

**П.Ф. Забродский, И.Х. Яфарова**

**Патогенетические механизмы нарушений иммунного  
статуса фосфорорганическими соединениями (ФОС) в  
сочетании с антидотами. Хроническое действие ФОС.  
Фармакологическая коррекция**

© П.Ф. Забродский, 2012

© И.Х. Яфарова, 2012

ISBN 978-5 -91272-254-15

УДК 612.014.46:616-092  
ББК 52.84+52.54+52.8 Я 41  
3-130

**САРАТОВ – 2012**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
Перечень сокращений	3
Введение	5
Глава 1. Механизмы нарушений иммунитета при действии фосфорорганических соединений. Способы фармакологической коррекции	8
Глава 2. Материал и методы исследований	40
Глава 3. Воздействие ФОС в комбинации с их антидотами на факторы неспецифической резистентности организма	56
Глава 4. Влияние острого отравления фосфорорганическими соединениями в комбинации с их антидотами на систему иммунитета	66
Глава 5. Изменение функции Th1- и Th2-лимфоцитов, кооперации Т- и В-лимфоцитов, концентрации в крови кортикостерона, активности ацетилхолинэстеразы лимфоцитов, состояния перекисного окисления липидов под влиянием ФОС в комбинации с антидотами	93
Глава 6. Фармакологическая коррекция нарушений иммунного статуса после острого действия ФОС в комбинации с антидотами	111
Глава 7. Воздействие хронической интоксикации фосфорорганическими веществами на показатели неспецифической резистентности организма содержание провоспалительных цитокинов в крови. Коррекция нарушений	125
Заключение	138
Выводы	169
Практические рекомендации	171
Литература	172

## ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

- АЗКЦ - антителозависимая клеточная цитотоксичность
- АКТГ – адрено-кортикотропный гормон
- АОК - антителообразующие клетки
- АХЭ – ацетилхолинэстераза
- БОВ – боевые отравляющие вещества
- ГГНС - гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
- ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа
- ДДВФ-диметилдихлорвинилфосфат
- ЕКК - естественные клетки-киллеры
- ЕЦ - естественная цитотоксичность
- ИАН - индекс активности нейтрофилов
- ИКК – иммунокомпетентные клетки
- ИЛ-1 (2 и т.д.) - интерлейкин-1 (2 и т.д.)
- К-клетки – клетки-киллеры (лимфоциты, определяющие АЗКЦ)
- НРО – неспецифическая резистентность организма
- ПЯЛ- полиморфноядерные лейкоциты
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- Th0-, Th1-, Th2 – Т-лимфоциты- хелперы типа 0,1,2
- ТКБ- тромбоцитарный катионный белок
- ТХ- токсичные химикаты
- ФМАН – фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов
- ФОС - фосфорорганические соединения
- ХО – химическое оружие
- ЭБ - эритроциты барана
- ЭК- эритроциты кур
- DL<sub>50</sub> - средняя смертельная доза, вызывающая смертельный исход у 50%  
отравленных
- Vi-антиген (Vi-Ag) - Т-независимый Vi - антиген брюшнотифозной  
вакцины

## ВВЕДЕНИЕ

Изучение воздействия фосфорорганических соединений (ФОС) на показатели неспецифической резистентности организма и иммунную систему, а также изучение возможностей коррекции его нарушений является одной из наиболее актуальных проблем токсикологии и иммунологии [Забродский П.Ф. и соавт., 1987; 1989, 1991, 1992, 2005, 2007, 2010, 2011]. Это определяется необходимостью уничтожения десятков тонн ФОС, относящихся к боевым отравляющим веществам, возможностью химически опасных аварий с поражением людей [Петров А.Н. и соавт. 2004; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], наличием и использованием антихолинэстеразных химических веществ в промышленности, сельском хозяйстве, медицине, быту, а также ростом отравлений ФОС, формирующих вторичные постинтоксикационные иммунодефициты [Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф. и соавт., 1995, 1996, 1998, 1999, 2009, 2010, 2011; Loose L.D., 1985; Luster M.J. et al., 1987; Sullivan J. B., 1989; Kimber I., 1996; Salazar K.D., 2008].

Нельзя полностью исключить и возможность применения ХО, включающего ФОС, в террористических и криминальных целях [Петров А.Н. и соавт. 2004; Masuda N. et al., 1995; Morita H. et al., 1995], а также в локальных вооруженных конфликтах [Balali-Moode M. et al., 2005; McManus J., Huebner K. M., 2005; Amitai G. et al., 2006; Saladi R.N et al., 2006]

Из ксенобиотиков, способных вызвать массовые отравления, ФОС наиболее опасны [Саватеев Н.В., Куценко С.А., 1993; Куценко С.А., 2004; Schans M. J. et al., 2004; Rosenberg Y.J., 2005]. Частота смертельных исходов у больных, получивших острую интоксикацию ФОС, в лечебных учреждениях составляет 20-25% [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Не вызывает сомнения, что одной из причин смерти отравленных при острых интоксикациях ФОС существенную роль играет снижение неспецифической резистентности организма (НРО) и депрессия иммунного статуса

[Забродский П.Ф. и соавт., 2003, 2004, 2005, 2007, 2011; Descotes J., 1986; Salazar K.D., 2008]. Возможна также реализация аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний [Хаитов Р. М. и соавт., 1995б; Забродский П. Ф., 2002; Kimber I., 1996; Rosenberg Y.J., 2005; Boers D. et al., 2008; Proskolil B.J. et al., 2008].

В настоящее время не исследованы особенности редукции факторов НРО и иммунных реакций в зависимости от особенностей токсикокинетики (характера метаболизма) различных ФОС [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], которые следует учитывать при назначении антидотов антихолинэстеразных соединений.

Известно, что после острого отравления ФОС, в частности, при групповых и массовых острых отравлениях, предусмотрено применение холиноблокаторов и реактиваторов холинэстеразы [Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Schans M. J. et al., 2004; Kuca K. et al, 2006]. При этом их коррегирующее влияние на нарушения иммунного статуса ФОС практически не исследовано [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф. и соавт., 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2011].

Исходя из особенностей нарушений НРО, гуморального и клеточного иммунного ответа при отравлениях ФОС в комбинации со средствами специфической терапии, следует изучить возможность применения эффективных иммуностимуляторов [Хаитов Р. М. и соавт., 1995а; 2002; 2006], которые позволят существенно снизить частоту постинтоксикационных осложнений и заболеваний, и, следовательно, уменьшить смертность пораженных ФОС.

Таким образом, учитывая широкое использование ФОС в промышленности и сельском хозяйстве, существующую вероятность поражения людей при аварийных ситуациях на объектах по уничтожению ФОС, возможность применения ряда ФОС при террористических актах, а также недостаточно изученные патогенетические особенности действия

различных ФОС в сочетании со средствами специфической терапии на гомеостаз иммунной системы и возможность его коррекции, следует заключить, что данная проблема актуальна и важна как в теоретическом, так и в практическом отношениях.

## ГЛАВА 1

# МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЙ ИММУНИТЕТА ПРИ ДЕЙСТВИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ. СПОСОБЫ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ

### 1.1. Общая характеристика фосфорорганических веществ

В 1902 г. А.Е. Арбузов открыл новый путь получения эфиров алкилфосфиновых кислот, получивших название “перегруппировки Арбузова”. Это позволило в 1931 г. А.Е. Арбузову и Б.А. Арбузову впервые получить эфиры пиррофосфористой, а также моно- и дитиопиррофосфорных кислот и выделить в чистом виде этиловый эфир пиррофосфорной кислоты. В 1932 г. Lange и Kruger синтезировали ряд алкиловых эфиров фторфосфорной кислоты, получивших название «эфиров Ланге». Было установлено, что эти соединения ядовиты. Начиная с 1950 г. синтез новых фосфорорганических соединений (ФОС) принял исключительно широкий размах [Голиков С.Н., 1968; Rosenberg Y.J., 2005; Kuca K. et al, 2006]. В настоящее время производство ФОС в мире составляет сотни тысяч тонн [Каган Ю.С., 1977; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]

ФОС составляют обширную группу веществ, широко используемых в сельском хозяйстве в качестве пестицидов (ФОП): инсектицидов – для уничтожения насекомых, акарицидов – клещей, нематоцидов – червей, зооцидов и ротентицидов – грызунов, лимацидов – моллюсков, ларвицидов – личинок насекомых, овоцидов – яиц насекомых, фунгицидов – грибков, гербицидов – сорняков, дефолиантов (препаратов, вызывающих опадение листьев и облегчающих уборку некоторых культур), десикантов (препаратов, способствующих подсушиванию растений). В промышленности ФОС используются для синтеза различных веществ, обладающих избирательным действием в отношении определенных видов животных и другими целями. В быту ФОС применяются преимущественно в качестве инсектицидов. Боевые отравляющие вещества (БОВ)

составляют специальную группу фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ), которые, включая средства доставки (применения), являются химическим оружием [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

По своему химическому строению большинство ФОС относятся к следующим группам: эфиры тиофосфорной кислоты (тиофос, метафос, метилнитрофос, меркаптофос, трихлорметафос-3), эфиры дитиофосфорной кислоты (карбофос, фосфамид), амиды пирогликофосфорной кислоты (октаметил), эфиры алкилфосфорных кислот (хлорофос, ДДВФ) [Голиков С.Н., 1968; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000].

В отечественной литературе ФОС по токсичности разделяют на 4 группы: сильнодействующие токсичные вещества – метафос, тиофос, меркаптофос, метилэтилтиофос ( $DL_{50}$  - 10- 50 мг/кг), высокотоксичные вещества – метилмеркаптофос, фосфамид, ДДВФ, базудин, антио, цидал, фталофос, бензофосфат ( $DL_{50}$  - 50-200 мг/кг), соединения средней токсичности – хлорофос, метилнитрофос, карбофос, трихлорметафос-3, сайфос ( $DL_{50}$  - 200-1000 мг/кг), вещества малой токсичности – винилфосфат, бромфос, абат, цианокс, валексон, демуфос ( $DL_{50}$  - более 1000 мг/кг) [Медведь Л.И. и соавт., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. В особую группу можно выделить ФОВ, являющиеся БОВ с  $LD_{50}$  менее 10 мг/кг (зарин, зоман, VX) и яды, относящиеся к, так называемым, супертоксикантам ( $LD_{50}$  – менее 5 мг/кг при внутрижелудочном введении) [Куценко С.А., 2004; Rosenberg Y.J., 2005].

ФОС представляют собой большую группу токсикантов, обладающих антихолинэстеразным эффектом и довольно подробно описанных в многочисленных учебниках и монографиях [Голиков С.Н., 1968; Медведь Л.И. и соавт., 1968; Каган Ю.С., 1977; Саватеев Н.В., 1978; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Маркова И.В. и соавт., 1998; Куценко С.А., 2004].

Основной механизм действия ФОС на системы и органы организма –



ингибирование ацетилхолинэстеразы. Это вызывает накопление ацетилхолина в центральной нервной системе (ЦНС), мозговом веществе надпочечников, ганглиях вегетативной нервной системы, а также в синаптической щели нервных окончаний парасимпатического отдела нервной системы, подходящим к м-холинорецепторам внутренних органов. Кроме того, ацетилхолин выделяется из пресинаптической мембраны нервных окончаний симпатической нервной системы, иннервирующей потовые железы, и соматической нервной системы (синапсы скелетных мышц). В результате действия ацетилхолина реализуется мускариноподобное, никотиноподобное и центральное действие ФОВ [Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

Неантихолинэстеражным механизмами действия ФОС [Прозоровский В.Б., Саватеев Н.В., 1976] является их способность фосфорилировать некоторые белки, действовать на м- и н-холинорецепторы (курареподобный эффект), взаимодействовать с протеолитическими ферментами, оказывать воздействие на адренергические структуры, способствующее увеличению секреции ацетилхолина из нервных окончаний [Прозоровский В.Б., Саватеев Н.В., 1976; Саватеев Н.В., 1978; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Sharp D., 2006].

Острые и хронические интоксикации ФОС, как правило, происходят при нарушении техники безопасности в процессе использования данных соединений по назначению, а также при употреблении их с суицидальной целью или в качестве суррогатов алкоголя. В связи с реализацией Федеральной целевой программы «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации», предусматривающей широкомасштабную утилизацию токсичных химикатов, существенная часть которых является фосфорорганическими отравляющим соединениям, не исключена

вероятность массовых отравлений при авариях и нарушениях техники безопасности. Возможно использование ФОС в качестве отравляющих веществ при осуществлении террористических актов [Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005] (например, использование в 1995 году зарина в метро Токио сектой «Аум Синрике» [Masuda N. et al., 1995]).

При острых отравлениях ФОС возникают поражения многочисленных органов и систем, что проявляется психоневрологическими симптомами, нарушением функции дыхания, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, печени, почек и других органов и систем [Голиков С.Н., 1968; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006].

Наиболее частыми осложнениями тяжелых отравлений ФОС являются пневмонии, поздние интоксикационные психозы и полиневриты [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Rosenberg Y.J., 2005; Sharp D., 2006].

Существуют основания полагать, что одной из причин постинтоксикационной пневмонии является нарушение механизмов физиологической регуляции системы иммунитета [Забродский П.Ф. и соавт., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Sharp D., 2006]. Возможны и другие инфекционные осложнения и заболевания после острого отравления ФОС, а также патологические нарушения, тесно связанные с изменением регуляции иммунного гомеостаза: мутагенное, канцерогенное, демиелинизирующий эффект и аллергические реакции [Каган Ю.С., 1977; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2000].

## **1.2. Токсикологические свойства хлорофоса**

Хлорофос (диптерекс, диплокс, трихлорфон, триэтилорфон, Байер Л-13/99, 0,0-диметил-1-окси-2,2,2-три-хлорэтанфосфат) относится к эфирам алкилфосфорных кислот. Химически чистый хлорофос - белое

кристаллическое вещество с запахом, напоминающим эфир. Молекулярный вес - 257,42 Да; точка плавления 78-83°. Температура кипения при 0,1 мм рт. ст. составляет 100° С, упругость паров - 0,00003 при 24° С. Летучесть - 0,11 мг/м<sup>3</sup> при 20° С и 0,38 мг/м<sup>3</sup> при 30° С. Растворяется в воде, бензоле, эфире, особенно хорошо - в хлороформе. Технический препарат - твердое вещество, напоминающее парафин, или темная густая жидкость с эфирным запахом. Температура плавления 68-70° [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983].

Хлорофос применяется главным образом в водных растворах. Широко используется в дезинфекционной практике для уничтожения мух, клопов, блох, тараканов. Для защиты растений хлорофос применяется как контактный и кишечный инсектицид. Особенно эффективен для уничтожения грызущих личинок и насекомых (гусениц, майских жуков, июньского хруща, монашенки). Благодаря своему системному действию хлорофос пригоден также для борьбы с вредителями, минирующими листья растений. В полеводстве хлорофос применяется главным образом против личинок свекловичной мухи. Эффективен против клопа-черепашки, хлебного жука, хлебной жужелицы, зерновой моли. Кроме того, он с успехом используется против рапсового пилильщика и гусениц мотылька, а также для уничтожения сенного червя и листоверток на виноградниках. В плодоводстве хлорофос применяется против яблоневого, грушевого, сливового и крыжовникового пилильщиков и яблоневой моли. Хлорофос пригоден также для уничтожения зимней пяденицы, кольчатого шелкопряда, златогузки, непарного шелкопряда, вишневой фруктовой мухи, различных видов долгоносиков. Хлорофос обладает высокой инсектицидной эффективностью в отношении рисового фразника и хлопкового червя [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977].

В последнее время хлорофос стали применять в ветеринарии для борьбы с эндо- и эктопаразитами на овцах и коровах, а также против личинок овода. В ветеринарной практике он может быть использован и

в качестве противоглистного средства. Токсическое действие хлорофоса сходно с действием других ФОС, но проявляется медленнее и менее интенсивно. В отличие от многих ФОС хлорофос оказывает местное действие на кожу (гиперемия, трещины, подкожные кровоизлияния). При интоксикации хлорофосом наряду с понижением активности холинэстеразы происходит изменение активности трансаминазы крови, состава фракций белка, а также нарушение антитоксической функции печени [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983].

Отравления хлорофосом возможны при контакте с большими количествами препарата: открывание бочек, набирание и взвешивание ядохимиката, приготовление рабочих растворов, заправка бака самолета раствором. Минимально действующие дозы хлорофоса для людей при однократном приеме внутрь не превышают 5-7 мг/кг.  $DL_{50}$  хлорофоса для неинбредных белых мышей и крыс составляет при различных путях введения от 400-1000 мг/кг. Самцы крыс более устойчивы к действию хлорофоса [Голиков С.Н., 1968; Забродский П.Ф., Линючев М.Н., 1993].

### **1.3. Токсикологические свойства диметилдихлорвинилфосфата**

ДДВФ (диметилдихлорвинилфосфат, вапона, винилфосфат, дихлофос, перкола, нуван, геркол) является эфиром эфиры алкилфосфорной кислоты (О,О-диметил-О,2,2-дихлорвинилфосфат). ДДВФ является бесцветной, прозрачной жидкостью с неприятным запахом. Молекулярный вес составляет 220,99 Да; точка кипения – 120°C при давлении 3 мм рт. ст. и 74°C при - 3 мм рт. ст. Летучесть равна 145 мг/кг при 20° и 350 мг/кг – при 30°C. В воде растворимость ДДВФ составляет 10 г/л [Каган Ю.С., 1977]. Дихлофос быстро разрушается во внешней среде. При 20°C в воде гидролизуются 50% ДДВФ в течение 61,5 сут, а при температуре 70°C – за 25 мин.

Используется для уничтожения малярийных комаров, эффективен против растительноядных клещей, щитовок, мух, минирующей моли, практически всех видов насекомых, дезинсекции транспортных самолетов и складов. В сельском хозяйстве используется в виде 50% эмульсии [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983].

Являясь высокотоксичным соединением, ДДВФ в экспериментальных исследованиях может использоваться для моделирования иммуотропных эффектов боевых ФОВ [Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Следует отметить, что ДДВФ используется в ВВС РФ для дезинсекции транспортных самолетов и складов [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983], а также для борьбы с педикулезом [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Острое отравление ДДВФ характеризуется типичной клинической картиной проявления интоксикации ФОС. В опытах на крысах показано, что  $DL_{50}$  для данного вида животных составляет при внутрижелудочном введении 25-60 мг/кг. При нанесении на кожу  $DL_{50}$  ДДВФ равно 107 мг/кг для самцов и 75 мг/кг для самок крыс.  $DL_{50}$  ДДВФ для белых крыс составляет 32-40 мг/кг при внутрибрюшном введении [Голиков С.Н., 1968]. Среднелетальная доза ДДВФ для белых крыс при подкожном введении яда составляет  $65,0 \pm 2,5$  мг/кг [Беликов В.Г., 2000]. По данным Забродского П.Ф. и Линючева М.Н. (1993)  $DL_{50}$  ДДВФ для мышей обоего пола при внутрибрюшном и пероральном введении составляет  $40,0 \pm 0,8$  и  $126,0 \pm 5,7$  мг/кг соответственно. В организме хлорофос метаболизируется, образуя ДДВФ, поэтому признаки отравления этих ФОС очень похожи. В концентрации  $8,2 \cdot 10^{-7}$  М ДДВФ ингибирует активность холинэстеразы эритроцитов крупного рогатого скота на 50% [Голиков С.Н., 1968].

Таким образом,  $DL_{50}$  ДДВФ для неинбредных белых мышей и крыс составляет при различных путях введения от 25 до 126 мг/кг. Самцы крыс

более устойчивы к действию дихлофоса. Мыши обладают менее выраженной чувствительностью к ДДВФ, чем крысы.

#### 1.4. Токсикологическая характеристика метафоса

Метафос (метилпаратион, метацид, нитрокс 80, фолидол, дальф, вофатокс, 0,0-диметил-0-4-нитрофенилтиофосфат) является белым кристаллическим веществом. Молекулярный вес – 263,21 Да; температура кипения - 158°; температура плавления - 36-36,5°С; плотность - 1,351 г/см<sup>3</sup>. Летучесть при 20°С - 14 мг/м<sup>3</sup>, при 30°С – 0,53 мг/м<sup>3</sup>. Практически не растворим в воде, плохо растворим в керосине и других продуктах перегонки нефти. Хорошо растворяется в растительных маслах, углеводородах жирного и ароматического ряда, кетонах, сложных эфирах.

Технический метафос - желтая или коричневая жидкость с неприятным запахом. Выпускается в виде 2,5% дуста и 30% концентрата эмульсии. Применяется для борьбы с клопом-черепашкой на посевах злаковых культур, хлопковым долгоносиком, а также для уничтожения клещей, тлей, трипсов. Метафос - быстродействующий кишечный, контактный и ингаляционный инсектицид, но с более сильным начальным действием [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977].

Метафос вызывает в опытах на животных значительные изменения со стороны крови; уменьшение содержания гемоглобина, эритроцитов, ускорение РОЭ, нейтрофильный лейкоцитоз со значительным сдвигом лейкоцитарной формулы влево, повышенное содержание метгемоглобина. Эти явления своим происхождением обязаны, по-видимому, наличию в структуре метафоса паранитрофенола. DL<sub>50</sub> при введении в желудок белым крысам 15-25 мг/кг, белым мышам 30-50 мг/кг, кроликам 100-420 мг/кг. При нанесении на кожу крысам DL<sub>50</sub> составляет 67 мг/кг, кроликам — 100-400 мг/кг. Абсолютно смертельная доза при ингаляционном отравлении крыс составляет 0,024 мг/л.

Пороговая концентрация при вдыхании дуста метафоса в течение 4-х ч составляет 0,0036 мг/л. При ежедневном введении через рот 0,5 мг/кг в течение 6 месяцев погибает часть кошек. Метафос при ежедневном введении в течение 43 дней по 4 мг не вызывал у людей подавления активности холинэстеразы и каких-либо симптомов отравления. При ежедневном приеме 7-9 мг препарата активность холинэстеразы понизилась на 20% по сравнению с активностью фермента у лиц, не подвергшихся действию метафоса. Наибольшая ежедневная доза метафоса, переносимая человеком при приеме внутрь, составляет 0,1 мг/кг  $DL_{50}$  [Голиков С.Н., 1968; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Забродский П.Ф., Линючев М.Н., 1993].

### **1.5. Нарушения неспецифической резистентности организма, гуморального и клеточного звена иммунитета фосфорорганическими соединениями**

Гомеостаз иммунной системы обеспечивается не только специфическими иммунными реакциями, включающими функцию Т- и В-систем иммунитета, но и факторами НРО: фагоцитарной активностью, системами комплемента и пропердина, системами интерферонов, лизоцима, тромбоцитарного катионного белка ( $\beta$ -лизина), белков острой фазы, эндогенных пептидов антибиотиков и др. [Descotes J., 1986]. Данные факторы одни авторы определяют, как пассивный (или врожденный) иммунитет [Ройт А. и соавт., 2000], другие считают их доиммунными биологическими механизмами резистентности к инфекциям [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Хаитов Р.М., 2006].

Описано непосредственное действие ФОС (диизопропилфторфосфата и других соединений) на мембрану лейкоцитов, в результате чего изменяется концентрация калия, натрия и кальция в клетках [Woodin A.M., Wieneke A.A., 1969; Taurog J.D., et al., 1979]. Это приводит к снижению

хемотаксиса лейкоцитов [Woodin A.M., Wieneke A.A., 1969; Woodin A.M., Harris A., 1973], уменьшению секреции гистамина, серотонина,  $\beta$ -глюкоронидазы и лизоцима из лейкоцитов, причем определенную роль в данном процессе играет снижение активности эстераз данных клеток [Becker E.L., et al., 1967]. Существуют основания предполагать, что ацетилхолин при острой интоксикации ФОС легкой и средней степени тяжести способен оказывать противоположный эффект [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Dulis B.H. et al., 1979].

Фосфорорганические пестициды при остром и хроническом воздействии интоксикации вызывают снижение фагоцитарной активности нейтрофилов [Золотникова Г.П., 1980; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Hermanowicz A., Kossman S., 1984]. С уменьшением этого показателя под влиянием ФОС связывают повышенную частоту заболеваний верхних дыхательных путей у лиц, контактирующих с фосфорорганическими инсектицидами [Золотникова Г.П., 1980; Hermanowicz A., Kossman S., 1984]. В начальном периоде хронической интоксикации (2-3 месяца) фагоцитарная активность нейтрофилов повышается, затем наступает ее существенное снижение [Перелыгин В.М. и соав., 1971]. Острая интоксикация карбофосом приводит к снижению функции лейкоцитов [Пирцхалава А.В., 1989] и перитонеальных макрофагов [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1988]. Использование модели экспериментальной сальмонеллезной инфекции у мышей позволило выявить снижение НРО организма под действием фосфамида и альбуша при дозе, в 10 раз меньшей по сравнению с общепринятыми показателями. Фосфамид и альбуш воздействовали на сопротивляемость организма к инфекции в одинаковой степени. Установлена также количественная зависимость между заболеваемостью населения кишечными инфекциями и интенсивностью применения агрохимикатов [Чугунихина Н.В., Хасанова М.И., 1994].

Редукция факторов НРО при увеличении дозы ФОС в диапазоне от 0,75 до 1,0  $DL_{50}$  по сравнению с активирующим эффектом меньших доз



[Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007] , видимо, связано с инактивацией эстераз нейтрофилов [Хейхоу Ф.Г.Дж, Кваглино Д., 1983] и лимфоцитов [Ferluga J. et al, 1972]. При этом повышающий антиинфекционную НРО эффект ацетилхолина (и кортикостероидов) при интоксикации ФОС, видимо, превышает супрессирующее действие, связанное с ингибированием эстераз клеток крови [Забродский П.Ф. и соавт., 2005].

Существуют основания полагать, что нарушения НРО под влиянием ФОС могут быть обусловлены нарушением функции нейрогуморальных механизмов [Корнева Е.А., 1990], увеличением в плазме крови гормонов гипофиза, глюкокортикоидов и биогенных аминов [Кузьминская У.А. и соавт., 1980; Забродский П.Ф., 1993; Szot R.J., Murphy S.D., 1970], действием ацетилхолина на холинорецепторы нейтрофилов [Dulis B.H. et al., 1979], изменением в клетках крови содержания циклических нуклеотидов [Henson P.M., Oades Z.G., 1976], ингибированием эстераз нейтрофилов и моноцитов [Забродский П.Ф., 1993; Хейхоу Ф.Г.Дж, Кваглино Д., 1983; Ferluga J. et al, 1972] и системы комплемента [Becker E.Z. et al., 1966].

В начале 60-х годов прошлого столетия началось изучение действия ФОС на гуморальный иммунный ответ [Феерман И.С. и соавт., 1964; Штенберг А.И., Джунусова Р.М., 1968; Фридман Г.И., 1970]. Действие ФОС на клеточные иммунные реакции описано на несколько лет позже и в дальнейшем происходило, как правило, с одновременной оценкой гуморальных иммунных реакций. В этот период исследования были сосредоточены в основном на эффектах, обусловленных хроническим воздействием фосфорорганических инсектицидов. Было установлено, что фосфорорганические вещества вызывают снижение антителообразования (синтеза иммуноглобулинов). При последующем изучении функции гуморального иммунного ответа после хронического воздействия метилмеркаптофоса, хлорофоса, циклофоса и других ФОС эти результаты были в целом подтверждены с помощью различных методов исследования

гуморальной иммунной реакции [Николаев А.И. и др., 1972; Диноева С.К., 1974; Жминько П.Г., 1986; Присяжнюк Т.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2005-2011; 1986; Desi I., Varga L., 1983].

Ивановым В.В. (1986) было показано, что при ежесуточном поступлении хлорофоса в диапазоне доз от 5 до 100 мг/кг в организм крыс с водой через 1 мес увеличивалось количество лимфоцитов в периферической крови, затем содержание этих клеток в тимусе и селезенке уменьшалось пропорционально суточной дозе яда.

Экспериментальные исследования, проведенные на разных видах животных, выявили противотканевые аутоантитела при воздействии ФОС (метилмеркаптофоса, фосфамида, базудина, бутифоса, афоса). Аналогичные данные получены при исследовании крови у людей, профессионально контактирующих с базудином и бутифосом [Жминько П.Г., 1991]. Антитела с антигеном могут образовывать в организме нерастворимые иммунные комплексы антиген-антитело. Такие иммунные комплексы фиксируются в органах и тканях организма. Нерастворимые иммунные комплексы могут взаимодействовать практически со всеми клетками крови, комплементом, рецепторами многих клеток, что является причиной повреждения мембран и развития аутоиммунных заболеваний [Ройт А. и соавт, 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 2002, 2005].

Уменьшение иммуногенности спленоцитов в опытах по изучению формирования гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при различных моделях [Забродский П.Ф., Мышкина А.К., 1989] может быть связано с ингибированием ФОС эстераз иммунокомпетентных клеток [Ferluga J. et al., 1972]. При рассмотрении иммуотропных эффектов ФОС следует учитывать, что дифференцировка и созревание Т-лимфоцитов регулируется имеющимися на эпителиальных клетках тимуса н-холинорецепторами [Tominasa K. et al., 1989], а также (как уже указывалось) наличием м- и н-холинорецепторов на лимфоцитах [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Masini et al., 1985; Rossi A. et al., 1989].

Стимуляция м-холинорецепторов ацетилхолином оказывает существенное влияние на процессы, связанные с перераспределением лимфоцитов в органах иммунной системы, [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979], концентрация которого после действия ФОС в синапсах и циркулирующей крови повышается. Результаты проведенных опытов позволили авторам заключить, что ФОС в дозе 0,7 DL<sub>50</sub> изменял формирование реакции ГЗТ, характер проявления которой на разных моделях в основном связан с особенностями миграции Т-лимфоцитов из селезенки. При рассмотрении иммуотропных эффектов ФОС следует учитывать, что дифференцировка и созревание Т-лимфоцитов регулируется имеющимися на эпителиальных клетках тимуса никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами [Tominasa K. et al., 1989], а также (как уже указывалось) наличием м- и н-холинорецепторов на лимфоцитах [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Masini et al., 1985; Rossi A. et al., 1989].

Под влиянием холинергической стимуляции увеличивается концентрация ацетилхолина в крови и происходит стимуляция м-холинорецепторов естественных клеток-киллеров [Wietrowt R.W. et al., 1978; Grabczewska E. et al., 1990], что, может приводить к изменению их функции [Забродский П.Ф., 1987, 1993, 2002, 2007].

Реакцию трансплантат против хозяина и фагоцитарное число существенно снижалось под влиянием хлорофоса [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1990]. J.C. Street и Sharma R.P. (1975) установили, что угнетение клеточного иммунитета при интоксикации ФОС сопровождается изменением иммунной структуры лимфатических фолликулов селезенки, в частности, уменьшением тимусзависимых зон в этом органе с атрофией коры тимуса.

Различное действие дитиокарбаматов на ряд иммунологических параметров *in vitro* и на выживаемость *in vitro* лимфоцитов самок мышей показало сопоставление иммунотоксичности антихолинэстеразных препаратов, относящихся к ФОС, и производных карбаминовой кислоты,

обладающих антихолинэстеразным эффектом, показало, что эффект зависел от дозы, отмечалось различное влияние на массу тимуса и селезенки, активность естественных клеток-киллеров (ЕКК). Диэтилдитиокарбамат и этилен-бис-дитиокарбамат в отличие от метилдитиокарбамата при введении в желудок в дозах 200, 225 и 300 мг/кг в сутки в течение 7 дней не влияли на киллерную активность клеток селезенки [Padget E.L. et al., 1992]. Обработка карбаматов постмитохондриальным супернатантом не оказывала влияния на их цитотоксичность [Rodgers K.E. et al., 1986]. Полученные данные свидетельствуют о том, что антихолинэстеразный эффект в реализации иммунотоксичности ФОС не является решающим.

Малатион *in vitro* (лимфоциты мышей) при концентрациях 75 мкг/мл и выше существенно снижает образование зрелых форм цитотоксических Т-лимфоцитов под влиянием клеток аллогенной опухоли Р815. Аналогичный эффект при меньших дозах вызывали этилпаратион, метилпаратион, фенитротрион и фентиол подавляют генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов в дозе 5-10 мкг/мл [Rodgers K.E. et al., 1985]. Преинкубация ФОС с постмитохондриальным супернатантом печени крыс, приводящая к их биотрансформации, значительно ослабляет этот эффект. Карбофуран существенно не влияет на активность цитотоксических Т-клеток, а карбанил подавляет ее в дозе 50-100 мкг/мл. Длительное введение малатиона (0,1 DL<sub>50</sub>) в течение двух недель вызывало у мышей уменьшение количества Т-клеток в тимусе. Острая интоксикация данным пестицидом (0,5 DL<sub>50</sub>) вызывала увеличение пролиферации Т-лимфоцитов при их стимуляции конканавалином А [Devens B.H. et al., 1985]. Отмечается супрессия выработки Т-ростковых факторов (ИЛ-1, ИЛ-2) у мышей под влиянием ФОС [Арипова Т. У. и соавт., 1991].

Многие иммуносупрессивные эффекты малатиона усиливаются при хранении этого ФОС в условиях повышенной температуры [Devens B.H. et al., 1985; Thomas I.K., Imamura T., 1986]. Острая интоксикация

малатионом в дозе 0,5 DL<sub>50</sub> через 5 суток приводила к увеличению антителообразующих клеток в селезенке после иммунизации эритроцитами барана [Rodgers K.E. et al., 1985]. Отмечалось увеличение пролиферации лимфоцитов в ответ на их стимуляцию липополисахаридом и конканавалином А. При этом количество лимфоцитов в тимусе и селезенке не изменялось. Отсутствие супрессии гуморального иммунного ответа, вероятно, можно объяснить тем обстоятельством, что при применении малатиона в дозе 0,5 DL<sub>50</sub> не отмечалось признаков интоксикации и изменения холинэстеразной активности плазмы. Повышение активности В-системы иммунитета может быть связано с повышением продукции иммуностимулирующих интерлейкинов. Патогенез данного эффекта пока не выяснен. В то же время, установлено снижение функции лейкоцитов и макрофагов под влиянием острой интоксикации карбофосом [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1988; Пирцхалава А.В., 1989]. Неочищенный малатион в опытах *in vitro* тормозил иммунный ответ на тимусзависимый и тимуснезависимый антигены, подавлял способность макрофагов представлять антиген [Thomas I.K., Imamura T., 1986a, 1986b].

Существуют данные, позволяющие предполагать, что в реализации механизма ФОС, ингибирующего цитотоксичность Т-лимфоцитов, существенное значение имеет связанная с эстеразной активностью проницаемость мембраны клетки-эффектора для ионов кальция и магния. В свою очередь электролитный обмен этой клетки сопряжен с внутриклеточным содержанием циклических нуклеотидов. Показано, что диизопропилфторфосфат уменьшает антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) при концентрациях от 0,5 до 4 мМ на 5-80% вследствие нарушения электролитного обмена клетки и изменения соотношения цАМФ/цГМФ и других механизмов [Trinchievi G., M. de Marchi, 1976; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

ДДВФ при хроническом воздействии в ежесуточных дозах от 0,025 до 0,100  $DL_{50}$  снижал функцию В-звена иммунитета у кроликов на брюшнотифозную вакцину [Desi I. et al., 1970]. Аналогичный эффект оказывал паратион, который в дозе 0,1  $DL_{50}$  при ежедневном пероральном поступлении в течение 8 суток уменьшал содержание антителообразующих клеток в селезенке у мышей на 35% [Wietrowt R.W. et al., 1978]. Отмечали угнетение гуморальной иммунной реакции при пятикратном введении мышам карбофоса в дозах от 0,05 до 0,01  $DL_{50}$  [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1990].

ФОС в некоторых случаях могут не влиять на антителообразование. Например, при действии лептофоса при концентрациях в пище от 10 до 500 ppm, отмечалось уменьшение активности холинэстеразы сыворотки крови в 1,5-8,8 раз через 12 недель, но при этом не было отмечено существенного влияния этого ФОС на количество антителообразующих клеток селезенки при первичном и вторичном гуморальном иммунном ответе [Koller L.D. et al., 1976]. Не отмечено изменения концентрации иммуноглобулинов в крови рабочих, связанных с использованием ФОС [Desi I. et al., 1986]. Установлено казалось бы парадоксальное явление: хлорофос при хроническом отравлении течение 100 дней (0,05  $DL_{50}$ ) приводил к увеличению антителопродукции к брюшнотифозному О- и Vi-антигену [Шафеев М.Ш., 1976]. Аналогичный феномен был установлен при действии ФОС в отношении IgM и IgG. При этом в сыворотке крови снижалось только содержание IgA [Kossman S. et al., 1985]. Доза метомидофоса, составляющая 0,05  $DL_{50}$ , оказывала активирующее влияние на гуморальную иммунную реакцию [Tiefenbach B., Wichner S., 1985].

Отражающая функцию Th1-клеток реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), при пероральном поступлении в течение двух месяцев у крыс Вистар снижал форматион в дозе 0,01  $DL_{50}$  (13,5 мг/кг). Авторы связывали это только (не совсем обоснованно, на наш взгляд) с увеличением содержания в крови кортикостерона [Хусинов А.А. и соавт.,

1991]. Действительно, одним из факторов редукции иммунных реакций может являться концентрация в циркулирующей крови кортикостероидов после интоксикации ФОС [Забродский П.Ф., 1993].

Зарегистрировано существенное уменьшение реакции ГЗТ на туберкулин у кроликов после получения ими ФОС в различных дозах в течение 10 и 24 суток. Редукция формирования ГЗТ прямо зависела от дозы и времени интоксикации. Так, метилпаратион в дозах от 0,04 до 1,50 мг/кг, получаемых ежедневно, через 24 дня уменьшал реакцию на повторные введения туберкулина от 1,2 до 2,8 раз. На 10-е сутки после ежедневного получения пестицидов дозозависимый эффект для метилпаратиона и большинства исследованных пестицидов отсутствовал [Street J.C., Sharma R.P., 1975].

Анализ данных литературы позволяет считать, что противоречивость экспериментальных исследований в отношении влияния ФОС на систему иммунитета у людей и животных может быть обусловлена особенностями токсикодинамики и токсикокинетики, определяющих иммунотоксичность этих соединений [Lee T.P. et al., 1979; Audre F. et al. 1983], проведением экспериментов в различное время суток, когда концентрация в крови кортикостероидов существенно различалась [Иванова А.С., 1998; Dhabhar F. S. et al., 1996] и другими причинами [Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006] в частности, повышением внутриклеточного содержания цГМФ под влиянием ацетилхолина [Денисенко П.П., 1980; Абрамов В.В. и соавт., 1986; Калинин А.Г., и соавт., 1988; Garoroy M.R. et al., 1975; MacManus J.P. et al, 1975].

При остром отравлении мышей паратионом в дозе 1,0 DL<sub>50</sub> в продуктивной фазе иммунного ответа (интоксикация через 2 суток после иммунизации эритроцитами барана) отмечается редукция функции антителообразующих клеток в селезенке мышей более, чем в 3 раза. На индуктивную фазу иммунного ответа (при введении паратиона

одновременно с иммунизацией эритроцитами барана) данное ФОС существенного влияния не оказывало [Wietrowt R.W. et al., 1978].

В целом такие же результаты получены при остром отравлении и другими фосфорорганическими инсектицидами - малатионом, дихлофосом, метамидофосом [Rodgers K.E. et al., 1986; Thomas I.K., Imamura T. 1986б]. Паратион в дозе 16 мг/кг, вызывающей выраженную холинергическую стимуляцию и гибель 20% мышей, более чем в 2 раза снижал число плазмоцитов в селезенке, продуцирующих IgM. Использование его через 2 сут после иммунизации (оценка иммунного ответа проводилась на 4-е сутки после иммунизации) доза 4 мг/кг, не вызывающая симптомов интоксикации, не влияла на формирование иммунной реакции [Casale G.P. et al., 1984]. Установлено существенное снижение синтеза антител фозалоном [Алимова М. Т. и соавт., 1991].

Супрессия гуморальной иммунной реакции под влиянием ФОС сопровождалась снижением лимфоидных индексов тимуса и селезенки, уменьшением активности холинэстеразы в плазме крови и мозге, увеличением концентрации кортизола и глюкозы в крови, активности трансаминазы в печени [Casale G.P. et al., 1983; Tiefenbach B., Wichner S., 1985]. При этом установлена обратная корреляция между активностью холинэстеразы в плазме крови и мозге и угнетением антителообразования [Tiefenbach B. et al., 1983]. Предполагают, что супрессия иммунного ответа связана с увеличением содержания в крови под влиянием ФОС кортикостероидов, так как применение преднизолона в дозе 100 мг/кг вызывает аналогичный эффект, а адреналэктомия иммунотоксическое действие антихолинэстеразных ядов устраняет [Tiefenbach B. et al., 1983; Tiefenbach B., Wichner S., 1985].

В опытах на крысах Вистар было показано, что введение внутрь форматиона в дозе 0,01 DL<sub>50</sub> в течение 2 мес вызывает повышение кортикостерона в крови, коррелирующее со снижением гуморального иммунитета [Хусинов А.А. и соавт., 1991]. Следует отметить, что выводы



авторов не вполне корректны и не учитывают других механизмов, обуславливающих иммунотоксичность ФОС [Забродский П.Ф., 2002, Забродский П.Ф. и соавт., 2005, 2007; Pruett S., 2008].

В экспериментах *in vitro* показано, что индуцированная антииммуноглобулинами подвижность В-лимфоцитов, существенно подавляется под влиянием диизопропилфторфосфата [Becker E.L., Unanue E.R., 1976]. Это не дает оснований признать роль глюкокортикоидов в супрессии функции В-клеток под влиянием ФОС основной. Данный вопрос предполагает экспериментальное изучение роли кортикостерона (его удельного веса) в реализации иммунотоксических эффектов ФОС.

При интоксикации диметоатом происходило восстановление содержания лимфоцитов в тимусе и селезенке через 72 часа. Редукция антителообразования была выявлена не только при дозах, вызывающих выраженную холинергическую стимуляцию [Casale G.P. et al., 1984], но и при воздействии относительно малой дозы метомидофоса (0,1 DL<sub>50</sub>).

В механизме действия ФОС на Т-систему иммунитета может иметь значение взаимодействия данных соединений с н-холинорецепторами Т-лимфоцитов. Косвенно это предположение подтверждает влияние холинергических агонистов на дифференцировку и созревание Т-лимфоцитов через имеющиеся на эпителиальных клетках тимуса никотиновые ацетилхолиновые рецепторы [Tomimasa K. et al., 1989].

Существенное значение в реализации действия ФОС на иммунный статус имеют неспецифические и специфические (иммунные) механизмы [Алимова М. Т. и соавт., 1991; Гущин Н.В. и соавт. 1991, Хусинов А.А. и соавт., 1991, Забродский П.Ф., 1993; Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

ФОС, вызывая увеличение концентрации ацетилхолином в лимфоидных органах, способны повышать подвижность В-лимфоцитов [Адо А.Д. и соавт., 1983]. При увеличении вводимой дозы ДДВФ

происходило прямо связанное с ней уменьшение Т-клеток в тимусе. Таким же образом действовали стрессорный фактор, гидрокортизон и ацетилхолин [Забродский П.Ф., 1993]. Видимо, инволюция тимуса при действии ФОС связана преимущественно с выходом тимоцитов из органа под влиянием кортикостероидов (неспецифический механизм) [Pruett S., 2008] и активацией м-холинорецепторов тимоцитов ацетилхолином - специфический эффект [Maslinski W. et al., 1989], и в меньшей степени - с цитотоксическим действием гормонов коры надпочечников [Heideman M., Bentgson A. , 1985; Bide R.W. et al., 2005; Sharp D., 2006].

Следует отметить, иммуностимулирующий (или иммуносупрессирующий) эффект ацетилхолина при острой интоксикации ФОС, вероятно, зависит от его концентрации в крови, лимфоидных органах и в области холинорецепторов иммунокомпетентных клеток, а также от изучаемого параметра системы иммунитета [Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Возможно, существует не известная до сих пор функция ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, регулирующая их активность не только путем гидролиза избытка ацетилхолина [Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006].

Получены результаты, демонстрирующие влияние пола и возраста и пренатального супрессирующего воздействия атразина на иммунную систему взрослых мышей [Rowe A.M.. 2008].

Сенсибилизация антигеном морских свинок увеличивает уязвимость к индуцированной О,О-диэтил-О-паранитрофенилтиофосфатом (паратионом) повышенной реактивности дыхательных путей и изменениям одного из механизмов, связанного с реализацией астматического синдрома (зависимого от ИЛ-5). Поскольку сенсибилизация к аллергенам характерна из 50 % общей совокупности популяции и 80 % астматиков (включая детей), эти результаты свидетельствуют о высоком риске возникновения астмы при действии ФОС [Proskolil B.J. et al., 2008].

При оценке влияние пестицидов в низких дозах на пролиферацию стимулированных митогеном лимфоцитов цыплят *in vitro*, выявлено нарушение фагоцитоза, индукция апоптоза, уплотнение хроматина в иммуногенных клетках. Данная методика предлагается в качестве альтернативной для оценки иммунотоксичности пестицидов, в частности ФОС [Kote P. et al., 2008].

Представляют интерес данные в отношении иммунотоксичности пропанила, которые во многом схожи с действием ФОС. Пропанил в моделях *in vivo* и *in vitro* воздействует на иммунную систему на органном, клеточном и молекулярном уровнях, вызывая атрофию тимуса, спленомегалию, уменьшение развития Т-клеток в тимусе и В-клеток в костном мозге, редукцию активности естественных клеток-киллеров и макрофагов, а также продукцию ими воспалительных цитокинов. Пропанил также воздействует на дыхательный взрыв макрофагов, ингибируя образование реактивного кислорода и оксида азота. Молекулярные механизмы, ответственные за данные эффекты, вероятно, связаны с альтерацией фактора (NF)- $\kappa$ B в ядре клетки, снижением транскрипции и внутриклеточной активности  $\text{Ca}^{++}$ . Действие пропанила нарушает множество функций зрелых Т- и В- лимфоцитов, снижая синтез цитокинов Т-клетками и иммунные реакции (адаптивный иммунитет). Степень супрессии гуморального иммунного ответа на модельные антигены и неповрежденные бактерии изменяется в зависимости от экспозиции токсиканта. Авторы отмечают, что влияние на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции) и систему иммунитета под влиянием пропанила только начинают изучаться [Salazar K.D. et al., 2008].

