

Ключевые слова: иммунология; иммуностропные свойства метронидазола; гуморальный иммунный ответ; мыши

В. А. Козлов, О. П. Колесникова (Новосибирск)

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОАКТИВНЫХ СВОЙСТВ МЕТРОНИДАЗОЛА

Институт клинической иммунологии СО АМН СССР

Активный интерес, проявляемый в последние годы, к синтетическим производным, имеющим в структуре имидазольное кольцо, обусловлен их высокими адаптогенными свойствами. Вместе с этим имидазол и его производные, являющиеся модуляторами метаболизма арахидоновой кислоты, рассматриваются как перспективные иммунофармакологические средства [1]. О перспективности использования модуляторов метаболизма арахидоновой кислоты, как потенциальных иммуноактивных веществ, свидетельствует внимание многих экспериментаторов и клиницистов к разработке путей регуляции биосинтеза и выделения в кровоток простагландинов, лейкотриенов, простаглицлина, тромбоксана — продуктов метаболизма арахидоновой кислоты. Эти вещества обладают очень интересными фармакологическими свойствами, использование которых резко расширит возможности регуляции функций организма, в том числе иммунитета. Получение этих веществ в качестве лекарственных препаратов затруднено и ограничено в связи с их нестойкостью. Именно поэтому активно ведется поиск и изучение лекарственных средств, избирательно влияющих на их продукцию, выделение в кровоток и физиологическое (в том числе иммуностропное) действие [1, 3].

Одним из известных и успешно применяемых для лечения заболеваний, вызванных *Trichomonas vaginalis*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica*, является производное имидазола — метронидазол (трихопол) — 1-(2-гидрооксиэтил)-2-метил-5-нитроимидазол. Расширение клинических показаний к назначению метронидазола, например, его высокая эффективность в лечении инфекций, вызванных анаэробами,

а также эмпирические наблюдения позволили нам предположить наличие иммуноактивных свойств у данного препарата. Для подтверждения этого предположения выполнено настоящее исследование, целью которого являлось изучение иммуностропных свойств метронидазола на модели гуморального иммунного ответа *in vivo* у мышей линии С57В1/6.

Методика. В работе использованы мыши самцы линии С57В1 6—8-недельного возраста, полученные из питомника «Светлые горы». Метронидазол («Polfa») растирали и вводили в виде взвеси внутривентрально или внутрибрюшинно в различных дозах от 2,5 до 250 мг/кг. Через 2 ч после последнего введения препарата животных иммунизировали внутривентрально или внутривенно $2,5 \cdot 10^8$ эритроцитами 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 [6]. Для определения количества полипотентных стволовых кроветворных клеток (ПСКК) селезенки использовали метод эндогенных селезеночных колоний гемопоэтических клеток [5]. При изучении скорости очищения кровотока от неорганических веществ (клиренс) за основу использовали метод [7]. Смесь желатины с тушью в объеме 0,2 мл вводили внутривенно. Кровь из орбитальной вены в объеме 0,1 мл начинали забирать через 20 с после введения туши с интервалами в 2 мин в течение 10 мин. Полученные данные обрабатывали статистически по Фишеру—Стьюденту с использованием критерия *t*.

Результаты. С учетом биотрансфор-

Таблица 1

Количество АОК на ЭБ в селезенке мышей линии С57В1 при разных дозах метронидазола, введенного внутрибрюшинно однократно за сутки до внутривенной иммунизации

Доза метронидазола, мг/кг	Число животных	Число спленоцитов на 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	10	153,5±12,4	5205±1056	31,9±6,5
25,0	10	170,0±12,3	11537±2881	73,2±20,4
75,0	9	161,1±9,4	10896±4291	63,7±24,8
125,0	10	161,0±8,3	6826±2139	42,8±13,7
250,0	10	168,0±17,5	4062±1502	31,1±11,6

мазии препарата и терапевтической дозы в экспериментах оценивали способность метронидазола стимулировать образование IgM антител в ходе первичного иммунного ответа, определяли сроки и способ введения препарата, способ иммунизации. Первоначально изучали влияние разных доз метронидазола, введенного однократно внутрибрюшинно за сутки до внутривенной иммунизации, на антителообразование (табл. 1). При такой схеме введения метронидазола его иммуноактивные свойства определяются в дозах от 12,5 до 125 мг/кг. В последующих опытах использована доза 125 мг/кг метронидазола. Она несколько выше оптимальной, но еще эффективна, что и было использовано в дальнейшем для отработки оптимальной дозы препарата, сроков и способов его введения, способа иммунизации. В следующей серии опытов препарат в дозе 125 мг/кг вводили мышам внутрибрюшинно одно-, двух- и пятикратно за 2 ч до внутрибрюшинной иммунизации (табл. 2). Как видно из данных, 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 в значительной степени объясняется условиями контакта антигена с клетками макрофагально-фагоцитирующей системы.

