

Российский хим. журн. (Журн. Рос. хим. общества им. Д.И. Менделеева) 2007. № 3. С. 25–28.

УДК 623.459:547.241:612.017.1.

**СВЯЗЬ С СУПРЕССИЕЙ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ РЕДУКЦИИ
ФУНКЦИИ TH1- И TH2-ЛИМФОЦИТОВ И СНИЖЕНИЯ
ПРОДУЦИРУЕМЫХ ИМИ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ ПРИ ПОДОСТРОМ
ОТРАВЛЕНИИ ТОКСИЧНЫМИ ХИМИКАТАМИ**

Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Ковалев А.Ю., Кадушкин А.М.

Саратовский военный институт радиационной, химической и
биологической защиты, Саратов

В экспериментах на крысах Wistar установлено, что при подостром отравлении токсичными химикатами веществом VX, заринном, сернистым ипритом и люизитом (ежедневное подкожное введение в дозе $1/7$ DL_{50} в течение 6 сут) супрессия клеточных и гуморальных реакций, а также снижение концентрации в крови цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4) с уменьшением соотношений ИЛ-2/ИЛ-4 показали, что редукция функции Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-клетками более выражена при действии VX и зарина. При интоксикации сернистым ипритом и люизитом данные субпопуляции Т-лимфоцитов поражаются в равной степени.

Ключевые слова: токсичные химикаты, иммунотоксичность, Th1, Th2-лимфоциты, интерлейкины

**THE ASSOCIATION OF SUPPRESSION OF IMMUNE RESPONSES
WITH REDUCTION OF FUNCTION OF TH1- AND TH2-
LYMPHOCYTES AND DECREASE PRODUCED BY THEM OF
INTERLEUKINS AT A SUBACUTE INTOXICATION OF TOXIC
CHEMICALS**

P. F. Zabrodskii, V.G. Germanchuk, Y.A. Kovalev, A.M. Kadushkin

Saratov Military Institute of Radiation, Chemical and Biological Defense

It was established in experiments on Wistar rats that subacute intoxication of toxic chemicals of VX, sarin, sulphur mustard, lewisite at (daily hypodermic administration at a dose of $1/7$ LD₅₀, during 6 day) invoked the suppression of cellular and humoral immune responses and decrease of concentration in a blood interleukins (IL-2, IL-4) with diminution of a relation an IL-2/ IL-4 have shown, that the reduction of function of Th1-lymphocytes in comparison with Th2-cells is more expressed. Th1- and Th1-lymphocytes are amazed equally at intoxication with sulphur mustard and lewisite

Keywords: toxic chemicals, immunotoxicity, Th1, Th2-lymphocytes, interleukins

Токсичные химикаты (ТХ) - зарин, вещество VX, сернистый иприт, люизит, – являются основным элементом химического оружия (ХО) и подлежат уничтожению согласно международным соглашениям на специальных промышленных объектах [1,5]. Не исключена возможность аварий на данных объектах, а также массовые поражения людей при транспортировке и хранении ТХ. Позитивные шаги международного сообщества, в том числе и России, в области ликвидации и полного запрета ХО не уменьшили реальность его использования в террористических и криминальных целях [3,5,14,16]. Существует возможность возникновения аварийных ситуаций в процессе уничтожения ХО, которые могут сопровождаться выбросом в окружающую среду ТХ или продуктов их

деструкции и приводить к поражению персонала объектов уничтожения ХО или населения прилегающих территорий [5]. Кроме того, до сих пор не исключено использование ТХ в локальных вооруженных конфликтах [15,16]. Сернистый иприт и люизит – ТХ кожно-нарывного действия (везиканты) [15], их запасы, подлежащие уничтожению, значительно превышают запасы других отравляющих веществ (ОВ). Из ТХ кожно-нарывного действия иприт широко применялся в период первой мировой войны и 10 локальных вооруженных конфликтов 20 столетия [16], в частности в Ирано-Иракском конфликте [11]. В настоящее время за рубежом активно ведутся разработки поиски высокоэффективных терапевтических (антидотных) средств при поражении заринном и веществом VX, являющимися отравляющими веществами нервно-паралитического действия (фосфорорганические отравляющие вещества), обладающие способностью необратимо ингибировать ацетилхолинэстеразу [9,13,18], исследуются биомаркеры для дифференциальной диагностики между поражением кожи сернистым ипритом или люизитом [10], изучаются отдаленные эффекты поражения ипритом [16] и заринном [17].

Отравления ТХ могут сопровождаться инфекционными осложнениями и заболеваниями, связанными с формированием постинтоксикационного иммунодефицитного состояния [3,4].