Иммунотоксическое действие ФОС в сублетальных дозах, по-видимому, может определяться эффектом гормонов надпочечников [Забродский П.Ф., 1993; 2000; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], ингибированием эстераз Т-хелперов, моноцитов, нейтрофилов, системы комплемента [Becker E.Z. et al., 1966], действием высоких концентраций

ацетилхолина на м-холинорецепторы иммуноцитов [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979]. Реализация описанных механизмов может приводить к редукции Т- и В- звена иммунитета [Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

В 2006 году Q. Li и T. Kawada сделано открытие механизмов ФОС, ингибирующих цитотоксичность клеток-киллеров. Авторы отмечают ингибирующее влияние ФОС на естественные клетки-киллеры, цитокинактивированные киллеры, цитотоксические Т-лимфоциты, уменьшение CD5 клеток, и увеличение CD26 клеток и аутоантител. ФОС нарушает два главных механизма цитотоксичности, обеспечивающих уничтожение опухолевых клеток и клеток, пораженных вирусом: ингибирует прямую продукцию цитолитических гранул, которые содержат формирующий поры белок перфорин, несколько сериновых протеаз, называемых гранзимами, и гранулизин, осуществляющий экзоцитоз гранзимов. Кроме того, ФОС нарушает второй механизм, связанный с Fas-лигандом (так называемый (Fas-L)/Fas механизм), при реализации которого FasL (CD95 L), находящийся на поверхности клетки-киллера, связывается с поверхностью клетки-мишени «смертельным» рецептором Fas (локализован на клетках CD95), индуцируя апоптоз клетки-мишени. ФОС ингибирует клетки-киллеры тремя механизмами: повреждая экзоцитоз гранул ЕКК, индуцированных цитокином (ИЛ-2) клеток-киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, ингибируя активность гранзимов, а также уменьшая внутриклеточный уровень порфирина, гранзима А и гранулизина, которые индуцируют дегрануляцию ЕКК и транскрипцию матричных РНК перфорины, гранзима А и гранулизина; повреждая механизм FasL/Fas апоптоза клеток-мишеней клетками-киллерами (этот механизм выявлен на мышцах, лишенных механизма экзоцитоза гранул); стимулируя апоптоз иммунных клеток [Li Q., Kawada T., 2006; Li Q., 2007].

При острых интоксикациях ФОС механизмы нарушения гомеостаза иммунной системы у людей до сих пор практически не изучены, что обусловлено определенными методическими трудностями и отсутствием у клиницистов единого подхода к получению и анализу лабораторных данных. Ряд публикаций свидетельствуют о том, что у больных через 1 сутки после отравления ФОС снижается содержание иммуноглобулинов в крови, а через 7-10 сут отмечается увеличение IgG и IgA. При этом содержание IgM не изменяется [Ананченко В.Г. и соавт. 1987]. Приведенные данные противоречат большинству проведенных экспериментальных исследований [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Casale G.P. et al., 1984; Tiefenbach B., Wichner S., 1985]. Показано, что после острой интоксикации ФОС у больных до 10 сут сохраняется редукция основных показателей иммунного статуса [Смирновым В.С. и соавт., 2000].

У лиц, работающих с ФОС, изменялись корреляционные связи внутри пула лимфоцитов и нейтрофилов, зависимость между содержанием В-лимфоцитов и общим количеством лимфоцитов [Федоров С.М. и соавт., 1988]. Незначительное уменьшение антитителоподукции под влиянием метилпаратиона сопровождалось существенной редукцией лимфоидного индекса селезенки. При хронической пероральной интоксикации роннелом (фенхлорфосом) отмечали снижение лимфоидного индекса тимуса в зависимости от дозы и экспозиции в 1,4-2,0 раза [Rodica G., Srefania M., 1973].

У рабочих хроническое воздействие фосфорорганических инсектицидов приводит к ингибированию Т-клеточного эффекта на митогенную стимуляцию фитогемагглютинином и уменьшение содержания Е-РОК в крови [Золотникова Г.П., 1980; Кащенко Л.А., и соавт., 1981].

В многомерных исследованиях в различных странах (Нидерландах, Италии, Финляндии и Болгарии), в которых участвовало 248 рабочих, подвергавшихся действию различных пестицидов (в том числе, и ФОС) выявлены зависимости между профессиональной экспозицией к пестицидам

и астматическими признаками (неприятные ощущения за грудиной, приступы астмы, хрипы и др.) Экспозицию оценивали по наличию в моче (концентрации) метаболитов пестицидов [Boers D. et al., 2008].

Лимфопролиферативные заболевания у людей, подвергшихся воздействию ФОС встречаются значительно чаще, вероятно, вследствие ингибирования эстераз моноцитов, Т-лимфоцитов и естественных киллеров [Newcombe D.S., 1991].

Существуют основания считать, что воздействие ФОС может приводить к повреждению структуры ДНК лимфоцитов [Москалева Е.Ю. и соавт., 1993; Sunil K. K.B, 1993].

Исследования на беспозвоночных, рыбах и млекопитающих показали, что иммунотоксичность ФОС прямо связана с ингибированием гидролитических ферментов серина (альфа-амино-бета-оксипропионовой кислоты) или эстераз в различных элементах иммунной системы, с прооксидантными эффектами в органах иммунной системы, а также модуляцией сигналов, управляющих иммунными функциями. Косвенные эффекты включают влияние нервной системы и нарушения метаболизма в иммунных органах [Galloway T., Handy R., 2003].

Несмотря на обширные данные литературы в отношении иммунотоксических эффектов ФОС, существует целый ряд не исследованных вопросов в отношении нарушения иммунного гомеостаза при острой интоксикации ФОС, в том числе и фоне применения их антидотов. Недостаточно изучена возможность коррекции нарушений иммунного гомеостаза, как их антидотами атропином и карбоксимом, так и различными иммуностимуляторами.

Данные различных исследователей зачастую противоречивы: не ясна роль механизмов, реализующихся на уровне органов и систем, при взаимодействии иммунокомпетентной клетки *in vitro*, практически не исследованы особенности перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета при острой интоксикации ФОС [Schans M. J. et al.,

2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006]. Также в достаточной степени не определена роль Th1- и Th2-лимфоцитов, ацетилхолинэстеразы Т-клеток, кортикостерона, ПОЛ и интерлейкинов в реализации основных иммунных реакций после действия ФОВ. Практически не исследованы эти механизмы при комбинированном действии ФОС и их антидотов.

Уточнение данных литературы и получение новых результатов исследований в отношении иммунотоксичности ФОС в комбинации с антидотами позволит обосновать необходимость применения средств адекватных характеру патогенетических нарушений системы иммунитета под влиянием ФОС в сочетании со средствами специфической терапии для профилактики постинтоксикационных инфекционных осложнений и заболеваний. Это позволит существенно снизить смертность больных при отравлении антихолинэстеразными соединениями в лечебных учреждениях.

#### **1.6. Характеристика иммуностимуляторов. Иммуностимулирующие свойства имунофана и полиоксидония**

Анализ обширной литературы, посвященной лекарственным средствам, обладающим выраженными иммуотропными эффектами, позволяет считать, что иммуномодуляторами являются вещества, способные вызывать иммунодепрессию и иммуностимуляцию, а также оказывать активирующее или супрессирующее действие на систему иммунитета в зависимости от ее функционального состояния. К иммуностимуляторам обычно относят соединения, способные увеличивать нормальный или пониженный гуморальный и клеточный иммунный ответ [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995а, 1995б, 2005а; Коготкова О.И. и соавт., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Hokland M. et al., 1999; Bondar N.F. et al., 2004; Singh N., Perfect J.R., 2007].

По основным функциональным признакам иммуностимуляторы подразделяются на препараты, стимулирующие преимущественно факторы НРО от инфекций (продигиозан, метилурацил, пентоксил, нуклеинат натрия), клеточный иммунитет (тималин, Т-активин, тимоптин, тимоген, молграмостин, леакадин) [Забродский П.Ф., 2002; Романцов М.Г. и соавт., 2008; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Khaitov R.M., 1993; Kimball E. S., 1993; Janik G., Kopp W.C., 1993], В-систему иммунитета (миелопид, спленин), а также оказывающее влияние практически на все звенья иммунного ответа и факторы НРО (имунофан, полиоксидоний) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Hokland M. et al., 1999; Bondar N.F. et al., 2004].

Данная классификация не является общепринятой. К современным препаратам, восстанавливающим функционирование фагоцитов, ЕКК и дефекты гуморального иммунитета относят ликолипид и полиоксидоний, восстанавливающим гуморальный иммунитет – миелопид, а функционирование Т-клеточного звена – Т-активин (тактивин), тимоген, имунофан, бестим и т.д. [Нестерова И.В., 2005].

По происхождению иммуностимуляторы подразделяются на продукты жизнедеятельности микроорганизмов, растений и животных (полисахариды, фосфолипиды мембран, гликопептиды, модифицированные токсины, ДНК и РНК микроорганизмов, вакцины и др.) [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Чекнёв С.Б., Бабаева Е.Е., 2004; Медуницин Н.В., 2005; Хабибуллаев Б.Б., 2005; Khaitov R.M., 1993], пептидные эндогенные стимуляторы иммунитета (препараты тимуса, селезенки, костного мозга, интерлейкины, интерфероны и др.) [Нестерова И.В., 2005; Петров Р.В. и соавт., 2005; Georgiev V.St. et al., 1993; Stevens G., 1993], синтетические стимуляторы иммунитета (левамизол, леакадин, тимоген) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Hokland M. et al., 1999; Bondar N.F. et al., 2004; Singh N., Perfect J.R., 2007], стимуляторы метаболических процессов - экстраиммунная терапия (анаболические гормоны, рибоксил, плазмол, витамины, бемитил, пирацетам, оротат калия,



и др.) [Зарубина И.В., Миронова О.П., 2001; Забродский П.Ф., 2002; Хаитов Р.М. и соавт., 1995б; 2002; Хаитов Р.М., 2006].

Описаны иммунопротективные эффекты мелатонина при действии пестицидов на крыс популяции Вистар, которые заключались в восстановлении клеточного иммунного ответа, за исключением реакции ГЗТ, вследствие нормализации цитокинового профиля, измененного широко используемым пестицидом пропоксуром [Suke S.G.. 2008].

В настоящее время средства коррекции нарушений системы иммунитета включает несколько сотен соединений, однако широко используются лишь несколько десятков из них. Необходимо учитывать, что практически все иммуностимуляторы имеют те или иные нежелательные побочные эффекты. Однако при применении имунофана и полиоксидония они не выявлены [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Нестерова И.В., 2005; Хаитов Р.М., 2006; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Изучение иммуностимулирующих характеристик различных препаратов [Беликов В.Г., 2001; Мальцева Г.М., 2002; Нечаев В.И. и соавт., 2003; Василенко О.А., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Нестерова И.В., 2005; Забродский П.Ф. и соавт., 1998, 2005; Елизарова Н.Л. и соавт., 2005; Hokland M. et al., 1999; Bondar N.F. et al., 2004; Singh N., Perfect J.R., 2007; Frasc S.C. et al., 2007] показывает, что наиболее эффективным при нарушении Т-звена иммунитета и снижении активности ЕКК вследствие действия ФОС могут являться Т-активин, при поражении В-звена иммунитета – имунофан, а при комбинированной супрессии факторов НРО, Т- и В-системы иммунитета – имунофан и полиоксидоний.

В литературе практически отсутствуют сведения, имеющие отношения к сравнительной характеристике действия некоторых иммуностимуляторов на иммунный гомеостаз. Однако анализ иммуностимулирующих эффектов иммуномодуляторов [Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 1989, 1997, 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003; Елизарова Н.Л. и соавт., 2005; Dyakonova V.A. et al.. 2004], позволяет считать наиболее приемлемыми препаратами для

коррекции постинтоксикационных нарушений, вызванных отравлениями ФОС, имунофан и полиоксидоний.

Исследованиями последних лет показано, что имунофан (аргинил-альфа-аспартил-лизил-тирозил-аргинин) – гексапептид с молекулярной массой 836 Да. Препарат относится к синтетическим иммуностимуляторам, обладает иммунорегулирующим, детоксикационным, гепатопротективным действием и вызывает инактивацию свободнорадикальных процессов ПОЛ [Покровский В.И. и соавт., 1997; Лебедев В.В. и соавт., 1999а, 1999б, 2000]. Фармакологическое действие пептидного иммунооксидредуктанта основано на достижении коррекции иммунной и окислительно-антиокислительной систем организма. Действие препарата начинает развиваться в течение 2-3 часов (быстрая фаза) и продолжается до 4 мес (средняя и медленная фазы).

В течение быстрой фазы (продолжительность до 2-3 суток) прежде всего, проявляется детоксикационный эффект – усиливается антиоксидантная защита организма путем стимуляции продукции церулоплазмينا, лактоферрина, активности каталазы. Препарат нормализует перекисное окисление липидов, ингибирует распад фосфолипидов клеточной мембраны и синтез арахидоновой кислоты с последующим снижением уровня холестерина крови и продукции медиаторов воспаления. При токсическом и инфекционном поражении печени имунофан предотвращает цитолиз, снижает активность трансаминаз и уровень билирубина в сыворотке крови [Константинов Б.А. и соавт, 2000; Лебедев В.В. и соавт., 2000; Караулов А.В., 2000а, 2000б].

В течение средней фазы (начинается через 2-3 суток, продолжительность – до 7-10 суток) происходит усиление реакций фагоцитоза и гибели внутриклеточных бактерий и вирусов. В течение медленной фазы (начинает развиваться на 7-10 сут, продолжительность до 4 месяцев) проявляется иммунорегуляторное действие препарата – восстановление нарушенных показателей клеточного и гуморального иммунитета. В этот период наблюдается восстановление

иммунорегуляторного индекса, отмечается увеличение продукции иммуноглобулинов [Лебедев В.В. и соавт., 2000; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003].

Влияние препарата на продукцию специфических противовирусных и антибактериальных антител эквивалентно действию некоторых лечебных вакцин. В отличие от последних препарат не оказывает существенного влияния на продукцию реактиновых антител класса IgE и не усиливает реакцию гиперчувствительности немедленного типа [Лебедев В.В., Покровский В.И., 1999а; 1999б].

В связи с установленным нами поражением различных элементов системы иммунитета, нарушением его разнообразных реакций, популяций лимфоцитов под влиянием токсикантов имунофан, возможно, может являться препаратом выбора при остром отравлении ФОС. Имунофан в отличие от тимогена и Т-активина способен оказывать не только иммуностимулирующее влияние на все звенья системы иммунитета, но и обеспечивать детоксицирующий, гепатопротективный и антиоксидантный эффекты [Покровский В.И. и соавт., 1997; Лебедев В.В., Покровский В.И., 1999а; 1999б]. Антиоксидантное действие имунофана предотвращает повреждение ДНК лимфоцитов и гранулоцитов, вызванное химическими факторами окружающей среды (токсикантами) [Караулов А.В. и соавт., 2005].

Полиоксидоний - это физиологически активное соединение с молекулярной массой 100 кДа, обладающее выраженной иммуномодулирующей активностью. По своей химической структуре он является сополимером N-окиси 1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксиэтил)-1,4-этиленпиперазиния бромида с молекулярной массой 80 кДа [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005]. Он является иммуномодулятором последнего поколения, обладает иммуностимулирующими, детоксикационными, антиоксидантными и мембраностабилизирующими

эффектами. При совместном введении полиоксидония и  $\text{CuSO}_4$  происходит 100%-ная защита животных от действия ядовитого сульфата меди при 100%-ной гибели их в контроле [Пинегин Б.В., и соавт., 2004; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005] и свойствами гепатопротектора [Ратькин А.В. и соавт., 2005]. Полиоксидоний оказывает активирующее действие на неспецифическую резистентность организма, фагоцитоз, гуморальный и клеточный иммунитет, действует на все звенья иммунного ответа, а также обладает способностью активировать ЕКК. Повышает функцию ЕКК полиоксидоний только в том случае, если она была исходно понижена. На нормальные уровни цитотоксичности лимфоцитов он влияния не оказывает [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Пинегин Б.В., и соавт., 2004; Dyakonova V.A. et al., 2004].

Одним из главных биологических свойств полиоксидония является его способность стимулировать антиинфекционную резистентность организма. Предварительное его введение за 48, 72 и 96 ч может существенно повысить устойчивость животных к заражению несколькими летальными дозами патогенного микроорганизма *S. typhimurium*, вероятно, в связи с его способностью повышать функциональную активность клеток фагоцитарной системы. Полиоксидоний в 1,5-2 раза усиливает способность фагоцитов периферической крови нормальных доноров убивать *S. aureus* и это усиление носит дозозависимый характер. Препарат обладает способностью активировать кислородонезависимые механизмы бактерицидности лейкоцитов. Полиоксидоний подавляет образование внеклеточных, но стимулирует образование внутриклеточных активных форм кислорода, от которых, как отмечалось, зависит гибель бактерии в клетке. Ингибция образования внеклеточных активных форм кислорода лейкоцитами можно рассматривать как положительный эффект этого иммуномодулятора, так как их избыточное образование лежит в основе повреждающего действия активированных нейтрофилов на различные ткани и органы. Полиоксидоний в определенных дозах обладает способностью

стимулировать как спонтанный, так и индуцированный синтез цитокинов, продуцируемых в основном клетками моноцитарно-макрофагальной системы и нейтрофилами: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  [Пинегин Б.В., и соавт., 2004], которые являются основными активаторами функциональной активности фагоцитарных клеток [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Пинегин Б.В., и соавт., 2004; Dyakonova V.A. et al., 2004]. При этом он ведет себя как истинный иммуномодулирующий препарат, то есть усиливает образование TNF только у лиц с исходно пониженным или средним уровнем синтеза цитокина и не оказывает влияния или даже несколько понижает продукцию у лиц с исходно повышенным его синтезом. Вероятно, способность полиоксидония индуцировать образование и провоспалительных (ИЛ-1 и факторы некроза опухоли - TNF), и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-6) лежит в основе его иммуномодулирующего эффекта. В условиях *in vivo* полиоксидоний обладает выраженной способностью стимулировать гуморальный иммунный ответ. При введении совместно с низкими дозами антигена препарат усиливает антителообразование в 5-10 раз по сравнению с животными, получавшими только один антиген. Важно отметить, что такое усиление можно наблюдать у старых мышей, у которых иммунный ответ по сравнению с молодыми животными существенно снижен [Пинегин Б.В., и соавт., 2004; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

Таким образом, имунофан, полиоксидоний может являться препаратом выбора при нарушении иммунного гомеостаза ФОС. Антиоксидантное действие полиоксидония, как и имунофана, вероятно, может предотвращать повреждение ДНК лимфоцитов и гранулоцитов, вызванное различными токсикантами [Караулов А.В. и соавт., 2005].

Возможность коррекции нарушений иммунного гомеостаза полиоксидонием после острых интоксикаций практически не исследована. Предположительно эффективность данного иммуномодулятора для

восстановления показателей иммунного статуса при отравлении ФОС в комбинации с их антидотами можно оценить, как очень высокую.

Таким образом, оценка эффективности имунофана и полиоксидония позволит рекомендовать данные препараты для изолированного или комбинированного применения с целью восстановления факторов НРО, клеточного и гуморального иммунного ответа после отравления ФОС в сочетании с применением антидотов, для профилактики инфекционных осложнений и заболеваний.

## ГЛАВА 2

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

#### 2.1. Объект исследования и применяемые препараты

Исследования проводились на 762 неинбредных белых крысах обоего пола, крысах популяции Wistar и на 77 беспородных белых мышах обоего пола, а также на мышах линии СВА. Масса крыс и мышей составляла соответственно 180-240 и 18-22 г. Кроме того, показатели системы иммунитета оценивали у 51 человека.

В экспериментах на животных использовали ФОС - метафос, ДДВФ и хлорофос, относящиеся соответственно к сильнодействующим, высокотоксичным веществам и соединениям средней токсичности. Эти ФОС относятся также к 2-м основным группам инсектицидов: метафос – к эфирам тиофосфорной кислоты, хлорофос и ДДВФ - эфирам алкилфосфорных кислот, ДДВФ - [Голиков С.Н., 1968]. Кроме того, применявшиеся ФОС относятся к соединениям не метаболизирующимся до более токсичных веществ (ДДВФ) и биотрансформирующимся в организме по типу «летального синтеза», то есть с образованием высокотоксичных метаболитов (метафос, хлорофос) [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983; Филлов В.А., 2002].

Токсиканты в дозах 0,75  $DL_{50}$  вводили подкожно.  $DL_{50}$  метафоса для крыс и мышей составляли  $25,3 \pm 2,6$  и  $36,0 \pm 4,2$  мг/кг соответственно,  $DL_{50}$  ДДВФ для крыс и мышей –  $70,0 \pm 4,5$  и  $58,5 \pm 6,3$  мг/кг соответственно, а  $DL_{50}$  хлорофоса для крыс составляла  $335 \pm 39$  мг/кг.

В качестве антидотов при интоксикации ФОС применяли атропина сульфат (20 мг/кг), карбоксим (20 мг/кг) которые вводили внутримышечно через 5-10 мин после введения ФОС в 2 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Изучение изменения иммунотоксичности фосфорорганических соединений в зависимости от характера их метаболизма при активации Р-450-зависимых монооксигеназ проводили путем использования индукторов монооксигеназной системы фенobarбитала и бензонала перорально в течение трех суток в дозах соответственно 50 и 70 мг/кг до острого отравления крыс хлорофосом и ДДВФ. Ферментиндуцирующие свойства фенobarбитала и бензонала оценивали по длительности сна, вызванного гексобарбиталом в дозе 80 мг/кг [Венгеровский А.И. и соавт., 1993].

В качестве иммуностимуляторов использовали имунофан (20 мкг/кг) и полиоксидоний (700 мкг/кг), которые вводили внутримышечно ежедневно в течение 4 сут. Дозы иммуностимуляторов, которые применялись в эквитерапевтических дозах для крыс обоснованы данными литературы и расчетами по общепринятым методам вычисления [Рыболовлев Ю.Р., 1982]. Первую дозу иммуностимулятора крысы получали через 30 мин после острой интоксикации ФОВ в дозе 1,0  $DL_{50}$ .

Иммунный статус исследовался на 10 сут у больных, получивших отравление ФОС (ДДВФ, хлорофос, метафос) средней степени тяжести в условиях применения антидотов (11 человек). Контрольная группа включала практически здоровых лиц в возрасте 20-45 лет (30 человек). Полиоксидоний применялся ежедневно внутримышечно в дозе 12 мг один раз в сутки ежедневно, общим курсом 9 инъекций, начиная с первых суток поступления больного в стационар (10 человек – отравления средней степени тяжести, использование атропина и карбоксима).

При этом исследовались основные показатели системы иммунитета: содержание в крови лейкоцитов, относительное и абсолютное содержание в крови лимфоцитов, а также их субпопуляций CD3, CD4, CD8, CD16, CD72, отношение CD4/CD8, IgA, IgM, IgG, реакция бласттрансформации лимфоцитов с фитогемагглютинином, АЗКЦ (Хаитов Р.М. [и др.], 1995а, с. 3-8).



Лимфоидные органы извлекали у животных после цервикальной дислокации в различные сроки после интоксикации.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Женевской конвенции "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" (Geneva, 1990).

## **2.2 Исследование факторов неспецифической резистентности организма**

### **2.2.1. Сывороточная активность лизоцима**

Лизоцим (мурамидаза) - один из важных факторов неспецифической защиты организма. Это термостабильный кристаллический белок типа муколитического энзима молекулярной массой от 10000 до 25000 Д. Содержится во многих секретах, жидкостях и тканях [Диксон М., Уэбб Э., 1982]. Ферментативная специфичность лизоцима заключается в разрушении связи между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в мукополисахариде, образующем оболочку многочисленных микроорганизмов. Образующиеся гликопептиды обладают адьювантной активностью, стимулируют продукцию антител, повышают митотическую активность иммуноцитов, индуцируют гиперчувствительность замедленного типа. Источником лизоцима являются нейтрофильные гранулоциты и моноциты [Гембицкий Е.В. и соавт., 1987].

Содержание сывороточного лизоцима определяли методом, основанным на способности лизоцима растворять индикаторный микрококк (*Micrococcus lysodeicticus*), измеряя при этом оптическую плотность опытной и контрольной суспензии микроорганизмов [Ремезов П.И., Башмаков Г.А., 1976]. Взвесь суточной агаровой культуры микрококка на 1/15 М фосфатном буфере (рН 6,2) стандартизировали по левому барабану фотоэлектроколориметра (ФЭК) до оптической плотности 0,66. В опытную пробирку вносили 0,4 мл фосфатного буфера, 0,1 мл исследуемой сыворотки и 2 мл стандартной взвеси микрококка. Смесь выдерживали при

37 °С 30 мин, после чего измеряли ее оптическую плотность на ФЭК по правому барабану в кювете №2 с зеленым светофильтром. Для количественной характеристики лизоцима в исследуемой сыворотке с использованием кристаллического лизоцима строили калибровочную кривую, исходя из активности фермента 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 50 мкг в пробе. Во все пробирки с различным содержанием лизоцима вносили с интервалом 30 с по 2 мл стандартизованной суспензии микрококка. Смесь инкубировали при 37° С 30 мин и в каждой пробирке, начиная с первой, измеряли оптическую плотность. Каждое последующее измерение выполняли через 30 с после предыдущего. С помощью калибровочной кривой находили количества лизоцима в исследуемой сыворотке, выраженное в абсолютных единицах. Для удобства расчетов зависимость между оптической плотностью микробной взвеси в опыте и контроле, а также содержанием лизоцима в исследуемой сыворотке использовали таблицу [Ремезов П. И., Башмаков Г. А., 1976].

Активность лизоцима исследовали на 5 и 10 сут после воздействия ФОС и антихолинэстеразных ядов в комбинации с их антидотами.

### **2.2.2. Тромбоцитарный катионный белок сыворотки крови**

Одним из факторов НРО является тромбоцитарный катионный белок (ТКБ) сыворотки крови, ранее известный как  $\beta$ -лизин [Бухарин О. В и соавт., 1998]. ТКБ - бактерицидное вещество сыворотки крови, избирательно активное в отношении грамположительных микроорганизмов и спорообразующих бацилл. ТКБ обнаружен в сыворотке крови, слюне, секрете слезных желез и других жидкостях организма. Источником ТКБ являются тромбоциты. Механизм действия  $\beta$ -лизина обусловлен изменением проницаемости мембран микроорганизмов и блокадой их окислительного метаболизма.

Метод определения активности  $\beta$ -лизина основан на избирательной чувствительности к его бактерицидному действию индикаторной культуры - *B. subtilis*. Тромбоцитарный катионный белок сыворотки крови ( $\beta$ -лизин) определяли фотонейфелометрическим ускоренным методом [Ремезов П.И., Башмаков Г. А., 1976], учитывая изменение оптической плотности раствора сахарозы при росте в ней индикаторной культуры. Учет результатов проводили по формуле:

$$\% \text{ лизиса} = \frac{D_1 - D_2}{D_2} \times 100, \text{ где}$$

$D_1$  - оптическая плотность опытных проб до инкубации;

$D_2$  - оптическая плотность опытных проб после инкубации.

Определение оптической плотности проводили на фотоэлектроколориметре.

### 2.2.3. Определения фагоцитарной активности нейтрофилов

Фагоцитоз относится к клеточному фактору НРО. Процесс фагоцитоза осуществляется микрофагами (гранулоцитами) и макрофагами (моноцитами крови, клетками пульпы селезенки, эндотелия кровеносных сосудов, полибластами, гистиоцитами и др.) и представляет собой сложный многоступенчатый процесс [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Хаитов Р.Я., Пинегин Б.В., 1995а; Гребенюк А.Н., 1998; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Помимо действия ферментов уничтожение чужеродной клетки может осуществляться путем "дыхательного" (кислородного) взрыва [Хаитов Р. М. и соавт., 2002]. В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что в фагоцитарной реакции активное участие принимает радикал оксида азота

(NO<sup>•</sup>), и различные цитокины, простагландины, лейкотриен В<sub>4</sub> и другие факторы [Гребенюк А.Н., 1998; Хаитов Р. М. и соавт., 2002].

Использованный нами метод оценки фагоцитарной активности нейтрофилов основан на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия (НСТ) в нерастворимый диформаза под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции. НСТ-тест, как уже указывалось, интегрально характеризует кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995; Сакаева Д.Д., Лазарева Д.Н., 1998; Белокрылов Г.А., Попова О.Я., 1999]. Учет результатов проводился путем подсчета в каждом мазке 100 нейтрофилов, среди которых определялся процент клеток, содержащих отложения диформаза (НСТ - позитивные нейтрофилы). Далее рассчитывался индекс активности нейтрофилов (ИАН) по формуле:

$$\text{ИАН} = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3}{100}, \text{ где}$$

**A** - количество клеток, не содержащих диформазиновых отложений или содержащий их в виде пылевидных немногочисленных включений;

**B** - количество клеток, в которых площадь отложений диформаза не превышает 1/3 площади ядра;

**C** - количество клеток, в которых названные отложения занимают от 1/3 до всей величины площади ядра;

**D** - количество клеток с диформазиновыми отложениями, по площади превосходящими площадь ядра.

Кроме того, оценку фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов (ФМАН) проводили общепринятыми методами [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995а, 1995б] по содержанию микробных клеток в

нейтрофиле, то есть определяли число поглощенных микробных тел по отношению к общему числу клеток – фагоцитарный показатель, и среднее число поглощенных микроорганизмов фагоцитом – фагоцитарное число.

## **2.3. Исследование показателей системы иммунитета**

### **2.3.1. Оценка содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови**

Содержание Т-клеток в тимусе крыс определяли общепринятым методом подсчета ядродержащих клеток в органе, учитывая то обстоятельство, что лимфоциты в вилочковой железе представлены в основном (около 90%) Т- популяцией [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2002]. Лимфоциты в селезенке, лимфатических узлах (для изучения брали паховые лимфоузлы) и костном мозге (исследовали клетки костного мозга бедренной кости) подсчитывали, исходя из их относительного содержания в мазках данного органа, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Для определения содержания в лимфоидных органах лимфоцитов клеточные суспензии из тимуса, селезенки, костного мозга и паховых лимфоузлов крыс готовили после действия ФОС (изолированно и в комбинации с антитоксинами) через 2 и 10 сут после отравления. Содержание лейкоцитов и лимфоцитов в крови крыс после интоксикации ФОС определяли на 2 и 10 сут общепринятыми методами [Гембицкий Е.В. и соавт., 1987].

### **2.3.2. Исследование функции Th1-лимфоцитов**

Для оценки влияния ФОС в комбинации с антитоксинами на функцию Th1-лимфоцитов исследовали формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Использовали модель данной реакции, в которой не используется перенос сингенных иммуноцитов, и адоптивную модель, связанную с переносом клеток (to adopt (англ.) – принимать, усваивать). ГЗТ

оценивали у неинбредных белых крыс после иммунизации внутривенным введением  $2 \cdot 10^8$  эритроцитов барана (ЭБ) в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия одновременно с ФОС. Разрешающую (вызывающую реакцию) дозу ЭБ ( $5 \cdot 10^8$  в 0,05 мл изотонического раствора хлорида натрия) вводили под апоневроз задней лапы через 4 сут после иммунизации. Оценку реакции осуществляли через 24 часа по приросту массы стопы задней лапы крыс по сравнению с контрольной [Брюхин Г.В. и соавт., 1990]. Данный тест отражал функцию Th1-лимфоцитов и способность их к продукции ИЛ-3,  $\gamma$ -интерферона,  $\beta$ -фактора некроза опухоли - лимфотоксина и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) [Georgiev V.St., Albright J.E., 1993].

При исследовании формирования ГЗТ у крыс-реципиентов после переноса им спленоцитов ( $5 \cdot 10^8$ ), иммунизированных  $10^8$  ЭБ сингенных доноров, реципиентов через 1 ч сенсibilизировали внутривенным введением  $10^8$  ЭБ. Через 4 сут под апоневроз стопы реципиентов вводили разрешающую дозу ЭБ ( $5 \cdot 10^8$ ) с последующей оценкой реакции через 24 ч. Спленоциты получали через 5 сут после иммунизации доноров. В данном эксперименте формирование ГЗТ отражало влияние острой интоксикации ФОС в комбинации с антидотами на вторичный иммунный ответ в модели адаптивной реакции, связанной с переносом иммунных спленоцитов крысам-реципиентам [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Донорам вводили ФОС, а также ФОС в сочетании с антидотами, через 30 мин после иммунизации [Германчук В.Г., 2000].

### **2.3.3. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности**

Антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), характеризующую функцию К-клеток, определяли по методу Ю. И. Зими́на, В. Ф. Ляхова (1985), через 5 сут после иммунизации, осуществляемой через 30 мин после отравления ФОС, а также после действия ФОС в сочетании с

антидотами (оценка действия ФОС в индуктивной фазе иммуногенеза). Кроме того, ФОС (ФОС в комбинации с антидотами) вводили на 3 сут после иммунизации ЭБ (оценка действия яда в продуктивной фазе иммуногенеза). В настоящее время доказано, что К-клетки - это ЕКК, использующие для усиления реакции антитела [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Хаитов Р.М., 2006].

Крыс иммунизировали ЭБ ( $5 \cdot 10^8$  клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия), ФОС вводили через 2 сут после иммунизации. Через 5 сут извлекали селезенку и тимус, готовили клеточные суспензии в растворе Хенкса, который затем фильтровали через капроновую сетку. Суспензии клеток дважды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия по 10 мин при 400 g. Жизнеспособность клеток определяли методом суправитальной окраски 0,1 % раствором трипанового синего. В качестве клеток-мишеней использовали трижды отмытые по 10 мин при 400 g ЭБ, которые в 2,5 % суспензии смешивали с равным объемом гипериммунной антисыворотки кролика в субагглютинирующем разведении (1:5000). Смесь инкубировали 30 минут при 37°C, а затем отмывали 3 раза раствором Хенкса и доводили до необходимой концентрации. Используемую антисыворотку предварительно инактивировали в течении 30 минут при 56 °C. Спленоциты (timoциты) смешивали с ЭБ в соотношении 20 : 1 (абсолютные значения соответственно  $20 \cdot 10^6$  и  $1 \cdot 10^6$ ) в 2 мл раствора Хенкса без фенолового красного и инкубировали 4 ч при 37°C. После инкубации смесь клеток центрифугировали 20 минут при 200 g, собирали супернатант. Цитопатогенность киллеров оценивали спектрофотометрическим методом по выходу гемоглобина из лизированных эритроцитов. Контролем служили пробы, содержащие эффекторы и интактные ЭБ. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 412 нм на спектрофотометре. Уровень АЗКЦ оценивали по индексу цитотоксичности (ИЦ) по формуле:

$$E_0 - E_K$$

$$\text{ИЦ} = \frac{E_0 - E_k}{E_{\max}} \times 100, \text{ где}$$

$E_0$  - оптическая плотность проб, содержащих эффекторные клетки и сенсibilизированные клетки мишени;

$E_k$  - оптическая плотность супернатантов проб, содержащих эффекторные клетки и интактные эритроциты;

$E_{\max}$  - оптическая плотность при максимальном гемолизе соответствующего числа эритроцитов (гемолиз проводили дистиллированной водой).

Действие ФОС в комбинации с антидотами оценивали при введении препаратов в индуктивной и продуктивной фазах иммуногенеза (одновременно с иммунизацией и через 2 сут после нее).

#### 2.3.4. Определение активности естественных клеток-киллеров

К ЕКК, открытым в 1976 году, относятся клетки, не имеющие антигенных маркеров Т- и В-лимфоцитов [Хаитов Р.М., 2006].

Оценка естественной цитотоксичности осуществлялась спектрофотометрическим методом [Гордиенко С. М., 1984], где клетками-эффекторами служили спленоциты крыс, а клетками-мишенями - эритроциты кур (ЭК) [Белокрылов Г. А. и соавт., 1980]. Очищенную взвесь лимфоцитов получали, удаляя прилипающие клетки инкубацией в колонках с нейлоновой ватой. Эффекторные клетки взвешивали в концентрации  $10^7$  клеток в 1 мл питательной среды следующего состава: среда № 199 с добавлением до 10% истощенной ЭК эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина (300 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и пенициллина (100 Ед/мл). В ходе опыта обеспечивали соотношение эффектор - мишень 10:1, при этом концентрация клеток-мишеней (ЭК) составляла  $10^6$  в 1 мл



питательной среды. Цитотоксический тест ставили в пластиковых камерах «Linbro» (76-013-05) с круглым дном. Результаты реакции учитывали по спектрофотометрическому определению концентрации гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЭК. В опытные лунки добавляли по 0,1 мл взвеси эффекторных клеток и по 0,1 мл взвеси ЭК. Проводили 3 контроля: эффекторные клетки в питательной среде без ЭК; питательная среда; взвесь ЭК в питательной среде без эффекторов. В конце инкубации содержимое лунок осторожно ресуспендировали и камеры центрифугировали 5 мин при 100g. 0,2 мл надосадка переносили в другие свободные ряды микропластины, а к осадку приливали 0,2 мл 0,25% раствора додецилсульфата натрия для лизиса ЭК, оставшихся неразрушенными в ходе цитотоксической реакции. Оптическую плотность осадков измеряли в специально изготовленных микрокуветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 0,1 мл на спектрофотометре при длине волны 413 нм. Определяли количество гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЕКК ЭК, путем лизиса осадка 0,25% додецилсульфата натрия. Индекс цитотоксичности (ИЦ) определяли по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_k - E_0}{E_k} \times 100, \text{ где}$$

$E_k$  - оптическая плотность лизированного осадка ЭК контрольной пробы без эффекторов против лизирующего раствора;

$E_0$  - оптическая плотность лизированных оставшихся в осадке опытной пробы неразрушенных ЭК против лизированного осадка эффекторных клеток без ЭК.

Функцию ЕКК оценивали на 2, 5 и 10 сут после введения ФОС (ФОС с сочетанием с антидотами).

### 2.3.5. Оценка гуморального звена иммунного ответа

Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому (эритроцитам барана - ЭБ) и тимуснезависимому антигенам брюшнотифозный Vi-антиген (Vi-Ag) оценивали также на 5 сут по числу антителобразующих клеток (АОК) в селезенке [Jerne N. K., Nordin A. A., 1963] после введения ФОС (а также ФОС в комбинации с антитодами) с внутрибрюшинной иммунизацией крыс ЭБ в дозе  $2 \cdot 10^8$  клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия и Vi-Ag в дозе 8 мкг/кг (использованный тест отражал синтез IgM В-клетками селезенки).

Для определения АОК к Vi-антигену использовали ЭБ, связанные с Vi-антигеном. АОК, характеризующие продукцию IgG, определяли в селезенке через 14 сут после иммунизации. При этом введение химических соединений проводили на 9 сут.

При практически одновременном введение ФОС (ФОС в сочетании с антитодами) с ЭБ и на 3 сут после иммунизации позволяло оценить соответственно индуктивную и продуктивную фазу гуморального иммунного ответа [Deskotes J., 1986; Хаитов Р.М., 2002].

### **2.3.6. Исследование роли Th1-, Th2-лимфоцитов в супрессии иммунных реакций, кооперации Т- и В- лимфоцитов при остром отравлении ФОС в комбинации с их антитодами**

Для оценки роли Th1, Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими – цитокинов  $\gamma$ -интерферона (ИФ- $\gamma$ ) и интерлейкина-4 (ИЛ-4) в супрессии гуморальных и клеточных иммунных реакций при остром отравлении ФОС в комбинации с антитодами эксперименты проводились на белых крысах обоего пола. ФОС (метафос) в сочетании с применением антитодных средств вводили в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> в продуктивной фазе иммуногенеза (на 3 сут после иммунизации эритроцитами барана). Концентрацию цитокинов – ( $\gamma$ -интерферона – ИФ- $\gamma$  и ИЛ-4) - определяли в плазме крови крыс на 5 и 8 сут после первой инъекции ФОС (а также ФОС в комбинации с антитодами)

методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) [Ройт А. и соавт., 2000], используя реактивы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int. Относительное значение активности Th1- и Th2-лимфоцитов в редукции иммунных реакций проводили также путем оценки числа АОК в селезенке на 5 сут после иммунизации ЭБ (синтез IgM), реакции ГЗТ (функция Th1-клеток) и числа АОК в селезенке на 8 сут после иммунизации ЭБ (синтез IgG) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Кооперацию Т- и В-лимфоцитов можно рассматривать, как механизм на уровне взаимодействия клеток, определяющий антителопродукцию. Исследование кооперации Т- и В- лимфоцитов проводили на мышах линии СВА *ex vivo*. Для получения Т-клеток использовали метод фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату (“Нитрон”) [Ширшев С.В., 1998]. Для выделения В-лимфоцитов применяли реакцию комплементзависимого масс-цитоллиза. В качестве цитотоксической сыворотки использовали моноклональные антитела против Thy 1.2 антигенов Т-лимфоцитов мыши (Cedarlane Laboratories Limited; London, Canada). Из суспензии спленоцитов макрофаги удаляли методом негативной селекции, используя их способность прилипать к стеклянной поверхности [Ширшев С.В., 1998]. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим (она составляла 95-98%). Инкубируемая по методу J. K. Thomas, T. Imamura (1986), культура содержала  $10^6$  и  $5 \cdot 10^5$  В- и Т-клеток соответственно,  $10^7$  эритроцитов барана в 0,15 мл среды Хенкса. Т- и В-лимфоциты с целью обеспечения сингенности клеток для каждого опыта получали из суспензии спленоцитов одной мыши. Антителообразующие клетки (АОК), число которых характеризует эффект кооперации Т- и В-лимфоцитов подсчитывали в инкубационных камерах через 4 сут [Thomas J. K., Imamura T., 1986a]. Данный тест отражает синтез IgM В-клетками селезенки при участии Th1-лимфоцитов.

Кооперацию Т- и В-лимфоцитов оценивали *ex vivo* после извлечения через 1 сут Т- или В-лимфоцитов из селезенки мышей, подвергавшихся

действию ФОС (ФОС в комбинации с антидотами). При этом соответственно В- или Т-клетки для исследования реакции получали от интактных сингенных животных. Используемая экспериментальная модель позволяла сравнить повреждающий эффект факторов на Т- или В-клетки.

### **2.3.7. Изучение активности ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов**

Различные эстеразы, как и кислые фосфатазы, являются лизосомальными ферментами и играют важную роль в реализации киллерной функции Т-лимфоцитов [Ferguson J. et al., 1972; Li C.Y. et al., 1973]. Изменение эстеразной активности в клетках отражает, с одной стороны, функциональную активность иммуноцитов, с другой – может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983].

Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в Т-лимфоцитах крысы определяли методом G.M. Ellman et al. (1961), выделяя клетки путем фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату (“Нитрон”) [Ширшев С.В., 1998]. 1,5 мл суспензии, содержащей  $5 \cdot 10^8$  клеток в 1 мл 0,1 молярного фосфатного буфера (рН–8,0), добавляли 20 мкл 0,075 моль ацетилхолин-иодида и 50 мкл 0,01 моль дитио-бис-нитробензойной кислоты. После 20 мин инкубации при 25° С реакция останавливалась добавлением 100 мкл 1,5–дифтор-2,4–динитробензола и регистрировали увеличение оптической плотности спектрофотометрически (420 нм) [Szelenyi J.G. et al., 1982]. За единицу активности АХЭ принимали мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл суспензии, содержащей  $10^9$  Т-лимфоцитов [Kutty K. M. et al., 1976].

Активность АХЭ определяли на 5 сут после отравления ФОС (ФОС в сочетании с применением их антидотов).

## **2.4. Исследование уровня кортикостерона в плазме крови и перекисного окисления липидов**

Оценку уровня кортикостерона в плазме крови крыс после действия ФОС в комбинации с антидотами проводили флюорометрическим методом. Определяли уровень неконъюгированных 11- оксикетостероидов по методу В.В. Давыдова (1970), в частности, кортикостерон через 1, 3, 12 и 24 ч после интоксикации ФОС (применялся наиболее токсичный и иммунотоксичный метафос) и его комбинации с антидотами.

Экстракция кортикостерона из анализируемых образцов плазмы крови проводилась четыреххлористым углеродом. Для удаления пигментов плазмы и нестероидных соединений экстракты промывались с помощью 0,1% раствора NaOH и дистиллированной воды. Затем верхний слой, включающий в себя кортикостерон, переносился, выпаривался и повторно экстрагировался 6 мл метиленхлорида или хлороформа. Для образования флюоресцентных комплексов использовалась смесь концентрированной серной кислоты и этанола в соотношении 3:1. После развития флюоресценции растворы исследовались на флюориметре с использованием интерферентных фильтров: первичного с пропусканием волн длиной 470 нм и вторичного – 540 нм.

Перекисное окисление липидов (ПОЛ) оценивали по суммарной продукции радикалов в крови методом люминолзависимой хемилюминесценции, активированной форболовым эфиром (0,156 мкМ) [Михальчик Е.В. и соавт., 2004], по активности каталазы и пероксидазы, содержанию малонового диальдегида в крови спектрофотометрически [Коробейникова Э.Н., 1989; Клинецвич А.Д. и соавт., 1994; Валеева И.Х. и соавт., 2002].

## **2.5. Методы статистической обработки результатов исследований**

Полученные данные обрабатывались с применением общепринятых статистических методов [Урбах В.Ю., 1975; Гублер Е.В., 1978; Лакин Г.Ф., 1980]. При этом различия между средними значениями в опытной и контрольной группах считались значимыми при  $p < 0,05$ . Расчеты среднелетальных доз ФОС проводили по методу А. Миллера и В. Тейтнера [Беленький М. Л., 1963].

В исследованиях использовались параметрические методы анализа с оценкой достоверности различий по t-критерию Стьюдента, определялись коэффициенты корреляции (r) между различными параметрами [Урбах В.Ю., 1975]. Статистический анализ экспериментальных данных осуществлялся также с помощью непараметрического метода (критерий U Вилкоксона – Манни - Уитни).

Расчеты проводились на персональном компьютере с использованием пакета программ Statgraphics.

### **ГЛАВА 3**

## **ВЛИЯНИЕ ФОС В КОМБИНАЦИИ С ИХ АНТИДОТАМИ НА ФАКТОРЫ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА**

### **3.1. Сывороточная активность лизоцима при остром отравлении ФОС в комбинации с их антидотами**

Нами установлено, что после острого действия метафоса, хлорофоса ДДВФ в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> (рис.3.1) на 4 сут происходило уменьшение сывороточной активности лизоцима соответственно в 1,94; 1,72 и 1,62 раза ( $p < 0,05$ ). Учитывая наибольшее снижение показателя под влиянием метафоса, именно данное соединение применялось в последующем в комбинации с антидотами.

При действии метафоса в комбинации с атропином сульфатом, карбоксимом и в сочетании с двумя этими антидотами установлено уменьшение активности лизоцима соответственно в 2,39; 1,60 и 1,86 раза ( $p < 0,05$ ). Несмотря на то, что различия между показателями после применения ФОС в комбинации с антидотами были незначительны, прослеживаются тенденции соответственно к увеличению и снижению супрессии активности лизоцима под влиянием атропина и карбоксима.

