

АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК СССР
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ИНСТИТУТ КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ
НАУЧНЫЕ ТРУДЫ



ОЦЕНКА
И КОРРЕКЦИЯ
СОСТОЯНИЯ
ИММУННОЙ СИСТЕМЫ
В КЛИНИКЕ
И ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ответственные редакторы:
профессор В. А. КОЗЛОВ,
канд. мед. наук Г. З. ШУБИНСКИЙ

Новосибирск — 1987

О. П. Колесникова, В. А. Козлов

ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ МЕТРОНИДАЗОЛА ПРИ РАЗВИТИИ ИММУННОГО ОТВЕТА МЫШЕЙ НА ЭРИТРОЦИТЫ БАРАНА

Метронидазол (1-(2-гидроксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол) — производное имидазола—высокоэффективный препарат в лечении инфекций, вызванных простейшими, анаэробами. Известно, что имидазол и его производные, являющиеся модуляторами метаболизма арахидоновой кислоты, проявляют иммуностропные свойства. Использование различных доз метронидазола, а также витральных тестов для определения его иммуноактивных свойств, позволило одним авторам отнести его к иммуностимуляторам, а другим,— к иммунодепрессорам [3, 7]. Вместе с тем механизм иммуноактивного действия метронидазола не известен.

Данные по клиническому применению метронидазола, а также некоторые экспериментальные работы позволили нам предположить, что иммуноактивные свойства метронидазола реализуются через влияние на систему мононуклеарных фагоцитов. Для подтверждения этого предположения выполнена настоящая работа.

Методика исследований. В работе использованы мыши-самцы линии С57BL/6 6—9-недельного возраста, полученные из питомника «Светлые горы». Метронидазол (POLFA) растирали и вводили в виде взвеси внутрижелудочно или внутрибрюшинно в различных дозах от 2,5 до 125 мг/кг веса. Через 2 часа после последнего введения препарата животных иммунизировали внутрибрюшинно или внутривенно $2,5 \times 10^8$ эритроцитов барана (ЭБ) в объеме 0,5 мл. На 4-е сутки животных забивали и определяли количество антителообразующих клеток (АОК) по числу гемолитических бляшек модифицированным методом локального гемолиза в полужидкой среде [5]. Для определения количества полипотентных стволовых кроветворных клеток (ПСКК) селезенки использовали метод эндогенных селезеночных колоний гемопозитических клеток [4]. При изучении скорости очищения кровотока от неорганических веществ (клиренс) за основу использовали метод Donald и Tennet [6]. Смесь желатины с тушью в объеме 0,2 мл вводили внутривенно. Кровь из орбитальной вены в объеме 0,1 мл начинали забирать через 20 сек после введения туши с интервалами в 2 мин в течение 10 мин.

Полученные данные обрабатывали статистически по Фишеру-Стьюденту с использованием критерия t .

Результаты и обсуждение. С учетом биотрансформации препарата в экспериментах оценивалась способность метронидазола стимулировать образование IgM антител в ходе первичного иммунного ответа. Определялись дозы, сроки и способ введения препарата, способ иммунизации. Первоначально изучали влияние разных доз метронидазола, введенного однократно внутрибрюшинно за сутки до внутривенной иммунизации, на антителообразование. Как видно из табл. 1,

Таблица 1

Количество АОК к ЭБ в селезенке мышей линии С57BL/6 при разных дозах метронидазола, введенного однократно внутрибрюшинно за сутки до внутривенной иммунизации

| Условия опыта | n | Число спленоцитов во всей селезенке $\times 10^6$ | Число АОК | |
|---------------|----|---|-------------------|-----------------------|
| | | | во всей селезенке | на 10^6 спленоцитов |
| Контроль | 9 | 188,9 ± 14,9 | 4209 ± 538 | 24,0 ± 3,7 |
| 12,5 мг/кг | 10 | 153,5 ± 12,4 | 5205 ± 1056 | 31,9 ± 6,5 |
| 25,0 мг/кг | 10 | 170,0 ± 12,3 | 11537 ± 2881 | 73,2 ± 20,4 |
| 75,0 мг/кг | 9 | 161,1 ± 9,4 | 10896 ± 4291 | 63,7 ± 24,8 |
| 125,0 мг/кг | 10 | 161,0 ± 8,3 | 6826 ± 2139 | 42,8 ± 13,7 |
| 250,0 мг/кг | 10 | 168,0 ± 17,5 | 4062 ± 1502 | 31,1 ± 11,6 |