Разработка наряду с антидотными средствами способов снижения поражения системы иммунитета токсичными химикатами предполагает дальнейшее изучение их иммуотропных эффектов [2,3].

Целью исследования являлась оценка роли Th1, Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4) в формирование супрессии гуморальных и клеточных иммунных реакций при подостром отравлении токсичными химикатами.

Материал и методы исследования

Эксперименты проводились на крысах Wistar обоего пола массой 180-240 г. ТХ вводили подкожно в дозе $1/7 \text{ DL}_{50}$ ежедневно подкожно в течение 6 сут (DL_{50} зарина, VX, сернистого иприта и люизита при подкожном введении составляли соответственно $0,21 \pm 0,02$, $0,018 \pm 0,004$, $5,5 \pm 0,3$ и $2,8 \pm 0,3$ мг/кг (иприт и люизит вводили в растворе диметилсульфоксида). Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунологии [2]. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому (эритроцитам барана - ЭБ) антигену определяли на 5 сут по числу АОК в селезенке после острой интоксикации ТХ с одновременной внутрибрюшинной иммунизацией крыс данными антигенами в дозах $2 \cdot 10^8$ клеток. В использованном тесте гуморальная иммунная реакция на введение ЭБ характеризует способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции В-лимфоцитами (плазматическими клетками) IgM [6]. АОК к ЭБ, синтезирующие IgG, определяли в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле на 8 сут [6,19]. Данные литературы позволяют полагать, что данный метод характеризует преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, так как Th1-лимфоциты обеспечивают возможность образования в этот период антителогенеза кроме IgM так же и IgG_{2a}, составляющих не более 20% от всех подклассов IgG [6,12].

Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) через 4 сут после первого введения ТХ спектрофотометрически. Формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), характеризующую функцию Th1-лимфоцитов [5], определяли у животных по приросту массы стопы задней лапы в %. При этом крыс внутрибрюшинно иммунизировали 10^8 ЭБ через 30 мин после введения ТХ. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$)

вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч.

Концентрацию цитокинов (ИЛ-2, ИЛ-4) определяли в периферической крови крыс через 4 и 7 сут после первого введения ТХ методом иммуноферментного анализа по протоколам, указанным в инструкции по применению наборов (BioSource Int. ELISA Kits).

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

Результаты исследования

Под влиянием ТХ (табл. 1) происходило снижение гуморального иммунного ответа через 4 сут к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов, по сравнению с контрольным уровнем. Так, VX, зарин, иприт и люизит уменьшали данный параметр соответственно в 2,66; 2,32; 3,95 и 3,22 раза ($p < 0,05$). Через 7 сут отмечалось супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов. Так, при действии VX и зарины данный параметр снижался соответственно в 1,72 и 1,44 раза ($p < 0,05$), при отравлении ипритом и люизитом - соответственно в 3,73 и 3,33 раза ($p < 0,05$). При отравлении VX, зарином, ипритом и люизитом отмечалась также существенная редукция активности ЕКК соответственно в 2,56; 2,23 4,31 и 3,42 раза ($p < 0,05$) и реакции ГЗТ - соответственно в 2,24; 2,04; 3,64 и 3,05 раза ($p < 0,05$). Установлено, что иммунные реакции под влиянием иприта и люизита по сравнению с действием VX и зарины уменьшались в большей степени ($p < 0,05$ для большинства сравниваемых групп).

Таблица 1

Влияние подострой интоксикации ТХ (ежедневное подкожное введение в дозе 1/7 DL₅₀ в течение 6 сут) на показатели системы иммунитета крыс ($\bar{x} \pm S_x$, n =7-11)

Серии опытов	АОК к ЭБ (IgM), 10 ³	АОК к ЭБ (IgG), 10 ³	ЕЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	38,3 $\pm$ 3,6	15,3 $\pm$ 1,6	31,5 $\pm$ 3,2	35,7 $\pm$ 2,5
VX	14,4 $\pm$ 1,5*	8,9 $\pm$ 1,1*	12,3 $\pm$ 2,2*	15,9 $\pm$ 2,1*
Зарин	16,5 $\pm$ 1,7*	10,6 $\pm$ 1,0*	14,1 $\pm$ 2,0*	17,5 $\pm$ 1,9*
Иприт	9,7 $\pm$ 0,8**	4,1 $\pm$ 0,9**	7,3 $\pm$ 0,9*°	9,8 $\pm$ 1,1*°
Люизит	11,9 $\pm$ 1,2**	4,6 $\pm$ 0,8**	9,2 $\pm$ 1,1*°	11,7 $\pm$ 1,3*°

Примечание: * - p<0,05 по сравнению с контролем; ** - p<0,05 по сравнению с действием VX и зарина; *° - p<0,05 по сравнению с действием зарина.