На 10 сут после действия ФОС, а также ФОС в комбинации с антидотами зарегистрирована незначительная супрессия синтеза лизоцима, которая находилась в пределах от 3,3 до 14,2% ( $p > 0,05$ ), что свидетельствует о практически полном восстановлении исследованного показателя.

Комбинированное применение двух антидотов атропина и карбоксима приводило к увеличению показателя по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС в комбинации с атропином, и их уменьшению по

сравнению с показателем при интоксикации ФОС и использовании карбоксима.

По интенсивности супрессии активности лизоцима ФОС в порядке снижения эффекта располагались в последовательности: метафос, ДДВФ, хлорофос. Необходимо отметить, что максимальное снижение показателя на 10 сут зарегистрировано после отравления хлорофосом и метафосом, минимальное – после действия ДДВФ.

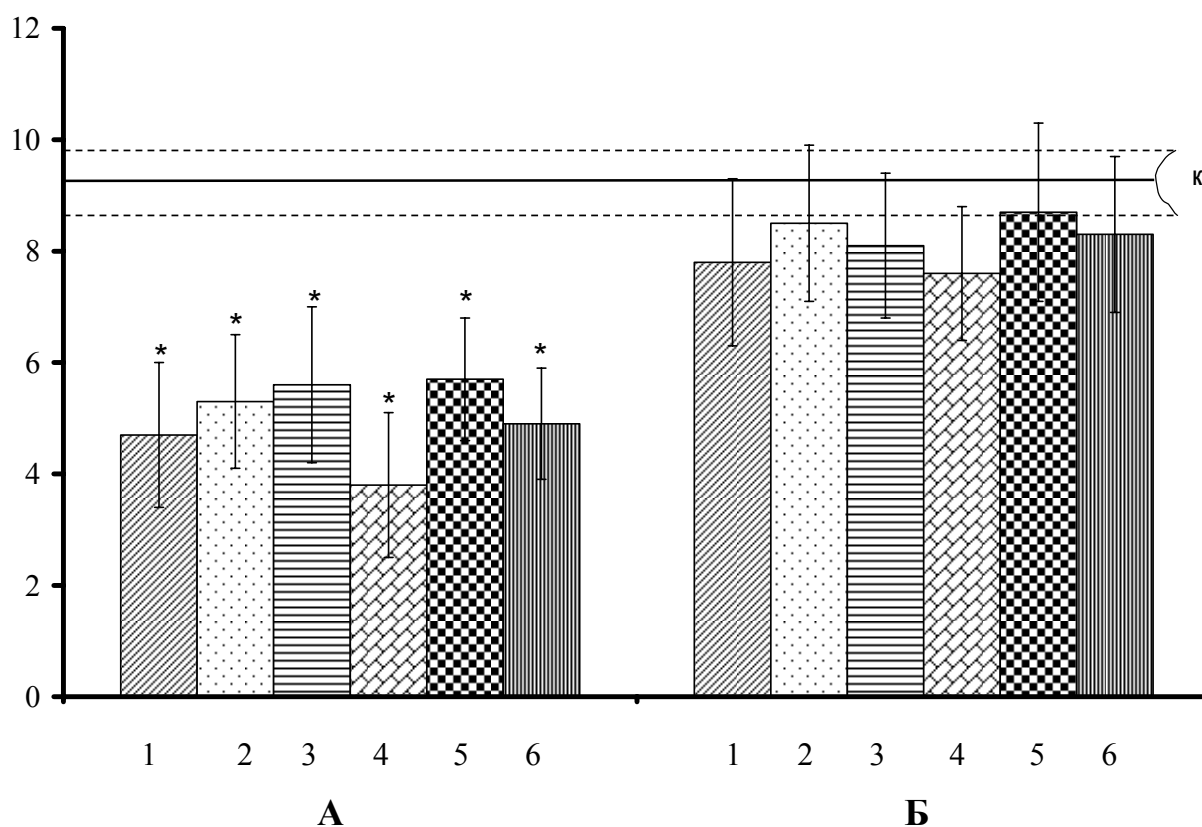


Рис. 3.1. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с их антидотами на активность лизоцима сыворотки крови крыс, мг/л (M±m)

По оси абсцисс: А, Б – срок наблюдения соответственно 5 и 10 сут; 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: активность лизоцима, мг/л, К – контроль; в каждой серии использовалось 12-15 животных; \* – различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ .

Снижение активности лизоцима под влиянием ФОС, вероятно, связана с ингибированием эстераз клеток крови, как самим ФОС (ДДВФ), так и соединениями, образующимися в результате их метаболизма (продуктами биотрансформации хлорофоса и метафоса соответственно



диметилдихлорвинилфосфатом и метаоксоном) [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983; Филов В.А., 2002; Забродский, П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Таким образом, после действия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 5 сут отмечается снижение активности лизоцима сыворотки крови с практически полным восстановлением показателя на 10 сут. По степени снижения показателя ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Установлена более выраженная супрессия показателя при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал редукцию активности лизоцима.

### **3.2. Сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка при остром действии ФОС в сочетании с антидотами**

Оценка активности тромбоцитарного катионного белка (ТКБ) сыворотки крови после острого действия ФОС показала (рис. 3.2), что на 5 сутки после интоксикации отмечается снижение показателя после действия метафоса, хлорофоса и ДДВФ соответственно в 1,52; 1,29 и 1,22 раза ( $p < 0,05$ ). Принимая во внимание то, что максимальная редукция параметра выявлена под влиянием метафоса, именно данное ФОС применялось в последующем в комбинации с антидотами.

При действии метафоса в комбинации с атропином сульфатом, карбоксимом и двумя антидотами в сочетании установлено снижение содержания ТКБ в сыворотке крови соответственно в 2,00; 1,20 и 1,31 раза ( $p < 0,05$ ). Под влиянием атропина и карбоксима происходило соответственно снижение и увеличение активности ТКБ по сравнению с показателем при интоксикации ФОС ( $p < 0,05$ ). При этом показатели оставались ниже контрольного уровня.

Комбинированное применение двух антидотов атропина и карбоксима приводило к увеличению показателя по сравнению с параметрами при

интоксикации ФОС в комбинации с атропином, и их уменьшению по сравнению с показателем при интоксикации ФОС и использовании карбоксима.

На 10 сут после действия ФОС и комбинации метафоса с атропином и дипироксимом происходило практически полное восстановление исследованного показателя.

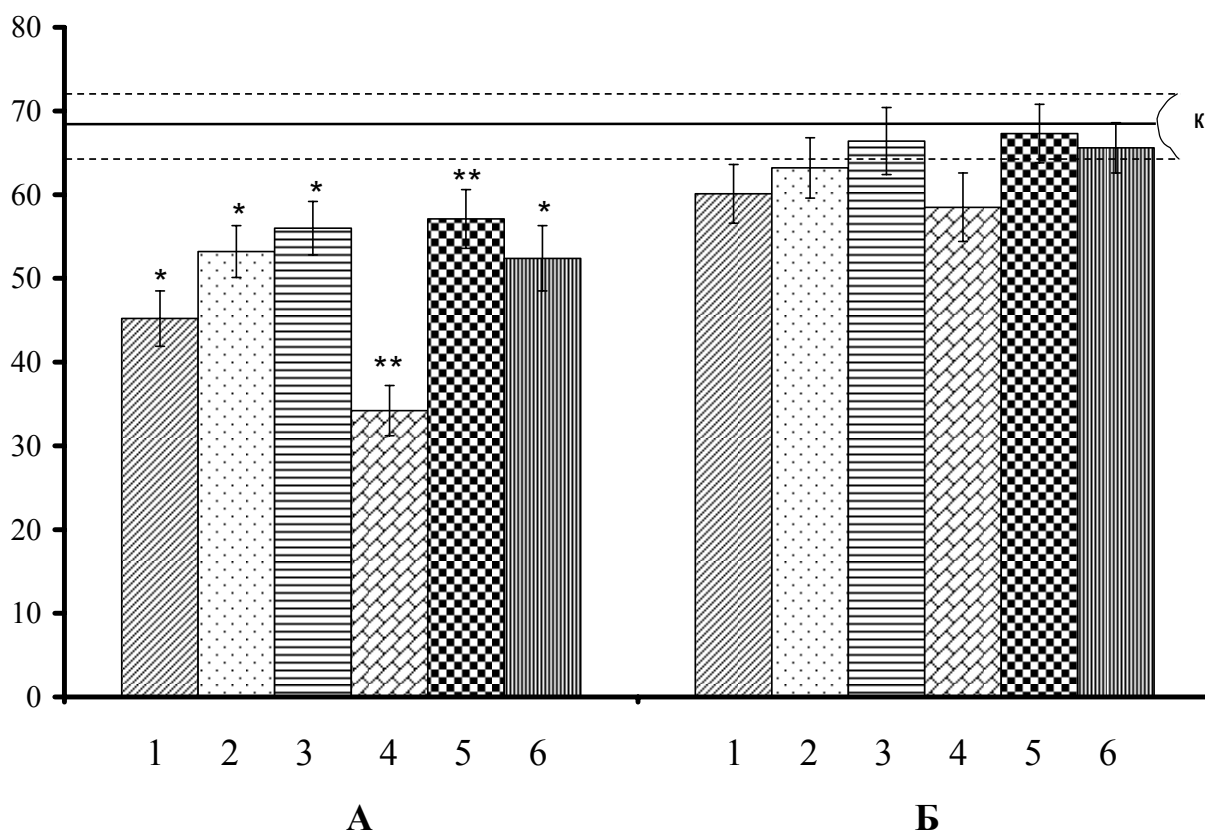


Рис. 3.2. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с их антидотами на активность тромбоцитарного катионного белка сыворотки крови крыс, % (M±m)

По оси абсцисс: А, Б – срок наблюдения соответственно 5 и 10 сут; 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: активность тромбоцитарного катионного белка, %, К – контроль; в каждой серии использовалось 12-15 животных; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

По интенсивности редукции активности ТКБ ФОС в порядке снижения эффекта располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ.

Несмотря на отсутствие значимых различий между показателями в контроле и экспериментальных сериях, следует отметить, что максимальное снижение показателя на 10 сут зарегистрировано после отравления хлорофосом и метафосом, минимальное – после действия ДДВФ. Так, после действия метафоса и ДДВФ активность ТКБ оставалась сниженной соответственно на 12,3 и 3,1%.

Таким образом, после действия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 5 сут отмечается снижение активности ТКБ сыворотки крови с практически полным восстановлением параметра на 10 сут. По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах (интенсивности и длительности) располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Отмечается более выраженная редукция активности ТКБ при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал супрессию активности ТКБ.

### **3.3. Фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов после острой интоксикации ФОС в комбинации с антидотами**

Исследование фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов (ФМАН) после острого действия ФОС и их комбинированного эффекта с антидотами показало (рис. 3.3), что на 5 сут отмечается снижение индекса активности нейтрофилов в спонтанном НСТ-тесте после действия метафоса, хлорофоса и ДДВФ соответственно в 2,07; 1,72 и 1,48 раза ( $p < 0,05$ ). Учитывая наибольшее снижение показателя под влиянием метафоса, именно данное соединение применялось в последующем в комбинации с антидотами.

При действии метафоса в комбинации с атропином сульфатом, карбоксимом и двумя антидотами в сочетании установлено уменьшение ФМАН соответственно в 2,82; 1,41 и 1,82 раза ( $p < 0,05$ ). Под влиянием карбоксима происходило статистически значимое увеличение активности ФМАН по сравнению с показателем при интоксикации метафосом ( $p < 0,05$ ).

При этом показатель оставался ниже контрольного уровня. Атропин несущественно усиливал редукцию ФМАН, вызванную ФОС.

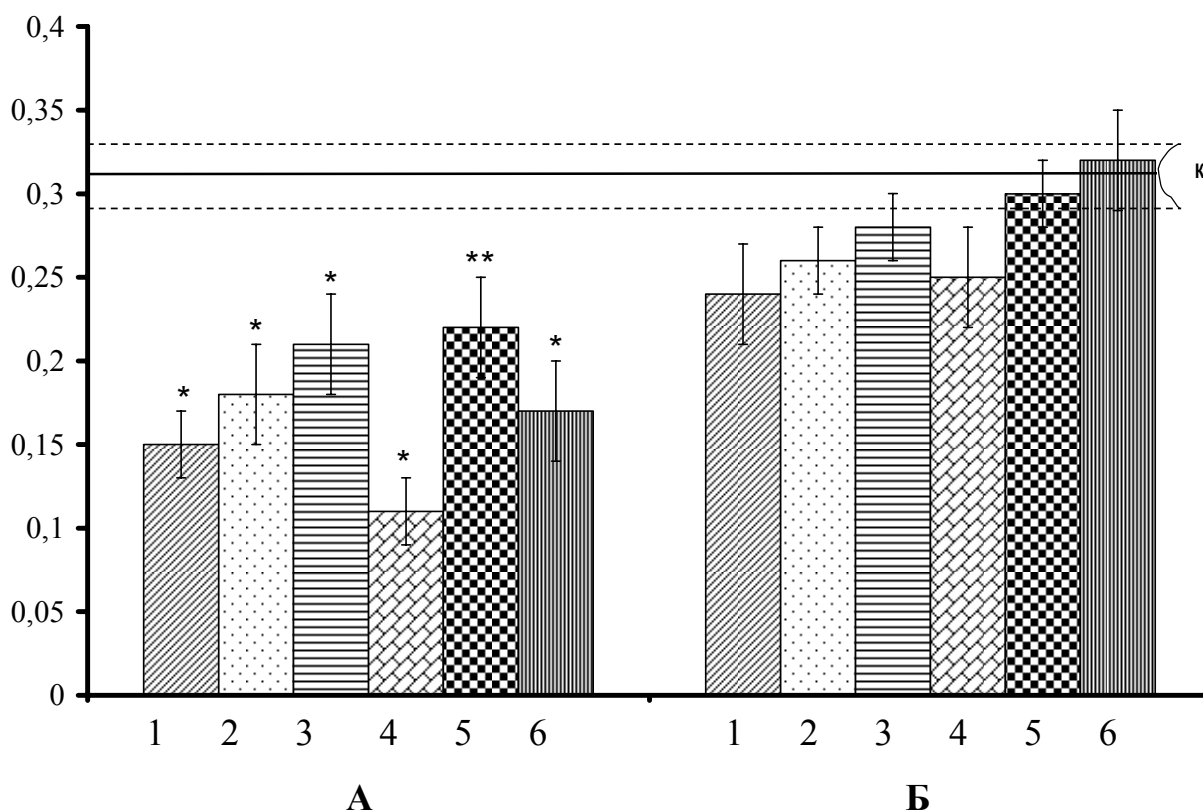


Рис. 3.3. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с их антидотами на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов крыс (индекс активности нейтрофилов) ( $M \pm m$ )

По оси абсцисс: А, Б – срок наблюдения соответственно 5 и 10 сут; 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: индекс активности нейтрофилов, К – контроль; в каждой серии использовалось 13-15 животных; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

На 10 сут после действия ФОС, а также метафоса в комбинации с атропином зарегистрирована несущественная супрессия ФМАН, которая находилась в пределах от 9,7 до 22,6% ( $p > 0,05$ ), что свидетельствует о частичном восстановлении исследованного параметра. После отравления метафосом в комбинации с карбоксимом, а также с атропином в сочетании с карбоксимом показатели практически не отличались от контрольного значения.

По степени снижения ФМАН ФОС в порядке уменьшения эффекта располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Необходимо отметить, что, несмотря на отсутствие достоверности различий показателей, можно предполагать, что наибольшее снижение показателя (также как и активности лизоцима и ТКБ) на 10 сут характерно после отравления хлорофосом и метафосом, наименьшее – после отравления ДДВФ.

Наименее выраженная супрессия показателя по длительности эффекта и его интенсивности у метафоса и хлорофоса по сравнению с ДДВФ обусловлено действием метаболитов метафоса и хлорофоса (соответственно метаоксона и диметилдихлорвинилфосфата).

С целью изучения ФМАН в полном объеме (кислородзависимые системы) нами оценивались в динамике фагоцитарный показатель (число поглощенных микробных тел по отношению к общему числу клеток) и фагоцитарное число (среднее число поглощенных микроорганизмов фагоцитом), а также индуцированная зимозаном активность нейтрофилов в НСТ-тесте при интоксикации метафосом, наиболее токсичным из применявшихся ФОС.

Установлено (табл. 3.1), что под влиянием метафоса существенно снижался фагоцитарный показатель, фагоцитарное число и индекс активности нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте через 1 сут соответственно в 2,16; 2,31 и 1,53 раза, через 3 сут - в 1,70; 1,87 и 1,38 раза, а через 5 сут - в 1,43; 1,54 и 1,25 раза соответственно ( $p < 0,05$ ). На 10 сут показатели достоверно не отличались от контрольных уровней.

Таблица 3.1

Изменение фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов крыс после острого отравления метафосом ( $0,75 \text{ ЛД}_{50}$ ) в комбинации с антидотами на 1-10 сут ( $M \pm m$ )

Токсиканты		Срок наблюдения, сут			
		1	3	5	10
Контроль (22)	ФП	$28,7 \pm 0,8$			
	ФЧ	$2,10 \pm 0,20$			
	НСТ инд	$0,55 \pm 0,02$			
Метафос	ФП	$13,5 \pm 1,7^*$	$16,9 \pm 2,0^*$	$20,0 \pm 2,1^*$	$25,0 \pm 2,4$
	ФЧ	$0,91 \pm 0,18^*$	$1,12 \pm 0,19^*$	$1,36 \pm 0,20^*$	$1,90 \pm 0,23$
	НСТ инд	$0,36 \pm 0,03^*$	$0,40 \pm 0,03^*$	$0,44 \pm 0,03^*$	$0,50 \pm 0,03$
Метафос+ атропин	ФП	$9,4 \pm 0,8^*$	$16,9 \pm 2,3^*$	$20,0 \pm 2,2^*$	$26,0 \pm 2,2$
	ФЧ	$0,53 \pm 0,20^*$	$0,70 \pm 0,17^*$	$0,96 \pm 0,15^*$	$1,80 \pm 0,14$
	НСТ инд	$0,25 \pm 0,02^{**}$	$0,30 \pm 0,03^{**}$	$0,39 \pm 0,03^*$	$0,46 \pm 0,03^*$
Метафос+ карбоксим	ФП	$21,2 \pm 1,6^{**}$	$23,2 \pm 2,1^{**}$	$24,2 \pm 2,0^*$	$26,4 \pm 2,3$
	ФЧ	$1,41 \pm 0,19^{**}$	$1,45 \pm 0,20^*$	$1,50 \pm 0,17^*$	$1,92 \pm 0,19$
	НСТ инд	$0,33 \pm 0,02^{**}$	$0,40 \pm 0,03^*$	$0,46 \pm 0,02^*$	$0,50 \pm 0,04$
Метафос+ атропин + карбоксим	ФП	$19,2 \pm 1,6^{**}$	$20,1 \pm 2,0^*$	$20,5 \pm 2,1^*$	$24,8 \pm 2,4$
	ФЧ	$1,30 \pm 0,19^*$	$1,39 \pm 0,18^*$	$1,45 \pm 0,17^*$	$1,81 \pm 0,18$
	НСТ инд (иан)	$0,33 \pm 0,02^{**}$	$0,36 \pm 0,03^*$	$0,40 \pm 0,02^*$	$0,49 \pm 0,04$

Примечание: ФП, ФЧ – соответственно фагоцитарный показатель, фагоцитарное число; НСТ инд – НСТ-тест индуцированный; иан – индекс активности нейтрофилов; в скобках – число крыс; в каждой серии использовалось 7-10 животных; \* - различие с контролем достоверно  $p < 0,05$ ; \*\* - различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

Применение после интоксикации ФОС атропина приводило к усилению супрессии параметров, причем ФМАН в индуцированном НСТ-тесте достоверно уменьшалась по сравнению с показателем при интоксикации через 1-3 сут ( $p < 0,05$ ). Индуцированный НСТ-тест оставался сниженным до 10 сут.

Карбоксим после отравления метафосом увеличивал ФМАН в течение 1-10 сут. При этом существенное повышение фагоцитарного показателя, фагоцитарного числа, а также индуцированной зимозаном активности нейтрофилов в НСТ-тесте была зарегистрирована через 1 сут по сравнению с показателями при отравлении. На 3 сут карбоксим достоверно повышал по сравнению с параметрами при отравлении ФОС только фагоцитарный показатель. Параметры, которые существенно повышались под влиянием карбоксима, оставались достоверно более низкими, чем в контроле.

Комбинированное применение двух антидотов атропина и карбоксима приводило к увеличению показателей по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС в комбинации с атропином, и их уменьшению по сравнению со значениями показателей при интоксикации ФОС и использовании карбоксима.

Результаты, полученные в НСТ-тесте, свидетельствуют, что действие ТХ на ФМАН реализуется вследствие взаимодействия токсикантов и их метаболитов с НАДФ·Н, НАДФ<sup>+</sup>. Это подтверждают данные литературы, полученные при исследовании других групп ядов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Таким образом, после острого действия ФОС через 1-5 сут отмечалось снижение ФМАН с практически полным восстановлением параметров на 10 сут, за исключением индекса активности нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте. По степени снижения ФМАН (интенсивности и длительности эффекта) ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Выявлена более выраженная редукция показателя при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал супрессию ФМАН.

### Резюме

После действия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 5 сут отмечается снижение активности лизоцима сыворотки крови с практически полным восстановлением показателя на 10 сут. Установлена более выраженная супрессия показателя при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал редукцию активность лизоцима.

Острое отравление ФОС, а также комбинированное действия ФОС и атропина на 5 сут снижает активность ТКБ сыворотки крови с практически полным восстановлением параметра на 10 сут. Отмечается более выраженная

редукция активности ТКБ при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал супрессию активности ТКБ.

После острого действия метафоса через 1-5 сут отмечалось снижение ФМАН с практически полным восстановлением параметров на 10 сут, за исключением индекса активности нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте. Выявлена более выраженная редукция показателя при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС уменьшал снижение ФМАН.

Комбинированное применение двух антидотов атропина и карбоксима приводило к увеличению показателей НРО по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС в комбинации с атропином, и их уменьшению по сравнению со значениями показателей при интоксикации ФОС и использовании карбоксима.

При математической обработке непараметрическими и параметрическими статистическими методами (путем вычисления средних значений супрессии при отравлении метафосом, хлорофосом и ДДВФ) установлено, что статистически значимо ( $p < 0,05$ ) ФОС в эквилетальных дозах в порядке уменьшения факторов НРО располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Максимальная редукция параметров при эквилетальных дозах по длительности эффекта отмечается при интоксикации метафосом, а минимальная – после острого отравления ДДВФ.



## ГЛАВА 4

### ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМ СОЕДИНЕНИЯМИ В КОМБИНАЦИИ С ИХ АНТИДОТАМИ НА СИСТЕМУ ИММУНИТЕТА

#### 4.1. Оценка содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови под влиянием ФОС в комбинации с их антидотами

##### 4.1.1. Оценка содержания лимфоцитов в тимусе и селезенке

В тимусе происходит созревание и дифференцировка незрелых Т-клеток, которые мигрируют в этот орган из костного мозга. В литературе клетки, мигрирующие из костного мозга в тимус, называют также претимоцитами или лимфоцитами-прекурсорами [Мальцева Г.М., 2002; Ройт А., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Проведенные эксперименты показали (рис. 4.1), что под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ содержание лимфоцитов в тимусе на 2 сут снижалось соответственно в 1,89; 1,55 и 1,46 раза ( $p < 0,05$ ), а в селезенке - 1,99; 1,88 и 1,66 раза ( $p < 0,05$ ). Сочетание метафоса с атропином и карбоксимом уменьшало число Т-лимфоцитов в тимусе крыс на 2 сут соответственно в 1,55 и 1,45 раза ( $p < 0,05$ ), а число лимфоцитов в селезенке - в 1,89 и 1,65 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Атропин существенно снижал редукцию числа лимфоцитов в тимусе, вызванную метафосом, и оказывал противоположный эффект на содержание лимфоцитов в селезенке, усиливая редуцирующий эффект ФОС. Так, под влиянием атропина по сравнению с интоксикацией метафосом число лимфоцитов в селезенке возрастало в 1,34 раза ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения.

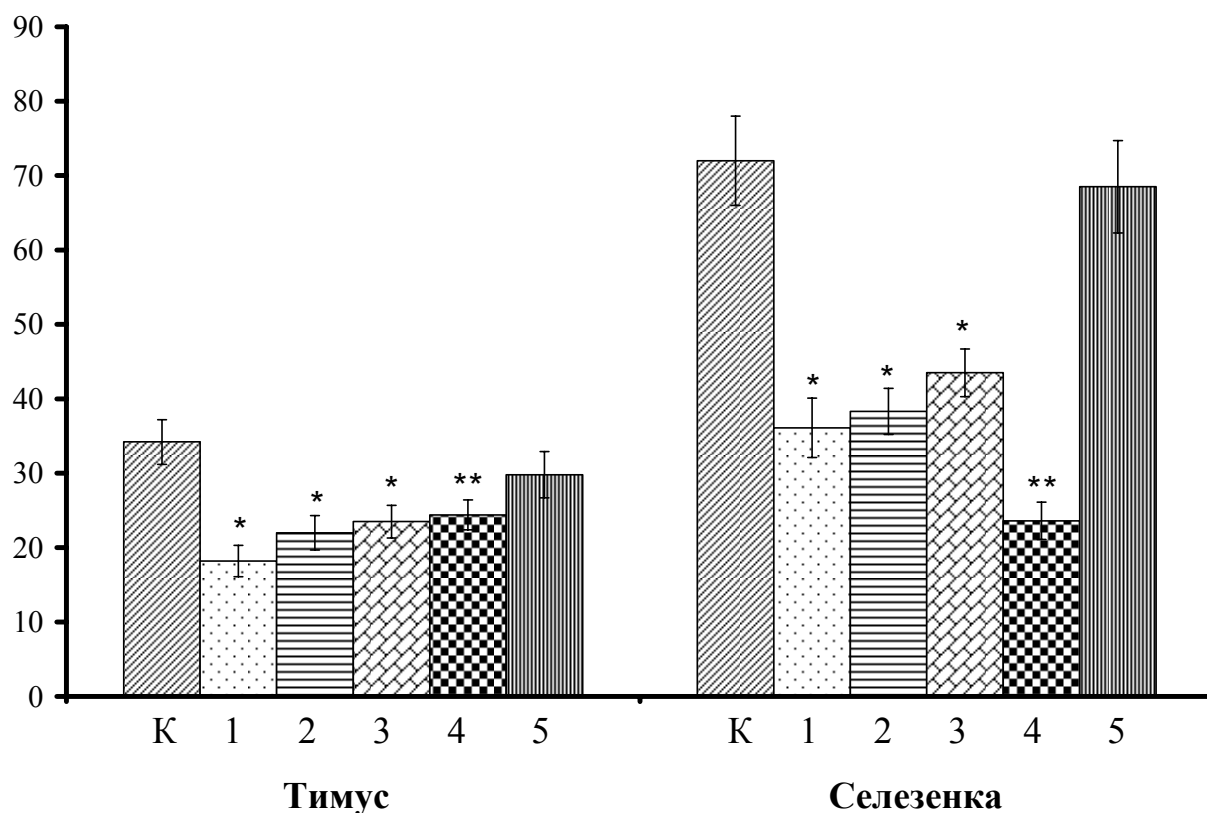


Рис. 4.1. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов в тимусе и селезенке крыс на 2 сут,  $\cdot 10^7$  ( $M \pm m$ )

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим; по оси ординат: содержание лимфоцитов в органе,  $\cdot 10^7$ ; в каждой серии использовалось 7-9 животных; \* – различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

Карбоксим восстанавливал число лимфоцитов в тимусе и селезенке практически до контрольного уровня. Результаты исследований свидетельствуют о том, что ФОС способны усиливать миграцию из тимуса и селезенки лимфоцитов в циркулирующую кровь, вероятно вследствие реализации перераспределения лимфоцитов (действия кортикостероидов и катехоламинов) [Горизонтов П.Д., 1981; Забродский П.Ф., 2002; Dhabhar F. S. et al., 1996; Pruett S., 2008].

Органы иммунной системы тесно взаимосвязаны. Известно, что тимэктомия приводит к существенному снижению содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета вследствие супрессии лимфоидного роста кроветворения [Жданов В.В. и соавт., 2002].

В селезенке холинергическая иннервация отсутствует, за исключением м-холинорецепторов, локализованных на пресинаптических мембранах  $\alpha$ -адренергических нервных окончаний [Rinner I, Schauenstein K., 1991], поэтому, атропин не только не способен снизить миграцию лимфоцитов из нее, но даже усиливает этот процесс вследствие относительного увеличения активности симпатического отдела вегетативной нервной системы. Известно, что норадреналин и адреналин увеличивают миграцию лимфоцитов из селезенки, активируя ее  $\alpha$ -адренорецепторы [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

После действия ФОС, а также их комбинаций с антидотами на 10 сут число лимфоцитов в тимусе и селезенке восстанавливалось до контрольных значений (табл. 4.1).

Таблица 4.1

Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов в тимусе и селезенке крыс на 10 сут,  $\cdot 10^7$  (M $\pm$ m)

Серии опытов	Число Т-лимфоцитов в тимусе	Число лимфоцитов в селезенке
Контроль	34,2 $\pm$ 3,0	72,0 $\pm$ 6,0
Метафос	30,1 $\pm$ 3,1	75,1 $\pm$ 6,3
Хлорофос	31,5 $\pm$ 3,2	73,2 $\pm$ 6,2
ДДВФ	33,7 $\pm$ 3,5	76,6 $\pm$ 6,1
Метафос+атропин	35,0 $\pm$ 3,3	74,8 $\pm$ 6,7
Метафос+ карбоксим	37,4 $\pm$ 3,6	70,4 $\pm$ 6,5

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 9 крыс.

Таким образом, после острого воздействия ФОС в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> зарегистрировано снижение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке на 2 сут с практически полным восстановлением показателей на 10 сут. По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Атропин существенно снижал редукцию числа лимфоцитов в тимусе, вызванную метафосом, и оказывал противоположный эффект на содержание лимфоцитов в селезенке,

усиливая редуцирующий эффект ФОС. Карбоксим восстанавливал число лимфоцитов в тимусе и селезенке практически до контрольного уровня.

#### 4.1.3. Содержание лимфоцитов в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови

В результате проведенных опытов нами показано (рис. 4.2), что под

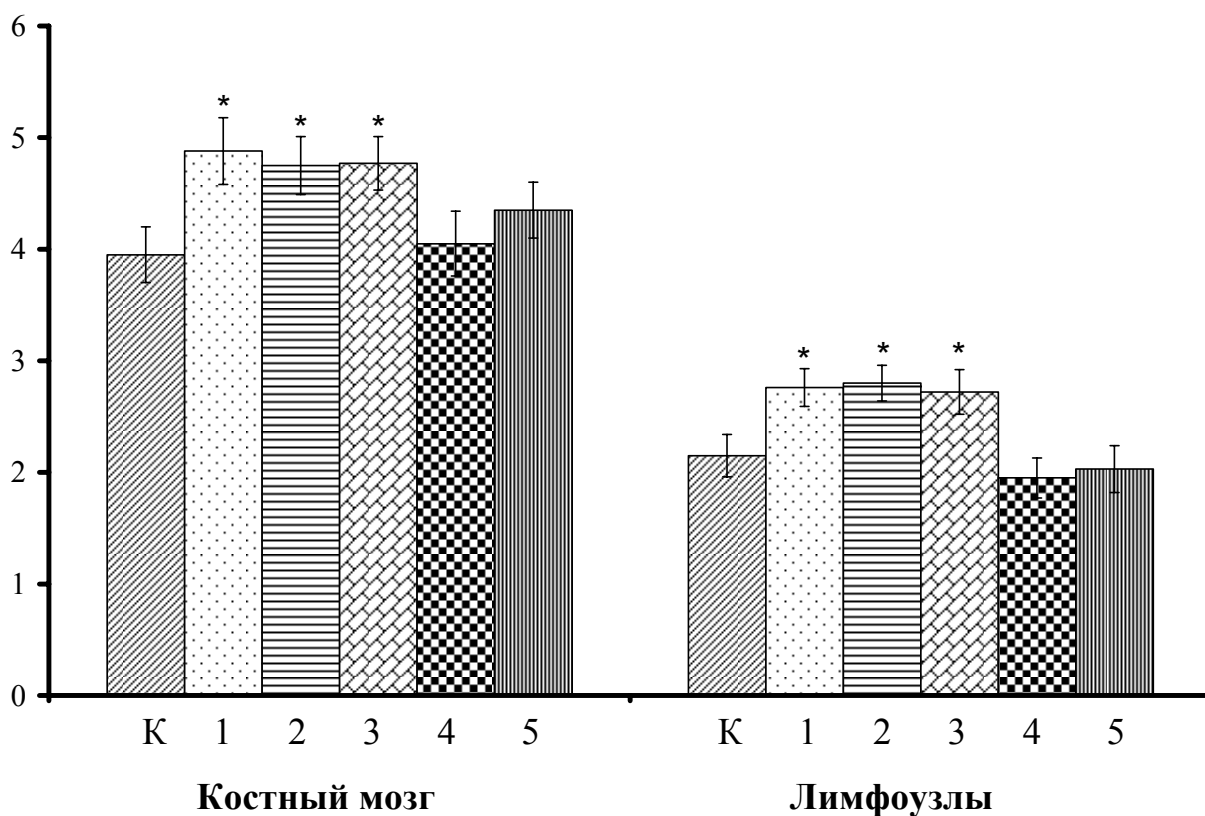


Рис. 4.2. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов ( $\cdot 10^7$ ) в костном мозге и лимфоузлах у крыс на 2 сут ( $M \pm m$ )

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим; по оси ординат: содержание лимфоцитов в органе,  $\cdot 10^7$ ; в каждой серии использовалось 7-9 животных; \* – различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ .

влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ число лимфоцитов в костном мозге крыс на 2 сут увеличивалось соответственно в 1,24; 1,20 и 1,21 раза ( $p < 0,05$ ), а число лимфоцитов в лимфоузлах – в 1,28; 1,30 и 1,27 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Существенных различий между эффектами

различных ФОС выявлено не было. Атропин и карбоксим полностью восстанавливали число Т-лимфоцитов в костном мозге и лимфоузлах до контрольного уровня.

На 10 сут содержание лимфоцитов в костном мозге и лимфоузлах под влиянием ФОС, а также их комбинации с атропином и карбоксимом восстанавливалось до контрольного уровня (табл. 4.2).

Таблица 4.2

Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов ( $\cdot 10^7$ ) в костном мозге и лимфоузлах у крыс на 10 сут ( $M \pm m$ )

Серии опытов	Костный мозг	Лимфоузлы
Контроль	3,95 $\pm$ 0,25	2,15 $\pm$ 0,19
Метафос	3,62 $\pm$ 0,29	1,98 $\pm$ 0,17
Хлорофос	3,53 $\pm$ 0,30	2,04 $\pm$ 0,19
ДДВФ	3,31 $\pm$ 0,31	1,88 $\pm$ 0,20
Метафос+атропин	3,40 $\pm$ 0,33	2,17 $\pm$ 0,18
Метафос+ карбоксим	3,80 $\pm$ 0,32	1,93 $\pm$ 0,21

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 8 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ .

После острой интоксикации ФОС отмечалось увеличение лимфоцитов в циркулирующей крови на 2 сут (табл. 4.3).

Применение антидотных средств атропина и карбоксима после отравления ФОС полностью восстанавливало содержание лимфоцитов в крови. На 10 сут содержание лимфоцитов в крови влиянием ФОС, а также их комбинации с атропином и карбоксимом восстанавливалось до контрольного уровня.

Вполне естественно, что антидоты ФОС, блокируя м-холинорецепторы тимуса, а также, снижая эффект интоксикации путем реактивации холинэстеразы, приводят к восстановлению содержания лимфоцитов в лимфоидных органах.

Таблица 4.3

Влияние острого отравления ФОС ( $0,75 \text{ DL}_{50}$ ) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов ( $\cdot 10^9/\text{л}$ ) в циркулирующей крови у крыс ( $M \pm m$ )

Серии опытов	Время после интоксикации, сут	
	2	10
Контроль	$8,5 \pm 0,2$	
Метафос	$9,2 \pm 0,2^*$	$8,2 \pm 0,3$
Хлорофос	$9,8 \pm 0,3^*$	$7,8 \pm 0,4$
ДДВФ	$9,5 \pm 0,3^*$	$8,7 \pm 0,3$
Метафос+атропин	$8,4 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,4$
Метафос+ карбоксим	$8,7 \pm 0,4$	$9,0 \pm 0,5$

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 12 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ .

Полученные данные, свидетельствующие о восстановлении количества лимфоцитов в органах системы иммунитета средствами специфической терапии, во-первых, не могут служить основанием для заключения о восстановлении функции лимфоцитов при отравлении ФОС антидотами, а во-вторых, результаты исследований позволяют полагать, что кроме антидотов для нормализации исследованных показателей в использовании иных медикаментозных средств нет необходимости.

Таким образом, на 2 сут после действия ФОС вследствие перераспределения лимфоцитов между органами иммунной системы отмечалось их увеличение в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови. На 10 сут показатели после воздействия ФОС существенно не отличались от контрольного уровня. Антидотные средства ФОС атропин и карбоксим практически полностью восстанавливали содержание лимфоцитов в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови.

## **4.2. Воздействие острого отравления фосфорорганическими соединениями в комбинации с их антидотами на клеточные иммунные реакции**

### **4.2.1. Изучение функции Th1-лимфоцитов**

Оценка функции Th1-лимфоцитов по формированию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) после воздействия ФОС, а также их комбинации с атропином и карбоксимом в модели, не связанной с переносом клеток, позволяет установить их действие на первичный клеточный иммунный ответ, в частности, на функцию Th1-клеток и продукцию ими ИЛ-12,  $\gamma$ -интерферона,  $\beta$ -фактора некроза опухоли и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) лимфоцитов, а также на участвующие в реализации гиперчувствительности IV типа Т-клетки памяти и макрофагов [Ройт А. и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993]. Исследование формирования ГЗТ под влиянием ФОС в комбинации с антидотами в модели с переносом сенсibilизированных лимфоцитов от крыс-доноров сингенным реципиентам позволяет оценить вторичный клеточный иммунный ответ.

В результате экспериментов на крысах популяции Вистар нами установлено (рис. 4.3), что под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ происходило снижение реакции ГЗТ (без переноса клеток) соответственно в 2,13; 1,93 и 1,66 раза ( $p < 0,05$ ). Применение антидота ФОС атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на функцию Th1-клеток, а карбоксима – уменьшало ( $p < 0,05$ ). При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Так, под влиянием атропина по сравнению с контролем и показателем при интоксикации метафосом реакция ГЗТ снижалась соответственно в 3,38 и 1,59 раза ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения, а карбоксим увеличивал по сравнению с параметром при отравлении формирование ГЗТ в 1,61 раза ( $p < 0,05$ ). Комбинация

антидотов атропина и карбоксима частично восстанавливала реакцию ГЗТ, которая оставалась ниже контрольного значения.

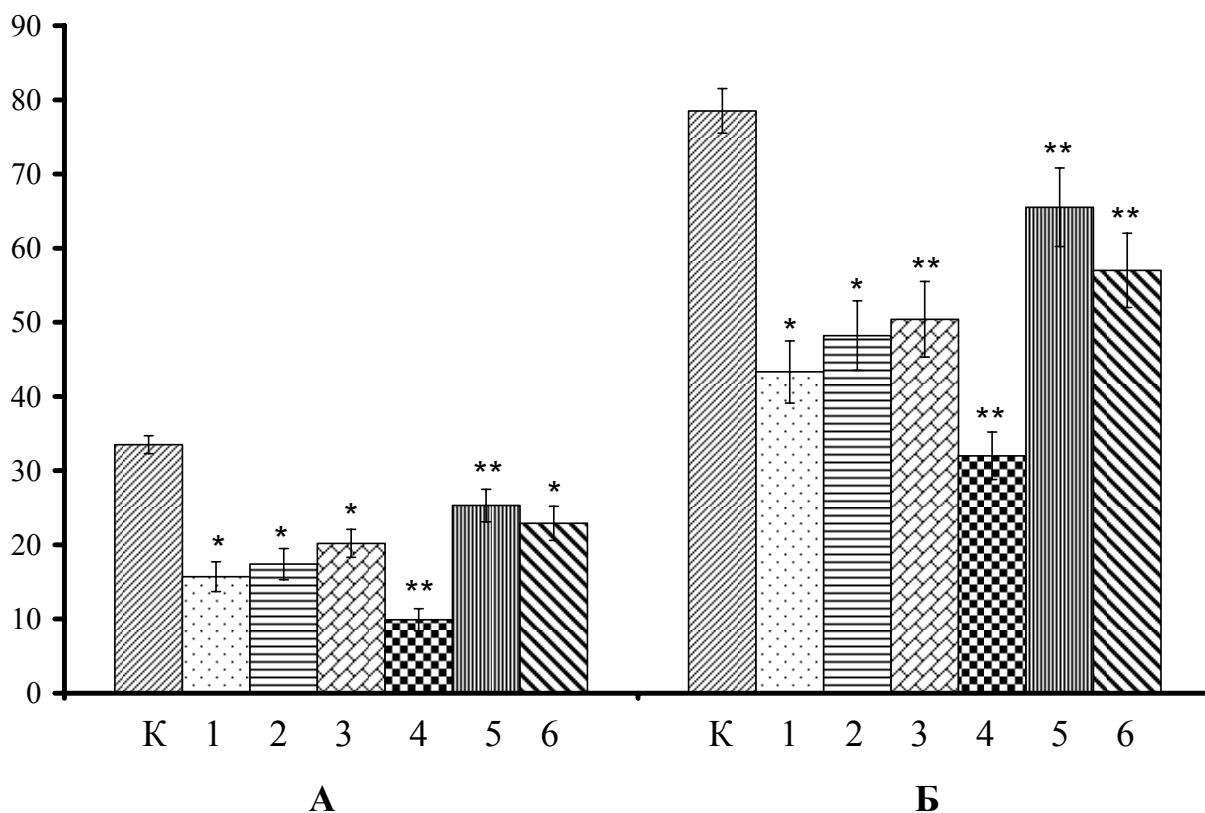


Рис. 4.3. Влияние острого отравления ФОС ( $0,75 DL_{50}$ ) в комбинации с антидотами на функцию Th1-лимфоцитов крыс по формированию гиперчувствительности замедленного типа (прирост массы задней стопы, %)  $[M \pm m]$

По оси абсцисс: А, Б – реакция без переноса и с переносом клеток соответственно; 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: прирост массы задней стопы, %, К – контроль ( $n=21$ ); в каждой серии использовалось 7-8 животных; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

Аналогичные результаты получены при использовании модели, связанной с переносом спленоцитов крысам-реципиентам после иммунизации крыс-доноров (реакция ГЗТ отражала формирование вторичного клеточного иммунного ответа). Полученные нами данные показали, что данные ФОС снижали реакцию ГЗТ соответственно в 1,81; 1,63 и 1,56 раза ( $p < 0,05$ ), метафос в комбинации с атропином в 2,45 раза



( $p < 0,05$ ). Карбоксим в комбинации с ФОС увеличивал реакции по сравнению с параметром при отравлении в 1,51 раза ( $p < 0,05$ ). Комбинация антидотов атропина и карбоксима частично восстанавливала формирование ГЗТ. При этом реакция оставалась ниже контрольного уровня, также как при изолированном использовании атропина и карбоксима.

По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ.

Следует отметить, что кроме Th1-лимфоцитов в реакции ГЗТ, ФОС, вероятно, поражают кератиноциты, клетки Лангерганса кожи, Т-клеток памяти и макрофаги [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М и соавт., 2002; Kimber I., 1996].

Таким образом, после воздействия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина зарегистрирована редукция формирования ГЗТ, характеризующей, как первичный, так и вторичный иммунный ответ, и свидетельствующей о поражении Th1-клеток. По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Отмечается более выраженное снижение реакции ГЗТ при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал реакцию ГЗТ (функцию Th1-клеток).

#### **4.2.2. Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности**

Реализацию антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) обеспечивают клетки-киллеры - К-клетки (кроме миелоидных). Доказано, что эти клетки идентичны естественным клеткам-киллерам (ЕКК), использующим для усиления реакции антитела (IgG) [Ройт А. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lanier L. L., 2003; Hansasuta P. et al., 2004; Lee J. C., et al., 2004; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006]. Естественные клетки-киллеры (ЕКК), активированные

связанными с клеткой-мишенью (например, клеткой, пораженной вирусом) антителами, уничтожают ее. При этом антитела (IgG) привлекают своим Fc-хвостом ЕКК, имеющие для этого соответствующий рецептор Fc $\gamma$ RIII. Возникает комплекс клетка-мишень – антитело – ЕКК, в котором ЕКК реализует свою киллерную функцию в отношении клетки-мишени [Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Хаитов Р. М., 2006; Garrity D. et al., 2005].

Помимо ЕКК в эту систему АЗКЦ входят моноциты, полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ) – базофилы, эозинофилы, сегментоядерные лейкоциты, а также другие фагоцитирующие и нефагоцитирующие миелоидные клетки [Ройт А. и соавт., 2000; French A. R., Yokoyma W. M., 2003]. В использованной нами модели эксперимента исследовалась вся система АЗКЦ: ЕКК (большие зернистые лимфоциты) и ПЯЛ в индуктивном (действие ФОС в комбинации с антитодами практически одновременно с иммунизацией ЭБ) и продуктивном периодах иммуногенеза (действие факторов и их сочетания на 3 сут после иммунизации).

При действии ФОС в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> в комбинации с антитодами на АЗКЦ селезенки крыс при иммунизации ЭБ одновременно с интоксикацией и на 3 сут после нее (индуктивный и продуктивный периоды иммуногенеза) происходило статистически значимое уменьшение исследованного показателя при остром отравлении всеми исследованными ФОС ( $p < 0,05$ ) на 5 сут после иммунизации (рис. 4.4).

Так, под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ в индуктивный период иммуногенеза происходило снижение АЗКЦ соответственно в 1,76; 1,69 и 1,64 раза ( $p < 0,05$ ). Применение антитода ФОС атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на АЗКЦ ( $p < 0,05$ ), а карбоксима – несущественно уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом АЗКЦ снижалась соответственно в 3,27 и 1,87 раза ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения, а карбоксим увеличивал по сравнению с параметром при

отравлении АЗКЦ в 1,27 раза ( $p>0,05$ ). Комбинация антидотов атропина и карбоксима не восстанавливала АЗКЦ, ее эффект был выше чем при действии ФОС и атропина и ниже, чем при действии ФОС и карбоксима..