Таблица 2

Количество антителообразующих клеток в селезенке мышей линии С57BL/6 при внутрибрюшинном введении препарата и ЭБ

| Условия опыта | n | Число спленоцитов 10^6 | Число АОК | |
|---------------------|----|-----------------------------|-------------------|-----------------------|
| | | | во всей селезенке | на 10^6 спленоцитов |
| Контроль | 26 | 207,9±10,0 | 16664±2829 | 80,5±12,4 |
| Введение препарата: | | | | |
| однократное | 20 | 193,5±10,1 | 15181±1878 | 86,0±12,9 |
| двукратное | 25 | 178,6±6,6 | 13309±1470 | 78,8±10,2 |
| пятикратное | 25 | 175,5±10,7 | 18518±2479 | 105,5±13,5 |

при такой схеме введения метронидазола его иммуностимулирующие свойства определяются в дозах от 12,5 до 125 мг/кг.

В последующих опытах была использована доза 125 мг/кг метронидазола, поскольку при такой дозе метронидазол проявляет иммуностимулирующие свойства, и она близка к терапевтической. В следующей серии опытов препарат в дозе 125 мг/кг вводили мышам внутрибрюшинно одно-, дву- и пятикратно за 2 часа до внутрибрюшинной иммунизации (табл. 2).

Как видно из данных табл. 2, доза метронидазола 125 мг/кг при внутрибрюшинном введении препарата и антигена оказалась неэффективной. Известно, что интенсивность антителообразования зависит от дозы антигена и пути его введения, что объясняется условиями контакта антигена с клетками макрофагально-фагоцитирующей системы (МФС). По данным [2] наблюдается резкое снижение антителообразования при внутрибрюшинном введении ЭБ мышам, предварительно за 4 дня до этого стимулированным введением мясо-пептонного бульона и имеющим к моменту введения антигена большое количество макрофагов в брюшной полости. Эти и другие данные свидетельствуют, что функциональная и метаболическая функция макрофагов, осуществляющих захват и переработку антигена до иммуногенной формы, существенным образом влияет на величину гуморального иммунного ответа. Так, при блокировании захвата и переваривания антигена (блок ретикуло-эндотелиальной системы — РЭС — определенной степени) развитие иммунного ответа не наблюдается. Однако и чрезмерное переваривание сопровождается угнетением иммуногенеза. Оценивая полученные результаты, мы предположили, что метронидазол действительно стимулирует функциональную и/или метаболическую функцию мононуклеарных фагоцитов, что имеет значение для

Таблица 3

Количество АОК в селезенке мышей линии С57В1 при 5-кратном пероральном введении метронидазола в дозе 125 мг/кг и разных способах иммунизации

| Условия опыта | Число наблюдений | Число спленоцитов во всей селезенке $\times 10^{-6}$ | Число АОК | |
|-------------------|------------------|--|-------------------|-----------------------|
| | | | во всей селезенке | на 10^6 спленоцитов |
| ЭБ внутривенно | | | | |
| контроль | 20 | 193,7 \pm 14,9 | 11123 \pm 1598 | 56,3 \pm 6,3 |
| опыт | 20 | 173,5 \pm 8,6 | 23353 \pm 2904 | 145,0 \pm 22,3 |
| ЭБ внутрибрюшинно | | | | |
| контроль | 24 | 162,3 \pm 11,1 | 10767 \pm 1155 | 77,2 \pm 10,9 |
| опыт | 23 | 140,0 \pm 9,8 | 8110 \pm 1307 | 66,9 \pm 12,4 |

последующей презентации антигена, введенного разными путями, и развития иммунного ответа. Следующая серия опытов была проведена в иных экспериментальных условиях: метронидазол вводили перорально в течение 5 дней, мышей иммунизировали внутривенно или внутрибрюшинно.

