

THE ANTICHOLINESTERASE MECHANISM AS THE FACTOR IMMUNOTOXICITY OF CHLORINATED HYDROCARBONS

It was established in experiments on noninbrede rats that the acute poisoning of chlorinated hydrocarbons (0,75 LD₅₀) – tetrachloromethane (phenoxin), 1,2-dichloethane and trichloroethylene - inhibiting an acetylcholinesterase, α -naphthyl-AS-acetate esterase and α - naphthyl-butyrate esterase of T lymphocytes and leads to suppression of immune responses caused by function of T-cells.

Keywords: chlorinated hydrocarbons, acetylcholinesterase, α -naphthyl-AS-acetate esterase, α -naphthyl-butyrate esterase, immunotoxicity

П.Ф. Забродский, А.М. Кадушкин, Д.Ю. Иванов

АНТИХОЛИНЭСТЕРАЗНЫЙ МЕХАНИЗМ КАК ФАКТОР ИММУНОТОКСИЧНОСТИ ХЛОРИРОВАННЫХ УГЛЕВОДОРОДОВ

В экспериментах на неинбредных крысах установлено, что острые отравления хлорированными углеводородами (1,2-дихлорэтан, тетрахлорметан, трихлоэтилен) дозе 0,75 ЛД₅₀ ингибируют ацетилхолинэстеразу, α -нафтил-AS-ацетатэстеразу и α -нафтил-бутиратэстеразу Т-лимфоцитов и вызывают супрессию иммунных реакций, обусловленных функцией Т-клеток.

Ключевые слова: хлорированные углеводороды ацетилхолинэстераза, α -нафтил-AS-ацетатэстераза, α -нафтил-бутиратэстераза, иммунотоксичность

В промышленности и быту хлорированные углеводороды (ХУ) – дихлорэтан (ДХЭ), тетрахлорметан (ТХМ), трихлорэтилен (ТХЭ) применяются как растворители масел, смол, битумов, полимеров, каучука, для экстрагирования жиров и алкалоидов, как обеззараживающие средства при обработке кож, чистки и обезжиривания одежды в быту и на производстве лаков и красок, в военном деле – в качестве средства для растворения хлорсодержащих дегазаторов и экстракции токсичных химикатов - ТХ (отравляющих веществ) при их индикации, в качестве растворителя ряда ТХ [1,2,3]. Острые групповые отравления ХУ возможны в процессе уничтожения ТХ, а также при аварийных ситуациях на химических предприятиях. Нельзя исключить употребление ХУ в качестве суррогатов алкоголя или с суицидальными целями [1,4].

В последние годы частота острых интоксикаций ХУ и показатель смертельных исходов от отравлений не уменьшаются. Несмотря на небольшую частоту острых интоксикаций данными соединениями (до 5%), они характеризуются весьма высокой смертностью отравленных (32-96%) [1,2]. Одной из причин танатогенеза могут являться инфекционные осложнения и заболевания, связанные со снижением показателей иммунного статуса в результате иммунотоксических эффектов как ХУ, так и их высокотоксичных метаболитов ХУ может поступать в организм через пищеварительный тракт, дыхательные пути, кожные покровы. Таким образом, вполне обоснованно возникает необходимость в изучении роли ацетилхолинэстеразы (АХЭ) и других эстераз в реализации иммунотоксичных свойств ХУ. В конце 70-годов было доказано и в последующем подтверждено многими исследователями, что в Т-лимфоцитах АХЭ локализована на клеточной мембране, а В-клетки являются эстеразонегативными [5,6,7]. Изучение иммунодефицитных состояний, обусловленных ингибированием эстераз (и, следовательно, активацией холинергической, а также гипоталамо-гипофизарно-адреналовой систем), тесно связано с исследованиями постстрессорных

изменений в организме различной этиологии и имеет как теоретическое, так практическое значение для обоснования способов профилактики и лечения инфекционных осложнений и заболеваний.

Целью настоящего исследования являлось определение связи антихолинэстеразных эффектов хлорированных углеводов с реализацией их Т-зависимой иммунотоксичности.

Материал и методы исследования

Опыты проводили на крысах массой 180-220г. Исследовались антихолинэстеразные свойства (по способности ингибировать АХЭ Т-лимфоцитов) ХУ (ДХЭ, ТХМ, ТХЭ) в дозе 0,75 ЛД₅₀, которые вводили подкожно однократно. Активность АХЭ в Т-лимфоцитах определяли через 4 сут после интоксикации, выделяя клетки путем фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату ("Нитрон") [8] и осуществляя реакции и расчеты по методу [7]. За единицу активности АХЭ (ЕД) принимали мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл суспензии, содержащей 10⁹ Т-лимфоцитов. Активность α -нафтил-AS-ацетатэстеразы и α -нафтил-бутиратэстеразы спленоцитов крысы (в основном Т-клеток органа) изучали гистохимическим методом [9] через 4 сут после воздействия ХУ. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми в иммунотоксикологии и экспериментальной иммунологии методами [1,10]. Исследовали Т-зависимую гуморальную иммунную реакцию и функцию Th1-лимфоцитов в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Гуморальный иммунный ответ оценивали через 4 сут по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке после внутрибрюшинной иммунизации крыс тимусзависимым антигеном эритроцитами барана (ЭБ) в дозе 2·10⁸ клеток через 30 мин после введения яда. Данный тест отражает синтез IgM В-клетками селезенки при участии Th1-лимфоцитов. Формирование (ГЗТ), характеризующее функцию Th1-клеток (а также макрофагов) в клеточной иммунной реакции, определяли у крыс по приросту массы стопы задней

