИЛ-6) методом иммуноферментного анализа (ELISA), используя видоспецифические наборы фирмы Bender MedSystems GmbH. Результаты тестов регистрировали на спектрофотометре Synergy-2 фирмы "BioTek" (США) [10]. Статистическую обработку проводили с помощью пакетов программ Excel и "STATISTICA 6". Различия между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и считали значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Острое отравление ЭГ сопровождалось кетоацидотическим сдвигом, максимально выраженным в токсикогенную фазу: достоверным увеличением уровня 3-ГМК и молочной кислоты, активности ЛДГ на фоне незначительной гипогликемии. САТ способствовала снижению летальности животных с 40 до 10 % в группе, достоверному изменению уровня маркеров лактата и кетоацидоза, но не оказала существенного позитивного влияния на активность ЛДГ. Таким образом, САТ, компенсируя ацидотическое состояние, не влияла на степень гипоксии. Комбинированная терапия, включающая иммуноотропные препараты, обуславливала коррекцию гликемии, не влияя на показатели кетоза, ацидоза и гипоксии.

Результаты изучения показателей, характеризующих функциональную активность мочевого выделительной системы (табл. 1) продемонстрировали наличие сформировавшейся в соматогенной фазе нефропатии: повышение уровня креатинина, мочевины и калия в сыворотке крови, что свидетельствовало о нарушении фильтрационной функции почек; изменения в составе и объеме мочи: наличие олигурии, сниженный клиренс креатинина, появление кристаллов оксалата кальция характерной формы (октаэдры — форма почтового конверта), протеинурия, возможно, вызванная повреждающим действием кристаллов оксалата кальция на эпителий почечных канальцев и выходом мембраносвязанных и цитоплазматических ферментов, содержащихся в нефротелиоцитах, в просвет канальцев; лейкоцитурия, обусловленная воспалением, вызванным некротической гибелью клеток нефроэпителия, тубулоинтерстициальным нефритом.

Комбинированная терапия с тимогеном оказала существенное протекторное влияние на формирование отсроченной нефропатии, что было обусловлено не столько его иммуномодулирующими свойствами, сколько свойствами цитопротектора и универсального дипептидного регулятора [15].

Что касается иммунной системы (табл. 2), то в ранний период после перенесенного отравления у выживших животных можно было наблюдать лишь невыра-

женное, но достоверное повышение миграционной активности лейкоцитов и значимое повышение уровня ИЛ-1 α , свидетельствующее о преимущественном поражении в токсикогенную фазу клеточного иммунитета, что согласуется с данными других исследователей [6, 9, 11], а также об активации воспаления вследствие некротической гибели клеток [14]. В дальнейшем происходило нарастание иммунодефицита, выражающееся в прогрессирующем снижении суммарного цитокинообразования лимфоцитов; росте уровня ЦИК, коррелирующего с угнетением фагоцитарной активности иммунокомпетентных клеток; и, как следствие, повышение уровня ИФН- γ .

САТ не только не оказала позитивного влияния, но и усугубляла поражение системы иммунитета за счет собственной иммунотоксичности этанола [7].

Тимоген и циклоферон проявили выраженное протекторное действие в отношении иммунодефицитного состояния у выживших животных. Однако необходимо отметить, что индуктор эндогенного интерферона циклоферон наиболее продуктивно влиял на такие показатели как уровень ЦИК, провоспалительных цитокинов, ИФН- γ , что напрямую связано с механизмом его действия [5]. Тимоген в свою очередь в ранний период после отравления повышал продукцию ИЛ-4, а в соматогенную фазу снижал повышенную продукцию ИФН- γ [15].

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что у выживших после отравления ЭГ животных развивается прогрессирующее вторичное иммунодефицитное состояние и отсроченная хроническая почечная недостаточность (ХПН). В токсикогенной фазе отравления иммунная и мочевыделительная системы повреждаются ЭГ и его метаболитами независимо друг от друга. В более поздний период после отравления (соматогенная фаза) недостаточность иммунной и мочевыделительной систем приводит к ухудшению состояния последних по механизму "порочного" круга, что ведет к дальнейшему прогрессированию патологии. Стандартная антидотная терапия не предотвращает развитие иммуносупрессии и формирующейся ХПН. В токсикогенную фазу отравления оценить степень тяжести поражения иммунной и мочевыделительной систем затруднительно, поэтому необходимо проводить мониторинг состояния иммунной и мочевыделительной систем в динамике и назначать необходимую терапию для предотвращения формирования устойчивых нарушений иммунного статуса и функции почек.