Как уже указывалось, согласно данным литературы число АОК к ЭБ через 4 сут характеризует синтез IgM В-лимфоцитами и функцию Th1-клеток. Активность ЕКК и формирование ГЗТ также свидетельствует о способности Th1-лимфоцитов влиять на данные реакции, а число АОК к ЭБ в реакции непрямого локального гемолиза в геле через 7 сут отражает синтез IgG и функцию Th2-лимфоцитов [6,12,19]. Показатели, характеризующие различные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при подостром действии VX и зарина в среднем снижались соответственно в 2,34 и 1,58 раза, а при отравлении ипритом и люизитом - в 3,60 и 3,53 раза соответственно. При этом Th1-лимфоциты подвергались действию ТХ при введении токсикантов крысам в суммарной дозе 4/7 DL₅₀, а Th2-лимфоциты - в дозе 6/7 DL₅₀. Это свидетельствует о том, что под влиянием антихолинэстеразных токсикантов VX и зарина в существенно большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов, а при действии везикантов иприта и люизита функция Th1- и Th2-лимфоцитов нарушается в равной степени.

Данное заключение подтверждается исследованием концентрации цитокинов в периферической крови крыс (табл. 2). При подострой интоксикации VX выявлено уменьшение концентрации ИЛ-2 и ИЛ-4 на 5 сут соответственно в 2,08 и 1,33 раза ($p<0,05$), а на 8 сут - в 2,24 и 1,49 раза ($p<0,05$) соответственно. Действие зарина вызывало в целом такую же редукцию исследованных параметров.

Таблица 2

Влияние подострой интоксикации токсичными химикатами (ежедневное подкожное введение дозы 1/7 DL_{50} в течение 6 сут) на содержание цитокинов в периферической крови крыс, пг/мл ($\bar{x} \pm Sx$, $n=6$)

Токсичные химикаты		ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-2/ИЛ-4
Контроль		1321 $\pm$ 92	116 $\pm$ 12	11,4
VX	5	635 $\pm$ 32*	87 $\pm$ 6*	7,3
	8	590 $\pm$ 30*	78 $\pm$ 5*	7,6
Зарин	5	556 $\pm$ 37*	80 $\pm$ 7*	7,0
	8	519 $\pm$ 28*	69 $\pm$ 5*	7,5
Иприт	5	423 $\pm$ 35*	39 $\pm$ 4*	10,8
	8	311 $\pm$ 31**	28 $\pm$ 3**	11,1
Люизит	5	517 $\pm$ 38*	45 $\pm$ 5*	11,5
	8	369 $\pm$ 40**	37 $\pm$ 4*	10,0

Примечание: 5, 8 - время исследования после иммунизации, сут; * - $p<0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p<0,05$ по сравнению с показателем на 5 сут.

Иприт снижал содержание в периферической крови ИЛ-2 и ИЛ-4 на 5 сут соответственно в 3,12 и 2,97 раза ($p<0,05$), а на 8 сут - в 4,25 и 4,14 раза ($p<0,05$) соответственно. Концентрация в крови ИЛ-2 и ИЛ-4 на 5 сут после действия люизита уменьшалась в 2,56 и 2,58 раза ($p<0,05$) соответственно, а на 8 сут - в 3,58 и 3,05 раза ($p<0,05$) соответственно. При отравлении ипритом и люизитом снижение интерлейкинов было более выражено по сравнению с действием антихолинэстеразных ТХ ($p<0,05$), а на 8 сут концентрация ИЛ-2 и ИЛ-4 снижалась по сравнению с

показателями, зарегистрированными на 5 сут. Полученные данные свидетельствуют о том, что при действии VX и зарина концентрация ИЛ-2 по сравнению с ИЛ-4 в крови снижается в большей степени, а при интоксикации ипритом и люизитом содержание в крови ИЛ-2 и ИЛ-4 уменьшается в равной степени.

Известно, что ИЛ-2 продуцируют Th1-лимфоциты, а ИЛ-4 – Th2-лимфоциты [6,7,12]. Увеличение соотношения ИЛ-2/ИЛ-4 характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th2-типа по сравнению с функцией Th1-клеток [7]. Нами установлено, что соотношение ИЛ-2/ИЛ-4 при отравлении VX составляло на 5 и 8 сут соответственно 7,3 и 7,6 при контрольном значении 11,4. Аналогичные данные получены при действии зарина. При подостром отравлении ипритом и люизитом соотношение ИЛ-2/ИЛ-4 находилось в пределах от 10,0 до 11,5. Это свидетельствует о более выраженной супрессии антихолинэстеразными ТХ функции Th1-лимфоцитов и приблизительно равной степени редукции функции Th1- и Th2- клеток ТХ кожно-нарывного действия. Вероятно, супрессирующий эффект антихолинэстеразных ТХ в отношении преимущественно Th1-лимфоцитов обусловлен способностью этих токсикантов ингибировать в большей степени ацетилхолинэстеразу на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа и α -нафтил-AS-ацетатэстеразу и α -нафтилбутиратэстеразу в их цитозоле [2,3,8], а также большей ролью эстераз в реализации функций данной субпопуляции Т-лимфоцитов.