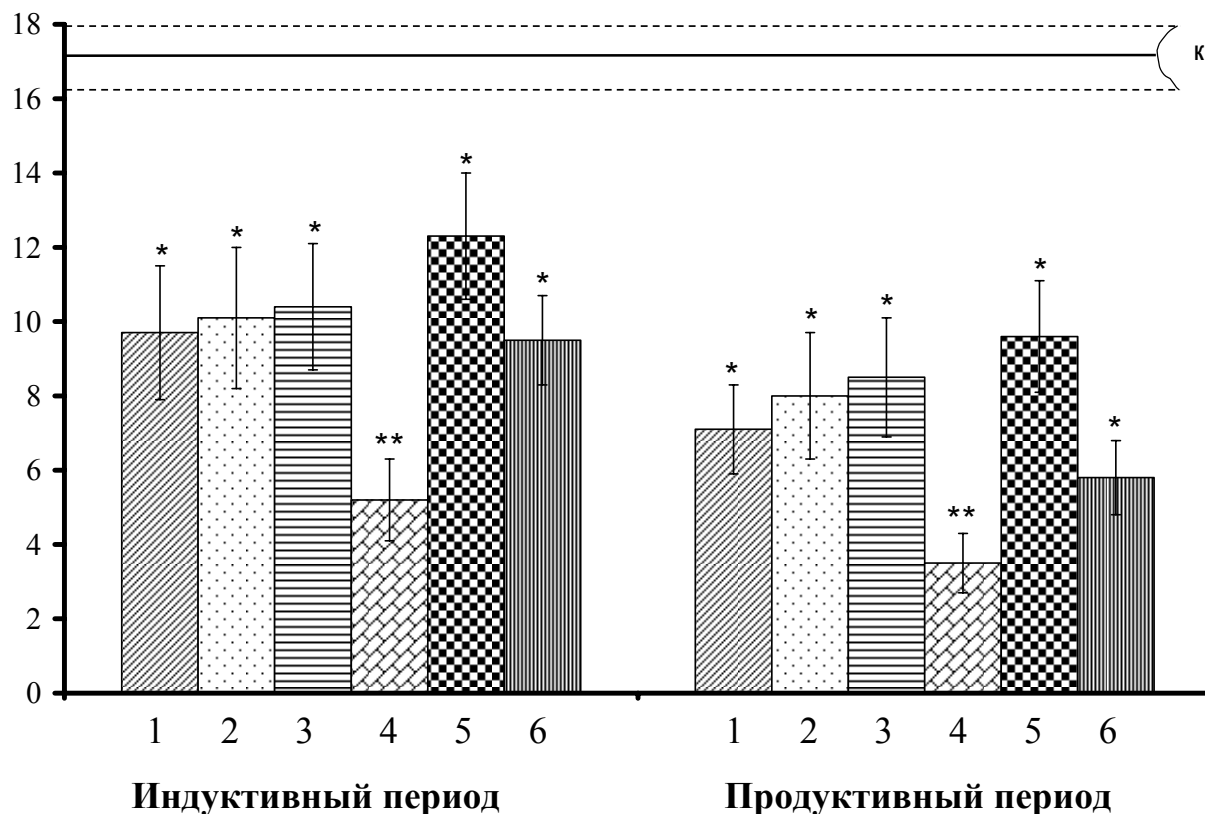


Рис. 4.4. Влияние острого отравления ФОС ( $0,75 DL_{50}$ ) в комбинации с антидотами на антителозависимую клеточную цитотоксичность спленоцитов крыс через 5 сут, % ( $M \pm m$ )

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: антителозависимая клеточная цитотоксичность, %, К – контроль ( $n=21$ ); в каждой серии использовалось 7-10 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p<0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p<0,05$ .

Сравнение характера супрессии АЗКЦ в индуктивный и продуктивный периоды иммуногенеза показывает нарастание эффекта редукции при введении ФОС в комбинации с антидотами в продуктивный период формирования иммунного ответа. Существенных отличий в действии ФОС в

комбинации с антитодами в индуктивной и продуктивной фазах иммуногенеза не выявлено.

По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ, однако существенных различий в их действии на АЗКЦ не выявлено.

Вероятно ФОС снижают АЗКЦ вследствие нарушения связывания IgG (FcγR) с Fc рецепторами. Эти рецепторы связывают К-клетки с IgG-покрытыми клетками-мишенями, которые К-клетки способны уничтожить в «нормальных» условиях (без действия ФОС) [Delves P.J., Roitt I.M., 2000; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Таким образом, после воздействия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина зарегистрирована редукция АЗКЦ, как в индуктивный так продуктивный периоды иммуногенеза, что свидетельствует о поражении К-клеток. Отмечается более выраженное снижение АЗКЦ при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал АЗКЦ.

#### **4.2.3. Оценка активности ЕКК селезенки**

К ЕКК, открытым в 1976 году, относятся клетки, не имеющие антигенных маркеров Т- и В-лимфоцитов (так называемые, О-клетки). Предполагают, что ЕКК происходят из предшественников Т-лимфоцитов [Ройт А. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Поверхность ЕКК имеет маркерные молекулы CD16, CD56, CD57 и CD94 (преимущественно ЕКК представлены клетками с маркерами CD16 и CD56) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lanier L. L., 2003].

При контакте с клетками опухоли и клетками, пораженными вирусами

или паразитами, ксеногенными клетками ЕКК способны уничтожать их. ЕКК не обладают способностью к фагоцитозу [Ройт А. и соавт., 2000; Lanier L. L., 2003; Hansasuta P. et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Цитолиз клетки-мишени осуществляется проникновением ферментов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (порообразование перфорином) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Nogueira N., 1984; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; Lee J. C., et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Кроме того, ЕКК способны обеспечивать уничтожение чужеродной клетки путем реализации "дыхательного взрыва" (поражение активными радикалами кислорода, гидроксильного радикала и т.п.), а также индукцией апоптоза. Активность ЕКК повышается интерферонами, интерлейкинами (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13) [Шуршалина А.В. и соавт., 2001; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986].

При контакте с клетками опухоли, клетками, пораженными вирусами или паразитами, ксеногенными клетками ЕКК способны уничтожать их без предварительного контакта с антигенами, находящимися на их поверхности. Они узнают определенные структуры высокомолекулярных гликопротеидов, которые экспрессируются на мембране инфицированных вирусом клеток. [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

На ЕКК локализованы киллер-активизирующие рецепторы, которые распознают множество различных молекул на поверхности всех ядерных клеток. На ЕКК находятся и киллер-ингибирующие рецепторы, распознают молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, которые также обычно присутствуют на всех ядерных клетках. Если активизирующие ЕКК «включаются», запускается команда, реализующая «киллинг» (уничтожение чужеродной клетки для ЕКК). Этот сигнал обычно отменяется

запрещающим сигналом, который посылает ингибирующий рецептор ЕКК при распознавании им молекулы ГКГС класса I. Эта система используется ЕКК для того, чтобы распознать нормальные клетки и клетки, испытывающие на своей поверхности недостаток молекул главного комплекса гистосовместимости класса I. Киллер-активизирующие рецепторы распознают множество молекул, представленных на поверхности нормальных ядерных клеток, и, в отсутствие подавляющего сигнала от киллер-ингибирующих рецепторов киллер-активирующие рецепторы реализуют сигнал ЕКК атаковать и уничтожить другую клетку. Цитотоксические гранулы ЕКК, которые содержат перфорин и гранзимы, поляризуются на границе с клеткой-мишенью и затем проникают в клетку-мишень [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lee J. C., et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

При изучении влияния на ЕКК различных ФОС (а также наиболее токсичного метафоса в комбинации с антидотами) нами установлено (рис. 4.5; табл. 4.4), что происходило статистически значимое уменьшение активности ЕКК неинбредных белых крыс ( $p < 0,05$ ) на 2 и 5 сут после интоксикации.

Так, под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ на 2 сут происходило снижение активности ЕКК соответственно в 2,39; 2,07 и 1,73 раза ( $p < 0,05$ ). Применение антидота ФОС атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на активность ЕКК, а карбоксима – существенно уменьшало ( $p < 0,05$ ). При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом активность ЕКК снижалась соответственно в 4,08 и 1,71 раза ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения, а карбоксим увеличивал по сравнению с параметром при отравлении активность ЕКК в 1,66 раза ( $p < 0,05$ ).

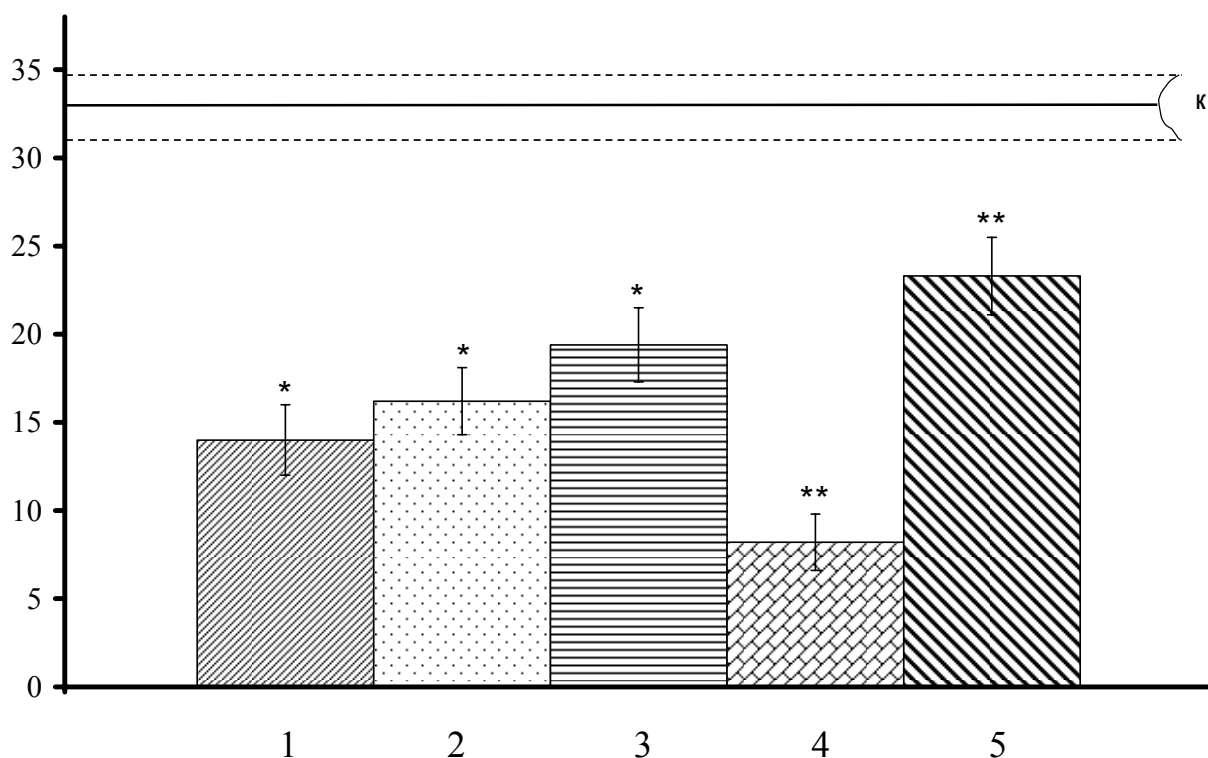


Рис. 4.5. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотными средствами на активность естественных клеток-киллеров крыс через 2 сут после интоксикации, % (M±m)

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: активность естественных клеток-киллеров, %, К – контроль (n=25); в каждой серии использовалось 7-9 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

Аналогичные но менее выраженные изменения активности ЕКК, были зарегистрированы на 5 сут. На 10 сут происходило полное восстановление параметра как при отравлении ФОС так и при их комбинированном применении с антидотами.

По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ.

Таким образом, после воздействия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина зарегистрирована супрессия активности ЕКК на 2 и 5 сут с восстановлением показателя на 10 сут после интоксикации. По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в

Таблица 4.4

Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотными средствами на активность естественных клеток-киллеров крыс, % (M±m)

Серии опытов	Время после интоксикации, сут		
	2	5	10
Контроль	33,5±1,3 (25)		
Метафос	14,0±2,0*	15,7±2,3*	28,5±2,5
Хлорофос	16,2±1,9*	17,0±1,8*	29,0±2,4
ДДВФ	19,4±2,1*	18,1±2,0*	30,9±2,7
Метафос+атропин	8,2±1,6**	10,8±2,2**	28,8±2,6
Метафос+карбоксим	23,3±2,2**	25,1±2,5**	32,4±2,8

Примечание: в скобках – число животных; в каждой серии использовалось от 7 до 9 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* - различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Отмечается более выраженное снижение активности ЕКК при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал активность ЕКК.

#### 4.3. Действие фосфорорганических соединений в комбинации с их антидотами на гуморальные иммунные реакции

##### 4.3.1. Исследование Т-зависимой гуморальной иммунной реакции

В опытах на белых крысах оценивали действие острого отравления ФОС в комбинации с антидотными средствами на гуморальный иммунный ответ к тимусзависимому антигену эритроцитам барана (ЭБ) по числу антителообразующих клеток в селезенке через 5 сут при иммунизации ЭБ. Иммунизация проводилась одновременно с введением ФОС в комбинации с антидотами (оценка иммунной реакции в индуктивный период



антителогенеза) на 3 сут после интоксикации (оценка антителообразования в продуктивный период антителогенеза). На 5 сут после введения ЭБ отмечается пик иммунного ответа, связанный с синтезом IgM [Ройт А. и соавт., 2000; Tumang J.R. et al., 1996; Delves P.J., Roitt I.M., 2000]. Принимая во внимание то, что Th1-лимфоциты участвуют не только в реализации клеточного иммунного ответа, но и в синтезе IgM [Pfeifer C. et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993], использованный тест дает представление о функциональной активности как В-лимфоцитов (плазмоцитов), так и о Th1 - лимфоцитов [Ройт А. и соавт., 2000; Abbas A.K. et al., 1996; Fleisher T.A., Oliveira J.B., 2004; Maekawa Y., Yasutomo K., 2005].

Нами показано (рис. 4.6), что у белых крыс после острой интоксикации метафосом, хлорофосом и ДДВФ на 5 сут после иммунизации в индуктивный период иммуногенеза происходит существенное уменьшение числа АОК соответственно в 2,33; 1,87 и 1,67 раза ( $p < 0,05$ ). По степени снижения числа АОК, синтезирующих IgM в селезенке, ФОС при их действии в индуктивной фазе иммуногенеза располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ.

Применение антитоксина ФОС атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана ( $p < 0,05$ ), а карбоксима – существенно уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом число антителообразующих клеток к эритроцитам барана снижалась соответственно в 3,39 и 1,45 раза ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения. Карбоксим и комбинация антитоксинов атропина и карбоксима увеличивали число антителообразующих клеток к эритроцитам барана по сравнению с показателем при интоксикации метафосом соответственно в 1,68 и 1,38 раза ( $p < 0,05$ ). При этом параметр оставался ниже контрольного уровня ( $p < 0,05$ ).

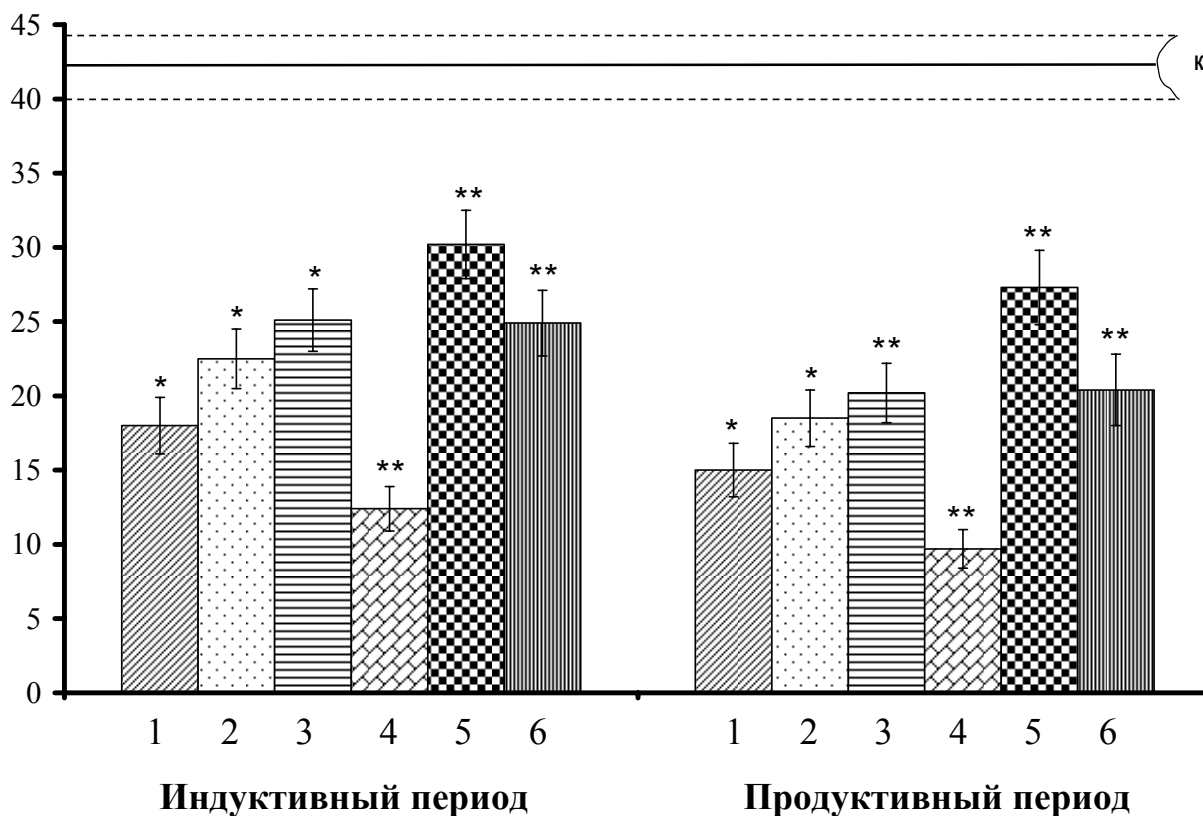


Рис. 4.6. Влияние острого отравления ФОС ( $0,75 \text{ DL}_{50}$ ) в комбинации с антидотными средствами на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана ( $\cdot 10^3$ ), синтезирующим IgM, в селезенке белых крыс на 5 сут ( $M \pm m$ )

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: число антителообразующих клеток к эритроцитам барана,  $\cdot 10^3$ , К – контроль ( $n=25$ ); в каждой серии использовалось 6-7 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

Все применявшиеся ФОС – метафос, хлорофос, ДДВФ – при их введении в продуктивный период антителогенеза вызывали более выраженное снижение АОК, чем продуктивный период иммуногенеза соответственно в 2,80; 2,27 и 2,08 раза ( $p < 0,05$ ). Антидоты и их комбинация влияли на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана также, как и в индуктивной фазе иммуногенеза.

Данные наших исследований свидетельствуют о том, что под влиянием ФОС в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом происходит более выраженная редукция функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих продукцию иммуноглобулинов М, и В-клеток

(плазмоцитов), синтезирующих IgM [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М., 2002; Pfeifer C. et al., 1991; Ellmeier W., 1999; Xiao W. et al. 2000; Grandmont M.J. et al., 2003; Woof J.M., Kerr M.A., 2004]. Это может быть вызвано большим поражающим эффектом ФОС в отношении синтеза IgM В-клетками (плазмócитами) спленоцитов, нарушением процессов дифференцировки В-лимфоцитов, перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета в период максимальной антителопродукции (3-5 сут после иммунизации), а также ингибирующим синтез антител действием кортикостероидов [Claman H.N., 1993; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], концентрация которых в крови при действии различных токсикантов увеличивается (стресс-реакция) [Селье Г., 1972; Забродский П.Ф., 2002; Pruett S., 2008].

Снижение Т-зависимой антителопродукции под влиянием ФОС, вероятно, обусловлено редукцией синтеза ряда лимфокинов, активирующих В-клетки [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Атропин усиливает супрессию антителобразования под влиянием ФОС, вероятно, вследствие блокады м-холинореактивных структур лимфоцитов в сочетании с ингибированием эстераз Т-клеток [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; MacManus J.P. et al., 1975;]. Не исключено, что данный антидот усиливает редукцию синтеза цитокинов Th1-лимфоцитами. Вполне естественно, что карбоксим, реактивируя ацетилхолинэстеразу Т-клеток, восстанавливает их активирующее действие на В-клетки, вероятно, повышая продукцию ими  $\gamma$ -интерферона [Ройт А. и соавт., 2000].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации ФОС происходит снижение Т-зависимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителогенеза. По степени редукции синтеза IgM ФОС располагались в порядке снижения эффекта в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на

гуморальный иммунный ответ, а карбоксима и его комбинации с атропином – снижало. При этом показатель Т-зависимого антителообразования оставались ниже контрольных значений.

#### **4.3.2. Оценка влияния острого отравления ФОС в комбинации с антидотными средствами на число антителообразующих клеток в селезенке, синтезирующих IgG**

Антителообразование на 14 сут после иммунизации ЭБ отражает синтез преимущественно IgG (преимущественно IgG1). Концентрация IgM в этот период практически не отличается от контрольного уровня [Ройт А. и соавт., 2000; Tumang J.R. et al., 1996; Delves P.J., Roitt I.M., 2000].

Исследование числа антителообразующих клеток в селезенке мышей, синтезирующих IgG, на 14 сут после иммунизации и после введения ФОС в комбинации с антидотами на 9 сут показало (рис. 4.7), что метафос, хлорофос, ДДВФ снижают исследованный показатель соответственно в 1,57; 1,42 и 1,27 раза ( $p < 0,05$ ).

По степени снижения числа АОК, синтезирующих IgG в селезенке, ФОС располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ.

Использование атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана ( $p < 0,05$ ), а карбоксима – существенно уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом число антителообразующих клеток к эритроцитам барана снижалась соответственно в 2,22 и 1,41 раза ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения. Карбоксим увеличивал число антителообразующих клеток к эритроцитам барана, синтезирующих IgG, по сравнению с показателем при интоксикации метафосом 1,22 раза ( $p < 0,05$ ). При этом параметр оставался ниже контрольного уровня ( $p < 0,05$ ).

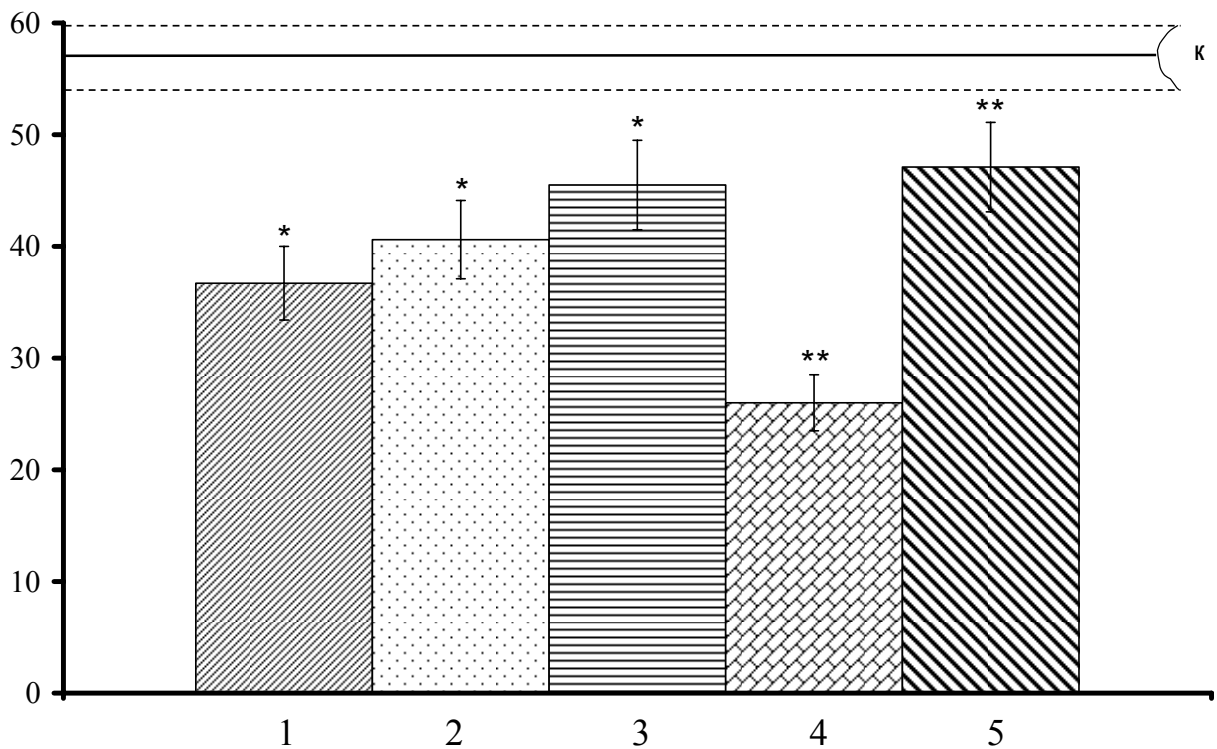


Рис. 4.7. Действие острого отравления токсичными химикатами (1,0  $DL_{50}$ ) в комбинации с антидотными средствами на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана ( $\cdot 10^3$ ), синтезирующим IgG, в селезенке белых мышей на 14 сут ( $M \pm m$ )

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, по оси ординат: число антителообразующих клеток к эритроцитам барана,  $\cdot 10^3$ , К – контроль; в каждой серии использовалось 6-7 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

Можно предположить, что атропин усиливает супрессию синтеза IgG под влиянием ФОС, вероятно, вследствие блокады м-холинореактивных структур лимфоцитов в сочетании с ингибированием эстераз Th2-клеток [MacManus J.P. et al., 1975; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Не исключено, что атропин усиливает редукцию синтеза цитокинов Th2-лимфоцитами. Вполне естественно, что карбоксим, реактивируя ацетилхолинэстеразу Th2-клеток, восстанавливает их активирующее действие на В-клетки, вероятно, повышая продукцию ими ИЛ-4 [Ройт А. и соавт., 2000].

Таким образом, под влиянием ФОС происходит снижение Т-зависимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgG). По степени редукции синтеза IgG ФОС располагались в порядке снижения эффекта в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на синтеза IgG, а карбоксима и его комбинации с атропином – снижало. При этом число АОК в селезенке, отражающее синтез IgG, оставалось ниже контрольных значений.

#### **4.3.3. Изучение тимуснезависимого антителообразования**

Известно, что Т-независимая антителопродукция осуществляется В-клетками без участия Т-хелперов (в данном случае Th1-лимфоцитов) [Ройт А. и соавт., 2000; Hausmann S., Wucherpfennig K.W., 1997;]. При гуморальном иммунном ответе на Т-независимый антиген синтезируются только IgM (пик иммунного ответа составляет 5 сут) [Ройт А. И соавт., 2000, Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Экспериментально установлено (рис. 4.8), что у белых крыс после острой интоксикации метафосом, хлорофосом и ДДВФ на 5 сут после иммунизации в индуктивный период иммуногенеза происходит существенное уменьшение числа АОК, синтезирующих IgM к Vi-антигену, соответственно в 1,46; 1,33 и 1,61 раза ( $p < 0,05$ ). По степени снижения числа АОК, синтезирующих IgM в селезенке, ФОС при их действии в индуктивной фазе иммуногенеза существенно не отличались. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на число антителообразующих клеток к Vi-антигену ( $p < 0,05$ ), а карбоксима – статистически значимо уменьшало ( $p < 0,05$ ). При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом число антителообразующих клеток к Vi-антигену снижалась соответственно в 2,34

и 1,44 раза ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения. Карбоксим и комбинация антидотов атропина и карбоксима увеличивали число антителообразующих клеток к Vi-антигену по сравнению с показателем при интоксикации метафосом соответственно в 1,31 ( $p < 0,05$ ) и 1,07 раза. При этом параметр оставался ниже контрольного уровня ( $p < 0,05$ ).

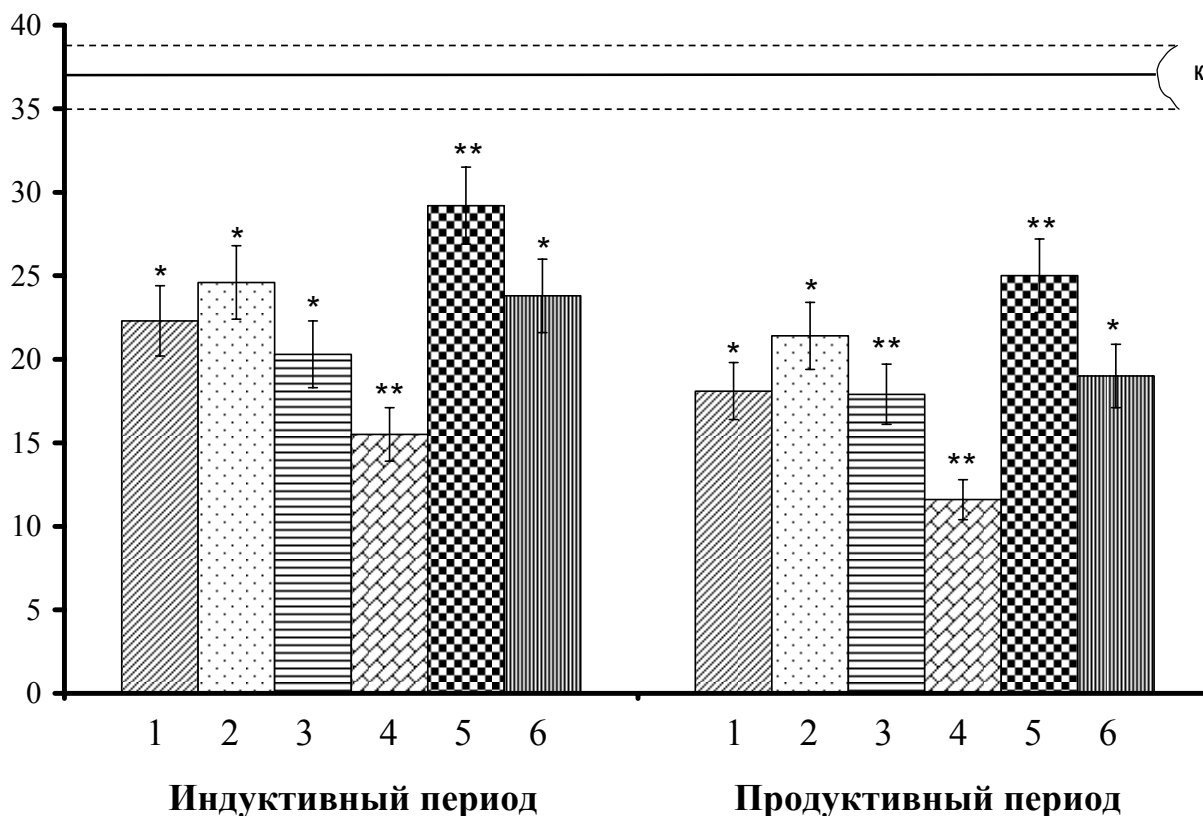


Рис. 4.8. Влияние острого отравления ФОС ( $0,75 \text{ DL}_{50}$ ) в комбинации с антидотными средствами на число антителообразующих клеток к Vi-Ag ( $\cdot 10^3$ ), синтезирующим IgM, в селезенке белых крыс на 5 сут ( $M \pm m$ )

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: число антителообразующих клеток к Vi-Ag,  $\cdot 10^3$ , К – контроль ( $n=25$ ); в каждой серии использовалось 6-7 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

Метафос, хлорофос и ДДВФ при их введении в продуктивный период антителогенеза вызывали более выраженное снижение АОК, чем в продуктивный период иммуногенеза соответственно в 2,00; 1,69 и 2,02 раза

( $p < 0,05$ ). Антитоды и их комбинация влияла на число антителообразующих клеток к Vi-антигену так же, как и в индуктивной фазе иммуногенеза.

Снижение угнетения гуморального иммунного ответа под влиянием карбоксима связано с ослаблением токсического эффекта ФОС и возможно, восстановлением функции эстераз макрофагов, продуцирующих ИЛ-1, необходимый для синтеза плазмодитами IgM в Т-независимом антителообразовании [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Эффект атропина, возможно, связан с устранением активирующего влияния ацетилхолина на В-лимфоциты (в определенном диапазоне концентраций), а также с блокадой м-холинорецепторов В-лимфоцитов (плазмодитов). [Адо А.Д. и соавт., 1983, 1995; MacManus J.P. et al., 1975; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Maslinski W. et al., 1983, 1987].

Менее выраженное снижение Т-независимого антителообразования при действии ФОС по сравнению с Т-зависимой антителопродукцией (см. разд. 4.3.1.), вероятно, обусловлено возможным активирующим действием на В-лимфоциты ацетилхолина [Адо А.Д. и соавт., 1995] и отсутствием эффектов, связанных с инактивацией эстераз Т-клеток [Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977], поскольку Т-лимфоциты не участвуют в тимуснезависимой антителопродукции.

Таким образом, под влиянием острой интоксикации ФОС происходит снижение тимуснезависимого антителообразования (числа АОК к Vi-антигену в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителообразования. По степени снижения синтеза IgM к Vi-антигену применявшиеся ФОС существенно не отличались. Применение атропина увеличивало редуцирующее воздействие ФОС на гуморальный иммунный ответ, а карбоксима— снижало. При этом показатель Т-зависимого антителообразования оставались ниже контрольного уровня.



## Резюме

Подводя итог результатам, изложенным в данной главе, можно заключить, что под влиянием острой интоксикации ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 2 сут зарегистрировано снижение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке с практически полным восстановлением показателей на 10 сут. Отмечается менее выраженное снижение числа лимфоцитов в тимусе при комбинированном действии ФОС и атропина, ФОС и карбоксима по сравнению с изолированным воздействием токсиканта. Антидоты после отравления ФОС снижали редукцию числа лимфоцитов в селезенке. При этом показатели оставались ниже контрольных уровней.

После воздействия антихолинэстеразных веществ на 2 сут вследствие перераспределения лимфоцитов между органами иммунной системы отмечалось их увеличение в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови. На 10 сут показатели после воздействия ФОС существенно не отличались от контрольного уровня. Антидотные средства ФОС атропин и карбоксим практически полностью восстанавливали содержание лимфоцитов в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови.

Острая интоксикация ФОС и комбинированное действие ФОС и атропина приводит к редукции формирования ГЗТ, характеризующей, как первичный, так и вторичный иммунный ответ, и свидетельствующей о поражении Th1-клеток. Отмечается более выраженное снижение реакции ГЗТ при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал реакцию ГЗТ (функцию Th1-клеток).

После воздействия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина зарегистрирована редукция АЗКЦ, как в индуктивный, так и продуктивный периоды иммуногенеза, что свидетельствует о поражении К-клеток. Отмечается более выраженное снижение АЗКЦ при

комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал АЗКЦ.

Острое отравление ФОС и комбинированное действие ФОС и атропина приводит к супрессии активности ЕКК на 2 и 5 сут с восстановлением показателя на 10 сут после интоксикации. Отмечается более выраженное снижение активности ЕКК при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал активность ЕКК.

Под влиянием острой интоксикации ФОС происходит снижение Т-зависимого антителообразования (числа АОК в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителогенеза. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на гуморальный иммунный ответ, а карбоксима и его комбинации с атропином – снижало. При этом показатель Т-зависимого антителообразования оставался ниже контрольных значений.

Воздействие ФОС приводит к снижению Т-зависимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgG). Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на синтез IgG, а карбоксима и его комбинации с атропином – снижало. При этом число АОК в селезенке, отражающее синтез IgG, оставалось ниже контрольных значений.

Под воздействием острой интоксикации ФОС происходит снижение тимуснезависимого антителообразования (числа АОК к Vi-антигену в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителообразования. По степени снижения синтеза IgM к Vi-антигену применявшиеся ФОС существенно не отличались. Применение атропина увеличивало редуцирующее воздействие ФОС на гуморальный иммунный

ответ, а карбоксима – снижало. При этом показатель Т-зависимого антителообразования оставался ниже контрольного уровня.

При математической обработке непараметрическими и параметрическими статистическими методами (путем вычисления средних значений супрессии при отравлении метафосом, хлорофосом и ДДВФ) установлено, что статистически значимо ( $p < 0,05$ ) по степени снижения параметров иммунного статуса ФОС в эквилетальных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ (средняя супрессия показателей ДДВФ была на  $32 \pm 3\%$  меньше, чем при действии метафоса) . При этом максимальный по продолжительности эффект зарегистрирован при действии метафоса, а минимальный – при остром отравлении ДДВФ.

## ГЛАВА 5

### **ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИИ TH1- И TH2-ЛИМФОЦИТОВ, КООПЕРАЦИИ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ, КОНЦЕНТРАЦИИ В КРОВИ КОРТИКОСТЕРОНА, АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ, СОСТОЯНИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФОС В КОМБИНАЦИИ С АНТИДОТАМИ**

#### **5.1. Исследование активности Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов под влиянием ФОС в комбинации с антидотами**

Под влиянием метафоса (табл. 5.1) происходило снижение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (по числу АОК к ЭБ в селезенке), характеризующему функцию Th1-лимфоцитов и синтез IgM, через 4 сут после иммунизации по сравнению с контрольным уровнем в 1,88 раза ( $p < 0,05$ ). При отравлении метафосом отмечалась также существенная редукция активности Th1-лимфоцитов, оцениваемая по реакции ГЗТ, соответственно в 1,54 раза ( $p < 0,05$ ). На 8 сут после иммунизации ЭБ отмечалась супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, после интоксикации метафосом 1,34 раза ( $p < 0,05$ ).

Снижение параметров, характеризующих клеточные гуморальные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии ФОС в среднем соответственно в 1,71 и 1,35 раза свидетельствует о том, что под влиянием ФОС в большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов.

Применение антидота ФОС атропина сульфата при отравлении метафосом существенно увеличивало супрессирующее действие антихолинэстеразного токсиканта на функцию Th1- и Th2-лимфоцитов ( $p < 0,05$ ). Карбоксим снижал редукцию активности Th1-клеток ( $p < 0,05$ ) и

практически полностью восстанавливал активность параметров, связанных с функцией Th2-лимфоцитов. Следует отметить, под влиянием карбоксима показатели, характеризующие функцию Th1-лимфоцитов, оставались статистически значимо меньшими, чем в контроле ( $p < 0,05$ ).

Таблица 5.1

Влияние интоксикации ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в продуктивной фазе иммуногенеза на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов ( $M \pm m$ ,  $n = 8-9$ )

Серии опытов	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	Число АОК к ЭБ (IgM), $\cdot 10^3$	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), $\cdot 10^3$
Контроль	43,1 $\pm$ 3,5	39,1 $\pm$ 3,2	18,2 $\pm$ 1,7
Метафос	22,9 $\pm$ 2,4*	25,4 $\pm$ 2,3*	13,6 $\pm$ 1,3*
Метафос + атропин	13,5 $\pm$ 1,5**	16,2 $\pm$ 1,7**	9,3 $\pm$ 1,1**
Метафос + карбоксим	29,8 $\pm$ 3,0**	22,4 $\pm$ 2,3**	15,0 $\pm$ 1,6

Примечание: \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и показателем при интоксикации ФОС.

Следует отметить, что при оценке влияния ФОС на функцию Th1- и Th2-клеток, мы не принимали во внимание действие ФОС на В-клетки (плазмоциты) при оценке числа АОК к ЭБ на 5 и 8 сут после иммунизации, так как это практически не повлияло бы на полученные нами данные о сравнительной активности двух типов Th-лимфоцитов.

Правомерность нашего подхода, свидетельствующего о существенном различии в редукции активности Th1- и Th2-лимфоцитов при интоксикации ФОС, подтверждается оценкой концентрации цитокинов в крови крыс (табл. 5.2). При остром отравлении метафосом в продуктивной фазе иммуногенеза выявлено уменьшение концентрации ИФН- $\gamma$  на 5 сут после иммунизации ЭБ в 1,95 раза ( $p < 0,05$ ), а ИЛ-4 - в 1,52 раза ( $p < 0,05$ ). Аналогичные данные получены при исследовании концентрации цитокинов в крови на 8 сут. Это

свидетельствуют о том, что по сравнению с ИЛ-4 концентрация ИФН- $\gamma$  в крови под влиянием ФОС снижается в большей степени.

Таблица 5.2

Влияние интоксикации ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в продуктивной фазе иммуногенеза на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ( $M \pm m$ , n = 6)

Серии опытов		ИФН- $\gamma$	ИЛ-4	ИФН $\gamma$ /ИЛ-4
Контроль	t	902 $\pm$ 82	129 $\pm$ 12	6,99 $\pm$ 0,64
Метафос	5	463 $\pm$ 42*	85 $\pm$ 9*	5,44 $\pm$ 0,53°
	8	409 $\pm$ 46*	83 $\pm$ 7*	4,93 $\pm$ 0,48*
Метафос + атропин	5	236 $\pm$ 34**	42 $\pm$ 6**	5,62 $\pm$ 0,43°
	8	227 $\pm$ 30**	39 $\pm$ 5**	5,82 $\pm$ 0,50°
Метафос + карбоксим	5	660 $\pm$ 60**	95 $\pm$ 8*	6,95 $\pm$ 0,61
	8	671 $\pm$ 62**	97 $\pm$ 9*	6,92 $\pm$ 0,64

Примечание: t - 5, 8 - время исследования после иммунизации, сут; \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; ° -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем (непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна-Уитни); \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и параметрами при интоксикации ФОС;

Применение атропина сульфата при отравлении метафосом существенно увеличивало редуцирующий эффект ФОС в равной степени на секрецию Th1- и Th2-лимфоцитами соответственно ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 ( $p < 0,05$ ). Назначение реактиватора холинэстеразы карбоксима снижало супрессию продукции ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 ( $p < 0,05$ ), обусловленную действием ФОС. При этом концентрация ИФН- $\gamma$  увеличивалась по сравнению с показателями после отравления ФОС ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного уровня ( $p < 0,05$ ), а содержание в крови ИЛ-4 оставалось достоверно сниженным по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ) и статистически значимо не отличалось от параметров после интоксикации метафосом. Использование атропина сульфата не изменяло соотношения ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4, а карбоксима - восстанавливало его до контрольного значения.

Уменьшение соотношения ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [Ройт А. и соавт., 2000]. Нами установлено, что при действии метафоса соотношение ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 было существенно ниже контрольного

уровня ( $p < 0,05$ ) равного  $6,99 \pm 0,64$  и составляло в среднем  $5,18 \pm 0,26$  (при оценке на 5 и 8 сут). Это свидетельствует о более выраженной супрессии под влиянием ФОС функции Th1-лимфоцитов по сравнению со снижением активности Th2-клеток. Вероятно, данный эффект обусловлен способностью ФОС активировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, увеличивая в крови концентрацию кортикостерона [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. При этом известно, что данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000]. Возможно также, что ФОС способны ингибировать в большей степени ацетилхолинэстеразу на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа и  $\alpha$ -нафтил-AS-ацетатэстеразу и  $\alpha$ -нафтилбутиратэстеразу в цитозоле этих клеток, а также большей ролью эстераз в реализации функций лимфоцитов Th1-типа [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Последнее предположение в определенной степени подтверждается способностью карбоксима в большей степени восстанавливать функцию Th1-клеток (по сравнению с активностью Th2-лимфоцитов), так как среднее значение соотношения ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 существенно возрастало ( $p < 0,05$ ) с  $5,18 \pm 0,26$  (действие ФОС) до  $6,94 \pm 0,44$  (комбинированный эффект ФОС и карбоксима).

Увеличение редукции функции Т-клеток, участвующих в реализации различных иммунных реакций, атропином после отравления ФОС обусловлено суммацией супрессорных эффектов, связанных с ингибированием эстераз Т-лимфоцитов и одновременной блокадой м-холинорецепторов Th1- и Th2-клеток [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Карбоксим восстанавливает активность лимфоцитов Th1- и Th2-типа, вероятно, вследствие реактивации ацетилхолинэстеразы, локализованной на их клеточной мембране [Kutty K. M. et al., 1976].

Полученные данные позволяют полагать, что относительное увеличение активности Th2-лимфоцитов по сравнению с функцией Th1-клеток при отравлении ФОС (а также при лечении отравления ФОС

атропином) может приводить к увеличению вероятности вирусных инфекций (по сравнению с микробными) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Asquith B., et al., 2007], а при использовании карбоксима возможность возникновения вирусных и микробных инфекционных заболеваний, по-видимому, одинакова.

Таким образом, острое действие ФОС в продуктивной фазе иммуногенеза в дозе, составляющей 0,75 DL<sub>50</sub>, в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. Под влиянием ФОС в крови концентрация ИФН- $\gamma$ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем концентрация ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками. Применение атропина сульфата при острой интоксикации ФОС увеличивало супрессию функции Th1- и Th2-лимфоцитов и синтеза ими соответственно ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 в равной степени, а использование карбоксима частично восстанавливало преимущественно активность Th1-клеток и синтез ИФН- $\gamma$  по сравнению с функцией Th2-лимфоцитов и продукцией ими ИЛ-4.

## **5.2. Оценка кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования *ex vivo* под влиянием ФОС в комбинации с антидотами**

При изучении кооперации Т- и В-лимфоцитов мышей *ex vivo* оценка функции этих популяций иммуноцитов в данной реакции осуществлялась по формированию АОК к ЭБ. *Ex vivo* изучался данный процесс в модели, предусматривающей забор Т- или В-клеток через 1 сут от сингенных мышей доноров линии СВА после воздействия на них ФОС для изучения *in vitro* кооперации этих клеток соответственно с В- или Т-лимфоцитами интактных животных.



При исследовании кооперации Т- и В-клеток после выделения их у мышей СВА через 1 сут после введения им метафоса в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> (а также ФОС в комбинации с антидотами), установлено (табл. 5.3), что метафос поражал в большей степени Т-клетки по сравнению с В-клетками. Атропин увеличивал редукцию кооперации Т- и В-лимфоцитов, а карбоксим – снижал. Так, зарегистрировано существенное снижение активности В-лимфоцитов в эффекте кооперации клеток после действия метафоса в дозе 0,75 DL<sub>50</sub> соответственно в 1,56 раза, а Т-клеток – соответственно в 2,19 раза ( $p < 0,05$ ).