Тимоген и циклоферон оказали выраженное протекторное действие в отношении иммунодефицитного состояния у выживших животных и в значительной степени предотвращали развитие почечной патологии. Это косвенно подтверждает то, что снижение надзорной функции иммунной системы, вероятно, играет важную роль в формировании установленных наруше-

ний функционального состояния мочевыделительной системы.

ВЫВОДЫ

1. Острое отравление этиленгликолем приводит к формированию у выживших животных прогрессирующего иммунодефицитного состояния и нефропатии.

2. Стандартная антидотная терапия, включающая этанол и натрия гидрокарбонат, способствует снижению летальности, но усугубляет выраженность отсроченных последствий острого отравления.

3. Тимоген и циклоферон оказывают выраженное протекторное действие в отношении постинтоксикационного иммунодефицитного состояния и отсроченной формирующейся хронической почечной недостаточности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Е. Ю. Бонитенко, Ю. Ю. Бонитенко, *Medline.ru*, **10**(17), 442 – 453 (2009).
2. Е. Ю. Бонитенко, Р. В. Бабаханян, В. К. Бородавко и др., *Medline.ru*, **4**(124), 292 – 429 (2003).
3. Ю. Ю. Бонитенко, Г. А. Ливанов, Е. Ю. Бонитенко и др., *Острые отравления этанолом и его суррогатами*, Ю. Ю. Бонитенко (ред.) ЭЛБИ-СПБ, Санкт-Петербург (2005).
4. В. М. Ермоленко, А. Ю. Николаев, *Острая почечная недостаточность*, “ГЭОТАР-Медиа”, Москва (2010).
5. Ф. И. Ершов и др., *Циклоферон. Клиническая фармакология и терапия: Руководство для врачей*, М.; СПб., (1998).
6. П. Ф. Забродский, В. Г. Германчук, *Бюл. exper. биол.*, № 10, 415 – 417 (2000).
7. П. Ф. Забродский, В. Г. Германчук, В. Г. Лим, *Exper. и клин. фармакол.*, **68**(01), 53 – 55 (2005).
8. П. Ф. Забродский, В. Ф. Киричук, М. Л. Нодель и др., *Бюл. exper. биол.*, № 1, 71 – 74 (2003).
9. П. Ф. Забродский, В. Ф. Киричук, О. В. Осипов, *Бюл. exper. биол.*, № 3, 301 – 303 (2002).
10. *Медицинские лабораторные технологии*, Т. 2, А. И. Карпищенко (ред.), Интермедика, СПб (2002).
11. В. Г. Лим, *Дис. ... д-ра мед. наук*, Саратов (2006).
12. Е. А. Лужников, Л. Г. Костомарова, *Острые отравления руководство для врачей*, Медицина, Москва (2000).
13. Е. А. Лужников, Ю. Н. Остапенко, Г. Н. Суходолова, *Неотложные состояния при острых отравлениях*, Медпрактика-м, Москва (2001).
14. А. В. Саватеев, Т. Н. Саватеева-Любимова, *Exper. и клин. фармакол.*, **73**(12) 44 – 49 (2010).
15. *Клиническая фармакология тимогена*, В. С. Смирнов (ред.), СПб (2003).
16. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. Ю. Хабриев (ред.), Медицина, Москва (2005).
17. Directive 2010 / 63 / EU of the European parliament and of the council on the protection of animals used for scientific purposes, *Official Journal of the European Union*. L.276. 33 – 79 (2010).

Поступила 17.05.12

EXPERIMENTAL JUSTIFICATION OF APPROACHES TO PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF DELAYED DISORDERS CAUSED BY ACUTE ETHYLENE GLYCOL POISONING

M. M. Lyubishin, K. V. Sivak, and T. N. Savateeva-Lyubimova

State Institute of Toxicology, Federal Medico-Biological Agency, ul. Bekhtereva 1, St. Petersburg, 192019, Russia

The development of delayed disorders caused by acute ethylene glycol poisoning has been studied in experiments on male rats. These disorders include chronic renal failure and secondary combined immunodeficiency status of the “circulus vitiosus” type. Urgent pharmacological correction was shown to be necessary shortly after the poisoning. The experimental therapy (administration of immunomodulators with various mechanisms of action in addition to conventional antidote treatment with ethanol) resulted in the restoration of nonspecific resistance and both cellular and humoral immunity. Reduction of the urinary system damage after the administration of immunomodulators was observed. The results demonstrated the importance of multiagent immunotherapy for the correction of delayed effects of acute ethylene glycol poisoning.

Key words: Acute ethylene glycol poisoning; antidote treatment; acidosis; hypoxia; cytokines; immune system; urinary system; cycloferon; thymogen