лапы. При этом животных иммунизировали 10^8 ЭБ внутрибрюшинно через 30 мин после введения ХУ. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

Результаты и обсуждение исследования

Т-лимфоциты, выделенные из селезенки, после острого воздействия различными ХУ ($0,75 \text{ ЛД}_{50}$) обладали сниженной антихолинэстеразной активностью по сравнению с контролем (табл. 1). Так, острое отравление ДХЭ, ТХМ и ТХЭ вызывало статистически значимое ($p < 0,05$) уменьшение активности АХЭ в Т-лимфоцитах селезенки соответственно в 1,51; 1,35 и 1,27 раза.

Снижение активности АХЭ в Т-клетках и числа эстеразопозитивных клеток, характеризующих активность других типов эстераз в Т-лимфоцитах (и, в определенной степени в моноцитах и макрофагах [9]) селезенки, прямо связано с уровнем супрессии Т-зависимого антителообразования, а также со степенью редукции реакции ГЗТ. Так, число АОК к ЭБ после действия ДХЭ, ТХМ и ТХЭ через 4 сут существенно уменьшалось соответственно в 1,89; 1,62 и 1,50 раза ($p < 0,05$), а формирование ГЗТ – в 1,51; 1,39 и 1,24 раза ($p < 0,05$) соответственно (табл. 1).

При оценке содержания эстеразопозитивных клеток (Т-клеток) в селезенке крыс установлено (табл. 2), что ДХЭ, ТХМ и ТХЭ уменьшали их относительное количество в органе, являющимся одним из основных продуцентов антител (иммуноглобулинов) [10]. Так, относительное содержание Т-клеток, содержащих α -нафтил-AS-ацетатэстеразу, снижалось через 4 сут после острой интоксикации ДХЭ, ТХМ и ТХЭ соответственно в 1,46; 1,34 и 1,25 раза ($p < 0,05$), а содержание α -нафтилбутиратэстеразопозитивных Т-лимфоцитов – в 1,62; 1,42 и 1,31 раза ($p < 0,05$) соответственно. Следует отметить, что, несмотря на отсутствие

существенных различий показателей иммунного ответа и эстеразной активности при действии различных ХУ, отмечаются минимальные значения иммунных реакций и максимальные показатели редукции эстеразной активности Т-клеток при отравлении ДХЭ, а также наибольшие параметры иммунного ответа и наименьшие уровни активности эстераз Т-клеток при интоксикации ТХЭ.

Таблица 1

Влияние ХУ (0,75 ЛД₅₀) на активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах спленоцитов крыс и Т-зависимые реакции системы иммунитета через 4 сут после острой интоксикации (M±m, n =8-11)

Вещества	Селезенка, активность АХЭ, МЕД/10 ⁹ клеток	АОК к ЭБ, х 10 ³	Реакция ГЗТ, %
Контроль	59,1±5,1	35,9±3,2	37,8±2,3
ДХЭ	39,0± 4,2*	19,2±2,2*	25,0±2,2*
ТХМ	43,9±3,1*	22,1±2,3*	27,2±2,4*
ТХЭ	46,5±3,0*	24,0±2,0*	30,5±2,0*

Примечание: * p<0,05 по сравнению с контролем.

Несомненно, что ингибирование АХЭ использованными нами токсикантами в сублетальных дозах имеет существенное значение в формировании постинтоксикационного иммунодефицитного состояния. При этом Т-лимфоциты (в частности, Th1-клетки), возможно, существенно утрачивают свои функции, что приводит к снижению Т-зависимых иммунных реакций. Это можно объяснить избыточной стимуляцией ацетилхолином м- и н-холинорецепторов, наличие которых на Т-лимфоцитах доказано [5,11]. В результате нарушается оптимальное соотношение цАМФ/цГМФ в иммунocyтах, необходимое для их

Таблица 2

Влияние острой интоксикации ХУ (0,75 ЛД₅₀) на содержание α -нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных и α -нафтилбутиратэстеразопозитивных клеток в спленоцитах крыс ($M \pm m$, $n=8-11$)