Как видно из табл. 3, пятикратное пероральное введение метронидазола в дозе 125 мг/кг с последующим внутривенным введением антигена существенно и достоверно усиливает иммунный ответ. При изменении способа иммунизации (внутрибрюшинное введение ЭБ) в аналогичном опыте наблюдается даже незначительное угнетение антителообразования. Оценивая в целом результаты, необходимо отметить важность детального изучения различных способов введения препаратов и пути введения антигена при скрининге иммуностропных свойств биологически активных веществ, что устранит получение как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов в эксперименте.

Мы выясняли и влияние метронидазола на фагоцитарную активность клеток системы мононуклеарных фагоцитов, определяемую по клиренсу туши. У мышей после пятикратного внутрибрюшинного введения метронидазола в дозе 125 мг/кг наблюдали достоверное уменьшение времени полувыведения частиц туши (163 \pm 9,8 сек) по сравнению с контрольными животными, у которых время полувыведения составляло 225 \pm 11,6 сек. Это свидетельствует о повышении функциональной активности элементов РЭС и МФС под влиянием метронидазола.

Основными компонентами иммуногенеза, сопровождающегося синтезом антител, являются пролиферация, дифференцировка и миграция ПСКК, формирование клона антителопродуцентов, регулирующее влияние Т-хелперов и т. д. В литературе последних лет имеется ряд сообщений, указы-

вающих на возможное участие клеток МФС в регуляции пролиферации ПСКК, существование в организме макрофагального механизма регуляции пролиферативной активности ПСКК [1]. С этой целью мы изучали влияние метронидазола на пролиферацию стволовой кроветворной клетки. У контрольных животных количество эндогенных колоний в селезенке составило $9,5 \pm 1,3$ (число наблюдений — 19). При однократном введении метронидазола в дозе 125 мг/кг за 2 часа до сублетального облучения количество эндогенных колоний у опытных мышей было достоверно выше по сравнению с контрольными мышами и составило $15,3 \pm 1,8$ гемопозитических колоний на селезенку при 20 наблюдениях. При дву- и пятикратном введении метронидазола внутрибрюшинно в той же дозе 125 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение числа эндогенных колоний, которое соответственно составляло $13,9 \pm 1,7$ (количество наблюдений — 14) и $16,3 \pm 2,3$ (количество наблюдений — 21). Увеличение числа эндогенных колоний гемопозитических клеток в селезенке облученных мышей, которым предварительно вводили метронидазол, свидетельствует о его способности стимулировать пролиферацию ПСКК. Можно предполагать, что препарат либо непосредственно действует на ПСКК, усиливая их пролиферацию, либо опосредованно через макрофагальный механизм.

Выводы

1. Испытание иммуноактивных свойств метронидазола в различных вивальных моделях позволяет считать, что его иммуностимулирующее действие на первичный гуморальный иммунный ответ у мышей линии С57ВL реализуется через влияние на систему мононуклеарных фагоцитов.

2. При испытании иммуноактивных веществ необходимо обрабатывать различные способы введения препаратов и пути введения антигена для устранения ложноположительных и ложноотрицательных результатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов В. А., Громыкина Н. Ю. Влияние макрофагов на гемопоз и иммуногенез // Итоги науки и техники. Иммунология. — М.: ВИНТИ, 1985. — Вып. 13. — С. 193—216.
2. Учитель И. Я. Макрофаги в иммунитете. — М: Медицина, 1978, 203 с.
3. Bahr V., Ullmann U. The influence of metronidazol and its two main metabolites on murine in vitro lymphocyte transformation // Eur. J. Clin. Microbiol. — 1983. — V. 2, N 4. — P. 568—570.
4. Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E. Cytological demonstration

- of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells//*Nature*.—1963.— V. 197, N 4.— P. 452—454.
5. *Cunningham A. J.* A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells//*Nature*.—1962.— V. 207, N 10.— P. 1106—1107.
 6. *Donald K., Tennet R.* The relative roles of platelets and macrophages in clearing particles from blood: the value of carbone clearance as a measure of reticulo-endotelial phagocytosis//*J. Pathol.*—1975.— V. 117, N 2.— P. 235—238.
 7. *Miller J. J.* The imidazoles as immunosuppressive agents//*Transplant. Proc.*—1980.— V. 12, N 2.— P. 300—303.