Таблица 5.3

Влияние метафоса и его антидотов через 1 сут на кооперацию Т- и В-лимфоцитов мышей *ex vivo* (число АОК на 10<sup>6</sup> В-клеток) [ $M \pm m$ ,  $n=5-6$ ]

Вещества	Кооперация лимфоцитов	
	В <sup>0</sup> +Т	В+Т <sup>0</sup>
Метафос	262±21 <sup>ac</sup>	187±19 <sup>a</sup>
Метафос + атропин	190±20 <sup>abc</sup>	105±13 <sup>ab</sup>
Метафос +карбоксим	284±30 <sup>a</sup>	250±24 <sup>ab</sup>

Примечание: контроль: В+Т - 410±34 на 10<sup>6</sup> В-клеток; В<sup>0</sup>, Т<sup>0</sup> - В<sup>0</sup>, Т<sup>0</sup> – клетки получали через 1 сут от мышей, подвергавшихся действию яда; <sup>a</sup> - различие с контролем (В+Т) достоверно –  $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> -  $p < 0,05$  по сравнению с действием метафоса; <sup>c</sup> -  $p < 0,05$  по сравнению с В<sup>0</sup>+Т.

Применение антидота ФОС атропина при интоксикации мышей, у которых выделяли В-клетки, существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на кооперацию лимфоцитов ( $p < 0,05$ ), а карбоксима – практически не уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина при интоксикации мышей, у которых выделяли В-клетки, по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом кооперация Т- и В-лимфоцитов снижалась соответственно в 2,15 и 1,38 раза ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения.

Применение атропина при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки, существенно увеличивало редуцирующее действие метафоса на кооперацию лимфоцитов ( $p < 0,05$ ), а карбоксима – существенно уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки, по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом кооперация Т- и В-лимфоцитов снижалась соответственно в 3,90 и 1,78 раза ( $p < 0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения. Карбоксим при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки, увеличивал кооперацию Т- и В-лимфоцитов по сравнению с показателем при интоксикации метафосом соответственно в 1,34 раза ( $p < 0,05$ ). При этом параметр оставался ниже контрольного уровня ( $p < 0,05$ ).

Установлено преимущественное поражение Т-клеток в эффекте кооперации, которое, вероятно, обусловлено действием ФОС на ацетилхолинэстеразу Т-лимфоцитов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Ferluga J. et al., 1972; Li C.G et al., 1973].

Атропин увеличивал супрессию кооперации лимфоцитов под влиянием ФОС, вероятно, вследствие блокады их м-холинореактивных структур лимфоцитов в сочетании с ингибированием эстераз Т-клеток [MacManus J.P. et al., 1975; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Эффект карбоксима, восстанавливающий кооперацию Т- и В-лимфоцитов, доказывает его реактивирующее действие на заблокированную ФОС ацетилхолинэстеразу Т-клеток.

Таким образом, под влиянием ФОС, а также их комбинации с антидотами, существенно снижается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Установлено преимущественное поражение Т-клеток в эффекте кооперации при действии ФОС, а также при комбинации ФОС с атропином. Атропин усиливает редукцию кооперации Т- и В-лимфоцитов, а карбоксим – снижает только при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки.

### 5.3. Изучение содержания кортикостерона в плазме крови

Роль кортикостероидов в реализации иммунного ответа неоднозначна, физиологические концентрации их необходимы для реализации полноценного гуморального иммунного ответа [Корнева Е.А., 1990; Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Высокие концентрации кортикостерона, в частности, при интоксикации ФОС, этанола и атразина [Иванова А.С., 1998; Szot R.J., Murphy S.D., 1970], вызывают супрессию ряда показателей системы иммунитета [Хусинов А.А. и соавт., 1991; Забродский П.Ф., 1993; 2002; Claman H.N., 1993; Tiefenbach B. et al., 1983, 1985; Stephen B. P. et al., 2003; Pruett S., 2008].

Нами установлено (табл. 5.4), что под влиянием метафоса содержание кортикостерона в плазме крови крыс увеличивается через 1 ч после интоксикации (рис. 5.1) и в дальнейшем к 24 ч (табл. 5.4) снижается до контрольного уровня. ДДВФ оказывает такой же эффект, но в отличие от действия метафоса при отравлении ДДВФ содержание в крови кортикостерона восстанавливается через 12 ч (табл. 5.4).

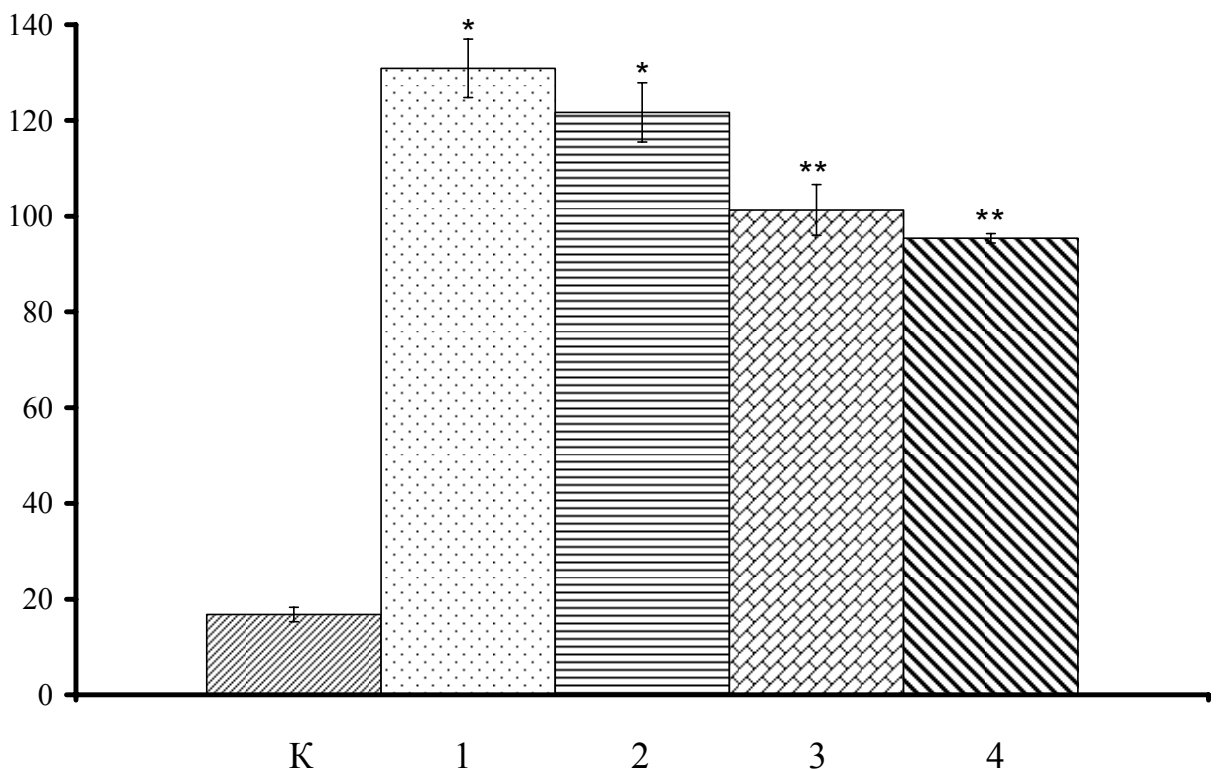


Рис. 5.1. Влияние острой интоксикации ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотными средствами на содержание кортикостерона в плазме крови крыс через 1 ч, нг/мл ( $M \pm m$ )

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – метафос, 2 – ДДВФ, 3 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим; по оси ординат: содержание кортикостерона, нг/мл, К – контроль; в каждой серии использовалось 7-11 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ ; ° - различие достоверно по сравнению с действием ФОС -  $p < 0,05$ .

Таблица 5.4

Влияние острой интоксикации ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотными средствами на содержание кортикостерона в плазме крови крыс, нг/мл ( $M \pm m$ )

Серии опытов	К	Время после воздействия, ч			
		1	3	12	24
Метафос	16,8± 1,5	130,9±6,1*	65,3±4,0*	31,0±2,2*	17,6±2,0
ДДВФ		121,7±6,2*	45,7±4,2*	19,7±2,5	13,4±1,9
Метафос + атропин		101,3±5,3**	45,0±4,1**	15,9±2,7°	19,6±2,5
Метафос + карбоксим		95,4±5,0**	40,1±3,8**	16,7±2,6°	15,0±2,2

Примечание: К – контроль; в каждой серии использовалось от 7 до 11 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* - различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ ; ° - различие достоверно по сравнению с действием ФОС -  $p < 0,05$ .

Это связано с особенностью токсикодинамики применявшихся ФОС: метафос метаболизируется до более токсичного метаоксона («летальный синтез»), а ДДВФ биотрансформируется до нетоксичных соединений [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983; Филлов В.А., 2002].

Так, под влиянием острой интоксикации метафосом через 1 и 3 ч концентрация кортикостерона увеличивалась соответственно в 7,79 и 3,89 раза ( $p < 0,05$ ), снижаясь до контрольного уровня через 24 ч, а под влиянием ДДВФ содержание кортикостерона в крови повышалось через 1 и 3 ч соответственно в 7,24 и 2,72 раза, уменьшаясь до контрольного значения через 12 ч..

Применение после отравления метафосом антидотов существенно изменяло концентрацию гормона в плазме крови. Атропин и карбоксим снижали концентрацию кортикостерона по сравнению с действием метафоса через 1-12 ч ( $p < 0,05$ ), при этом она существенно не отличалась от контроля через 24 ч.

Увеличение кортикостерона в крови под влиянием ФОС обусловлено реализацией общего адаптационного синдрома (увеличение продукции адreno-кортикотропного гормона гипофизом [Селье Г., 1972; Лемус В. Б., Давыдов В. В., 1974; Бирбин В.С., 2003; Dhabhar F.S. et al., 1996; Stephen B. P. et al., 2003; Pruett S., 2008]).

При вычислении коэффициентов корреляции между концентрацией кортикостерона в крови (через 1 ч) и АОК к ЭБ при остром отравлении крыс метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином (см. разд. 4.3.1.) установлено, что они составляли соответственно  $-0,725$  ( $p < 0,05$ ) [ $n=8$ ] и  $-0,731$  ( $p < 0,05$ ) [ $n=8$ ]. Коэффициенты корреляции при остром отравлении метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином между концентрацией кортикостерона в крови (через 1 ч) и реакцией ГЗТ составляли соответственно  $-0,740$  ( $p < 0,05$ ) [ $n=8$ ] и  $-0,732$  ( $p < 0,05$ ) [ $n=8$ ]. Значения  $r$  между активностью ЕКК крыс и концентрацией кортикостерона в крови при острой интоксикации метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином составляли соответственно  $-0,707$  ( $p < 0,05$ ) и  $-0,786$  ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, острая интоксикация метафосом и ДДВФ повышает концентрацию кортикостерона в плазме крови соответственно через 1-12 ч и через 1-3 ч, что обусловлено особенностями токсикокинетики этих ядов. Выявлена выраженная отрицательная корреляция между концентрацией кортикостерона при воздействии ФОС, а также ФОС в сочетании с применением атропина и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа. Атропин и карбоксим снижали концентрацию

кортикостерона по сравнению с действием метафоса через 1-12 ч, при этом она существенно не отличалась от контроля через 24 ч.

#### **5.4. Исследование активности ацетилхолинэстеразы Т-клеток под влиянием ФОС в комбинации с антидотами**

Эстеразы иммуноцитов, являясь лизосомальными ферментами, наряду с другими энзимами, играют важную роль в реализации функций ЕКК и различных субпопуляций Т-лимфоцитов, моноцитов и макрофагов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Ледванов М. Ю., Киричук В. Ф., 1996; Ferluga J. et al., 1972; Li C. Y. et al., 1973; Asquith B. et al. 2007; Frasc S.C. et al. 2007; Tomoiu A. et al. 2007]. Изменение эстеразной активности в клетках отражает, с одной стороны, функциональную активность иммуноцитов, с другой - может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови, так как именно эта субпопуляция лимфоцитов является эстеразопозитивной [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977; Asquith B. et al. 2007]. Роль ацетилхолинэстеразы на поверхности Т-лимфоцитов [Kutty K. M. et al., 1976; Szelenyi J.G. et al., 1982] до сих пор не вполне ясна. Возможно, она регулирует влияние ацетилхолина на холинореактивные структуры Т-лимфоцитов [Забродский П.Ф. и соавт., 2001; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1989; Tomoiu A. et al. 2007].

Проведенные нами опыты показали (рис. 5.2), что под влиянием метафоса и ДДВФ активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки у белых крыс на 5 сут существенно снижалась.

Острое отравление метафосом и ДДВФ вызывало статистически значимое уменьшение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки соответственно в 9,14 и 7,25 раза ( $p < 0,05$ ).

Несомненно, что ингибирование ацетилхолинэстеразы ФОС имеет существенное значение в формировании постинтоксикационного

иммунодефицитного состояния. При этом Т-лимфоциты, возможно, существенно утрачивают свои функции, что приводит к редукции Т-зависимого гуморального иммунного ответа, снижению цитотоксической активности Т-клеток. По-видимому, функция К-клеток и ЕКК при интоксикации ФОС также снижается вследствие ингибирования ацетилхолинэстеразы, так как эти клетки содержат этот фермент [Ройт А.и соавт., 2000; Voix E., Nogues M.V., 2007; Tomoiu A. et al. 2007].

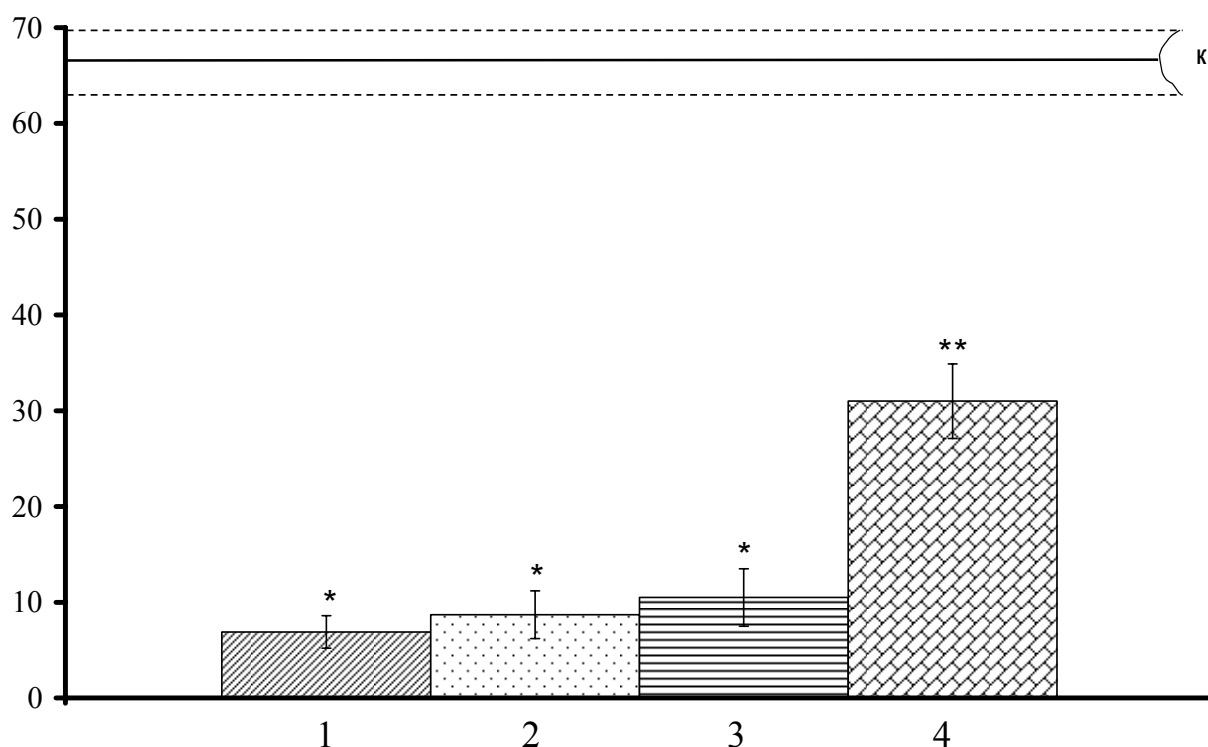


Рис. 5.2. Влияние острой интоксикации ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотами на активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки у белых крыс (мЕд/10<sup>9</sup> Т-клеток) на 5 сут (М±m)

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – ДДВФ, 3 – метафос + атропин, 4 – метафос + карбоксим; по оси ординат: активность ацетилхолинэстеразы Т- лимфоцитов, мЕд/10<sup>9</sup> Т-клеток, К – контроль; в каждой серии использовалось 7-11 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно -  $p < 0,05$ .

Использование после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки у белых крыс, а применение карбоксима после отравления ФОС существенно увеличивало исследуемый показатель ( $p < 0,05$ ). Однако он оставался ниже контрольного уровня.

Коэффициенты корреляции между активностью ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах тимуса крыс (на 5 сут) и АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ при остром отравлении крыс метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином составляли от 0,718 до 0,772 ( $p < 0,05$ ).

Таким образом, острое отравление ФОС вызывает существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса и селезенки. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах белых крыс, а применение карбоксима увеличивало исследуемый показатель. При этом активность ацетилхолинэстеразы в Т-клетках статистически значимо не отличалась от контрольного значения. Установлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при воздействии ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином активностью ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах тимуса.

### **5.5. Изменение показателей перекисного окисления липидов после острого отравления ФОС в комбинации с антидотами**

Перекисное окисление липидов мембран, в том числе и иммунокомпетентных клеток при остром отравлении различными токсикантами, действии экстремальных физических факторов и при различных патологических состояниях [Лукьянова Л.Д. и соавт., 2001; Зарубина И.В., Миронова О.П., 2002; Плужников Н.Н. и соавт., 2003; Hageman J.J. et al., 1992; Urban T. et al., 1995; Knight J.A., 1995; Jaeschke H., 1995; Ibuki Y., Goto R., 1997; Iamele L. et al., 2002] включает следующие стадии: разрыхление гидрофобной области липидного бислоя мембран, что делает белковые компоненты более доступными для протеаз; появление в гидрофобном хвосте жирной кислоты гидрофильной перекисной группы, приводящее к конформационным изменениям в фосфолипиде и липопротеидном комплексе, что изменяет биофизические свойства



мембраны и ферментативные функции липопротеидных комплексов; разрушение веществ, обладающих антиоксидантной активностью (витаминов, стероидных гормонов, убихинона) и снижении концентрации тиолов в клетке; образование по мере накопления гидроперекиси липидов трансмембранных перекисных кластеров, являющихся каналами проницаемости для ионов, в частности для ионов кальция. Формирование таких каналов патологической проницаемости может играть важную роль в возникновении избытка кальция в иммунокомпетентных клетках и реализации повреждающего действия этого катиона [Абдрашидова Н.Ф., Романов Ю.А., 2001; Бурмистров С.О. и соавт., 2002].

Исследование суммарной продукции радикалов (СПР), активности каталазы, пероксидазы и малонового диальдегида является информативным показателем ПОЛ при интоксикациях [Клинцевич А.Д. и соавт., 1994]. При этом каталаза и пероксидаза характеризует антиперекисную защиту, а малоновый диальдегид (МДА) является показателем активности процессов ПОЛ.

Наши исследования показали (табл. 5.5), что под влиянием метафоса и ДДВФ происходит снижение активности каталазы, пероксидазы и увеличения суммарной продукции радикалов и содержания в крови МДА.

Таблица 5.5

Действие острой интоксикации ФОС (0,75 DL<sub>50</sub>) в комбинации с антидотами на показатели перекисного окисления липидов у крыс через 3 сут (M $\pm$ m)

Серии опытов	Суммарная продукция радикалов, усл. ед.	Каталаза, ммоль/мин/л	Пероксидаза, мкмоль/мин/л	Малоновый диальдегид, нмоль/мл
Контроль	25,4 $\pm$ 3,2	255,4 $\pm$ 25,6	37,9 $\pm$ 3,7	6,60 $\pm$ 0,50
Метафос	54,7 $\pm$ 5,1*	156,8 $\pm$ 27,8*	22,3 $\pm$ 2,9*	8,52 $\pm$ 0,52*
ДДВФ	47,2 $\pm$ 5,3*	163,0 $\pm$ 24,0*	23,0 $\pm$ 2,7*	8,31 $\pm$ 0,56*
Метафос+атропин	48,5 $\pm$ 4,8*	171,0 $\pm$ 20,1*	25,1 $\pm$ 2,5*	8,60 $\pm$ 0,50*
Метафос+карбоксим	37,9 $\pm$ 3,8**	235,2 $\pm$ 25,0°	32,9 $\pm$ 2,4°	7,01 $\pm$ 0,51°

Примечание: в каждой серии использовалось от 8 до 14 крыс; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ ; \*\* - различие достоверно по сравнению с контролем и действием метафоса -  $p < 0,05$ ; ° - различие достоверно по сравнению с действием метафоса -  $p < 0,05$ ;

Так, действие метафоса статистически значимо ( $p < 0,05$ ) повышало суммарную продукцию радикалов, снижало активность каталазы и пероксидазы соответственно – в 2,15; 1,63 и 1,29 раза ( $p < 0,05$ ), а ДДВФ – в 1,86; 1,57 и 1,35 раза ( $p < 0,05$ ).

Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на ПОЛ, а применение карбоксима после отравления ФОС существенно снижало инициацию ПОЛ ( $p < 0,05$ ).

Нарушение функции иммунокомпетентных клеток вследствие инициации ПОЛ реализуется путем изменения функциональных свойств белков, входящих в состав мембран и мембраносвязанных ферментов и рецепторов, от их активации до полного ингибирования. Это может быть связано с изменением состава фосфолипидных мембран лимфоцитов, с прямым окислением SH-групп в активных центрах мембраносвязанных ферментов, с образованием внутри- и межмолекулярных "сшивок" [Плужников Н.Н. и соавт., 2003; Hageman J.J. et al., 1992; Urban T. et al., 1995; Knight J.A., 1995; Jaeschke H., 1995; Ibuki Y., Goto R., 1997; Iamele L. et al., 2002].

При вычислении коэффициентов корреляции между числом АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ (см. главу 4) при остром отравлении метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином и суммарной продукцией радикалов установлено, что они составляли от -0,715 до -0,778 ( $p < 0,05$ ) [ $n=9$ ]. Коэффициенты корреляции при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином между АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ и содержанием пероксидазы в крови крыс находились в пределах от 0,712 до 0,765 ( $p < 0,05$ ) [ $n=9$ ]. Коэффициенты корреляции между содержанием МДА в крови и показателями иммунного статуса при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином составляли от -0,709 до -0,775. Значения  $r$  между параметрами были статистически значимы.

Таким образом, острая интоксикация ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином приводит к инициации ПОЛ, что проявляется снижением активности показателей антиоксидантной системы (редукция каталазы и пероксидазы) и увеличением содержания малонового диальдегида и суммарной продукции радикалов в плазме крови. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на ПОЛ, а применение карбоксима после отравления ФОС существенно снижало инициацию ПОЛ. Выявлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии ФОС (и ФОС в комбинации с атропином) и показателями антиоксидантной системы и отрицательная корреляция между иммунными реакциями и продуктами ПОЛ, что свидетельствует о том, что инициация ПОЛ под влиянием ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином является одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

### Резюме

Полученные данные свидетельствуют о том, что острое действие ФОС в продуктивной фазе иммуногенеза в дозе, составляющей 0,75 DL<sub>50</sub>, в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. Под влиянием ФОС в крови концентрация ИФН- $\gamma$ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем концентрация ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками. Применение атропина сульфата при острой интоксикации ФОС увеличивало супрессию функции Th1- и Th2-лимфоцитов и синтеза ими соответственно ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 в равной степени, а использование карбоксима частично восстанавливало преимущественно активность Th1-клеток и синтез ИФН- $\gamma$  по сравнению с функцией Th2-лимфоцитов и продукцией ими ИЛ-4.

Под влиянием ФОС, а также их комбинации с антидотами, существенно снижается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Установлено преимущественное поражение Т-клеток в эффекте кооперации при действии ФОС, а также при комбинации ФОС с атропином. Атропин усиливает редукцию кооперации Т- и В-лимфоцитов, а карбоксим – снижает только при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки.

Острая интоксикация метафосом и ДДВФ повышает концентрацию кортикостерона в плазме крови соответственно через 1 - 12 ч и через 1-3 ч, что обусловлено особенностями токсикокинетики этих ядов. Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией кортикостерона и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа. Атропин и карбоксим снижали концентрацию кортикостерона по сравнению с действием метафоса через 1-12 ч, при этом она существенно не отличалась от контроля через 24 ч. Выявлена выраженная отрицательная корреляция между иммунными реакциями при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином и концентрацией кортикостерона в плазме крови.

При остром отравлении ФОС происходит существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах белых крыс, а применение карбоксима увеличивало исследуемый показатель. При этом активность ацетилхолинэстеразы в Т-клетках статистически значимо не отличалась от контрольного значения. Установлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином и активностью ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах.

Острая интоксикация ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином приводит к инициации ПОЛ, что проявляется снижением активности показателей антиоксидантной системы (редукция каталазы и пероксидазы) и увеличением содержания малонового альдегида и суммарной продукции

радикалов в плазме крови. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на ПОЛ, а применение карбоксима после отравления ФОС существенно снижало инициацию ПОЛ ( $p < 0,05$ ). Выявлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии ФОС (и ФОС в комбинации с антидотами) и показателями антиоксидантной системы и отрицательная корреляция между иммунными реакциями и продуктами ПОЛ.

Таким образом, преимущественное поражение ФОС (ФОС в комбинации с антидотами) функции Th1-лимфоцитов, редукция кооперации Т- и В-лимфоцитов, увеличение в крови кортикостерона, инактивация ацетилхолинэстеразы Т-клеток, активация ПОЛ являются факторами, приводящими к формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния. Антидоты при отравлении ФОС вызывают в зависимости от исследованных показателей различное по направленности и выраженности их изменение, либо не влияют на них. Атропин приводит к усилению иммунотоксических эффектов ФОС вследствие увеличения редукции кооперации Т- и В-клеток и синтеза цитокинов ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4, а карбоксим снижает эти эффекты в результате реактивации ацетилхолинэстеразы Т-клеток и увеличения синтеза ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4, а также редукции ПОЛ.

## ГЛАВА 6

### КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ИММУНОГО СТАТУСА ПОСЛЕ ОСТРОГО ДЕЙСТВИЯ ФОС В КОМБИНАЦИИ С АНТИДОТАМИ

#### 6.1. Изменение иммунотоксичности фосфорорганических соединений в зависимости от характера их метаболизма при активация Р-450- зависимых монооксигеназ

Индукция цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ барбитуратами, зиксорином и другими средствами является одним из способов терапии отравлений фосфорорганическими соединениями (ФОС) [Каган Ю.С. и соавт., 1980; Забродский П.Ф., Линючев М.Н., 1993]. Монооксигеназная система (система цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ), тесно связана с иммунологическими механизмами в системе поддержания химического гомеостаза [Саприн А.Н. и соавт., 1982; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Ферменты монооксигеназной системы содержатся в основном в печени, кроме того, в меньших количествах они находятся и в других тканях (лимфоидных органах, почках, коже). Барбитураты и другие соединения, индуцируя энзимную активность монооксигеназной системы, увеличивают ее способность осуществлять биотрансформацию ксенобиотиков в десятки раз [Козлов В.А. и соавт., 1991, Филлов В.А., 2002]. В лимфоидной ткани животных и человека идентифицированы следующие формы цитохрома Р-450: Р-450РВ-1, Р-450РВ-4, Р-450МС-1 $\alpha$ , Р-450МС-1 $\beta$ , а также бензпиренгидроксилаза, этоксирезорифин-О-деэтилаза, аминопирин-н-деметилаза [Козлов В.А. и соавт., 1991].

Данные литературы позволяют полагать, что под влиянием индукторов монооксигеназной системы токсичные химические вещества, не метаболизирующиеся по типу «летального синтеза» (а это большинство токсикантов) могут ослаблять их иммунотоксические эффекты, в то же время, образование более токсичных продуктов в процессе

биотрансформации может приводит к обратному эффекту [Саприн А.Н. и соавт., 1982; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Нами исследовалось влияние индукторов Р-450-зависимых монооксигеназ (фенобарбитала и бензонала перорально в течение трех суток в дозах соответственно 50 и 70 мг/кг) на иммуотоксические свойства фосфорорганических соединений – хлорофоса и ДДВФ, которые метаболизируются соответственно до более и менее токсичных веществ.

Ферментиндуцирующие свойства фенобарбитала и бензонала оценивали по длительности сна, вызванного гексобарбиталом в дозе 80 мг/кг [Венгеровский А.И. и соавт., 1993].

Установлено (табл.6.1.), что применение фенобарбитала приводило к

Таблица 6.1

Действие острого отравления хлорофосом и ДДВФ на показатели системы иммунитета у крыс после применения индукторов монооксигеназной системы печени ( $M \pm m$ ,  $n=9-12$ )

Серии опытов	АОК к ЭБ, $10^3$	АОК к Vi- Ag, $10^3$	ЕЦ, %	АЗКЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	$30,5 \pm 3,0$	$22,3 \pm 2,4$	$27,0 \pm 2,0$	$13,2 \pm 1,4$	$33,0 \pm 2,6$
Фенобарбитал	$38,4 \pm 3,1$	$26,8 \pm 2,2$	$33,9 \pm 2,5^*$	$16,5 \pm 1,7$	$38,7 \pm 2,5$
Бензонал	$37,9 \pm 3,2$	$25,9 \pm 2,8$	$36,8 \pm 2,7^*$	$17,3 \pm 1,6$	$40,2 \pm 3,1$
ДДВФ	$17,2 \pm 2,3^*$	$16,2 \pm 2,0^*$	$15,7 \pm 1,7^*$	$7,8 \pm 1,5^*$	$16,7 \pm 1,9^*$
Хлорофос	$14,4 \pm 2,1^*$	$12,6 \pm 1,4^*$	$18,0 \pm 1,8^*$	$8,4 \pm 1,3^*$	$16,0 \pm 1,7^*$
Фенобарбитал + хлорофос	$8,8 \pm 1,3^{**}$	$8,1 \pm 1,3^{**}$	$14,7 \pm 1,4^*$	$4,9 \pm 1,1^*$	$10,1 \pm 2,0^{**}$
Бензонал + хлорофос	$9,3 \pm 1,2^{**}$	$6,9 \pm 1,5^{**}$	$10,4 \pm 1,1^{**}$	$5,5 \pm 1,0$	$8,8 \pm 1,3^{**}$
Фенобарбитал + ДДВФ	$24,1 \pm 2,4$	$17,9 \pm 2,3$	$22,8 \pm 1,9$	$9,2 \pm 1,3$	$27,5 \pm 2,3$
Бензонал + ДДВФ	$26,7 \pm 2,6$	$20,0 \pm 2,1$	$25,5 \pm 2,2$	$10,5 \pm 1,4$	$28,0 \pm 2,7$

Примечание. \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и показателем после интоксикации ФОС без применения индукторов монооксигеназной системы.

несущественному увеличению гуморального иммунного ответа к Т-зависимому и Т-независимому антигенам, АЗКЦ и реакции ГЗТ соответственно в 1,26; 1,20; 1,25 и 1,17 раза ( $p>0,05$ ), а после использования бензонала – соответственно в 1,24; 1,16; 1,31 и 1,22 раза ( $p>0,05$ ). Под влиянием фенобарбитала и бензонала активность ЕКК повышалась соответственно в 1,24 и 1,36 раза ( $p<0,05$ ). Иммуностимулирующие эффекты фенобарбитала и бензонала практически не отличались.

Острая интоксикация ДДВФ вызывала снижение Т-зависимого, Т-независимой гуморальной иммунной реакции, ЕЦ, АЗКЦ и реакции ГЗТ соответственно в 1,77; 1,38; 1,71; 1,69 и 1,98 раза ( $p<0,05$ ), а хлорофосом соответственно в 2,10; 1,75; 1,49; 1,59 и 2,07 раза ( $p<0,05$ ).

Хлорофос, метаболизирующийся до более токсичного ДДВФ [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983], после применения фенобарбитала вызывал супрессию антителопродукции (к Т-зависимому и Т-независимому антигенам), активности ЕКК, уменьшение АЗКЦ и функции Th1-лимфоцитов (реакции ГЗТ) соответственно в 3,43; 2,72; 1,82; 2,64 и 3,23 раза ( $p<0,05$ ), а после использования бензонала - в 3,24; 3,19; 2,57; 2,49 и 3,71 раза ( $p<0,05$ ) соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что редукция параметров иммунного статуса под влиянием ферментиндуцирующих средств (фенобарбитала и бензонала) после острой интоксикации ФОС, в частности, хлорофосом, метаболизирующегося до более токсичного соединения ДДВФ (феномен «летального синтеза») более выражена, чем при остром действии ДДВФ (метаболита хлорофоса) ( $p<0,05$ ).

Иммунотоксичность при остром действии ДДВФ, который биотрансформируется до менее токсичных (или нетоксичных) веществ (диметилфосфата, дихлорвинилового спирта, дихлорацетальдегида, а также дихлорэтанола, дихлоруксусной кислоты) [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983] после индукции фенобарбиталом и бензоналом цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ значительно снижалась по сравнению с действием



диметилдихлорвинилфосфата без применения индукторов монооксигеназной системы и была несущественно ниже контрольных значений ( $p>0,05$ ).

Под влиянием фенобарбитала и бензонала статистически значимо увеличивалось время гексеналового сна (рис. 6.1).

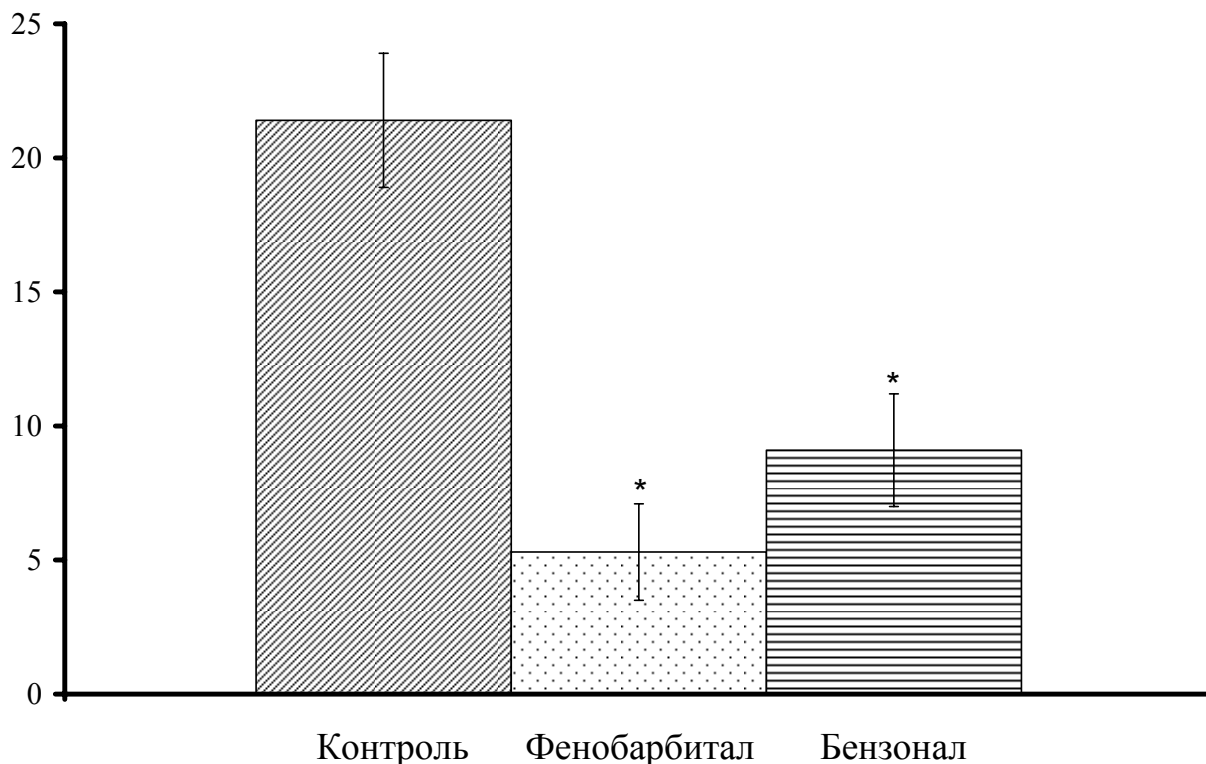


Рис. 6.1. Влияние фенобарбитала и бензонала на продолжительность гексобарбиталового сна крыс, мин ( $M\pm m$ )

По оси абсцисс – препараты; в каждой серии использовалось 8-9 крыс; по оси ординат - продолжительность гексобарбиталового сна, мин; \* -  $p<0,05$  по сравнению с контролем.

Вероятно, это обусловлено индукцией цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ в лимфоидной ткани (иммунокомпетентных клетках). Известно, что витамин А, левамизол, фенобарбитал и другие вещества, индуцирующие монооксигеназные системы, способны повышать активность Т-лимфоцитов, ЕКК в результате индукции в иммуноцитах цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ [Саприн А.Н. и соавт., 1982].

Цитохром Р-450-зависимые монооксигены печени и лимфоидной ткани, значительно повышая биотрансформацию хлорофоса [Каган Ю.С. и

соавт., 1980], превращают его в более токсичный ДДВФ (феномен «летального синтеза») [Голиков С.Н., 1968], что существенно увеличивает иммунотоксичность подвергнувшегося биотрансформации хлорофоса.

Поражение иммунной системы ДДВФ, снижается предварительной индукцией монооксигеназной системы, энзимы которой приводят к образованию менее ядовитых (или нетоксичных) соединений. Следует отметить, что при действии хлорофоса иммунотоксичность обусловлена как самим ФОС, так и его метаболитом ДДВФ, а при интоксикации ДДВФ супрессия иммунных реакций связана только с действием диметилдихлорвинилфосфатом (его метаболиты малотоксичны или нетоксичны) [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Таким образом, в зависимости от характера метаболизма ФОС (образующихся при их биотрансформации продуктов) цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы могут повышать или снижать их иммунотоксичность. Использование индукторов монооксигеназной системы фенобарбитала и бензонала перорально в течение трех суток в дозах соответственно 50 и 70 мг/кг до острого отравления животных хлорофосом, метаболизирующегося в организме до высокотоксичного соединения ДДВФ, вызывает увеличение иммунотоксических свойств хлорофоса. Применение индукторов цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ до острой интоксикации ядами, в частности, ДДВФ, которые биотрансформируются в организме до малотоксичных или нетоксичных веществ существенно уменьшают их супрессирующее действие на показатели системы иммунитета.

## **6.2. Влияние иммуностимуляторов на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и показатели иммунного ответа при острой интоксикации ФОС с применением антидотов**

При изучении иммуностимулирующих свойств имунофана и полиоксидония в опытах на крысах после острого отравления ФОС с применением антидотов в дозе 1,0 DL<sub>50</sub> установлено, что (как это уже указывалось в предыдущих главах) атропин и карбоксим (карбоксим в сочетании с атропином) соответственно увеличивал и уменьшал супрессию показателей НРО и иммунного статуса по сравнению с показателями после интоксикации ФОС. Карбоксим в сочетании с атропином незначительно увеличивал параметры по сравнению с показателями при интоксикации ФОС. При этом факторы НРО и показатели иммунного статуса оставались ниже контрольных значений. Полученные данные предполагают применение средств, направленных на восстановление нарушений НРО и иммунного гомеостаза (иммуностимуляторов). Эффективность иммуностимуляторов оценивалась при исследовании параметров, которые после интоксикации ФОС изменялись в наибольшей степени: ФМАН, активность Th1-клеток в реакции ГЗТ, функция ЕКК и гуморальный иммунный ответ к Т-зависимому антигену (см. главы 3 и 4).

Для оценки эффективности имунофана и полиоксидония, возможность восстановления которыми параметров НРО и иммунного статуса нами была обоснована в разд. 1.6., нами в опытах на неинбредных белых крысах установлено (табл. 6.2), что ФМАН, активность Th1-клеток, ЕКК и гуморальный иммунный ответ к тимусзависимому антигену (ЭБ) на 5 сут после острого воздействия метафоса снижались соответственно в 2,21; 1,80; 2,26 и 2,10 раза ( $p < 0,05$ ), при комбинации метафоса и атропина - в 3,10; 2,55; 3,72 и 2,99 раза ( $p < 0,05$ ), при действии метафоса в сочетании с карбоксимом в 1,55; 1,34; 1,44 и 1,89 раза ( $p < 0,05$ ), а при сочетанном действии метафоса,

атропина и карбоксима в 2,07; 1,55; 1,63 и 1,68 раза соответственно ( $p < 0,05$ ).

Таблица 6.2

Действие имунофана и полиоксидония на ФМАН и показатели иммунного ответа при остром отравлении ФОС в дозе 1,0 DL<sub>50</sub> в комбинации с антидотами при применении иммуностимуляторов на 5 сут после отравления (M $\pm$ m)

Серии опытов	ФМАН, иан	АОК к ЭБ, ·10 <sup>3</sup>	Активность Th1-клеток, %	Активность ЕКК, %
Контроль	0,31 $\pm$ 0,02 (28)	36,2 $\pm$ 1,3 (25)	33,5 $\pm$ 1,2 (21)	32,3 $\pm$ 1,2 (21)
Метафос	0,14 $\pm$ 0,02*	20,1 $\pm$ 2,0*	14,8 $\pm$ 1,8*	15,4 $\pm$ 1,6*
ХФ	0,15 $\pm$ 0,03*	21,0 $\pm$ 1,9*	16,0 $\pm$ 2,2*	15,8 $\pm$ 1,7*
ДДВФ	0,19 $\pm$ 0,02*	23,3 $\pm$ 2,2*	18,1 $\pm$ 1,9*	17,5 $\pm$ 1,8*
ХФ + атропин	0,09 $\pm$ 0,02**	15,1 $\pm$ 1,6**	10,2 $\pm$ 1,6**	10,5 $\pm$ 1,5**
ХФ + карбоксим	0,24 $\pm$ 0,02**	26,7 $\pm$ 1,8**	24,0 $\pm$ 2,1**	22,5 $\pm$ 2,0**
ДДВФ + атропин	0,15 $\pm$ 0,02**	16,2 $\pm$ 1,7**	12,3 $\pm$ 1,5**	12,0 $\pm$ 1,4**
ДДВФ + карбоксим	0,25 $\pm$ 0,02**	29,9 $\pm$ 2,1**	23,8 $\pm$ 1,8**	23,1 $\pm$ 1,9**
Метафос+атропин	0,10 $\pm$ 0,02*	14,2 $\pm$ 1,4**	9,0 $\pm$ 1,3**	10,8 $\pm$ 1,1**
Метафос+карбоксим	0,20 $\pm$ 0,03**	27,0 $\pm$ 2,2**	23,2 $\pm$ 2,1**	17,1 $\pm$ 2,5*
Метафос+атропин+ карбоксим	0,15 $\pm$ 0,02*	23,3 $\pm$ 2,1*	20,6 $\pm$ 2,2**	19,2 $\pm$ 1,8*
Метафос+атропин+ карбоксим имунофан	0,25 $\pm$ 0,02*	34,4 $\pm$ 3,3	31,7 $\pm$ 2,9	30,1 $\pm$ 3,2
Метафос+атропин+ карбоксим + ПО	0,33 $\pm$ 0,03°	38,7 $\pm$ 3,5	36,0 $\pm$ 3,2	32,5 $\pm$ 3,3

Примечание: ХФ – хлорофос; ПО – полиоксидоний, иан – индекс активности нейтрофилов; в скобках – число крыс; в каждой группе использовалось 7-9 крыс; \* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* -  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и показателем после интоксикации ФОС; ° -  $p < 0,05$  по сравнению с показателем после интоксикации ФОС в комбинации с антидотами и имунофаном.

Аналогичные показатели, свидетельствующие о существенном увеличении супрессии показателей при использовании атропина ( $p < 0,05$ ) и о

снижении ее при назначении карбоксима ( $p < 0,05$ ) по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС, получены в экспериментах при сочетанном применении хлорофоса, а также ДДВФ и их антидотов. При этом карбоксим не восстанавливает ФМАН и иммунные реакции до контрольного уровня. В порядке снижения эффекта ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ, что обусловлено особенностями их токсикокинетики.

Таким образом, комбинация различных ФОС с атропином независимо от токсичности и токсикокинетики ядов увеличивают супрессию показателей и частично снижают их при назначении карбоксима.

Следует отметить, что использование атропина и реактиваторов холинэстеразы предписано всеми учебниками и руководствами по лечению острых отравлений ФОС [Голиков С.Н., 1968; Медведь Л.И. и соавт., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Маркова И.В. и соавт., 1998; Куценко С.А., 2004]. Поэтому эффективность иммуностимуляторов оценивалась при отравлении наиболее токсичного ФОС метафоса на фоне применения атропина и карбоксима. Кроме того, антидот карбоксим полностью не восстанавливает ФМАН и иммунные реакции, а атропин даже усиливает их редукцию.

Применение имунофана после интоксикации метафосом и применении антидотов ФОС (атропина и карбоксима) приводило к увеличению ФМАН, активности Th1-клеток, ЕКК и гуморального иммунного ответа по сравнению показателями при интоксикации ФОС соответственно в 1,79; 1,71; 2,14 и 1,95 раза ( $p < 0,05$ ). При этом по сравнению с контролем исследованные параметры были снижены соответственно – в 1,24 ( $p < 0,05$ ); 1,05; 1,06 и 1,07 раза, что свидетельствует о том, что имунофан не восстанавливает до уровня контрольного значения ФМАН.

Назначение полиоксидония после интоксикации метафосом и применении его антидотов (атропина и карбоксима) ФОС приводило к увеличению ФМАН, активности Th1-клеток, ЕКК и гуморального иммунного

ответа по сравнению показателями при интоксикации ФОС соответственно в 2,36; 1,90; 2,43 и 2,11 раза ( $p < 0,05$ ). При этом исследованные показатели по сравнению с контролем практически не отличались, что свидетельствует о том, что полиоксидоний восстанавливает до уровня контрольного значения, наиболее поражаемые ФОС (и ФОС в комбинации с антидотами) параметры доиммунного и иммунного гомеостаза.

В целом эффективность полиоксидония несущественно превышала стимулирующий эффект имунофана, за исключением действия ПО в комбинации с антидотами при отравлении ФОС при исследовании ФМАН. В среднем имунофан увеличивал исследованные показатели в  $1,89 \pm 0,17$  раза по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС (и ФОС в комбинации с антидотами), а полиоксидоний – в  $2,20 \pm 0,20$  раза.

При Т-зависимом антителообразовании действие имунофана и полиоксидония, вероятно, реализуется путем активации процесса кооперации макрофагов, Т-клеток и В-лимфоцитов, антителопродуцирующих В-клеток, функции Th1-лимфоцитов, секретирующих  $\gamma$ -интерферон,  $\beta$ -фактор некроза опухоли (лимфотоксин), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), и Th2-клеток, продуцирующих ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ГМ-КСФ [Ройт А., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; ; Kimber I., 1996].