По данным [4], наблюдается резкое снижение антителообразования при внутрибрюшинном введении эритроцитов барана 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 о том, 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 (блок РЭС определенной степени) иммунного ответа не наблюдается. Однако и чрезмерное переваривание также сопровождается угнетением иммуногенеза. Оценивая полученные результаты, мы предположили, что метронидазол действительно стимулирует функциональную и/или метаболическую функцию мононуклеарных фагоцитов, что имеет значение для последующей презентации антигена, введенного разными путями, и развития иммунного ответа.

Для однозначного решения вопроса об иммуотропных свойствах метронидазола проведен специальный опыт. Метронидазол в дозе 125 мг/кг вводили перорально в течение 5 дней, иммунизировали мышей внутривенно или внутрибрюшинно (табл. 3).

Таблица 2

Количество АОК в селезенке мышей линии С57В1 при внутрибрюшинном введении метронидазола в дозе 125 мг/кг за 2 ч до внутрибрюшинной иммунизации

Условия опыта	Число животных	Число спленоцитов на 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:				
однократно	20	193,5±10,1	15181±1878	86,0±12,9
двукратно	25	178,6±6,6	13309±1470	78,8±10,2
пятикратно	25	175,5±10,7	18518±2479	105,5±13,5

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

Условия опыта	Число животных	Число спленоцитов на 10^6	Число АОК	
			во всей селезенке	на 10^6 спленоцитов
Внутривенное введение ЭБ				
контроль	20	$193,7 \pm 14,9$	11123 ± 1598	$56,3 \pm 6,3$
опыт	20	$173,5 \pm 8,6$	23353 ± 2904	$145,0 \pm 22,3$
Внутрибрюшинное введение ЭБ				
контроль	24	$162,3 \pm 11,1$	10767 ± 1155	$77,2 \pm 10,9$
опыт	23	$140,0 \pm 9,8$	8110 ± 1307	$66,9 \pm 12,4$

Пятикратное пероральное введение метронидазола в дозе 125 мг/кг с последующим внутривенным введением антигена существенно и достоверно увеличивает гуморальный иммунный ответ. При изменении способа иммунизации (внутрибрюшинное введение ЭБ) в аналогичном опыте наблюдается даже незначительное угнетение антителообразования. Оценивая в целом полученные результаты, необходимо отметить важность детального изучения различных способов введения препаратов и пути введения антигена в оценке иммуностропных свойств различных веществ, что устранил получение как ложноположительных, так и ложноотрицательных результатов в эксперименте.

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

Основными этапами 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, указывающих на возможное участие клеток макрофагально-фагоцитирующей системы в регуляции пролиферации ПСКК, существования в организме «макрофагального

механизма» регуляции пролиферативной активности ПСКК [2]. 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 ч до сублетального облучения количество эндогенных колоний у опытных мышей было достоверно выше по сравнению с контрольными животными и составило $15,3 \pm 1,8$ гемопоэтических колоний на селезенку (20 наблюдений). При двух- и пятикратном введении метронидазола внутрибрюшинно в той же дозе 125 мг/кг также наблюдалось достоверное увеличение числа эндогенных колоний, которое соответственно составляло $13,9 \pm 1,7$ (14 наблюдений) и $16,3 \pm 2,3$ (21 наблюдение). Увеличение числа эндогенных колоний гемопоэтических клеток в селезенке облученных мышей, которым предварительно вводили метронидазол, свидетельствует о его способности стимулировать пролиферацию ПСКК. Можно предполагать, что препарат прямо действует на ПСКК, усиливая их пролиферацию, либо опосредованно через «макрофагальный механизм».

Заключение. Стимуляция метронидазолом пролиферации ПСКК, определяемая по увеличению эндогенного колониеобразования гемопоэтических клеток, стимуляция функциональной активности макрофагов, определяемая по увеличению скорости очищения кровотока от туши, а также стимуляция антителообразования позволяет предполагать на данном этапе, что иммуноактивное действие метронидазола реализуется через систему мононуклеарных фагоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беклемишев Н. Д. // Иммунология.—1985.— № 5.— С. 11—17.
2. Козлов В. А., Громыхина Н. Ю. // Итоги науки и техники.— Сер.: Иммунология.— М., 1985.— Т. 13.— С. 192—216.
3. Лакин К. М., Макарова В. А. и др. // Фармакол. и токсикол.—1984.— № 2.— С. 67—79.
4. Учитель И. Я. Макрофаги в иммунитете.— М., 1978.
5. Becker A. J., McCulloch E. A., Till J. E. // Nature.—1963.— Vol. 197.— P. 452—454.
6. Cunningham A. J. // Nature.—1962.— Vol. 207.— P. 1106—1107.
7. Donald K., Tennet R. // J. Pathol.—1975.— Vol. 117.— P. 235—238.
8. Lewis A., Carlson P., Chang J. // Ann. Repts. Med. Chem.—1982.— Vol. 17.— P. 191—202.