Редукция активности ЕКК под влиянием ТХ, видимо, связана со снижением продукции ИЛ-2 Th1-клетками. Известно, что данный цитокин активируют ЕКК [6,12].

Заключение

Таким образом, подострое действие токсичных химикатов зарина и вещества VX в дозе $1/7 \text{ DL}_{50}$ (ежедневно, в течение 6 сут) в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-лимфоцитов. Иммунные реакции, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов, при подострой интоксикации ипритом и люизитом снижаются в равной степени. При этом супрессия параметров более выражена, чем при действии зарина и VX. Особенности поражения Th1- и Th2-лимфоцитов при действии зарина, VX, иприта и люизита подтверждается исследованиями, свидетельствующими о том, что в периферической крови концентрация ИЛ-2 по сравнению с ИЛ-4 уменьшается в большей степени. При действии иприта и люизита содержание ИЛ-2 и ИЛ-4 в крови снижается в равной степени, при этом редукция показателей более выражена, чем при действии антихолинэстеразных токсичных химикатов. Полученные данные могут быть использованы для разработки способов снижения поражения системы иммунитета токсичными химикатами путем использования цитокинов, в частности, ИЛ-2 и ИЛ-4, в оптимальных дозах в зависимости от выявленных особенностей нарушений иммунного гомеостаза антихолинэстеразными ТХ, сернистым ипритом и люизитом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Жуков В.Е., Клаучек В.В., Шкодиц П.Е. // Токсикол. вестник.-2002.- №5.- С. 31-35.
2. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Мальцева Г.М., Молотков А.О..
Иммуотропные свойства холинергических веществ / Под редакцией

- П.Ф.Забродского. – Саратов: Издательство «Научная книга», 2005. – 251 с.
3. Забродский П. Ф. Влияние ксенобиотиков на иммунный гомеостаз. – В кн.: Общая токсикология/ Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова.- М.: Медицина, 2002. – С. 352-384.
 4. Забродский П. Ф., Германчук В.Г., Киричук В.Ф. и др.// Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2003.-Т. 136.-№8.-С. 202-204.
 5. Петров А.П., Софронов Г.А., Нечипоренко С.П., Сомин И.Н. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. Хим. об-ва им Д.И. Менделеева). - 2004. – Т. XLVIII, № 2. –С.110-116.
 6. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. - М.: Мир, 2000. – 582 с.
 7. Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед.-2005.-Т. 140, № 12.-С. 622-624.
 8. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Иммунологическая цитохимия.-М.: Медицина, 1983.-319 с.
 9. Amitai G., Adani R., Fishbein E. et al. // J.Appl.Toxicol. –2006 – Vol. 26.- N 1. –P.81-87.
 - 10.Arroyo C.M., Burman D.L., Kahler D.L. et al. // Cell Biol. Toxicol. – 2004. – Vol.20, N 6. –P. 345-359.
 - 11.Balali-Moode M., Hefazi M. Mahmoudi M. et at. // Fundam. Clin. Pharmacol. –2005 – Vol. 19.-N 6. –P. 713-721.
 - 12.Georgiev V.St., Albright J.E. Cytokines // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993. - Vol. 685. – P.284-602.
 - 13.Lenz D.E., Maxwell D.M., Korlovich I. et al. // 2005.- Vol. 157-158. P.- 158:205-210.
 - 14.Masuda N., Tahatsu M., Mjnnau Y., Ozawa T. // Lancet.- 1995.- N 8962.- P. 1446-1447.

15. McManus J., Huebner K. M. Vesicants // Crit. Care Clin.- 2005. Vol. 21, N 4. –P. 707-718,
16. Saladi R.N., Smith E., Persaud A.N. // Clin. Exp. Dermatol. –2006 – Vol. 1.-N 6. –P. 1-5.
17. Sharp D. // Lancet. – 2006.- Vol. 14.- N 367 (9505).- P.95-97.
18. Shin T.M., Kan R.K., McDonough J.H. // Chem. Biol. Interact. – 2005.- Vol. 157-158.- P.293-303.
19. Smialowicz R. J., Luebke R.W., Riddle M. M. // Toxicology. - 1992. - Vol.75, №5. - P.235-247.