При остром отравлении метафосом в условиях специфической терапии атропином и карбоксимом (табл. 6.4). иммуногенеза выявлено уменьшение концентрации ИФН- $\gamma$  на 5 сут после иммунизации ЭБ в 1,77 раза ( $p < 0,05$ ), а ИЛ-4 - в 1,33 раза ( $p < 0,05$ ). Аналогичные данные получены при исследовании концентрации цитокинов в крови на 8 сут (см. разд. 5.1.). Соотношение ИФН $\gamma$ /ИЛ-4 снижалось через 5 и 8 сут соответственно до 5,25 и 5,78, что свидетельствует о преимущественном поражении Th1-клеток. Применение полиоксидония приводило к полному восстановлению содержания цитокинов в крови и соотношения ИФН $\gamma$ /ИЛ-4 после

интоксикации ФОС в комбинации с антидотами атропином и карбоксимом (табл. 6.3).

Таблица 6.3

Влияние интоксикации ФОС (1,0 DL<sub>50</sub>) в продуктивной фазе иммуногенеза на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл (M±m, n=6)

Серии опытов		ИФН-γ	ИЛ-4	ИФНγ/ИЛ-4
Контроль	t	902±82	129±12	6,99±0,64
Метафос + атропин + карбоксим	5	510±50**	97±8*	5,25±0,51*
	8	533±62**	95±9*	5,78±0,54
Метафос + атропин + карбоксим +ПО	5	895±86	118±13	7,58±0,73
	8	910±88	125±14	7,28±0,70

Примечание: ПО – полиоксидоний; t - 5, 8 - время исследования после иммунизации, сут; \* -p<0,05 по сравнению с контролем; \*\* - p<0,05 по сравнению с контролем и параметрами при интоксикации ФОС.

Доказанная нами возможность восстановления имунофаном и полиоксидонием основных показателей гуморального и клеточного иммунитета и концентрации цитокинов в крови дает основания предполагать, что механизм их действия может быть связан с неспецифической стимуляцией функций клеток организма, способных к пролиферации, а также с увеличением секреции цитокинов Т-клетками. Иммуностимулирующие свойства имунофана и полиоксидония обусловлены помимо активации зрелых лимфоцитов полипотентных стволовых кроветворных клеток [Лебедев В.В. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003]. Этот механизм, вероятно, при действии имунофана обеспечивается стимуляцией синтеза энзимов и других белков вследствие активации иммуностимуляторами циклического аденозинмонофосфата, РНК-полимеразы, синтеза ДНК [Белокрылов Г.А. и соавт., 1999].

Полиоксидоний, вероятно, стимулирует В-клетки (плазмоциты), синтезирующие IgM (в использованном тесте), а также ЕКК после интоксикации ФОС в комбинации с антидотами вследствие способности

активировать выработку  $\gamma$ -интерферона Th1-лимфоцитами. Этот лимфокин активирует ЕКК и восстанавливает постинтоксикационное нарушение их функции, а также индуцирует экспрессию рецепторов ИЛ-2 на их поверхности [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Полиоксидоний, вероятно, как и имунофан активируют Th1-лимфоциты, Th1-клетки памяти и макрофаги вследствие увеличения активности РНК-полимеразы и синтеза ДНК лимфоцитов [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2000, 2002].

Таким образом, полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ФОС в дозе 1,0 DL<sub>50</sub> (и ФОС в комбинации с антидотами) достигается применением полиоксидония, который увеличивает секрецию ИФН $\gamma$  и ИЛ-4 соответственно Th1- и Th2-клетками. Имунофан восстанавливает практически до контрольных значений все основные показатели системы иммунитета, за исключением ФМАН.

### **6.3. Влияние полиоксидония на показатели системы иммунитета после острого отравления фосфорорганическими соединениями**

Нами исследовались влияние полиоксидония, как наиболее эффективного иммуностимулятора, на основные показатели иммунного статуса у людей, получивших отравление средней степени тяжести ФОС (ДДВФ, хлорофосом, метафосом) (табл. 6.4). Отравленные получали антидоты атропин и карбоксим в дозах, рекомендованных современными учебниками и руководствами [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Маркова И.В. и соавт., 1998; Куценко С.А., 2004]. Полиоксидоний применялся ежедневно внутримышечно в дозе 12 мг один раз в сутки ежедневно, через день, общим курсом 9 инъекций, начиная с первых суток поступления больного в стационар.

Установлено, что после острых отравлений ФОС средней степени применение полиоксидония на 10 сут приводило к практически



полному или частичному (но статистически не значимому –  $p < 0,05$ ) восстановлению большинства показателей иммунного статуса. После лечения оставались увеличенным синтез IgA (вероятно, вследствие увеличение их продукции в результате воспалительных изменений слизистых оболочек дыхательных путей), сохранялось увеличенное содержание в крови числа лейкоцитов, а также вследствие сохранившегося после лечения лейкоцитоза относительное содержание В-лимфоцитов (CD72).

Таблица 6.4

Влияние полиоксидония на показатели иммунного гомеостаза у лиц, получивших острые отравления ФОС средней степени тяжести на 10 сут

Показатели	Контроль (30)	Отравление (11)	Лечение (10)
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	$5,7 \pm 0,5$	$9,2 \pm 0,9^*$	$7,6 \pm 0,8^*$
Лимфоциты, % / $10^9/\text{л}$	$31,8 \pm 1,6 /$ $1,81 \pm 0,12$	$17,1 \pm 2,7^* /$ $1,57 \pm 0,16$	$25,6 \pm 2,5 /$ $1,91 \pm 0,17$
CD3, % / $10^9/\text{л}$	$77,0 \pm 2,8 /$ $1,39 \pm 0,08$	$58,0 \pm 2,5^* /$ $0,91 \pm 0,05^*$	$62,1 \pm 2,7 /$ $1,23 \pm 0,06$
CD4, % / $10^9/\text{л}$	$41,5 \pm 2,3 /$ $0,57 \pm 0,03$	$35,5 \pm 3,3^* /$ $0,32 \pm 0,04^*$	$37,7 \pm 3,4 /$ $0,47 \pm 0,05$
CD8, % / $10^9/\text{л}$	$18,2 \pm 1,5 /$ $0,25 \pm 0,01$	$23,4 \pm 2,4^* /$ $0,21 \pm 0,03^*$	$20,1 \pm 2,5 /$ $0,24 \pm 0,04$
CD4/CD8	$2,28 \pm 0,26$	$1,52 \pm 0,18^*$	$1,87 \pm 0,20$
CD16, % / $10^9/\text{л}$	$19,3 \pm 1,5 /$ $0,27 \pm 0,02$	$17,7 \pm 2,0 /$ $0,16 \pm 0,03^*$	$18,0 \pm 2,1 /$ $0,22 \pm 0,03$
CD72, % / $10^9/\text{л}$	$11,2 \pm 1,1 /$ $0,20 \pm 0,02$	$16,8 \pm 2,1^* /$ $0,15 \pm 0,02^*$	$15,5 \pm 1,9^* /$ $0,19 \pm 0,03$
IgA, г/л	$1,96 \pm 0,16$	$2,81 \pm 0,37^*$	$2,52 \pm 0,27^*$
IgM, г/л	$1,46 \pm 0,07$	$1,24 \pm 0,08^*$	$1,35 \pm 0,10$
IgG, г/л	$12,2 \pm 0,4$	$10,0 \pm 0,5^*$	$12,0 \pm 0,6$
РБТЛ с ФГА, %	$22,3 \pm 2,5$	$15,0 \pm 2,3^*$	$18,4 \pm 2,4$
АЗКЦ, %	$12,3 \pm 1,3$	$8,0 \pm 1,4^*$	$13,5 \pm 1,8$

Примечание: РБТЛ – реакция бласттрансформации лейкоцитов, ФГА – фитогемагглютинин; в скобках – число наблюдений; \* - различие с контролем (практически здоровые люди в возрасте 20-45 лет) достоверно -  $p < 0,05$ ; ° - различие с контролем и показателями у больных.

Таким образом, применение полиоксидония после поступления больных в стационар с отравлением ФОС средней степени тяжести в условиях применения атропина и карбоксима восстанавливало практически все показатели иммунного статуса на 10 сут. Результаты клинических наблюдений подтверждают полученные экспериментальные данные.

### Резюме

Заключая данную главу, можно постулировать, что в зависимости от характера метаболизма ФОС (образующихся при их биотрансформации продуктов) цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы могут повышать или снижать их иммунотоксичность. Использование индукторов монооксигеназной системы фенobarбитала и бензонала перорально в течение трех суток в дозах соответственно 50 и 70 мг/кг до острого отравления животных хлорофосом, метаболизирующегося в организме до высокотоксичного соединения ДДВФ, вызывает увеличение иммунотоксических свойств хлорофоса. Применение индукторов цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ до острой интоксикации ядами, в частности, ДДВФ, которые биотрансформируются в организме до малотоксичных или нетоксичных веществ существенно уменьшают их супрессирующее действие на показатели системы иммунитета.

В порядке снижения эффекта ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. ФОС независимо от их токсичности и токсикокинетики при сочетанном применении с атропином увеличивают супрессию показателей и частично снижают ее при назначении карбоксима. При этом карбоксим не восстанавливает ФМАН и иммунные реакции до контрольного уровня.

Полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ФОС в дозе 1,0 DL<sub>50</sub> (и ФОС в комбинации с антидотами) достигается применением полиоксидония, который увеличивает секрецию

ИФН $\gamma$  и ИЛ-4 соответственно Th1- и Th2-клетками. Имунофан восстанавливает практически до контрольных значений все основные показатели системы иммунитета, за исключением ФМАН.

Применение полиоксидония после поступления больных с отравление ФОС средней степени тяжести в стационар, восстанавливало практически все показатели иммунного статуса. Результаты клинических наблюдений подтверждают полученные экспериментальные данные.

## ГЛАВА 7

### **ВОЗДЕЙСТВИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ ВЕЩЕСТВАМИ НА ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА, СОДЕРЖАНИЕ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ. КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ**

#### **7.1. Влияние хронической интоксикации фосфорорганическими веществами на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови**

Неспецифическая резистентность организма (НРО) определяется, так называемыми, факторами доиммунной защиты организма [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Хаитов Р.М., 2006], к основным из которых относятся рецепторы для патогенов PRR и Toll, система комплемента, белки острой фазы, сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка - ТКБ ( $\beta$ -лизина), лизоцима, интерфероны и фагоцитоз. [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б; Петров Р.В., 1987; Забродский П.Ф., 2002; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Хаитов Р.М., 2006].

Под влиянием хронической интоксикации ФОВ (0,01 DL<sub>50</sub> ежедневно) отмечалась существенная редукция фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов (ФМАН) (табл. 7.1). Через 30 сут после действия вещества VX фагоцитарный показатель (ФП), фагоцитарное число (ФЧ), индекс активности нейтрофилов в спонтанном и индуцированном НСТ-тестах уменьшались соответственно в 1,55; 1,74; 2,00 и 1,54 раза ( $p < 0,05$ ), а после интоксикации зарином - в 1,41; 1,54; 1,56 и 1,47 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно.

По степени редукции ФМАН эффекты ФОВ в эквилетальных дозах существенно не отличались (хотя, в целом, супрессирующее действие VX было несущественно выше, чем зарины). Так, средняя кратность снижения

всех параметров при действии вещества VX и зарина составляла соответственно  $1,68 \pm 0,07$  и  $1,49 \pm 0,02$  ( $p < 0,05$ ).

Таблица 7.1

Изменение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов крыс под влиянием хронической интоксикации ФОВ (суммарная доза  $0,3 \text{ DL}_{50}$ , 30 сут) (M+m, n=8-10)

Параметры	Контроль	VX	Зарин
Фагоцитарный показатель, %	$29,8 \pm 2,8$	$19,2 \pm 2,0^*$	$21,1 \pm 1,9^*$
Фагоцитарное число, у.е.	$2,30 \pm 0,21$	$1,32 \pm 0,14^*$	$1,49 \pm 0,16^*$
НСТ-тест спонтанный, иан	$0,28 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02^*$	$0,18 \pm 0,02^*$
НСТ-тест индуцированный, иан	$0,57 \pm 0,05$	$0,37 \pm 0,04^*$	$0,39 \pm 0,04^*$

Примечание: иан – индекс активности нейтрофилов; у.е. – условные единицы (среднее число микробных клеток, поглощенных одним нейтрофилом); \* - различие с контролем достоверно  $p < 0,05$ .

Известно, что действие ФОВ на ФМАН реализуется вследствие взаимодействия ядов и их метаболитов с НАДФ·Н и НАДФ<sup>+</sup> [Румянцев А.П., 1981; Брызгина Т. М., 1989]. Действие ФОВ может быть также связано с ингибированием токсикантами и их метаболитами ФАД<sup>+</sup>, ФАД·Н, восстановленного и окисленного убихинона, цитохрома  $b_{245}$  лейкоцитов, а также другими механизмами нарушения функционирования НАДФ·Н-оксидазного комплекса нейтрофилов. Кроме кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитоза ФОВ, поражают и кислороднезависимые микробицидные системы моноцитарно-фагоцитарной системы, в частности нейтрофилов [Гребенюк А.Н. и соавт., 1998].

Нельзя исключить, что редукция ФМАН может быть связана с ингибированием ФОС эстераз цитозоля клеток ММС ( $\alpha$ -нафтилацетатэстеразы,  $\alpha$ -нафтилбутиратэстеразы,  $\alpha$ -нафтил-AS-D-ацетатэстеразы,  $\alpha$ -нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы) [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Li C. G. et al., 1983],

а также с инициацией ФОВ перекисного окисления липидов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Поражение ФОВ ФМАН сопровождается снижением в крови концентрации провоспалительных цитокинов. Так, после хронической интоксикации веществом VX концентрация в крови крыс ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 уменьшалась соответственно в 1,64; 1,76 и 1,62 раза ( $p<0,05$ ), а после отравления заринном - в 1,47; 1,58 и 1,45 раза ( $p<0,05$ ) соответственно. По степени снижения исследованных параметров действие ФОВ в эквивалентных дозах практически не отличалось.

При воздействии никотина в эквивалентной дозе (0,01 DL<sub>50</sub> ежесуточно, в течение 30 сут) концентрация в крови крыс ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6 снижалась соответственно в 1,93; 2,17 и 1,85 раза ( $p<0,05$ ). Это позволяет полагать, что редукция содержания провоспалительных цитокинов в крови обусловлена, в основном стимуляцией н-холинорецепторов клеток МФС ацетилхолином при интоксикации ФОВ (табл. 7.2).

Таблица 7.2

Влияние хронической интоксикации ФОВ и никотина (суммарная доза 0,3 DL<sub>50</sub>, 30 сут) на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови крыс, пг/мл (M+m, n=7)

Серии опытов	ФНО $\alpha$	ИЛ1 $\beta$	ИЛ-6
Контроль	87 $\pm$ 9	65 $\pm$ 8	115 $\pm$ 10
VX	53 $\pm$ 6*	37 $\pm$ 4*	71 $\pm$ 7*
Зарин	59 $\pm$ 7*	41 $\pm$ 5*	79 $\pm$ 8*
Никотин	45 $\pm$ 5*	30 $\pm$ 45*	62 $\pm$ 7*

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

Снижение продукции провоспалительных цитокинов нейтрофилами, моноцитами, макрофагами (и, в меньшей степени, другими клетками иммунной системы происходит вследствие реализации под влиянием холинергической стимуляции холинергического противовоспалительного пути (механизма) - «cholinergic anti-inflammatory pathway» (активация ацетилхолином н-холинорецепторов  $\alpha 7nAChR$ ) [Забродский П.Ф., 2010;

Kessler W. et al., 2006; Tracey K.J., 2007; Oke S.L., Tracey K.J., 2008; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009].

Реализация холинергического противовоспалительного пути (механизма) «cholinergic anti-inflammatory pathway» происходит при хроническом воздействии ФОВ [Забродский П.Ф., 1987; Kessler W. et al., 2006; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009]. Этот механизм включает взаимодействие следующих элементов: м-холинорецепторы (mAChR) головного мозга (вероятно, дорсального вегетативного ядра n. vagus продолговатого мозга), модулирующие иммунорегуляторную функцию блуждающего нерва; эфферентные волокна n. vagus; ацетилхолин; н-холинорецепторы – nAChR – (в частности,  $\alpha 7$ nAChR) клеток моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС); система, так называемой, киназы Януса (JAK2); фактор транскрипции STAT3 («signal transducer and activator of transcription 3»); транскрипционный фактор NF- $\kappa$ B (фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла); провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли- $\alpha$  - ФНО $\alpha$ , высокомолекулярной группы протеин В1 - HMGB1, макрофагально-воспалительный протеин-2 - MIP-2, интерлейкины ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6) [Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V. A., 2007; Pavlov V.A., 2008].

При интоксикации ФОС, вероятно, редукция синтеза провоспалительных цитокинов происходит в результате механизмов связанных с «cholinergic anti-inflammatory pathway». Известно, что возбуждение ацетилхолином mAChR нейтрофилов приводит к увеличению их фагоцитарно-метаболической активности [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Существуют основания полагать, что при интоксикации ФОВ состояние ФМАН определяют многочисленные эффекты, ряд которых разнонаправлены (например, активация mAChR и  $\alpha 7$ nAChR нейтрофилов) [Забродский П.Ф., 2010]. Следует учитывать влияние на ФМАН и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатико-адреналовой систем [Trabold B., 2007].

Существуют данные литературы, которые свидетельствуют о том, что снижение синтеза провоспалительных цитокинов при холинергической стимуляции, в частности, под влиянием ФОВ, может приводить к уменьшению летальности животных в ранней стадии сепсиса [Забродский П.Ф., 1987; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007, Забродский П.Ф., 2010; Fernandez-Cabezudo M.J. et al., 2010; Su X. et al., 2010].

При поражении ядами моноцитарно-фагоцитарная система играет очень важную роль в реализации многочисленных эффектов. Снижение синтеза провоспалительных цитокинов можно рассматривать, как весьма негативную реакцию при хроническом действии ФОВ. При этом возможны нарушения, связанные с деструкцией и удалением тканей, пораженных токсикантом и сопряженными с его действием процессами [Laskin D. L. et al., 2011].

Таким образом, после хронической интоксикации ФОВ (российский VX, зарин) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL<sub>50</sub> (по 0,01 DL<sub>50</sub> ежедневно) снижается фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов. При хроническом отравлении ФОС снижается функция моноцитарно-фагоцитарной системы вследствие стимуляции nAChR ацетилхолином, что проявляется уменьшением концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6.

### **3.2. Влияние иммуномодуляторов на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови при хронической интоксикации фосфорорганическими веществами**

В экспериментах на белых крысах оценивали действие различных иммуномодуляторов на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови. Нами установлено (табл. 7.3; табл. 7.4), что, при хронической интоксикации ФОВ



(веществом VX) Т-активин, имунофан, полиоксидоний восстанавливали при назначении на 24 сут показатели ФМАН и содержание цитокинов в крови. При этом наибольшей активностью обладал полиоксидоний, а Т-активин восстанавливал содержание в крови ФНО $\alpha$  и ИЛ1 $\beta$  только частично (при этом между их концентрациями при действии иммуномодуляторов и показателями в контроле существенных различий не отмечалось).

Таблица 7.3

Влияние иммуностимуляторов на фагоцитарно-метаболическую активности нейтрофилов крыс под влиянием хронической интоксикации веществом VX (суммарная доза 0,3 DL<sub>50</sub>, 30 сут) ( $M \pm m$ , n=8-10)

Серия опытов	ФП, %	ФЧ, у.е.	НСТ сп.	НСТ инд.
Контроль	29,8 $\pm$ 2,8	2,30 $\pm$ 0,21	0,28 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,05
VX	19,2 $\pm$ 2,0*	1,32 $\pm$ 0,14*	0,14 $\pm$ 0,02*	0,37 $\pm$ 0,04*
VX + Т-активин	24,0 $\pm$ 2,0	1,71 $\pm$ 0,19	0,23 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,04
VX + имунофан	26,2 $\pm$ 2,5	1,93 $\pm$ 0,20	0,25 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,04
VX + полиоксидоний	28,5 $\pm$ 2,7	2,23 $\pm$ 0,21	0,26 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,05

Примечание: иан – индекс активности нейтрофилов; ФП, ФЧ – фагоцитарные показатель и число соответственно; НСТ сп. - НСТ-тест спонтанный; НСТ инд. - НСТ-тест индуцированный; у.е. – условные единицы (среднее число микробных клеток, поглощенных одним нейтрофилом); \* - различие с контролем достоверно  $p < 0,05$ .

Так, Т-активин, имунофан, полиоксидоний повышали ФП по сравнению с показателем при интоксикации VX соответственно в 1,25; 1,36 и 1,48 раза ( $p < 0,05$ ), спонтанный НСТ-тест - в 1,64; 1,79 и 1,86 раза ( $p < 0,05$ ), а концентрацию ИЛ-6 - в 1,27; 1,44 и 1,58 раза ( $p < 0,05$ ).

Следует отметить, что существенных отличий между стимулирующими эффектами различных иммуномодуляторов выявлено не было. Учитывая, что супрессирующие эффекты зарина и VX практически не отличаются, а действие последнего даже превышает влияние зарина на исследованные показатели, следует ожидать, что полученные данные справедливы и в

отношении иммуностимулирующих эффектов препаратов при хроническом отравлении заринном.

Таблица 7.4

Влияние иммуностимуляторов на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови крыс, пг/мл ( $M \pm m$ ,  $n=7$ )

Серии опытов	ФНО $\alpha$	ИЛ1 $\beta$	ИЛ-6
Контроль	87 $\pm$ 9	65 $\pm$ 8	115 $\pm$ 10
VX	53 $\pm$ 6*	37 $\pm$ 4*	71 $\pm$ 7*
VX + Т-активин	65 $\pm$ 8	45 $\pm$ 6	90 $\pm$ 8*
VX + имунофан	73 $\pm$ 9	64 $\pm$ 7	102 $\pm$ 9
VX + полиоксидоний	80 $\pm$ 9	70 $\pm$ 7	112 $\pm$ 11

\* - различие с контролем достоверно  $p < 0,05$ .

Эффект Т-активина, по-видимому, обусловлен его способностью повышать активность В-звена иммунитета [Имантаева Г.М., 2005], активировать макрофаги [Большаков и соавт., 1991], представляющие антиген Т-клеткам, выработку ИФН- $\gamma$  и ИЛ-2 Th1-лимфоцитами [Ханафиева И.В. и соавт., 1992; Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993; Ройт А. и соавт., 2000], который стимулирует синтез IgM плазмócитами, увеличивать пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность Т-клеток [Стасий Е.Д. и соавт., 1990; Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф., 1991].

Иммуностимулирующее действие имунофана при хронической интоксикации этанолом обусловлено его иммунорегулирующим, детоксикационным, инаktivацией свободнорадикальных процессов ПОЛ [Лебедев В.В. и соавт., 1999, 2000]. При этом достигается коррекция иммунной и окислительно-антиокислительной систем организма.

Эффект полиоксидония обусловлен его иммуностимулирующим действием в отношении Т-, В-лимфоцитов, плазматических клеток и других клеток иммунной системы, а также его антиоксидантными,

детоксикационными и мембраностабилизирующими свойствами [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

Таким образом, применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови, а имунофан и полиоксидоний - практически полностью.

### **3.3. Сывороточная активность лизоцима при действии ФОВ.**

#### **Иммунокоррекция**

Исследование показателя лизоцимной активности сыворотки крови для оценки неблагоприятного действия химических факторов на организм свидетельствуют о высокой чувствительности данного теста [Бухарин О. В. и соавт., 1985; Агапов В.И. и соавт., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Как правило, химические соединения вызывают снижение лизоцимной активности сыворотки крови [Агапов В.И. и соавт., 2004; Василенко О.А., 2004; Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Однако свидетельством отрицательного воздействия ксенобиотиков на организм может являться также и кратковременное повышение содержания лизоцима в крови [Барштейн Ю. А. В. и соавт., 1991].

После хронического действия VX в дозе 0,01 ЛД<sub>50</sub> в течение 30 сут через 30 сут (рис. 7.1) происходило уменьшение сывороточной активности лизоцима в 1,89 раза ( $p < 0,05$ ).

Супрессия активности лизоцима под влиянием ФОВ, вероятно, связана с ингибированием эстераз клеток крови, а также вследствие эффекта токсиканта, инактивирующего многочисленные биохимические реакции, связанные с участием различных эстераз [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Снижение синтеза лизоцима может происходить также вследствие воздействия ФОВ на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

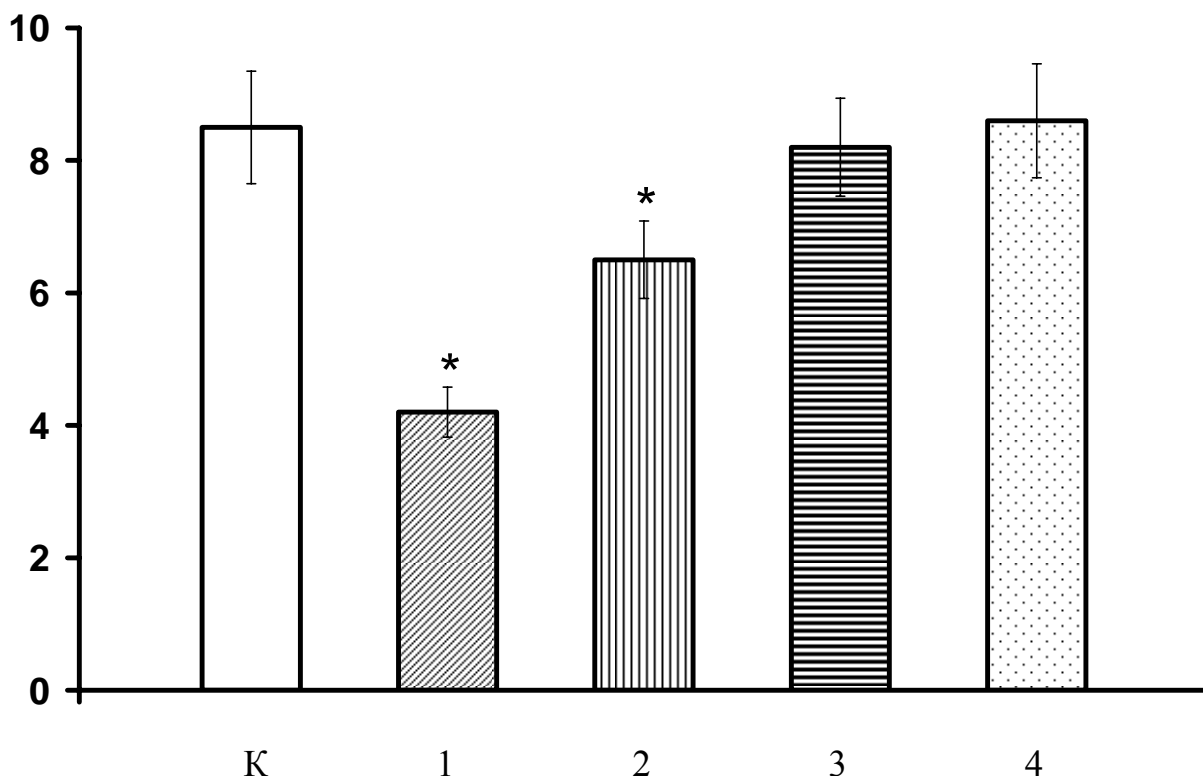


Рис. 7.1. Влияние иммуностимуляторов на активность лизоцима сыворотки крови крыс после хронической интоксикации веществом VX (суммарная доза 0,3 DL<sub>50</sub>, 30 сут), мг/л ( $M \pm m$ , n=8-10)

По оси абсцисс: К-контроль, 1 – VX, 2 – VX + Т-активин, 3 – VX + имунофан, 4 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: активность лизоцима, мг/л; \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ .

При хронической интоксикации ФОВ (вещество VX) имунофан, полиоксидоний восстанавливали активность лизоцима сыворотки крови при назначении на 23 сут и применении в течение 7 сут (рис. 3.1). Существенных отличий между стимулирующими эффектами этих иммуномодуляторов выявлено не было. Т-активин увеличивал активность лизоцима незначительно ( $p > 0,05$ ).

Таким образом, после хронического действия ФОВ в дозе 0,01 ЛД<sub>50</sub> в течение 30 сут происходит снижение активности лизоцима сыворотки крови. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало активность лизоцима сыворотки крови крыс, сниженную под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний полностью восстанавливали показатель.

### 3.4. Сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка при хронической интоксикации ФОВ. Коррекция

Начиная от беспозвоночных и заканчивая млекопитающими и человеком, важным фактором неспецифической защиты организма представителей царства *Animalia*, являются катионные антимикробные пептиды. Эти соединения представляют собой обширную группу неферментных белков с молекулярной массой от 2 до 10 кДа, за счет электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной поверхностью микробной клетки способных оказывать на нее прямое бактерицидное действие. В частности, подобные свойства демонстрирует тромбоцитарный катионный белок (ТКБ), освобождающийся из гранул тромбоцитов в процессе свертывания крови и ответственный за обеспечение стерильности образующегося сгустка [Каримов И.Ф. и соавт., 2009]

Исследование влияние хронического действия ФОВ (вещества VX) на содержание ТКБ сыворотки крови показало (рис. 7.2), что через 30 сут отмечается снижение показателя в 1,53 раза ( $p < 0,05$ ).

Редукция сывороточной активности ТКБ может быть связана с действием ФОВ на его синтез и выделение тромбоцитами [Бухарин О.В., 1974, 1985; Забродский П.Ф., 1998; 2002; Сидельникова Н.М., 2004]. Механизм супрессии активности ТКБ ( $\beta$ -лизина), видимо, обусловлен нарушением функции тромбоцитов в результате взаимодействия с эстеразами тромбоцитов ФОВ, ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [Ротенберг Ю.С., 1980; 1982; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф., 2002], инициацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2004а, 2004б; Василенко О.А., 2004]. Нарушение продукции ТКБ, вероятно, наряду с действием ФОВ на клеточном уровне может быть обусловлено изменением активности гипоталамо-гипофизарно-

надпочечниковой системы (ГГНС) [Бухарин О.В. и соавт., 1974, 1998; Забродский П.Ф., 2002].

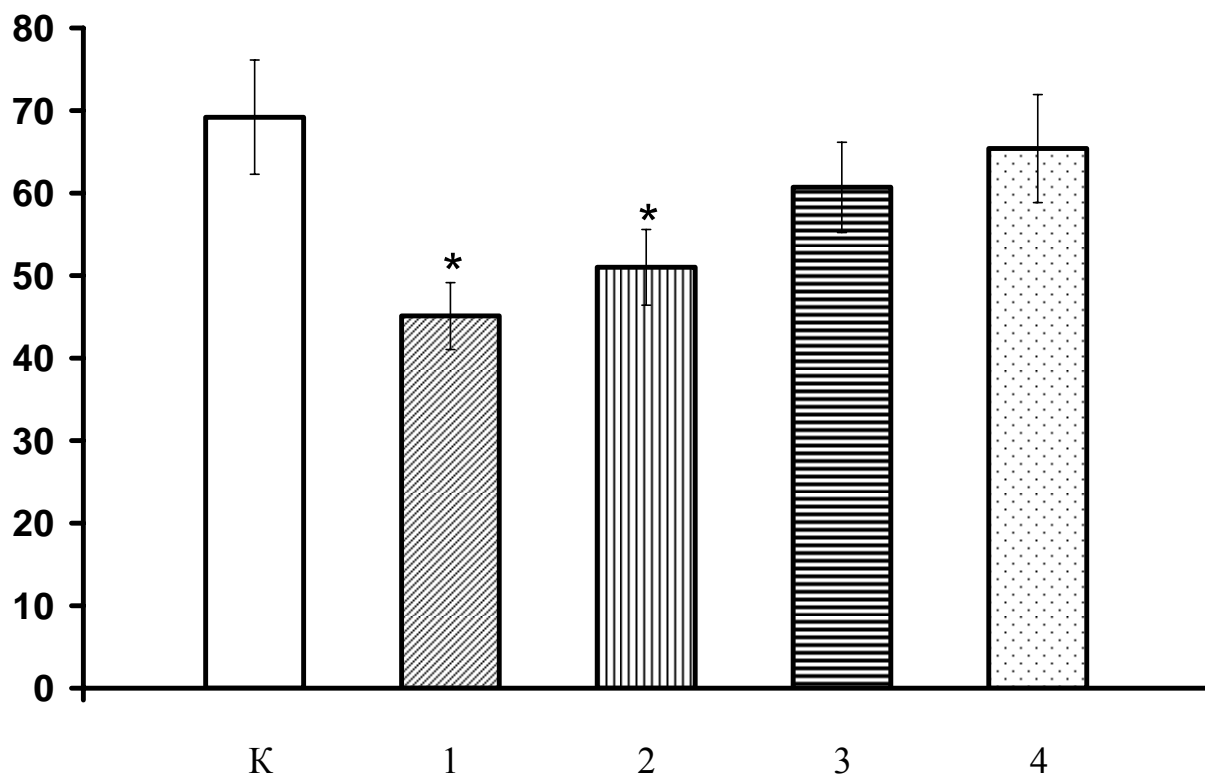


Рис. 7.2. Влияние иммуностимуляторов на активность тромбоцитарного катионного белка сыворотки крови крыс после хронической интоксикации VX (суммарная доза 0,3 DL<sub>50</sub>, 30 сут), % (M±m, n=8-10)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – VX + Т-активин, 3 – VX + имунофан, 4 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: активность тромбоцитарного катионного белка, %, \* - различие с контролем достоверно -  $p < 0,05$ .

При хронической интоксикации веществом VX Т-активин не восстанавливал активность ТКБ. Использование имунофана и полиоксидония увеличивало содержание ТКБ в сыворотке крови при назначении на 24 сут до контрольного значения (рис. 3.2). Существенных отличий между стимулирующими эффектами этих иммуномодуляторов не выявлено.

Таким образом, после хронического действия ФОВ в дозе 0,01 ЛД<sub>50</sub> в течение 30 сут происходит снижение активности ТКБ сыворотки крови. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ не

восстанавливало сывороточную активность ТБК, сниженную под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний увеличивали показатель до контрольного значения.

### Резюме

Полученные нами результаты исследований показали, что после хронической интоксикации ФОС (российский VX, зарин) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL<sub>50</sub> (по 0,01 DL<sub>50</sub> ежедневно) снижается фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов. При хроническом отравлении ФОС уменьшается функция моноцитарно-фагоцитарной системы вследствие стимуляции nAChR ацетилхолином, что проявляется уменьшением концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6.

Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови, а имунофан и полиоксидоний - практически полностью.

После хронического действия ФОВ в дозе 0,01 ЛД<sub>50</sub> в течение 30 сут происходит снижение активности лизоцима сыворотки крови. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало активность лизоцима сыворотки крови крыс под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний восстанавливал показатель полностью.

Хроническое действие ФОВ в дозе 0,01 ЛД<sub>50</sub> в течение 30 сут вызывает снижение активности ТБК сыворотки крови. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ не восстанавливало сывороточную активность ТБК, сниженную под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний увеличивали показатель до контрольного значения.





## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды фосфорорганическими соединениями, широко используемыми в сельском хозяйстве и быту, увеличение аварий на химических объектах, возможность массовых поражений при транспортировке и хранении ФОС, рост острых и хронических интоксикаций данными соединениями, снижающие гуморальный и клеточный иммунный ответ, обуславливает различные инфекционные, онкологические и аллергические заболевания [Хаитов Р. М. и соавт., 1995; Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007; Descotes J., 1986; Luster M. I. et al., 1987]. Особую актуальность проблема изучения иммунотоксичности ФОС приобрела в связи с тем, что в последнее время частота острых интоксикаций данными соединениями существенно увеличилась.

В 60 странах мира за 20 лет зарегистрировано более 34000 отравлений ФОС, при этом 73% случаев отравлений связано с их употреблением. В России больные с острыми отравлениями ФОС составляют до 3% поступающих в специализированные токсикологические центры. Из них в лечебных учреждениях погибает в настоящее время 20-24% больных [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Несомненно, что в танатогенезе при отравлениях ФОС существенную роль играет нарушение патогенетических механизмов иммунного статуса, а также редукция факторов НРО [Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Наиболее часто в клинической практике встречаются острые отравления хлорофосом, метафосом и ДДВФ [Лужников Е.А., Костомарова, Л.Г., 2000].

В настоящее время ФОС, которые являются элементом химического оружия, подлежат уничтожению согласно международным соглашениям на специальных промышленных объектах [Жуков В.Е. и соавт., 2002; Петров А.Н. и соавт. 2004]. Позитивные шаги международного сообщества, в том числе и России, в области ликвидации и полного запрета химического оружия не уменьшили реальность его использования в террористических и

криминальных целях [Петров А.П. и соавт. 2004; Saladi R.N. et al., 2006].

Использование атропина и карбоксима, как антидотов ФОС, является обязательным после острого отравления данными соединениями при оказании первой медицинской (при острых отравлениях ФОС при их использовании в сельском хозяйстве, а также аварийных ситуациях на объектах по уничтожению химического оружия), доврачебной и врачебной помощи [Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Маркова И.В. и соавт., 1998; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. В связи с данным обстоятельством не вызывает сомнения необходимость исследования влияния на основные параметры системы иммунитета комбинированного действия ФОС и его антидотов с целью обоснования применения иммуномодуляторов из большого арсенала известных сейчас веществ данного класса.

Существует целый ряд не исследованных вопросов в отношении нарушения иммунного гомеостаза при острой интоксикации ФОС, несмотря на обширные данные литературы в отношении их иммунотоксических эффектов, в том числе и фоне применения их антидотов. Недостаточно изучена возможность коррекции нарушений иммунного гомеостаза, как их антидотами атропином и карбоксимом, а также различными иммуностимуляторами.

Данные различных исследователей зачастую противоречивы, не ясна роль механизмов, реализующихся на уровне органов и систем и при взаимодействии ФОС в комбинации с антидотами на популяции и субпопуляции лимфоцитов, практически не исследованы особенности перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета при острой интоксикации ФОС в комбинации с антидотами [Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

Данные литературы позволяют заключить, что получение новых результатов исследований в отношении нарушения ФОС факторов НРО и

иммунного гомеостаза в комбинации с антидотами, позволит обосновать адекватную характеру нарушений патогенетических механизмов регуляции иммуногенеза, возможность использования из большого арсенала иммуностимуляторов наиболее перспективных иммуностимулирующих средств имунофана и полиоксидония для профилактики постинтоксикационных инфекционных осложнений и заболеваний. Это позволит существенно снизить смертность больных при отравлении ФОС в лечебных учреждениях.

В результате проведенных нами экспериментальных исследований показано, что после действия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 5 сут отмечается снижение активности лизоцима сыворотки крови с практически полным восстановлением показателя на 10 сут. По степени снижения показателя ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Установлена более выраженная супрессия показателя при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал редукцию активность лизоцима.

Редукция активности лизоцима под влиянием ФОС, вероятно, связана с ингибированием эстераз клеток крови, как самого ФОС (ДДВФ), так и соединениями, образующимися в результате их метаболизма (продуктами биотрансформации хлорофоса и метафоса соответственно диметилдихлорвинилфосфатом и метаоксоном) [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983; Филов В.А., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Нельзя исключить и того, что редукция синтеза лизоцима может происходить также вследствие воздействия ФОС и продуктов их биотрансформации на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

После действия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 5 сут отмечается снижение активности ТКБ сыворотки крови с практически полным восстановлением параметра на 10 сут. По степени

снижения параметра (интенсивности и длительности) ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Отмечается более выраженная редукция активности ТКБ при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал супрессию активности ТКБ.

Снижение сывороточной активности ТКБ может быть связано с действием ФОС и их метаболитов (при отравлении метафосом и хлорофосом) на его синтез и выделение тромбоцитами [Бухарин О.В., 1998; Забродский П.Ф., 1999; 2002; Сидельникова Н.М., 2004]. Механизм супрессии активности ТКБ, видимо, обусловлен нарушением функции тромбоцитов в результате взаимодействия с эстеразами ( $\alpha$ -нафтиацетатэстеразой) мегакариоцитов ФОС и их метаболитов (диметилдихлорвинилфосфата и метаоксона), ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [Ротенберг Ю.С., 1982; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], инициацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Василенко О.А., 2004; Забродский П.Ф., 1996, 2002].

Нами установлено, что после острого действия ФОС через 1-5 сут отмечалось снижение ФМАН с практически полным восстановлением параметров на 10 сут, за исключением индекса активности нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте. По степени снижения ФМАН (интенсивности и длительности) ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Выявлена более выраженная редукция показателя при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал супрессию ФМАН.

Характер изменений ФМАН, сходный с действием ФОС, был обнаружен в экспериментах с пероральным отравлением ДХЭ [Давыдова Е.В. и др., 1995]. При обследовании пациентов с отравлениями суррогатами алкоголя [Романенко О.И., Гребенюк А.Н., 1997; Сосюкин А.Е. и соавт., 1997] изменения ФМАН были менее выражены. Несмотря на различные

специфические механизмы действия ядов, проявление их токсичности на уровне нейтрофилов весьма сходно [Гребенюк А.Н., Романенко О.И., 1996; Агапов В.И. и соавт., 2004]. Это подтверждается и в проведенных нами опытах.

Данные, полученные в НСТ-тесте, свидетельствуют, что воздействие ФОС на ФМАН реализуется вследствие взаимодействия токсикантов и их метаболитов с НАДФ·Н, НАДФ<sup>+</sup>. Это подтверждают данные литературы, полученные при исследовании других групп ядов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Действие ФОС и их метаболитов может быть также связано с ингибированием ФАД<sup>+</sup>, ФАД·Н, восстановленным и окисленным убихиноном и цитохромом b<sub>245</sub> лейкоцитов или иными механизмами нарушения функционирования НАДФ·Н-оксидазного комплекса нейтрофилов. Кроме кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитоза ФОС и продукты их биотрансформации, вероятно, поражают и кислороднезависимые микробицидные системы фагоцитов [Гребенюк А.Н. и соавт., 1998]. Это доказано в опытах Е.В. Давыдовой и соавт. (2004а, 2004б), результаты которых свидетельствуют о снижении внутриклеточного содержания катионных белков в нейтрофилах крыс после острой интоксикации ДХЭ в дозе 1,0 ЛД<sub>50</sub>.

Существенное значение в угнетении ФМАН может иметь дисфункция гипоталамо-гипофизарной системы под влиянием ФОС [Pruett S., 2008], приводящая к изменению чувствительности микро- и макрофагов к микроорганизмам, в результате чего угнетается их цитотоксичность [Брюхин Г. В., Михайлова Г. И., 1990; Гребенюк А.Н. и соавт., 1998]. Так, показано, что глюкокортикоиды и катехоламины снижают суммарную фагоцитарную активность фагоцитов крыс, причем существенную роль в данном феномене играют адреналин [Шилов Ю.И., 2001]. Кроме того, нарушение активности ФМАН может быть связано с мембранотоксическим действием ФОС, инициацией ПОЛ мембран нейтрофилов, их взаимодействием с сульфгидрильными, гидроксидными и другими группами мембран

фагоцитов, нарушением функции ферментов тканевого дыхания митохондрий нейтрофилов [Ротенберг Ю.С., 1982; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2002, 2007]. Не исключено ингибирование эстераз нейтрофилов ФОС [Забродский П. Ф., 1996, 2002; Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007; Li C. G. et al., 1973].

При математической обработке непараметрическими и параметрическими статистическими методами (путем вычисления средних значений супрессии при отравлении метафосом, хлорофосом и ДДВФ) установлено, что статистически значимо ( $p < 0,05$ ) ФОС в эквилетальных дозах в порядке уменьшения факторов НРО располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. В целом максимальная редукция параметров при эквилетальных дозах по длительности эффекта отмечалась при интоксикации метафосом, а минимальная – после острого отравления ДДВФ.

После острого воздействия ФОС в дозе  $0,75 \text{ DL}_{50}$  зарегистрировано снижение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке на 2 сут с практически полным восстановлением показателей на 10 сут. По степени снижения параметра ФОС в эквилетальных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Атропин на 2 сут существенно снижал редукцию числа лимфоцитов в тимусе, вызванную ФОС, и оказывал противоположный эффект на содержание лимфоцитов в селезенке, усиливая редуцирующий эффект ФОС. Карбоксим восстанавливал число лимфоцитов в тимусе и селезенке на 2 сут.

Изменение содержания в тимусе и селезенке лимфоцитов является показателем, характеризующим способность данных органов обеспечивать иммуногенез, то есть реализацию клеточных и гуморальных иммунных реакций. ФОС способны снижать массу тимуса и селезенки, а также содержание в них лимфоцитов в результате реализации стресс-реакции [Мутускина Е.А. и соавт., 2001; Pruett S., 2008] (действие гормонов коры надпочечников, в частности, кортикостерона), которая уменьшает миграцию

в эти органы лимфоцитов из костного мозга [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Идова В.Г. и соавт., 2004], подавляет пролиферацию лимфоцитов в тимусе и селезенке [Ройт А., 2000]. ФОС способны усиливать миграцию из тимуса и селезенки лимфоцитов в циркулирующую кровь (реализация перераспределения, вследствие действия кортикостероидов и катехоламинов) [Горизонтов П.Д., 1981; Забродский П.Ф., 2002; Dhabhar F. S. et al., 1996; Pruett S., 2008].

Содержание Т-лимфоцитов в тимусе снижают различные стрессорные воздействия, приводящие к увеличению концентрации кортикостероидов в плазме крови [Александров В.Н., 1983]. Такой же эффект оказывает ацетилхолин (стимуляция м-холинорецепторов тимоцитов), вызывая выход зрелых Т-клеток из тимуса [Maslinski W. et al., 1989, 1992]. Можно предположить, что атропин, блокируя м-холинорецепторы, может приводить к снижению выхода тимоцитов из вилочковой железы.

Следует отметить, что в селезенке холинергическая иннервация отсутствует, за исключением м-холинорецепторов, локализованных на пресинаптических мембранах  $\alpha$ -адренергических нервных окончаний [Rinner I, Schauenstein K., 1991], поэтому атропин не только не способен снизить миграцию лимфоцитов из нее, но даже усиливает этот процесс вследствие относительного увеличения активности симпатического отдела вегетативной нервной системы. Известно, что норадреналин и адреналин увеличивают миграцию лимфоцитов из селезенки, активируя ее  $\alpha$ -адренорецепторы [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Снижение лимфоцитов в тимусе под влиянием ФОС может быть обусловлено и их апоптозом. Это может быть связано с действием кортикостероидов на лимфоциты. Известно, что гормоны коры надпочечников вызывают как запрограммированную гибель лимфоцитов (апоптоз), так и их миграцию из тимуса и селезенки [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Claman H. N., 1972, 1993; Dhabhar F. S. et al., 1996; Pruett S., 2008]. Кроме того, ФОС и их метаболиты, инактивируя

эстеразы лимфоцитов, инициируя ПОЛ, могут вызывать апоптоз иммуноцитов [Хаитов Р.М и соавт., 2000; Durant S., 1986; Li Q., Kawada T., 2006].