Вещества	α -нафтил-AS-ацетатэстеразопозитивных клетки, %	α -нафтил-бутиратэстеразопозитивные клеток, %
Контроль	48,8 $\pm$ 3,4	38,1 $\pm$ 3,3
Дихлорэтан	33,5 $\pm$ 3,1*	23,5 $\pm$ 2,5*
Тетрахлорметан	36,4 $\pm$ 3,2*	26,8 $\pm$ 2,7*
Трихлорэтилен	39,0 $\pm$ 3,0*	29,1 $\pm$ 2,4*

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

пролиферации и дифференцировки [11]. Роль неспецифических эстераз в реализации Т-зависимых иммунных реакций, несмотря на давно доказанную возможность их ингибирования антихолинэстеразными соединениями [6], до сих пор не ясна. Безусловно, в реализации иммунотоксических эффектов ХУ антихолинэстеразное (антиэстеразное) действие, по сравнению с другими многочисленными механизмами, играет не основную роль, однако это не исключает его существенное значение в формировании Т-зависимого иммунодефицита [1,3,12].

Данные литературы свидетельствуют [5,6,13], что антихолинэстеразные соединения, ингибируя активность эстераз в Т-лимфоцитах, а также в моноцитах, интактных и активированных лимфокинами естественных клетках-киллерах, ослабляют иммунологический контроль и эффекторные функции, опосредуемые этими клетками. Вероятно, инактивация эстераз иммунокомпетентных клеток снижает эстеразозависимую детоксикацию, в результате чего инициируется процесс лимфомогенеза, подавляется иммунитет к вирусу Эпштейна-Барра и человеческому герпесвирусу-6, способствующим развитию лимфом [13].

Таким образом, острая интоксикация хлорированными углеводородами в дозе, составляющей 0,75 ЛД₅₀, приводит к ингибированию ацетилхолинэстеразы, α -нафтил-AS-ацетатэстеразы и α -нафтил-бутиратэстеразы Т-лимфоцитов, приводящему к супрессии Т-зависимых иммунных реакций.

Список литературы

1. **Забродский, П.Ф.** Иммуотропные свойства ядов и лекарственных средств / П.Ф. Забродский. – Саратов, изд. Саратовского мед. ун-та, 1998.-214 с.
2. **Лужников, Е.А.** Острые отравления / Е.А Лужников, Л.Г. Костомарова // Руководство для врачей. 2-е изд., перераб и доп. - М.: Медицина. 2000. – 434 с.
3. **Тиунов, Л.А.** 1,2-Дихлорэтан / Л.А. Тиунов // Вредные химические вещества. Углеводороды. Хлорпроизводные углеводородов: Справ. изд. / Под. ред. В.А. Филова и др. – Л.: Химия, 1990.- С. 357-372.
4. **Бадюгин, И.С.** Военная токсикология, радиология и защита от оружия массового поражения / Под ред. И.С. Бадюгина / И.С. Бадюгин, П.Ф. Забродский, В.П. Поляруш. - М.: Военное издательство, 1992. – 334 с.
5. **Забродский, П.Ф.** Влияние ксенобиотиков на иммунный гомеостаз / П.Ф. Забродский // Общая токсикология/ Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова.- М.: Медицина, 2002. – С. 352-384.
6. **Fergula, J.** The effect of organophosphorus inhibitors, p-nitrophenol and cytocholasin-B on cytotoxic killing of tumor cells and the effect of shaking / J. Fergula, G. L. Ashercon, E. L. Becker // Immunol. - 1972.- Vol. 23.- No 4. - P. 577 - 590.
7. **Szelenyi, J.G.** Acetilcholinestrerase activity of lymphosytes: an enzyme characteristic of T-cells / J.G. Szelenyi, E. Bartha, S.R. Hollan // Brit. J. Haematol.- 1982.- Vol. 50, N 2. - P. 241-245.

8. **Ширшев, С.В.** Зависимость внутриклеточного уровня цАМФ интактных спленоцитов от популяционного состава клеточной суспензии и активности циклооксигеназы / С.В. Ширшев // Бюл. эксперим. биол. и мед. -1998.- №6.- с. 666-669.
9. **Хейхоу, Ф.Г.Дж.** Иммунологическая цитохимия / Ф.Г.Дж. Хейхоу, Д. Кваглино.-М.: Медицина, 1983.-319 с.
10. **Ройт, А.** Иммунология. Пер. с англ. / А. Ройт, Дж .Бростофф, Д. Мейл. - М.: Мир, 2000. – 582 с.
11. **Richman, D.P.** Nicotinic acetylcholine receptor: evidence for a functionally distinct receptor on human lymphocytes / D.P. Richman, B.G.W. Arnason // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1979.-Vol. 76, N 9.-P. 4632-4635.
12. **Забродский, П.Ф.** Изменение неспецифической и иммунологической резистентности организма при остром отравлении дихлорэтаном / П.Ф. Забродский, В.Ф. Киричук, А.В. Грызунов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1997.-Т. 123.-№1.-С. 51-53.
13. **Newcombe, D.S.** Immune surveillance, organophosphorus exposure, and lymphomagenesis / D.S. Newcombe // Lancet.-1991.-N 8792.-P. 539-541