Нами установлено, что на 2 сут после действия ФОС вследствие перераспределения лимфоцитов между органами иммунной системы отмечалось их увеличение в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови. На 10 сут показатели после воздействия ФОС существенно не отличались от контрольного уровня. Антидотные средства ФОС атропин и карбоксим практически полностью восстанавливали содержание лимфоцитов в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови.

Данные литературы и результаты исследований, изложенные в главе 5 позволяют считать [Горизонтов П.Д., 1981, Корнева Е. А. И соавт., 1990; Rey A. et al., 1984, 2006; Maslinski W. et al., 1992], что перераспределение лимфоцитов между органами системы иммунитета (снижение лимфоцитов в тимусе, селезенке, и повышение их числа в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови) под влиянием ФОС связано с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [Pruett S., 2008], приводящее к увеличению концентрации в крови кортикостероидов, и изменением характера холинергической иннервации лимфоидных органов.

Вполне естественно, что антидоты ФОС, блокируя м-холинорецепторы лимфоидных органов, а также снижая эффект интоксикации путем реактивации холинэстеразы, приводят к восстановлению содержания лимфоцитов в лимфоидных органах.

Полученные данные, свидетельствующие о восстановлении количества лимфоцитов в органах системы иммунитета, во-первых, не могут служить основанием для заключения о восстановлении функции лимфоцитов при отравлении ФОС антидотами, а во-вторых, результаты исследований позволяют полагать, что кроме антидотов для нормализации исследованных показателей в использовании иных медикаментозных средств нет необходимости.



После воздействия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина зарегистрирована редукция формирования ГЗТ, характеризующей, как первичный, так и вторичный иммунный ответ, и свидетельствующей о поражении Th1-клеток. По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос и ДДВФ. Отмечается более выраженное снижение реакции ГЗТ при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал реакцию ГЗТ (функцию Th1-клеток).

В формировании реакции ГЗТ кроме Th1-лимфоцитов принимают участие кератиноциты, клетки Лангерганса кожи, Т-клетки памяти. Взаимодействие этих клеток обеспечивают реализацию ГЗТ путем активации макрофагов. В основном Th1-лимфоциты регулируют физиологические механизмы, обеспечивающие функцию Т-звена иммунитета [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Kimber I., 1996]. Полученные нами результаты косвенно свидетельствуют о том, что ФОС (а также ФОС в сочетании с антидотами) уменьшают способность Th1-лимфоцитов синтезировать ИЛ-12,  $\gamma$ -интерферон и  $\beta$ -фактор некроза опухоли (лимфотоксин) [Шуршалина А.В. и соавт., 2001; Kimber I., 1996]. Следует отметить, что ФОС и их комбинация с антидотами, вероятно, снижают активность и других клеток, обеспечивающих формирование ГЗТ (кератиноцитов, клеток Лангерганса, Т-клеток памяти) и макрофагов [Ройт А. и соавт., 2000].

Механизм действия ФОС, что подтверждено данными главы 5, реализуется вследствие ингибирования эстераз, которые локализованы преимущественно в Т-хелперах (Th1- и Th2-лимфоцитах) [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Существенную роль в супрессии ГЗТ, вероятно, играют и другие механизмы действия ФОС (активация гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы, приводящей к увеличению в крови кортикостерона [Pruett S., 2008], инициация ПОЛ,

апоптоз клеток, повреждение мембран и органелл иммуноцитов, ингибирование ферментов тканевого дыхания) [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф., 1998; 2002].

Острая интоксикация ФОС, а также комбинированное действие ФОС и атропина приводит к редукции АЗКЦ, как в индуктивный так продуктивный периоды иммуногенеза, что свидетельствует о поражении К-клеток. Отмечается более выраженное снижение АЗКЦ при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал АЗКЦ.

Помимо уже описанных общих механизмов иммунотоксичности ФОС, данные соединения способны уменьшать АЗКЦ вследствие нарушения электролитного обмена клетки и изменения соотношения цАМФ/цГМФ [Trinchievi G., de Marchi M., 1976; Lanier L. L., 2003] и реализации апоптоза К-клеток [Li Q., Kawada T., 2006].

Существуют основания полагать, что ФОС снижают АЗКЦ вследствие нарушения связывания IgG (Fc $\gamma$ R) с Fc рецепторами. Эти рецепторы связывают К-клетки с IgG-покрытыми клетками-мишенями, которые К-клетки способны уничтожить в «нормальных» условиях (без действия ФОС) [Delves P.J., Roitt I.M., 2000; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ через 2 сут происходило снижение активности ЕКК соответственно в 2,39; 2,07 и 1,73 раза ( $p<0,05$ ). Применение антидота ФОС атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на активность ЕКК, а карбоксима – существенно уменьшало ( $p<0,05$ ). При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом активность ЕКК снижалась соответственно в 4,08 и 1,71 раза ( $p<0,05$ ), оставаясь ниже контрольного значения, а карбоксим увеличивал по сравнению с параметром при отравлении активность ЕКК в 1,66 раза ( $p<0,05$ ).

ФОС снижают цитолиз клетки-мишени, по-видимому, блокируя проникновение ферментов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (порообразование перфорином) [Lee J. C. et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006], а также вследствие нарушения реализации "дыхательного взрыва" (поражение активными радикалами кислорода, гидроксильного радикала и т.п.) и индукцией апоптоза. Не исключено, что активность ЕКК под влиянием ФОС в комбинации с их антидотами снижается вследствие редукции синтеза и продукции лимфоцитами интерферонов и интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Шуршалина А.В. и соавт., 2001; Marx J.L., 1986]. В последнее время было показано, что ФОС нарушают проникновение гранзимов в клетку-мишень [Li Q., Kawada T., 2006]. При этом ФОС ингибирует клетки-киллеры тремя механизмами: повреждая экзоцитоз гранул ЕКК, индуцированных цитокином (ИЛ-2) клеток-киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, ингибируя активность гранзимов, а также уменьшая внутриклеточный уровень порфирина, гранзима А и гранулизина, которые индуцируют дегрануляцию ЕКК и транскрипцию матричных РНК перфорины, гранзима А и гранулизина; повреждая механизм FasL/Fas апоптоза клеток-мишеней клетками-киллерами (этот механизм выявлен на мышах, лишенных механизма экзоцитоза гранул); стимулируя апоптоз иммунных клеток [Li Q., Kawada T., 2006; Li Q., 2007].

Под влиянием острой интоксикации ФОС происходит снижение Т-зависимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителогенеза. По степени редукции синтеза IgM ФОС располагались в порядке снижения эффекта в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на гуморальный иммунный ответ, а карбоксима и его комбинации с атропином

– снижало. При этом показатель Т-зависимого антителообразования оставались ниже контрольных значений.

Наши исследования свидетельствуют о том, что под влиянием ФОС в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом происходит более выраженная редукция функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих продукцию иммуноглобулинов М, и В-клеток (плазмоцитов), синтезирующих IgM [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М., 2002; Pfeifer C. et al., 1991; Ellmeier W., 1999; Xiao W. et al. 2000; Grandmont M.J. et al., 2003; Woof J.M., Kerr M.A., 2004]. Это может быть вызвано большим поражающим эффектом ФОС в отношении синтеза IgM В-клетками (плазмоцитами) спленоцитов, нарушением процессов дифференцировки В-лимфоцитов, перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета в период максимальной антителопродукции (3-5 сут после иммунизации), а также ингибирующим синтез антител действием кортикостероидов [Claman H.N., 1993; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Pruett S., 2008], концентрация которых в крови при действии различных токсикантов увеличивается (стресс-реакция) [Селье Г., 1972; Забродский П.Ф. и соавт., 2002, 2007; Pruett S., 2008].

Снижение Т-зависимой антителопродукции под влиянием ФОС, вероятно, обусловлено редукцией синтеза ряда лимфокинов: BSF-1, активирующего В-клетки; росткового фактора В-клеток – BCGF-II, стимулирующего клональную экспансию активированных клеток; фактора дифференцировки В-клеток  $\mu$  - BCDF $\mu$ , который способствует созреванию клеток с высокой скоростью секреции IgM; фактора BCDF $\gamma$ , вызывающего прекращение синтеза с IgM на IgG и высокую скорость его секреции [Ройт А., 1991; Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. В настоящее время эти цитокины называются организаторами лимфоцитарного иммунного ответа. К ним относятся интерлейкины IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, IFN- $\gamma$ , которые регулируют пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов в периферических лимфоидных органах и тканях. Их продуцируют

дендритные клетки и макрофаги, а затем и сами лимфоциты [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Атропин усиливает супрессию антителообразования под влиянием ФОС, вероятно, вследствие блокады м-холинореактивных структур лимфоцитов в сочетании с ингибированием эстераз Т-клеток [MacManus J.P. et al., 1975; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Не исключено, что данный антидот усиливает редукцию синтеза цитокинов Th1-лимфоцитами. Вполне естественно, что карбоксим, реактивируя ацетилхолинэстеразу Т-клеток, восстанавливает их активирующее действие на В-клетки, вероятно, повышая продукцию ими  $\gamma$ -интерферона [Ройт А. и соавт., 2000].

Острая интоксикация ФОС снижает Т-зависимое антителообразование (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgG). По степени редукции синтеза IgG ФОС располагались в порядке снижения эффекта в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на синтез IgG, а карбоксима и его комбинации с атропином – снижало. При этом число АОК в селезенке, отражающее синтез IgG, оставалось ниже контрольных значений.

Относительно небольшое снижение синтеза IgG, по сравнению с продукцией IgM (оцениваемой по числу АОК в селезенке) при действии ФОС связано с действием факторов, оказывающих на антителообразование противоположное влияние. Концентрация ацетилхолина, увеличивающаяся не только в холинергических синапсах, но и в крови, может оказывать активирующий эффект на продукцию IgG В-клетками селезенки, увеличивать число антителопродуцентов в данном органе системы иммунитета [Адо А.Д. и соавт., 1983; Абрамов В.В. и савт., 1986; Забродский П.Ф., 2002]. Вероятно, ацетилхолин, в отличие от ингибирования эстераз иммуноцитов, способен повышать функцию преимущественно Th2-клеток, которые увеличивают продукцию IgG [Ройт А. и соавт., 2000; Забродский

П.Ф. и соавт., 2005; Pfeifer C. et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Abbas A.K. et al., 1996].

Атропин усиливает супрессию синтеза IgG под влиянием ФОС, вероятно, вследствие блокады м-холинореактивных структур лимфоцитов в сочетании с ингибированием эстераз Th2-клеток [MacManus J.P. et al., 1975; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Не исключено, что данный антидот усиливает редукцию синтеза цитокинов Th2-лимфоцитами. Вполне естественно, что карбоксим, реактивируя ацетилхолинэстеразу Th2-клеток, восстанавливает их активирующее действие на В-клетки, вероятно, повышая продукцию ими ИЛ-4 [Ройт А. и соавт., 2000].

Под влиянием острой интоксикации ФОС происходит снижение тимуснезависимого антителообразования (числа АОК к Vi-антигену в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивную фазу иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителообразования. По степени снижения синтеза IgM к Vi-антигену применявшиеся ФОС существенно не отличались. Применение атропина увеличивало редуцирующее воздействие ФОС на гуморальный иммунный ответ, а карбоксима – снижало. При этом показатели Т-зависимого антителообразования оставались ниже контрольного уровня.

Снижение угнетения гуморального иммунного ответа под влиянием карбоксима связано с ослаблением токсического эффекта ФОС и возможно, восстановлением функции эстераз макрофагов, продуцирующих ИЛ-1, необходимый для синтеза плазмócитами IgM в Т-независимом антителообразовании [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Эффект атропина, возможно, связан с устранением активирующего влияния ацетилхолина на В-лимфоциты (в определенном диапазоне концентраций), а также с блокадой м-холинорецепторов В-лимфоцитов (плазмócитов). [Адо А.Д. и соавт., 1983, 1995; MacManus J.P. et al., 1975; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Maslinski W. et al., 1983, 1987].

Менее выраженное снижение Т-независимого антителообразования при действии ФОС по сравнению с Т-зависимой антителопродукцией вероятно, обусловлено возможным активирующим действием на В-лимфоциты ацетилхолина [Адо А.Д. и соавт., 1995] и отсутствием эффектов, связанных с инактивацией эстераз Т-клеток [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П.Ф. и соавт., 1993, 2005; Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977], поскольку Т-лимфоциты не участвуют в тимуснезависимой антителопродукции.

Преимущественное нарушение Т-зависимой антителопродукции под влиянием ФОС обусловлено, наряду с другими механизмами, действием токсикантов одновременно на макрофаги, В-лимфоциты и Т-клетки (в использованной нами экспериментальной модели на субпопуляцию лимфоцитов Th1-типа), участвующих в реализации данной иммунной реакции, в то время как тимуснезависимый иммунный ответ обеспечивается в основном функцией В-клеток, активируемых антигеном в присутствии ИЛ-1, секретируемом макрофагами [Gillbert K. M. et al., 1985]. Вполне естественно, что иммунотоксическое действие на три элемента, взаимодействующих в процессе антителообразования, проявляется значительно большим его угнетением, чем при поражении одного или двух элементов, если нет оснований предположить возможность реализации селективного иммунотоксического эффекта.

При математической обработке непараметрическими и параметрическими статистическими методами (путем вычисления средних значений супрессии при отравлении метафосом, хлорофосом и ДДВФ) установлено, что статистически значимо ( $p < 0,05$ ) по степени снижения параметров иммунного статуса ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ (средняя супрессия показателей ДДВФ была на  $32 \pm 3\%$  меньше, чем при действии метафоса).

При изучении механизмов действия ФОС на систему иммунитета на субклеточном уровне показано, что острое действие ФОС в продуктивной

фазе иммуногенеза в дозе, составляющей 0,75 DL<sub>50</sub>, в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. Под влиянием ФОС в крови концентрация ИФН- $\gamma$ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем концентрация ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками. Применение атропина сульфата при острой интоксикации ФОС увеличивало супрессию функции Th1- и Th2-лимфоцитов и синтеза ими соответственно ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 в равной степени, а использование карбоксима частично восстанавливало преимущественно активность Th1-клеток и синтез ИФН- $\gamma$  по сравнению с функцией Th2-лимфоцитов и продукцией ими ИЛ-4.

Уменьшение соотношения ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 под влиянием ФОС характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [Ройт А. и соавт., 2000]. Нами установлено, что при действии метафоса соотношение ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 было существенно ниже контрольного уровня ( $p < 0,05$ ) равного  $6,99 \pm 0,64$  и составляло в среднем  $5,18 \pm 0,26$  (при оценке на 5 и 8 сут). Это свидетельствует о более выраженной супрессии под влиянием ФОС функции Th1-лимфоцитов по сравнению со снижением активности Th2-клеток. Вероятно, данный эффект обусловлен способностью ФОС активировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, увеличивая в крови концентрацию кортикостерона [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Pruett S., 2008]. При этом известно, что данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000]. Возможно также, что ФОС способны ингибировать в большей степени ацетилхолинэстеразу на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа и  $\alpha$ -нафтил-AS-ацетатэстеразу и  $\alpha$ -нафтилбутиратэстеразу в цитозоле этих клеток, а также большей ролью эстераз в реализации функций лимфоцитов Th1-типа. Последнее предположение в определенной степени подтверждается способностью карбоксима в большей степени



восстанавливать функцию Th1-клеток (по сравнению с активностью Th2-лимфоцитов), так как среднее значение соотношения ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 существенно возрастало ( $p < 0,05$ ) с  $5,18 \pm 0,26$  (действие ФОС) до  $6,94 \pm 0,44$  (комбинированный эффект ФОС и карбоксима).

Увеличение редукции функции Т-клеток, участвующих в реализации различных иммунных реакций, атропином после отравления ФОС обусловлено суммацией супрессорных эффектов, связанных с ингибированием эстераз Т-лимфоцитов и одновременной блокадой м-холинорецепторов Th1- и Th2-клеток [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Карбоксим восстанавливает активность лимфоцитов Th1- и Th2-типа, вероятно, вследствие реактивации ацетилхолинэстеразы, локализованной на их клеточной мембране [Kutty K. M. et al., 1976].

Полученные данные позволяют полагать, что относительное увеличение активности Th2-лимфоцитов по сравнению с функцией Th1-клеток при отравлении ФОС (а также при лечении отравления ФОС атропином) может приводить к увеличению вероятности вирусных инфекций (по сравнению с микробными) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Asquith B., et al., 2007], а при использовании карбоксима возможность возникновения вирусных и микробных инфекционных заболеваний, по-видимому, одинакова.

Под влиянием ФОС, а также их комбинации с антидотами, существенно снижается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Установлено преимущественное поражение Т-клеток в эффекте кооперации при действии ФОС, а также при комбинации ФОС с атропином. Атропин усиливает редукцию кооперации Т- и В-лимфоцитов, а карбоксим – снижает только при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки.

Преимущественное поражение Т-клеток в эффекте кооперации, которое обусловлено действием ФОС на ацетилхолинэстеразу Т-лимфоцитов (см. разд. 5.3).

Атропин увеличивал супрессию кооперации лимфоцитов под влиянием ФОС, вероятно, вследствие блокады их м-холинореактивных структур лимфоцитов в сочетании с ингибированием эстераз Т-клеток [MacManus J.P. et al., 1975; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Эффект карбоксима, восстанавливающий кооперацию Т- и В-лимфоцитов, доказывает его реактивирующее действие на заблокированную ФОС ацетилхолинэстеразу Т-клеток.

Механизм редукции активности Т- и В-клеток в процессе их кооперации, может быть, связан с нарушением их функции как в результате прямого мембранотоксического эффекта ФОС, так и вследствие ингибирования ими тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Ротенберг Ю.С., 1982], уменьшения активации Т-клеток вследствие снижения продукции ИЛ-2 Th0-клетками [Хаитов Р.М. и соавт., 2002] и синтеза Th2-лимфоцитами ИЛ-4, приводящему к снижению активации В-лимфоцитов [Шуршалина А.В. и соавт., 2001].

Острая интоксикация метафосом и ДДВФ повышает концентрацию кортикостерона в плазме крови соответственно через 1 - 12 ч и через 1-3 ч, что обусловлено особенностями токсикокинетики этих ядов. Это связано с особенностью токсикодинамики применявшихся ФОС: метафос метаболизируется до более токсичного метаоксона («летальный синтез»), а ДДВФ биотрансформируется до нетоксичных соединений [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983; Филов В.А., 2002].

Атропин и карбоксим снижали концентрацию кортикостерона по сравнению с действием метафоса через 1-12 ч, при этом она существенно не отличалась от контроля через 24 ч. Выявлена выраженная отрицательная корреляция между иммунными реакциями и концентрацией кортикостерона в плазме крови.

Увеличение кортикостерона в крови под влиянием ФОС обусловлено реализацией общего адаптационного синдрома (увеличение продукции

адрено-кортикотропного гормона гипофизом) [Селье Г., 1972; Лемус В. Б., Давыдов В. В., 1974; Бирбин В.С., 2003; Dhabhar F.S. et al., 1996; Stephen B. P. et al., 2003; Pruettt S., 2008].

Острое отравление ФОС вызывает существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах, а применение карбоксима увеличивало исследуемый показатель. При этом активность ацетилхолинэстеразы в Т-клетках статистически значимо не отличалась от контрольного значения. Установлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями и активностью ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах.

Ингибирование ацетилхолинэстеразы ФОС имеет существенное значение в формировании постинтоксикационного иммунодефицитного состояния. При этом Т-лимфоциты, возможно, существенно утрачивают свои функции, что приводит к редукции Т-зависимого гуморального иммунного ответа, снижению цитотоксической активности Т-клеток, функции К-клеток и ЕКК, содержащих данный фермент [Ройт А.и соавт., 2000; Voix E., Nogues M.V., 2007; Tomoiu A. et al. 2007].

Данные литературы свидетельствуют, что ФОС тормозят активность эстераз в моноцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, интактных и активированных лимфокинами ЕКК. ФОС ослабляют эффекторные функции, опосредуемые данными видами клеток. Развитие лимфомы часто связано с присутствием вируса Эпштейна-Барра и человеческого герпесвируса-6, иммунитет к которым зависит от функции моноцитов, Т-лимфоцитов и ЕКК. Существуют основания считать, что торможение активности эстераз иммунокомпетентных клеток, вызываемое ФОС, ослабляет процесс, так называемой, эстеразозависимой детоксикации, в результате чего способствует развитию процесса лимфомогенеза. Кроме того, снижение активности эстераз подавляет иммунитет к патогенам,

способствующим развитию лимфом (герпесвирусам) [Newcombe D.S., 1991; Asquith B. et al. 2007].

Острая интоксикация ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином приводит к инициации ПОЛ, что проявляется снижением активности показателей антиоксидантной системы (редукция каталазы и пероксидазы) и увеличением содержания малонового альдегида и суммарной продукции радикалов в плазме крови. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на ПОЛ, а применение карбоксима после отравления ФОС существенно снижало инициацию ПОЛ. Выявлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии ФОС (и ФОС в комбинации с антидотами) и показателями антиоксидантной системы. Кроме того, выявлена отрицательная корреляция между иммунными реакциями и продуктами ПОЛ, что свидетельствует о том, что инициация ПОЛ под влиянием ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином является одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Повреждающий эффект ПОЛ в отношении иммунокомпетентных клеток реализуется вследствие изменения функциональных свойств белков, входящих в состав мембран и мембраносвязанных ферментов и рецепторов, от их активации до полного ингибирования. Это может быть связано с изменением состава фосфолипидных мембран ИКК, с прямым окислением SH-групп в активных центрах мембраносвязанных ферментов, с образованием внутри- и межмолекулярных "сшивок". Гидроперекиси липидов способны также трансформировать активность ряда ферментов, например, моноаминооксидазы с моноаминов на другие амины, а малоновый диальдегид может образовывать ковалентные связи со многими амидами иммунцитов [Плужников Н.Н. и соавт., 2003; Hageman J.J. et al., 1992; Urban T. et al., 1995; Knight J.A., 1995; Jaeschke H., 1995; Ibuki Y., Goto R., 1997; Iamele L. et al., 2002].

Весьма высокотоксичным и относительно стабильным является супероксидный анион. Он взаимодействует с молекулами белка, липопротеидов, вызывает разрыв спиралей ДНК, окисление тиоловых групп, инициирует ПОЛ, вызывая структурные нарушения биологических мембран иммуноцитов и других клеток [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Арчаков А.И., 1993]. С прямым или опосредованным через другие активные формы кислорода действием супероксидного аниона связывают мутагенные и канцерогенные эффекты, а также нарушение многочисленных функций иммунитета [Арчаков А.И., 1993; Плужников Н.Н. и соавт., 2003; Куценко С.А., 2004; Hageman J.J. et al., 1992; Urban T. et al., 1995; Knight J.A., 1995; Jaeschke H., 1995; Ibuki Y., Goto R., 1997; Iamele L. et al., 2002]. Первичным объектом такого прооксидантного действия ФОС и их метаболитов могут являться ненасыщенные жирные кислоты внутриклеточных мембран (олеиновая, линолевая, линолиновая, арахидоновая), которые в свою очередь образуют свободный радикал как результат акта одноэлектронного окисления (отрыв атома водорода от реагирующей цепи). Образуются радикалы ( $RO^+_2$ ) и гидроперекиси ( $ROOH$ ) жирных кислот, что приводит к структурной и функциональной перестройке мембран. В результате увеличивается проницаемость мембран для ионов  $H^+$ ,  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  с последующим пространственным разобщением окислительных цепей. [Меерсон Ф.З., 1984; Плужников Н.Н. и соавт., 2003]. Наконец, разрывается мембрана с выходом внутриклеточных протеолитических ферментов, и клетка погибает [Плужников Е.А., 1999; Ibuki Y., Goto R., 1997; Urban T., et al., 1995]. На наш взгляд, это в полной мере можно отнести и к лимфоцитам.

Весь механизм пероксидации липидов как цепной реакции, однажды индуцированной, является неспецифическим. Это обычный, стандартный путь повреждения внутриклеточных мембран, которым завершается любая патология, любое острое отравление ксенобиотиками, ведущая к истощению антиоксидантных систем организма [Ibuki Y., Goto R., 1997]. .

Данные литературы позволят считать, что стресс-реакция, приводящая к повышению уровня кортикостероидов [Pruett S., 2008] и катехоламинов в крови под влиянием ФОС, может являться одним из факторов, инициирующим ПОЛ [Валеева И.Х. и соавт., 2002]. Показана, в частности, активация ПОЛ при гипоксической гипоксии [Зарубина И.В., Миронова О.П., 2002]. Следует отметить, что вследствие поражения дыхательной системы все исследованные ФОС вызывают этот вид гипоксии [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000].

Полученные данные свидетельствуют о том, что преимущественное поражение ФОС (ФОС в комбинации с антидотами) функции Th1-лимфоцитов, редукция кооперации Т- и В-лимфоцитов, увеличение в крови кортикостерона, инактивация ацетилхолинэстеразы Т-клеток, активация ПОЛ являются факторами, приводящими к формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния. Антидоты при отравлении ФОС вызывают в зависимости от исследованных показателей различное по направленности и выраженности их изменение, либо не влияют на них. Атропин приводит к усилению иммунотоксических эффектов ФОС вследствие увеличения редукции кооперации Т- и В-клеток и синтеза цитокинов ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4, а карбоксим снижает эти эффекты в результате реактивации ацетилхолинэстеразы Т-клеток и увеличения синтеза ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4, а также редукции ПОЛ.

При изучении возможностей коррекции нарушений факторов НРО и иммунного гомеостаза после острого действия ФОС в комбинации с антидотами нами установлено, что в зависимости от характера метаболизма ФОС (образующихся при их биотрансформации продуктов) цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы могут повышать или снижать их иммунотоксичность. Использование индукторов монооксигеназной системы фенobarбитала и бензонала перорально в течение трех суток в дозах соответственно 50 и 70 мг/кг до острого отравления животных хлорофосом, метаболизирующимся в организме до высокотоксичного соединения ДДВФ,

вызывает увеличение его иммунотоксических свойств. Применение индукторов цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ до острой интоксикации ядами, в частности, ДДВФ, которые биотрансформируются в организме до малотоксичных или нетоксичных веществ существенно уменьшают их супрессирующее действие на показатели системы иммунитета.

В порядке снижения эффекта ФОС располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Независимо от токсичности и токсикокинетики комбинация ФОС с атропином увеличивают супрессию показателей и частично снижают их при назначении карбоксима. При этом карбоксим не восстанавливает ФМАН и иммунные реакции до контрольного уровня.

Полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ФОС в дозе 1,0 DL<sub>50</sub> (и ФОС в комбинации с антидотами) достигается применением полиоксидония, который увеличивает секрецию ИФН $\gamma$  и ИЛ-4 соответственно Th1- и Th2-клетками. Имунофан восстанавливает практически до контрольных значений все основные показатели системы иммунитета, за исключением ФМАН.

В целом эффективность полиоксидония несущественно превышала стимулирующий эффект имунофана. Так, в среднем имунофан увеличивал исследованные показатели в  $1,89 \pm 0,17$  раза по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС (и ФОС в комбинации с антидотами), а полиоксидоний – в  $2,20 \pm 0,20$  раза.

Применение полиоксидония после поступления больных в стационар с отравлением ФОС средней степени тяжести в условиях применения атропина и карбоксима восстанавливало практически все показатели иммунного статуса на 10 сут. Результаты клинических наблюдений подтверждают полученные экспериментальные данные.

При Т-зависимом антителообразовании действие имунофана и полиоксидония, вероятно, реализуется путем активации процесса кооперации макрофагов, Т-клеток и В-лимфоцитов,

антителопродуцирующих В-клеток, функции Th1-лимфоцитов, секретирующих  $\gamma$ -интерферон,  $\beta$ -фактор некроза опухоли (лимфотоксин), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), и Th2-клеток, продуцирующих ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ГМ-КСФ [Ройт А., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; ; Kimber I., 1996].

Доказанная нами возможность восстановления иммунофаном и полиоксидонием основных показателей гуморального и клеточного иммунитета дает основания предполагать, что механизм их действия может быть связан с неспецифической стимуляцией функций клеток организма, способных к пролиферации, а также со способностью полиоксидония стимулировать секрецию цитокинов Т-клетками. Иммуностимулирующие свойства иммунофана и полиоксидония обусловлены как активацией зрелых лимфоцитов, так и полипотентных стволовых кроветворных клеток [Лебедев В.В. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003]. Этот механизм, вероятно, при действии иммунофана обеспечивается стимуляцией синтеза энзимов и других белков вследствие активации иммуностимуляторами циклического аденозинмонофосфата, РНК-полимеразы, синтеза ДНК [Белокрылов Г.А. и соавт., 1999б].

Полиоксидоний, вероятно, стимулирует В-клетки (плазмоциты), синтезирующие IgM (в использованном тесте), а также ЕКК после интоксикации ФОС в комбинации с антидотами вследствие способности активировать выработку  $\gamma$ -интерферона Th1-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000]. Этот лимфокин активирует ЕКК и восстанавливает постинтоксикационное нарушение их функции, а также индуцирует экспрессию рецепторов ИЛ-2 на их поверхности [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Полиоксидоний, вероятно, как и иммунофан активируют Th1-лимфоциты, Th1-клетки памяти и макрофаги вследствие увеличения



активности РНК-полимеразы и синтеза ДНК лимфоцитов [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2000, 2002].

Таким образом, острая интоксикация ФОС в эквивалентных дозах в порядке уменьшения факторов НРО и системы иммунитета располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. В целом максимальная редукция параметров при эквивалентных дозах по длительности эффекта отмечается при интоксикации метафосом, а минимальная – после острого отравления ДДВФ. ФОС в комбинации с их антидотами атропином и карбоксимом вызывает супрессию факторов НРО, гуморальных и клеточных иммунных реакций. Атропин усиливает редуцирующее действие ФОС, а карбоксим – уменьшает. Факторами, приводящими к формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния при действии ФОС (ФОС в комбинации с антидотами), являются преимущественное поражение функции Th1-лимфоцитов, редукция кооперации Т- и В-лимфоцитов, увеличение в крови кортикостерона, инактивация ацетилхолинэстеразы Т-клеток, активация ПОЛ. В зависимости от характера метаболизма ФОС (образующихся при их биотрансформации продуктов) индукторы цитохром Р-450-зависимых монооксигеназы могут повышать или снижать их иммунотоксичность. Полное восстановление показателей иммунного статуса и концентрации в крови ИФН $\gamma$  и ИЛ-4 после острого отравления ФОС в комбинации с антидотами достигается применением полиоксидония. Эффективность полиоксидония доказана клинически при отравлении ФОС. Имунофан восстанавливает практически до контрольных значений все основные показатели системы иммунитета, за исключением ФМАН.

После хронической интоксикации ФОС (российский VX, зарин) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL<sub>50</sub> (по 0,01 DL<sub>50</sub> ежедневно) снижается фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов. При хроническом отравлении ФОС снижается функция моноцитарно-фагоцитарной системы вследствие стимуляции nAChR

ацетилхолином, что проявляется уменьшением концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6.

Характер изменений ФМАН, сходный с действием ФОВ, был обнаружен в экспериментах с пероральным отравлением дихлоэтаном [Давыдова Е.В. и др., 1995]. При обследовании пациентов с отравлениями суррогатами алкоголя [Романенко О.И., Гребенюк А.Н., 1997; Сосюкин А.Е. и соавт., 1997] изменения ФМАН были менее выражены. Несмотря на различные специфические механизмы действия ядов, проявление их токсичности на уровне нейтрофилов весьма сходно [Гребенюк А.Н., Романенко О.И., 1996; Агапов В.И. и соавт., 2004]. Это подтверждается и в проведенных нами опытах.

Данные, полученные в НСТ-тесте, свидетельствуют, что воздействие ФОВ на ФМАН реализуется вследствие взаимодействия токсикантов и их метаболитов с НАДФ $\cdot$ Н, НАДФ $^+$ . Это подтверждают данные литературы, полученные при исследовании других групп ядов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Действие ФОС и их метаболитов может быть также связано с ингибированием ФАД $^+$ , ФАД $\cdot$ Н, восстановленным и окисленным убихиноном и цитохромом  $b_{245}$  лейкоцитов или иными механизмами нарушения функционирования НАДФ $\cdot$ Н-оксидазного комплекса нейтрофилов. Кроме кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитоза ФОС и продукты их биотрансформации, вероятно, поражают и кислороднезависимые микробицидные системы фагоцитов [Гребенюк А.Н. и соавт., 1998]. Это доказано в опытах Е.В. Давыдовой и соавт. (2004а, 2004б), результаты которых свидетельствуют о снижении внутриклеточного содержания катионных белков в нейтрофилах крыс после острой интоксикации дихлорэтаном в дозе 1,0 ЛД $_{50}$ .

Существенное значение в угнетении ФМАН может иметь дисфункция гипоталамо-гипофизарной системы под влиянием ФОВ [Pruett S., 2008], приводящая к изменению чувствительности микро- и макрофагов к микроорганизмам, в результате чего угнетается их цитотоксичность [Брюхин

Г. В., Михайлова Г. И., 1990; Гребенюк А.Н. и соавт., 1998]. Так, показано, что глюкокортикоиды и катехоламины снижают суммарную фагоцитарную активность фагоцитов крыс, причем существенную роль в данном феномене играют адреналин [Шилов Ю.И., 2001]. Кроме того, нарушение активности ФМАН может быть связано с мембранотоксическим действием ФОС, инициацией ПОЛ мембран нейтрофилов, их взаимодействием с сульфгидрильными, гидроксидными и другими группами мембран фагоцитов, нарушением функции ферментов тканевого дыхания митохондрий нейтрофилов [Ротенберг Ю.С., 1982; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2002, 2007]. Не исключено ингибирование эстераз нейтрофилов ФОС [Забродский П. Ф., 1996, 2002; Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007; Li C. G. et al., 1973].

Уменьшение продукции провоспалительных цитокинов нейтрофилами, моноцитами, макрофагами (и, в меньшей степени, другими клетками иммунной системы) происходит вследствие реализации под влиянием холинергической стимуляции холинергического противовоспалительного пути (механизма) - «cholinergic anti-inflammatory pathway» (активация ацетилхолином н-холинорецепторов  $\alpha 7nAChR$ ) [Забродский П.Ф., 2010; Kessler W. et al., 2006; Oke S.L., Tracey K.J., 2008; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009].

При хроническом воздействии ФОВ возможна реализация холинергического противовоспалительного пути (механизма) - «cholinergic anti-inflammatory pathway» [Забродский П.Ф., 1987; Kessler W. et al., 2006; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009]. Этот механизм включает взаимодействие следующих элементов: м-холинорецепторы (mAChR) головного мозга (вероятно, дорсального вегетативного ядра n. vagus продолговатого мозга), модулирующие иммунорегуляторную функцию блуждающего нерва; эфферентные волокна n. vagus; ацетилхолин; н-холинорецепторы – nAChR – (в частности,  $\alpha 7nAChR$ ) клеток моноцитарно-фагоцитарной системы (МФС); система, так называемой, киназы Януса (JAK2); фактор

транскрипции STAT3 («signal transducer and activator of transcription 3»); транскрипционный фактор NF-κB (фактор транскрипции, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла); провоспалительные цитокины (фактор некроза опухоли-α - ФНОα, высокомолекулярной группы протеин B1 - HMGB1, макрофагально-воспалительный протеин-2 - MIP-2, интерлейкины ИЛ-1β, ИЛ-6) [Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V. A., 2007; Pavlov V.A., 2008].

Вероятно, при интоксикации ФОС происходит не только редукция синтеза провоспалительных цитокинов происходит в результате механизмов связанных с «cholinergic anti-inflammatory pathway». Известно, что возбуждение ацетилхолином mAChR нейтрофилов приводит к увеличению их фагоцитарно-метаболической активности [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Существуют основания полагать, что при интоксикации ФОВ состояние ФМАН определяют многочисленные эффекты, ряд которых разнонаправлены (например, активация mAChR и α7nAChR нейтрофилов) [Забродский П.Ф., 2010;].

Интересно отметить, что снижение синтеза провоспалительных цитокинов при холинергической стимуляции, в частности, под влиянием ФОС, может приводить к снижению летальности животных в ранней стадии сепсиса [Забродский П.Ф., 1987; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007, Забродский П.Ф., 2010; Su X. et al., 2010].

Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови, а иммунофан и полиоксидоний - практически полностью.

Эффект Т-активина обусловлен его способностью повышать активность В-звена иммунитета [Имантаева Г.М., 2005], активировать макрофаги [Большаков и соавт., 1991], представляющие антиген Т-клеткам, выработку ИФγ Th1-лимфоцитами [Ханафиева И.В. и соавт., 1992; Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993], который стимулирует синтез IgM плазмócитами,

увеличивать пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность Т-клеток [Стасий Е.Д. и соавт., 1990; Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф., 1991].

Иммуностимулирующее действие имунофана при хронической интоксикации этанолом обусловлено его иммунорегулирующим, детоксикационным, инактивацией свободнорадикальных процессов ПОЛ [Лебедев В.В. и соавт., 1999, 2000]. При этом достигается коррекция иммунной и окислительно-антиокислительной систем организма.

Эффект полиоксидония обусловлен его иммуностимулирующим действием в отношении Т-, В-лимфоцитов, плазматических клеток и других клеток иммунной системы, а также его антиоксидантными, детоксикационными и мембраностабилизирующими свойствами [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

После хронического действия ФОВ в дозе 0,01 ЛД<sub>50</sub> в течение 30 сут происходит снижение активности лизоцима сыворотки крови.

Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало активность лизоцима сыворотки крови крыс, сниженную под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний восстанавливал показатель полностью.

Использование показателя лизоцимной активности для оценки неблагоприятного действия химических факторов на организм свидетельствуют о высокой чувствительности данного теста [Бухарин О. В. и соавт., 1985; Агапов В.И. и соавт., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Как правило, химические соединения вызывают снижение лизоцимной активности сыворотки крови [Агапов В.И. и соавт., 2004; Василенко О.А., 2004; Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Однако свидетельством отрицательного воздействия ксенобиотиков на организм может являться также и кратковременное повышение содержания лизоцима в крови [Барштейн Ю. А. В. и соавт., 1991].

Редукция активности лизоцима под влиянием ФОВ, вероятно, связана с ингибированием эстераз клеток крови токсикантами [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Нельзя исключить и того, что редукция синтеза лизоцима может происходить также вследствие воздействия ФОВ и продуктов их биотрансформации на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

После хронического действия ФОВ в дозе 0,01 ЛД<sub>50</sub> в течение 30 сут происходит снижение активности ТБК сыворотки крови. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ не восстанавливало сывороточную активность ТБК, сниженную под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний увеличивали показатель до контрольного значения.

Снижение сывороточной активности ТКБ может быть связано с действием ФОВ на его синтез и выделение тромбоцитами [Бухарин О.В., 1974, 1985; Забродский П.Ф., 1999; 2002; Сидельникова Н.М., 2004]. Механизм супрессии активности ТКБ ( $\beta$ -лизина), видимо, обусловлен нарушением функции тромбоцитов в результате взаимодействия с эстеразами тромбоцитов ФОВ, ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [Ротенберг Ю.С., 1980; 1982; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф., 2002], инициацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2004а, 2004б; Василенко О.А., 2004]. Нарушение продукции ТКБ, вероятно, наряду с действием ФОВ на клеточном уровне может быть обусловлено изменением активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) [Бухарин О.В. и соавт., 1974, 1998; Забродский П.Ф., 2002].

Таким образом, хроническая интоксикация ФОВ вызывает супрессию факторов НРО, уменьшает функцию моноцитарно-фагоцитарной системы вследствие стимуляции н-холинорецепторов ацетилхолином, что проявляется

уменьшением концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6.

## ВЫВОДЫ

1. Острое отравление ФОС в эквивалентных дозах в порядке уменьшения факторов неспецифической резистентности организма и иммунного ответа располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ, что обусловлено классом их токсичности и особенностями их метаболизма.

2. Острое действие ФОС в дозе  $0,75 \text{ DL}_{50}$  приводит к снижению активности лизоцима, тромбоцитарного катионного белка в сыворотке крови сыворотки крови, фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов. При терапии поражения ФОС атропином сульфатом ( $20 \text{ мг/кг}$ ) отмечалась более выраженная супрессия показателей, а при назначении карбоксима ( $20 \text{ мг/кг}$ ) существенно снижалась их редукция, оставаясь ниже контрольных значений.

3. После острого воздействия ФОС в дозе  $0,75 \text{ DL}_{50}$  на 2 сут уменьшалось число лимфоцитов в тимусе и селезенке, увеличиваясь в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови. Атропин существенно снижал редукцию содержания лимфоцитов в тимусе, вызванную ФОС, и оказывал противоположный эффект на число лимфоцитов в селезенке, усиливая супрессирующий ФОС. Карбоксим восстанавливал содержание лимфоцитов в тимусе и селезенке. Атропин и карбоксим практически полностью восстанавливали содержание лимфоцитов в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови.

4. Острая интоксикация ФОС и их комбинированный эффект с атропином приводит к редукции функции Th1-клеток, антителозависимой клеточной цитотоксичности, активности естественных клеток-киллеров. При терапии отравления атропином отмечается более выраженное снижение клеточных иммунных реакций, а карбоксимом - частичное их восстановление.



5. Под влиянием острой интоксикации антихолинэстеразными веществами происходит супрессия Т-зависимого и Т-независимого антителообразования, отражающего синтез IgM, а также антителопродукции, характеризующей синтез IgG. Применение атропина существенно увеличивало редуцирующее действие ФОС на гуморальный иммунный ответ, а карбоксима – частично снижало.

6. Острое действие ФОС в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. При этом применение атропина увеличивало супрессию функции Th1- и Th2-лимфоцитов и редукцию синтеза ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 в равной степени, а использование карбоксима частично восстанавливало преимущественно активность Th1-клеток и синтез ИФН- $\gamma$ . Длительность повышения концентрации кортикостерона в крови под влиянием ФОС зависит от особенностей их токсикокинетики. Атропин и карбоксим снижали концентрацию кортикостерона в крови; атропин усиливал редукцию кооперации Т- и В-лимфоцитов, практически не влиял на супрессию активности ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов и инициацию ПОЛ, а использование карбоксима незначительно восстанавливало данные параметры.

7. Индукторы монооксигеназной системы в зависимости от особенностей токсикокинетики ФОС (образование высокотоксичных или малотоксичных метаболитов) вызывает увеличение или снижение их иммунотоксических свойств. Полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ФОС в дозе 1,0 DL<sub>50</sub> (и ФОС в комбинации с антидотами) достигается применением полиоксидония, который увеличивает секрецию ИФН $\gamma$  и ИЛ-4. Эффективность полиоксидония доказана клинически при отравлении ФОС.

8. Хроническая интоксикация ФОВ (российский VX и зарин в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL<sub>50</sub>, по 0,01 DL<sub>50</sub> ежедневно) существенно снижает фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов

вследствие стимуляции их н-холинорецепторов ацетилхолином, уменьшала концентрацию в крови провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливает фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови, а имунофан и полиоксидоний - практически полностью.

## ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В экспериментах на животных наиболее информативными показателями для оценки иммуносупрессивных эффектов ФОС являются тесты, характеризующие фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов, Т-зависимое антителообразование, активность Th1-клеток, кооперацию Т- и В-клеток, содержание цитокинов и ПОЛ.

2. После острого отравления ФОС, несмотря на применение антидотов, из которых атропин способен усиливать редукцию антихолинэстеразными ядами иммунных реакций), возникает супрессия показателей системы иммунитета, требующая применения фармакологических средств для ее устранения с целью профилактики и лечения возможных инфекционных осложнений и заболеваний.

3. Относительное снижение активности Th1-лимфоцитов по сравнению с функцией Th2-клеток при отравлении ФОС (а также при лечении отравления ФОС атропином и карбоксимом) может приводить к увеличению вероятности вирусных инфекций по сравнению с микробными).

4. После острого отравления ФОС в комбинации со средствами специфической терапии для восстановления иммунных реакций целесообразно применять иммуномодулятор полиоксидоний.

5. После хронического отравления ФОС для восстановления показателей НРО целесообразно применять иммуномодуляторы. В целом по степени эффективности иммуностимулирующего эффекта в порядке его увеличения иммуномодуляторы располагаются в последовательности: Т-активин, имунофан, полиоксидоний.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов В.В. Влияние ацетилхолина на синтез IgG и пролиферацию лимфоцитов в культуре мононуклеаров, выделенных от больных ревматоидным артритом, раком молочной железы и здоровых доноров / В.В. Абрамов, В.С.Ширинский, В.П. Лозовой // Иммунология.- 1986.-N 6.- С. 83-86.
2. Абдрашидова Н.Ф. Состояние эритроцитарной системы и ПОЛ-окислительной активности у больных хроническим бронхитом, вдыхавших и не вдыхавших озон / Н.Ф.Абдрашидова, Ю.А. Романов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.132, №9. – С. 317-319.
3. Агапов В.И. Изменение неспецифической и иммунологической резистентности при остром отравлении норборнаном / В.И.Агапов, В.Д. Гладких, В.В. Кирьянов // Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты – СПб.: ООО «Изд. Фолиант», 2004.- С. 74-75.
4. Адо А.Д. Ацетилхолининдуцированная подвижность лимфоцитов интактных и сенсibilизированных мышей / А.Д. Адо, М.М. Гольдштейн, В.И. Донцов //Бюл. эксперим. биологии и медицины.-1983.-N 4, -С. 66-67.
5. Адо А.Д. Некоторые вопросы нервной регуляции иммунных и аллергических реакций (об отношении холиновых и антигенсвязывающих рецепторов / А.Д. Адо // Эксперим. и клин. фармакология.-1995.- N 3.-С.43-45.
6. Александров В.Н. Гуморальный иммунный ответ после травмы различной тяжести / В.Н. Александров // Пат. физиол. и эксперим. терапия. – 1983. - №4. – с. 70-72.
7. Алимова М.Т. Влияние пестицидов на антителообразование и иммунорегуляторные показатели лимфоцитов у мышей / М.Т. Алимова, А.В. Маджидов, Т.У. Арипова // Иммунология.-1991.- №2.-С. 33-34.

8. Ананченко В.Г. Влияние фосфорорганических пестицидов на систему иммунитета при острых пероральных отравлениях/ Ананченко В.Г., Лужников Е.А., Алехин Ю.Д. // Сов. мед.-1987.-N 3.-С. 106-108.
9. Арипова Т. У., Маджидов А. В., Алибекова М.Г. Влияние пестицидов на продукцию интерлейкина-2 / Т.У. Арипова, А.В. Маджидов, М.Г. Алибекова // Иммунология.-1991.-N 2.-С. 67-68.
10. Арчаков А.И. Оксигенация биологических мембран / А.И. Арчаков— М.: Медицина, 1993.- 234 с.
11. Бажигитова Б.Б. Динамика иммунологических показателей у больных с частыми повторными заболеваниями респираторного тракта в результате применения имунофана / Б.Б. Бажигитова., А.А. Шортанбаев // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. - 2003. - Т.5.- №2. – С. 205.
12. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта: 2-е изд. / М.Л. Беленький. – Л.: Медицина, 1963. – 235 с.
13. Беликов В.Г. Коррекция тимогеном нарушений физиологических механизмов регуляции иммуногенеза при остром отравлении токсичными химическими веществами/ В.Г. Беликов // Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СГМУ. -2001.- 149 с.
14. Белокрылов Г.А. Лизосомально-катионный тест и тест восстановления НСТ лишь частично отражают степень завершенности фагоцитарного процесса в гранулоцитах человека / Г.А. Белокрылов, О.Я. Попова // Бюл. эксперим. биол. и мед.-1999-Т.133, № 1.-С. 75-77.
15. Бирбин В.С. Нарушение иммунного гомеостаза при сочетанном действии ядов общетоксического действия (нитрилов) и механической травмы и его коррекция (экспериментальное исследование) / В.С. Бирбин // Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СГМУ. -2003.- 173 с.
16. Брюхин Г.В. Интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа у потомства крыс с хроническими поражениями печени /

Г.В.Брюхин, Г.И. Михайлова // Физиол. журн.-Киев.-1990.-Т 36.-№6.- с. 94-100.

17. Бурмистров С.О. Нарушение активности свободнорадикальных процессов в ткани яичников и мозга крыс при хронической ингаляции толуолом и диоксином / С.О. Бурмистров, А.В. Арутюнян, М.Г. Степанов // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.132, №9. – С. 257-262.

18. Бухарин О.В. Способность микроорганизмов к инаktivации бактерицидного действия тромбоцитарного катионного белка ( $\beta$ -лизина) / О.В. Бухарин, К.Г. Сулейманов, О.Л. Чернова // Бюл. экспер. биол. и мед.-1998.-№7.-С. 66-67.

19. Валеева И.Х. Влияние димесфосфона и ксидифона на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крыс, длительно получавших преднизолон/ И.Х. Валеева, Л.Е. Зиганшина, З.А. Бурнашова //Эксперим. и клин. фармакология.- 2002.- Т.65, N 2.-С. 40-43.

20. Василенко О.А. Характер и механизмы нарушений неспецифической резистентности организма и специфической иммунной защиты при остром отравлении арсенитами/ О.А. Василенко // Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СВРХБЗ. -2004.- 165 с.

21. Венгеровский А.И. Эффективность ферментиндуцирующих средств при экспериментальном поражении печени тетрахлорметаном/ А.И. Венгеровский, И.М. Седых, А.С. Саратиков // Эксперим. и клин. фармакол.-1993.-Т.56, № 5.-С. 47-49

22. Гембицкий Е.В. Оценка иммунного статуса организма в лечебных учреждениях Советской Армии и Военно-Морского Флота/ Метод. Пособ / Е.В. Гембицкий, Л.А. Кожемякин, А.М. Королук.- 1987.- М.: Изд-во ЦВМУ МО СССР. – С.24-25.

23. Германчук В.Г. Нарушения регуляции физиологических механизмов иммуногенеза при остром отравлении нитрилами/ В.Г. Германчук // Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СВРХБЗ. -2000.- 121 с.

24. Голиков С.Н. Профилактика и терапия отравлений фосфорорганическими инсектицидами / С.Н. Голиков. – М., 1968. – 168 с.
25. Голиков С.Н. Общие механизмы токсического действия/ АМН СССР / С.Н. Голиков, И.В.Саноцкий, Л.А. Тиунов - Л.: Медицина, 1986. –280 с.
26. Гордиенко С.М. Нерадиометрические методы оценки естественной цитотоксичности на эритроцитарные клетки-мишени/ С.М. Гордиенко // Иммунология.-1984.-№1.-с. 31-36.
27. Горизонтов П. Д. Система крови как основа резистентности и адаптации организма / П.Д. Горизонтов // Физиол. журн. – Киев.- 1981а.-Т 27.-№3.-с. 317-321.
28. Горизонтов П. Д. Стресс. Система крови в механизме гомеостаза. Стресс и болезни Горизонтов П. Д. // Гомеостаз. – М.:Медицина, 1981б.- С. 538-573.
29. Гребенюк А.Н. Общие механизмы иммуноцитологических реакций при химических воздействиях / А.Н. Гребенюк, О.И. Романенко // Сб. материалов XIII научн. докл. молодых ученых и специалистов военно-медицинской академии.- СПб., 1996.- С. 21-22.
30. Гребенюк А.Н. Нейтрофил и экстремальные воздействия / Под ред. А.Н. Гребенюка и В.Г. Бовтюшко / А.Н.Гребенюк, А.Е. Антушевич, В.Ф. Беженарь. –СПб., 1998.- 215 с.
31. Гублер Е.В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов / Е. В. Гублер. – Л.: Медицина, 1978.-296 с.
32. Гущин Н.В. Активность ацетилхолинэстеразы лимфоцитов крыс при интоксикации пестицидами / Н.В. Гущин, Д.С. Хайдарова, Л.И. Кугушева // Бюл. эксперим. биол. и мед.-1991.-Т. 111, № 2.-С. 144-146.
33. Давыдов В.В. Флюорометрическое определение неконъюгированных 11-оксикортикостероидов в биологических средах организма / В.В. Давыдов // Патофизиология экстремальных состояний. Труды ВМА им. С.М. Кирова, т. 189.- Л.: ВмедА, 1970. С.- 85-86.

34. Давыдова Е.В. Состояние нейтрофилов периферической крови в условиях острых воздействий токсикантов различных групп / Е.В. Давыдова, С.М. Алексеев, Е.Ю. Бонитенко // Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты – СПб.: ООО «Изд. Фолиант», 2004а.- С. 74-75.

35. Давыдова Е.В. Лейкоцитарная защита при острых отравлениях липофильными ксенобиотиками / Е.В. Давыдова, Е.Ю. Бонитенко, О.А. Романенко // Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты – СПб.: ООО «Изд. Фолиант», 2004б.- С. 75-77.

36. Давыдова Е.В. Состояние лейкоцитарной защиты при экспериментальных отравлениях карбофосом и дихлорэтаном / Е.В. Давыдова, О.И. Романенко, В.В. Шилов // Актуальные проблемы теоретической и прикладной токсикологии: Тез. Докл. 1 Всероссийской конференции токсикологов.- СПб, 1995.- С. 44.

37. Денисенко П.П. Роль холинореактивных систем в регуляторных процессах / П.П. Денисенко - М: Медицина.-1980.-С. 296.

38. Диксон М. Ферменты / Пер. с англ. / М. Диксон, Э. Уэбб - М.: Мир, 1982.-Т 2. - 806 с.

39. Диноева С.К. Динамика изменений иммунной структуры лимфатических фолликулов селезенки при интоксикации пестицидами / С.К. Диноева // Гигиена и санитария.-1974.-N 3.-С. 85-87.

40. Елизарова Н.Л. Опиоиды в составе тактивина:  $\beta$ -эндорфин/ Н.Л. Елизарова., В.Я. Арион, И.В. Зимина // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 2. - С. 204.

41. Жамсаранова С.Д. Оценка функциональной активности макрофагов при воздействии карбофоса и 2,4 Д/ С.Д. Жамсаранова, С.Н. Лебедева, В.А. Ляшенко // Сборник науч. трудов ВНИИ гигиены и пестицидов, полимеров и пласт. масс.-1988.- № 18.-С. 143-147.

42. Жамсаранова С.Д. Использование показателей иммунной системы организма животных при оценке пороговых доз пестицидов/ С.Д.



Жамсаранова, Э.С. Миронова, З.Д. Сергеева // Гигиена и санитария.-1990.-№ 2.-С. 75-76.

43. Жданов В.В. Механизмы кроветворения у бестимусных крыс/ В.В. Жданов, Т.А. Лукьянова, Е.В. Кириенкова // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2002. – Т.133, №5. – С. 522-524.

44. Жминько П.Г. Роль иммунных комплексов в патогенезе нейротоксического действия фосфорорганического пестицида афоса / П.Г. Жминько // Проблемы экологии и пути их решения: Материалы научно-практич. конф. АН УССР и ВАПВОСВ. – Киев, Издание АН УССР, 1991.-С. 42-43.

45. Жуков В.Е. Токсикологическая характеристика комбинированного действия иприта и люизита / В.Е. Жуков, В.В. Клаучек, П.Е. Шкодич // Токсикол. вестник.-2002.-№5.- С. 31-35.

46. Забродский П.Ф. Иммуотропные свойства ацетилхолинэстеразных веществ // Проблемы охраны здоровья населения и защиты окружающей среды от химических вредных факторов. Тез. докл. I Всес. съезда токсикологов. - Ростов н/Д, 1986.-С. 342-343.

47. Забродский П.Ф. Влияние армина на факторы неспецифической резистентности организма и первичный гуморальный ответ // Фармакол. и токсикол. – 1987.- Т 49.-№2.-С. 57-60.

48. Забродский П.Ф. Стимуляция антителообразования, К-клеток и функции макрофагов комбинированным применением активаторов циклических нуклеотидов и бензодиазепиновых рецепторов // Иммунология.- 1991.-№ 5.-С. 40-42.

49. Забродский П.Ф. Фармакологическая регуляция активности нейтрофилов холинотропными препаратами, барбитуратами и феназепамом // Эксперим. и клин. фармакология.-1992.-Т. 55, № 6.-С. 31-33.

50. Забродский П. Ф. Механизмы иммуотропных эффектов фосфорорганических соединений // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1993. - Т 116, № 8. - С. 181 -183.

51. Забродский П.Ф. Влияние антидотных препаратов на иммунные реакции при острой интоксикации диметилдихлорвинилфосфатом // Эксперим. и клин. фармакология.-1995.-№ 2.-С. 49-51.
52. Забродский П.Ф. Изменение антиинфекционной неспецифической резистентности организма под влиянием холинергической стимуляции // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1995. - Т. 119, № 8. - С. 164 - 167.
53. Забродский П.Ф. Фармакологическая коррекция нарушений системы иммунитета при острой интоксикации диметилдихлорвинилфосфатом // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1996. - Т. 121, №4. - С. 441 - 443.
54. Забродский П.Ф. Иммуотропные свойства ядов и лекарственных средств.- Саратов : Изд. СГМУ, 1998.-213 с.
55. Забродский П.Ф. Влияние тимогена на постинтоксикационное иммунодефицитное состояние, вызванное острым отравлением ацетонитрилом // Эксперим. и клин. фармакол. – 1999.-Т 62, №3.-С. 48-49.
56. 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.
57. Забродский П.Ф., Германчук В.Г. Оценка роли кортикостерона в реализации иммуносупрессивных эффектов при остром отравлении токсичными химическими веществами //Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2000.- Т.129, №5.-С. 552-555.
58. Забродский П.Ф., Германчук В.Г. Иммунный гомеостаз при антидотной терапии острых отравлений токсичными химическим веществами// Токсикол. вестник.-2002, №1.- С. 8-11.
59. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Киричук В.Ф., Нодель М.Л., Аредаков А.Н. Антихолинэстеразный механизм как фактор иммунотоксичности различных химических соединений //Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2003.-Т. 136.-№8.-С. 202-204.

60. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Ковалев А.Ю., Кадушкин А.М. Нарушение функции субпопуляций Т-лимфоцитов при подостром отравлении токсичными химикатами // Российский хим. журн.- 2007.- № 3.- С. 25–28.
61. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., Кадушкин А.М. Роль Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов в супрессии иммунных реакций при подостром отравлении антихолинэстеразными токсикантами // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2007.-Т. 144, №7.-С. 62-64.
62. Забродский П.Ф. Влияние холинергической стимуляции на формирование гиперчувствительности замедленного типа/ П.Ф. Забродский, А.К. Мышкина //Иммунология.-1989.- № 6.-С. 88.
63. Забродский П.Ф., Нодель М.Л., Василенко О.А., Аредаков А.Н. Влияние имунофана на показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов после острых отравлений токсичными химическими веществами // Эксперим. и клин. фармакология.-2004. – Т. 67, № 5.-С. 28-30.
64. Забродский П.Ф. Иммуностимуляторы. – Саратов, «Аквариус». – 2001.- 109 с.
65. Забродский П.Ф. Относительное увеличение функции Th2-лимфоцитов при интоксикации фосфорорганическими соединениями как фактор риска развития респираторных аллергических реакций // Аллергология и иммунология.- 2007.- Т. 8, № 1.- С. 156.
66. Забродский П.Ф., Германчук В.Г. Роль антихолинэстеразного механизма в супрессии антителообразования при острой интоксикации фосфорорганическими соединениями // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001.-Т. 131, №5.-С. 551-553.
67. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Мальцева Г.М., Молотков А.О. Иммуотропные свойства холинергических веществ / Под ред. П.Ф. Забродского. – Саратов: Изд. «Научная книга», 2005. – 251 с.
68. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Сидельникова Н.М. Влияние аминостигмина на показатели НРО и системы иммунитета при остром

отравлении 3-хинуclidилбензилатом (BZ) // Эксперим. и клин. фармакология. – 2005. – Т. 68, № 6 – С. 56-59.

69. Забродский П.Ф., Линючев М.Н. Оценка защиты фармакологическими средствами, индуцирующими монооксигеназные ферменты от пестицидов по показателям летальности // Эксперим. и клин. фармакология. – 1993. – Т. 56, № 5 – С. 45-47.

70. Забродский П.Ф. Иммунотоксикология ксенобиотиков / П.Ф. Забродский, В.Г. Мандыч. - Саратов, СВИБХЗ, 2007.- 420 с.

71. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., Германчук В.Г. Иммуностимулирующие свойства полиоксидония при остром отравлении антихолинэстеразными токсичными химикатами // Эксперим. и клин. фармакология. – 2006. – Т. 69, № 6 – С. 37-39.

72. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., Германчук В.Г. Сравнительная оценка влияния острого отравления токсичными химикатами на параметры неспецифической резистентности организма и системы иммунитета // Токсикол. вестник. – 2006. - № 6. – С. 6-9.

73. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., Кадушкин А.М. Редукция функции Th1- и Th2-лимфоцитов при остром отравлении фосфорорганическим соединением диметилдихлорвинилфосфатом // Вестник новых мед. технологий. 2007.- Т. XIV, № 1.- С. 201–202.

74. Забродский П.Ф., Мышкина А.К. Влияние холинергической стимуляции на формирование гиперчувствительности замедленного типа // Фармакол. и токсикол.-1989.-№ 6.-С. 46-48

75. Забродский П.Ф., Шиловых Н.Г., Кажкин А.А. Влияние острой интоксикации фосфорорганическими инсектицидами на иммунный гомеостаз и его коррекция / Воен.-мед. факультет при СГМУ, Саратов, 1994. – 9 с. – Деп. в ВИНТИ 20.04.94, №958-В94.

76. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., Забродская Е.П. и др. Особенности цитокинового профиля при подостром отравлении токсичными химикатами // Токсикологический вестник.-2008.-N 6.- С. 9-12.

77. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х., Лим В.Г. и др. Редукция иммунных реакций и синтеза цитокинов, связанных с функцией Th1-, Th2-лимфоцитов, и их коррекция полиоксидонием при подостром отравлении фосфорорганическими соединениями // Эксперим. и клин. фармакология - 2009.- N 6.- С. 40-42.

78. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х., Лим В.Г. и др. Роль холинергической и цитокиновой регуляции функции Т-лимфоцитов в формировании активации и редукции иммунных реакций при отравлениях разными дозами фосфорорганических соединений // Бюлл. эксперим. биол. и медицины- 2009.- Том 148, N 9.- С. 287-290.

79. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Яфарова И.Х. и др. Редукция иммунных реакций и синтеза цитокинов, связанных с функцией Th1-, Th2-лимфоцитов, и их коррекция полиоксидонием при подостром отравлении фосфорорганическими соединениями // Эксперим. и клин. фармакология - 2009.- N 6.- С. 40-42.

80. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Яфарова И.Х. и др. Влияние фосфорорганических соединений на систему иммунитета и продукцию Th1- и Th2-лимфоцитами цитокинов // Аллергология и иммунология. - 2009.- Том 10, N 1.- С. 159.

81. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Яфарова И.Х. и др. Изменение цитокинового профиля и функции Th1-,Th2- лимфоцитов при подостром отравлении фосфорорганическими соединениями // Вестник новых медицинских технологий.- 2009.-Т.12, N1.-С.200-201.

82. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., Яфарова И.Х. и др. Модуляция антидотами фосфорорганических соединений иммунных реакций и синтеза цитокинов, связанных с функцией Th1-, Th2-лимфоцитов // Токсикологический вестник.-2009.-N 3.- С. 7-10.

83. Забродский П.Ф., Яфарова И. Х. Особенности цитокинового профиля при подостром отравлении фосфорорганическими соединениями //

Актуальные вопросы военной медицины и военного образования : Сб.науч.тр.- Саратов, 2008.- С.102.

84. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х. Нарушение функции субпопуляций Т-лимфоцитов и при отравлении фосфорорганическими соединениями // Актуальные вопросы военной медицины и военного образования: Сб. науч. тр.- Саратов, 2008.- С.103.

85. Забродский П.Ф., Яфарова И. Х., Лим В.Г. Особенности цитокинового профиля при подостром отравлении токсичными химикатами // Токсикологический вестник.-2008.- № 6.- С. 9-12.

86. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х., Лим В.Г. Влияние фосфорорганических соединений на систему иммунитета и продукцию Th1- и Th2-лимфоцитами цитокинов // Аллергология и иммунология. - 2009.- Т.10. - № 1.- С. 159.

87. Забродский П.Ф, Яфарова И.Х. Влияние комбинированного действия фосфорорганических соединений и их антидотов на иммунные реакции и синтез цитокинов Th1-, Th2- лимфоцитами // Аллергология и иммунология. - 2009.- Т.10. - № 2.- С. 306.

88. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х. Действие фосфорорганических соединений на фоне применения их антидотов на иммунный ответ и синтез цитокинов лимфоцитами // Российский аллергологический журнал.-2009.- Вып.1.- № 3.- С. 410 // Современные проблемы аллергологии, иммунологии и иммунофармакологии: Сб. тр. X Международного конгресса. – Казань, 2009.

89. Забродский П.Ф., Яфарова И. Х., Лим В.Г. Роль холинергической и цитокиновой регуляции функции Т-лимфоцитов в формировании активации и редукции иммунных реакций при отравлениях разными дозами фосфорорганических соединений // Бюл. эксперим. биол. и медицины. - 2009.- Т.148.- № 9.- С. 287-290.

90. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х., Лим В.Г. Комбинированное действие антидотов фосфорорганических соединений на иммунные реакции / // Сб. науч. тр. Саратовского военного института биологической и

химической безопасности. - Саратов: СВРХБЗ, 2009.- Выпуск 11.- С.100-104.

91. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х., Лим В.Г. Влияние фосфорорганических соединений в комбинации с антидотными средствами на гуморальный ответ // Доклады Академии военных наук. – Саратов, 2009. - № 2(37). – С.101-103.

92. Забродский П.Ф., Яфарова И. Х., Лим В.Г., А.А. Свистунов. Нарушения активности Th1-,Th2- лимфоцитов при интоксикации фосфорорганическими соединениями и их фармакологическая коррекция/ // Доклады Академии военных наук. – Саратов, 2009. - № 2(37). – С.94-96.

93. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х., Лим В.Г Влияние фосфорорганических инсектицидов на активность субпопуляций Т-лимфоцитов // Доклады Академии военных наук. – Саратов, 2009. - № 2 (37). – С.99-101.

94. Забродский П.Ф. Оценка влияния ацетилхолина на летальность мышей от сепсиса и продукцию провоспалительных цитокинов // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2010. Т. 150, N 9. С. 309 - 311.

95. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х.. Нарушения функции Th1- и Th2-лимфоцитов при остром отравлении этанолом // Доклады академии военных наук. Поволжское отделение. 2010. N2 (42). С. 124-127.

96. Забродский П.Ф., Гришин В.А., Лим В.Г., Яфарова И.Х.. Изменения цитокинового профиля и редукция функции субпопуляций лимфоцитов при подостром отравлении этанолом // Доклады академии военных наук. Поволжское отделение. 2010. N2 (42). С. 127-129.

97. Забродский П.Ф. Коррекция полиоксидонием нарушений иммунного статуса при интоксикации фосфорорганическими соединениями //Российский аллергологический журнал. 2011. No. 4. Вып. 1. С. 365-366.

98. Забродский П.Ф. Изменение иммунных реакций и содержания цитокинов в крови после хронической интоксикации фосфорорганическими веществами// Аллергология и иммунология. 2011. Том 12. No. 3. С. 314.

99. Забродский П.Ф. Изменение активности моноцитарно-фагоцитарной системы после хронической интоксикации фосфорорганическими соединениями // Аллергология и иммунология. 2011. Том 12. No. 3. С. 314.

100. Забродский П.Ф., Гришин В.А. Влияние реактиватора холинэстеразы карбоксима на активность ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов и иммунные реакции при остром отравлении фосфорорганическими соединениями // Эксперим. и клин. фармакология. 2011. Т. 74. No. 10. С. 31-33.

101. Забродский П.Ф., Кузьмин А.В. Влияние ацетилхолина и его комбинированного действия с атропином на функцию моноцитарно-макрофагальной системы // Доклады академии военных наук. 2011. No. 3(47). С. 104-108.

102. Забродский П.Ф., Кузьмин А.В. Влияние холинергической стимуляции на функцию моноцитарно-макрофагальной системы при моделировании острого инфекционного процесса // Доклады академии военных наук. 2011. No. 3(47). С. 108-111.

103. Забродский П.Ф., Кузьмин А.В. Механизм снижения летальности фосфорорганическими соединениями при остром инфекционном процессе // Доклады академии военных наук. 2011. No. 3(47). С. 111-114.

104. Забродский П.Ф., Кузьмин А.В., Гришин В.А. Влияние реактивации ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов на восстановление иммунных реакций после при остром отравлении фосфорорганическими соединениями // Доклады академии военных наук. 2011. No. 3(47). С. 114-119.

105. Забродский П.Ф., Кузьмин А.В., Гришин В.А. Фармакологическая коррекция нарушений иммунного статуса при отравлении фосфорорганическими соединениями // Доклады академии военных наук. 2011. No. 3(47). С. 119-120.



106. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Абаимов А.В. Влияние хронической интоксикации фосфорорганическими соединениями на иммунный статус и цитокиновый профиль. Иммунокоррекция // Доклады академии военных наук. Поволжское отделение. 2011. №. 3(47). С. 120-125.

107. Зарубина И.В. Антиоксидантная защита головного мозга при острой гипоксии беметилом / И.В. Зарубина, О.П. Миронова // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.133, №2. – С. 165-167.

108. Зимин Ю.И., Ляхов В.Ф. Эффект кооперации в реакции зависимой от антител клеточной цитотоксичности / Ю.И. Зимин, В.Ф. Ляхов // Иммунология.-1985.-№1.- с. 27-30.

109. Золотникова Г.П. О нарушении иммунологической реактивности организма под воздействием пестицидов в условиях теплиц / Г.П. Золотникова // Гиг. труда.-1980.-№ 3.-С. 38-40.

110. Иванов В.В. Изменение численности и качественного состояния лимфоцитов при хроническом радиационно-химическом поражении крыс / В.В. Иванов //Гигиена и санитария.-1986.-N 3.-С. 37-40.

111. Иванова А.С. Характер вовлечения эндокринной системы в стресс ответе на отравления нейротропными средствами / А.С. Иванова // Токсикол. вестник.-1998.-№4.- с. 16-19.

112. Идова В.Г. Иммунная реакция у мышей при психоэмоциональном напряжении в условиях снижения синтеза серотонина в мозге / В.Г. Идова, М.А. Чейдо, Л.В. Девойно // Сб. докл. Акад. наук, 2004. - Т. 398, №1. – С. 132-134.

113. Каган Ф.С. Токсикология фосфорорганических пестицидов / -М.: Медицина, 1977.-296.

114. Каган Ю.С., Кокшарева Н.В., Овсянникова Л.М. Использование индукции цитохрома Р-450 как один из новых принципов терапии отравлений фосфорорганическими инсектицидами / Ю.С. Каган, Н.В. Кокшарева, Л.М. Овсянникова // Вестн. АМН СССР.-1980.-№ 8.-С. 55-57.

115. Калинин А.Г., Борисова Л.С., Инжеваткина С.М. Влияние веществ, увеличивающих внутриклеточное содержание цГМФ, на функциональную активность В-клеток у мышей / А.Г. Калинин, Л.С. Борисова, С.М. Инжеваткина // Иммунология.-1988.-N 4.-С. 33-36.

116. Караулов А.В. Клинико-иммунологическая эффективность применения имунофана при оппортунистических инфекциях / А.В. Караулов // Лечащий врач. – 2000а. - №5-6. - С. 28-29.

117. Караулов А.В. Молекулярно-биологическое обоснование применения имунофана в клинической практике / А.В. Караулов // Лечащий врач. – 2000б. – № 4. - С.46-47.

118. Караулов А.В. Оценка различных методов иммуномониторинга при проведении иммунокоррекции / А.В. Караулов, В.Ф. Ликов, И.В. Евстигнеева. // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 2. - С. 136-137.

119. Кащенко Л.А. Т- и В-система иммунитета у больных интоксикацией пестицидами / Л.А. Кащенко, Р.М. Разибакиевич, Л.А. Федорина // Гиг. труда и проф. заболеваний.-1981.-№ 4.-С. 17-19.

120. Клинецвич А.Д. Сравнительный анализ изменений белкового обмена, перекисного окисления липидов и системы гемостаза при действии полихлорированных дибензо-п-диоксинов и радиации / А.Д.Клинецвич, С.И. Баулин, В.Ф. Головков // Докл. АН.- 1994.- Т.335, №3.- С. 378-381.

121. Коготкова О.И. Сочетанное применение в эксперименте живой противосибирезвенной вакцины СТИ с липидом / О.И. Коготкова, Н.П. Буравцева, Е.И. Еременко // Иммунология. -2004. - № 2.- С. 109 - 111.

122. Козлов В.А. Активность цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ и функции иммунокомпетентных клеток / В.А. Козлов, Г.Ю. Любимов, Н.Н. Вольский // Вестн. АМН СССР.-1991.-N 12.-С. 8-13.

123. Константинов Б.А. Иммунореабилитация в кардиохирургии на примере больных с инфекционным эндокардитом / Б.А. Константинов, Л.И. Винницкий, В.А. Иванов // Inter. J. Immunorehabilitation. – 2000. - Vol. 2, №1. - Р. 146-151.

124. Корнева Е.А. Нарушение нейрогуморальной регуляции функций иммунной систем / Е.А. Корнева // Вест. АМН СССР.- 1990.- №11.- С. 36-42.
125. Коробейникова Э.Н. Фотометрический метод определения молонового альдегида / Э.Н. Коробейникова // Лаб. дело.- 1989.- №7.- С.8-10.
126. Кузьминская У.А. Патогенетическое значение изменений состояния биогенных аминов в патологии, связанной с воздействием химических факторов внешней среды / У.А. Кузьминская, В.А. Иваницкий, В.Ф. Шилина // Эндокринная система организма и токсические факторы внешней среды. Л., 1980. - С. 210 - 219.
127. Куценко С.А. Военная токсикология. радиобиология и медицинская защита / С.А. Куценко. - Санкт-Петербург, Фолиант, 2004.- 588с.
128. Лазарева Д. Н. Стимуляторы иммунитета / Д.Н. Лазарева, Е.К. Алехин. - М.: Медицина, 1985.-256 с.
129. Лакин Г.Ф. Биометрия / Г.Ф. Лакин. - М.: Высш. шк., 1980.- 293 с.
130. Лебедев В.В. Иммунологические и патогенетические аспекты терапии инфекционных болезней регуляторными пептидами/ В.В. Лебедев, В.И. Покровский // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1999а. – № 2. - С. 52-56.
131. Лебедев В.В. Имунофан - синтетический пептидный препарат нового поколения / В.В. Лебедев, В.И. Покровский // Вестник Российской АМН.-1999б.- №4.- С. 56-61.
132. Лебедев В.В. Фармакологическая иммунореабилитация в системе специфической иммунопрофилактики и вакцинотерапии: современные подходы и перспективы развития / В.В. Лебедев, А.В. Данилина, И.В. Сгибова // Inter. J. Immunorehabilitation. – 2000. - Vol. 2, N 1. - P. 146-151.
133. Ледванов М.Ю. Введение в клиническую иммунологию / М.Ю. Ледванов, В.Ф. Киричук. - М: Медицина, 1996.- 141 с.

134. Лемус В.Б. Нервные механизмы и кортикостероиды при ожогах / В.Б. Лемус, В.В. Давыдов.- Л.: Медицина, Ленингр. отделение, 1974. -182 с.
135. Лудевиг Р. Острые отравления: Пер. с нем. / Р. Лудевиг, К. Лос.– М.: Медицина, 1983.- 560 с.
136. Лужников Е.А. Острые отравления: Руководство для врачей. 2-е изд., перераб и доп. / Е.А. Лужников, Л.Г. Костомарова - М.:Медицина. 2000. – 434 с.
137. Лукьянова Л.Д., Михайлова Н.Н., Фоменко Д.В., Кизиченко Н.В., Душина Е.Н. Об особенностях нарушений энергетического обмена при травматическом шоке и возможности их фармакологической коррекции / Л.Д. Лукьянова, Н.Н. Михайлова, Д.В. Фоменко // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.132, №9. – С. 263-267.
138. Мальцева Г.М. Именения физиологических механизмов регуляции системы иммунитета при остром отравлении атропиноподобными препаратами (м-холиноблокаторами): Автореф. дисс. канд. мед. наук. / Г.М. Мальцева. - М., 2002.-24 с.
139. Маркова И.В. Клиническая токсикология детей и подростков / И.В. Маркова, В.В. Афанасьева, Э.К. Цыбульский. – Санкт-Петербург, Интермедика, 1998. – 304 с.
140. Медведь Л.И. Пестициды и проблемы здравоохранения / Л.И. Медведь, Ю.С. Каган, Е.И. Спыну. – Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Менделеева.- 1968.- №3.- с. 263-271.
141. Медуницин Н.В. Регуляция вакцинального иммунитета / Н.В. Медуницин // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 2. - С. 137-139.
142. Михайлов С.С. Метаболизм фосфорорганических ядов / С.С. Михайлов, И.Г. Щербак. – М.: Медицина. – 1983. – 112 с.
143. Михайлова А.А. Механизмы снижения иммунного ответа при стрессе и его коррекция миелопидом/ А.А. Михайлова, Л.А. Захарова, Е.А. Кирилина // Стресс и иммунитет: Тез. докл. Всес. конф. «Стресс и иммунитет (психонейроиммунология).- Ростов н/Д, 1989.- С.31-32.

144. Михайлова А.А. Миелопиды и иммунореабилитация / А.А. Михайлова // *Inter. J. Immunorehabilitation*. - 1997. - № 5. - с. 5.
145. Михайлова М.Н. Использование имунофана для коррекции изменений гематологических показателей, вызванных циклофосфаном / М.Н. Михайлова, Л.М. Меркулова, Г.Ю. Стручко // *Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы*. - 2003. - Т.5. - №2. - С. 230.
146. Михальчик Е.В. Профилактическое и лечебное действие комплексного антиоксидантного препарата при ожогой травме у крыс / Е.В. Михальчик, А.В. Иванова, М.В. Ануров // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* - 2004. - Т.138, №9. - С. 299-301.
147. Могуш Г. Острые отравления /Пер. с рум. / Г. Могуш. - Бухарест, Медицинское издательство, 1984. – с. 440-464.
148. Москалева Е.Ю. Повреждения ДНК лимфоцитов и иммунодефицитные состояния / Е.Ю. Москалева, Н.А. Федоров, О.А. Кизенко // *Вестн. РАМН*. - 1993. - № 4. - С. 12 - 17.
149. Мутускина Е.А., Багдасаров Л.А., Трубина И.Е. Некоторые показатели стресс-реакции организма на разных этапах постреанимационного периода / Е.А. Мутускина, Л.А. Багдасаров, И.Е. Трубина // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* – 2001. – Т.133, №1. – С. 38-41.
150. Нестерова И.В. Стратегия и тактика иммунотерапии вторичных иммунодефицитных состояний с инфекционным синдромом / И.В. Нестерова // *Аллергология и иммунология*. – 2005. – Т.6, № 2. - С. 139-140.
151. Нечаев В.И. Иммуномодуляторы при лечении больных туберкулезом по стратегии DOTS / В.И. Нечаев, В.В. Крылов, А.В. Хованов // *Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы*. – 2003.- Т. 5, №2.- С. 204.
152. Николаев А.И. Иммунодепрессивное действие некоторых ядохимикатов/ А.И. Николаев, Л.А. Пономарева, И.С. Гиллер // *Фармакол. и токсикол.* -1972.-Т. 35, N 3. -С. 352-355.

153. Петров А.Н. Антитоды фосфорорганических отравляющих веществ / А.Н. Петров, Г.А. Софронов, С.П. Нечипоренко // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. Хим. об-ва им Д.И. Менделеева). - 2004. – Т. XLVIII, № 2. –С.110-116.

154. Петров Р.В. Миелопептиды и иммунный статус / Р.В.Петров, А.А. Михайлова, Л.А. Фонина // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 2. - С. 204.

155. Перелыгин В.М. Шнирт М.Б., Арипов О.А. Действие некоторых пестицидов на иммунологическую реактивность/ // Гигиена и санитария.- 1971.-№ 12.-С. 29-33.

156. Пинегин Б.В. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения/ Б.В. Пинегин, А.В. Некрасов, Р.М. Хаитов // Цитокины и воспаление.-2004. -Т. 3, № 3. - С. 41-47.

157. Пирцхалава А.В. Гетерогенная реакция острого отравления организма хлорофосом / А.В. Пирцхалава // Сообщ. АК ГССР.-1989.-Т. 133, № 2.-С. 421-424.

158. Плужников Н.Н. Некоторые аспекты антирадикальной защиты мембран / Н.Н. Плужников, Л.С. Бакулина, В.И. Легеза // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины / Под общей ред. Н.Н. Плужникова (Научн. тр. НИИЦ (МБЗ) ГосНИИИ военной медицины, Т.4). – СПб., 2003. - С. 123-139.

159. Покровский В.И., Лебедев В.В., Шелепова Т.М. Имунофан – пептидный препарат нового поколения в лечении инфекционных и онкологических заболеваний: свойства, область применения / В.И. Покровский, В.В. Лебедев, Т.М. Шелепова // Практикующий врач. - 1997. – № 12. - С.14-15.

160. Попова Е.А. Иммунофармакотерапия имунофаном в лечении больных с гнойными менингитами / Е.А.Попова, И.И. Лисун, А.Д. Алимов // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. – 2003.- Т. 5, №2.- С. 252.

161. Прозоровский В.Б., Саватеев Н.В. Неантихолинэстеразные механизмы действия антихолинэстеразных средств/ – Л.: Медицина, 1976. – 160 с.
162. Присяжнюк Т.Н., Петровская О.Г., Кузьменко Н.М. Особенности воздействия хлорофоса на организм теплокровных / Т.Н. Присяжнюк, О.Г. Петровская, Н.М. Кузьменко // Гигиена и санитария.-1986.-N 6.-С. 65-67.
163. Ратькин А.В. Гепатопротекторы препятствуют токсическому действию циклофосфана на печень крыс при  $\text{CCl}_4$ -гепатите / А.В. Ратькин, А.С. Саратиков, В.С. Чучалин // Эксперим. и клин. фармакология.-2005.-Т.68, № 2.-С. 47-50.
164. Ремезов А.И. Методы определения естественной (неспецифической) резистентности организма / А.И. Ремезов, Г.А. Башмаков. - Л.,1976.- 65 с.
165. Ройт А. Основы иммунологии: Пер. с англ. / А. Ройт - М.: Мир, 1991.-327 с.
166. Ройт А. Иммунология. Пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл. - М.: Мир, 2000. – 582 с.
167. Ротенберг Ю.С. Классификация ксенобиотиков по локализации их действия на ферментные системы митохондрий / Ю.С. Ротенберг // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1982.- №9.-С. 42-45.
168. Романенко О.И. Лейкоцитарная защита при острых отравлениях / О.И. Романенко, А.Н. Гребенюк // Морской мед. журн. –1997.- Т.4, №4.- С. 8-11.
169. Романцов М.Г., Ершов Ф.И., Горячева Л.Г. Фармакотерапевтическая эффективность циклоферона при патологических состояниях у детей / М.Г. Романцов, Ф.И. Ершов, Л.Г. Горячева // Вест. Санкт-Петербургской ГМА им. И.И. Мечникова. – 2008.- №3 (28).- С.69-77.
170. Рыболовлев Ю.Р. Прогнозирование действия ксенобиотиков на человека / Ю.Р. Рыболовлев // Фармакол. и токсикол. – 1982.- №1.- С. 110-114.

171. Саватеев Н.В. Ядовитые вещества, выделяющиеся при разрушении промышленных объектов, и мероприятия по оказанию медицинской помощи пострадавшим / Н.В. Саватеев, С.А Куценко // Воен.-мед. журн. – 1993.- №6.-С. 36-40.

172. Сакаева Д.Д. Влияние гентамицина на иммунитет при иммунодефиците и действие иммуномодуляторов/ Д.Д. Сакаева, Д.Н. Лазарева // Эксперим. и клин. фармакол..-1998.- Т.61, №3. - С. 50-53.

173. Саприн А.Н., Караулов А.В., Пирузян Л.А. О взаимосвязи активности цитохрома Р-450 в лимфоцитах с их иммунной функцией / А.Н. Саприн, А.В. Караулов, Л.А. Пирузян // Докл. АН СССР.-1982.-Т. 267, № 5.- С. 1276-1280.

174. Селье Г. На уровне целостного организма. Пер. с англ. / Г. Селье. - М.,-1972.

175. Сидельникова Н.М. Характер и механизмы нарушений неспецифической резистентности организма и специфической иммунной защиты при остром отравлении веществом ВЗ / Н.М. Сидельникова // Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СВРХБЗ. -2004.- 168 с.

176. Смирнов В.С. Иммунотоксические эффекты химических ксенобиотиков / В.С. Смирнов, С.В. Петленко, А.Е. Сосюкин // Иммунодефицитные состояния / ред. – В.С. Смирнов и И.С.Фрейдлин.- СПб: «Фолиант», 2000.- 337-367.

177. Сосюкин А.Е. Влияние ксенобиотиков на состояние нейтрофилов / А.Е. Сосюкин, Г.А. Софронов, А.Н. Гребенюк // Морской мед. журн.- 1997.- Т.4, №8.-С. 26-31.

178. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях / В.Ю. Урбах. – М.: Медицина, 1975.- 295 с.

179. Федоров С.М. Иммунологические показатели у больных профессиональными дерматозами, вызванными фосфорорганическими пестицидами/ С.М.Федоров, Н.М. Мазина, В.П. Бухова // Вестн. дерматол. и венерол.-1988.-№ 8.-С. 46-48.



180. Феерман И.С. К вопросу о хронической интоксикации хлорофосом / И.С. Феерман, Э.М. Бонгард, Н.С. Лашенко // Гиг. труда.- 1964.- № 11.-С. 36-38.
181. Филов В.А. Взаимодействие организма и ксенобиотиков; хемобиокинетика / В.А. Филов // Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова.- М.: Медицина, 2002. – С. 32-89.
182. Фридман Г.И. Влияние севина, хлорофоса и ДДТ на некоторые специфические иммунологические показатели иммунобиологической и общей реактивности организма (к проблеме токсических воздействий малой интенсивности) / Г.И. Фридман // Вопросы гигиены и токсикологии пестицидов. М.: Медицина, 1970.-С. 139-145.
183. Хабибуллаев Б.Б. Коррекция вторичных иммунодефицитов с помощью металлсодержащих соединений хитозана / Б.Б. Хабибуллаев // Аллергология и иммунология. – 2005. – Т.6, № 2. - С. 207.
184. Хаитов Р.М. Иммунология / Р.М. Хаитов. – М.: ГЭОТАР- Медиа, 2006. – 320 с.
185. Хаитов Р.М. Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 1995а.- №4.- с. 3-8.
186. Хаитов Р.М. Экологическая иммунология / Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, Х.И. Истамов. - М.: Изд-во ВНИРО, 1995б.- 219 с.
187. Хаитов Р.М. Иммунология. – 2-е изд., перераб. и доп. / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. - М.: Медицина, 2002.- 536 с.
188. Хаитов Р. М. Иммунология. / Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович. – М.: Медицина, 2000.- 430 с.
189. Хаитов Р.М. Современные представления о механизме действия полиоксидония / Р.М.Хаитов, Б.В. Пинегин // Иммунология. – 2005.-Т. 26.-№ 4.-С. 197.
190. Хейхоу Ф.Г. Гематологическая цитохимия / Ф. Г. Дж. Хейхоу, Д. Кваглино. – М.: Медицина, 1983.- 319 с.

191. Хусинов А.А. Нейроэндокринная система и специфические факторы иммунитета при отравлении пестицидами / А.А. Хусинов, Д.С. Хайдарова, Г.В. Гущин // Бюл. эксперим. биологии и мед.-1991.-Т. 111, № 12.-С. 623-624.

192. Чекнёв С.Б. Активность лимфоцитов человека в присутствии соединений, содержащих углеводные компоненты / С.Б. Чекнёв, Е.Е. Бабаева // Бюл. эксперим. биологии и мед.-2004.-Т. 138, N 11.-С. 555-558.

193. Чугунихина Н.В., Хасанова М.И. Влияние пестицидов на неспецифическую сопротивляемость организма инфекции / Н.В. Чугунихина, М.И. Хасанова // Гиг. и санитария.- 1994.- №1.-С. 19-21.

194. Шафеев М.Ш. Влияние хлорофоса на некоторые показатели иммунологической реактивности организма / М.Ш. Шафеев // Изучение экстремальных состояний.- Казань, 1976.-С. 60-63.

195. Шилов Ю.И., Ланин Д.В. Влияние гидрокортизона на функции фагоцитирующих клеток брюшной полости крыс в условиях блокады  $\beta$ -адренорецепторов / Ю.И. Шилов, Д.В. Ланин // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.131, №10. – С. 439-442.

196. 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.

197. Штенберг А.И. Угнетение иммунологической реактивности организма животных под влиянием некоторых ФО пестицидов / А.И. Штенберг, Р.М. Джунусова // Бюл. эксперим. биол.-1968.-N 3.-С. 86-88.

198. Шуршалина А.В. Соотношение уровней цитокинов при генитальном герпесе в различные фазы инфекционного процесса / А.В. Шуршалина, В.Н. Верясов, Г.Т. Сухих // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.132, №7. – С. 59-61.

199. Щеглова М.Ю. Клиническая эффективность применения иммунофана у больных бронхиальной астмой / М.Ю. Щеглова, Г.А.

Макарова // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. – 2003.- Т. 5, №2.- с. 222.

200. Яфарова И.Х., Забродский П.Ф., Лим В.Г. Нарушение активности лимфоцитов и иммунного ответа при воздействии фосфорорганических соединений // Сб. науч. тр. Саратовского военного института биологической и химической безопасности. - Саратов: СВирХБЗ, 2009.- Выпуск 11.- С.90-93.

201. Abbas A.K. Functional diversity of helper T lymphocytes / A.K. Abbas, K.M. Murphy, A. Sher // Nature. – 1996. – Vol. 383. – P. 787–793.

202. Amitai G. Bifunctional compounds eliciting anti-inflammatory and anti-cholinesterase activity as potential treatment of nerve and blister chemical agents poisoning/ G.Amitai, R.Adani, E. Fishbein // J.Appl.Toxicol. –2006 – Vol. 26.-N 1. –P.81-87.

203. Asquith B. In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection/ B. Asquith, Y. Zhang, A.J. Mosley, C.M. de Lara // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-2007.- Vol. 104, N 19. – P. 8035-8040.

204. Audre F. Pesticide-containing diets augments in anti-sheep red blood cell non reaginic antibody responses in mice but viay prolong murine infection with Giardia muris/ Audre F., A. Gillon, S. Lafout, G. Yourdan //Environ. Res.- 1983.-Vol. 32, N 1.-P. 145-150.

205. Balali-Moode M. Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans / M. Balali-Moode, M. Hefazi, M. Mahmoudi // Fundam. Clin. Pharmacol. –2005 – Vol. 19.-N 6. –P. 713-721.

206. Becker E.Z. Mechanisms of immunologic injury of rat peritoneal mast cells. I. The effect of phosponate inhibitors on the homocytotropic component of rat complement / E.Z. Becker, K.F. Austen // J. exp. med.-1966.-Vol. 124, N 3.- P. 379-395.

207. Becker E.Z. The requirement for esterase activation in the anti-immunoglobulin-triggered movement of B lymphocytes / E.Z. Becker, E.R. Unanue // *J.Immunol.*-1976.-Vol. 117, N 1.-P. 27-32.

208. Bide R. WImmediate post-dosing paralysis following severe soman and VX toxicosis in guinea pigs / R.W. Bide, L. Schofield, D.J. Risk // *J.Appl.Toxicol.* –2005 – Vol. 25.-N 5. –P.410-417.

209. Boix E. Mammalian antimicrobial proteins and peptides: overview on the RNase A superfamily members involved in innate host defence/ E. Boix, M.V. Nogues // *Mol. Biosyst.*- 2007.- Vol. 3, N 5. – P. 317-335.

210. Bondar N.F. Synthesis, immunomodulating activity and (1)H NMR studies of 7-oxo-9,11-ethano-13-azaprostanooids / N.F. Bondar, M. B. Golubeva, L.P. Isaenya, N.F. Konoplya // *Eur. J. Med. Chem.* – 2004.- Vol. 39, N 5.- P. 389-396.

211. Boers D. Asthmatic symptoms after exposure to ethylenebisdithiocarbamates and other pesticides in the Europit field studies / D. Boers, L. Amelsvoort van, C. Colosio // *Hum. Exp. Toxicol.*- 2008.- Vol. 27, N 9.- P.- 721-725.

212. Casale G.P. The effects of organophosphate-induced cholinergic stimulation on the antibody response to sheep erythrocytes in inbred mice / G.P. Casale, S.D. Cohen, R.A. DiCapva. // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*-1983.-Vol. 68, N 2.-P. 198-205.

213. Casale G.P. Parathion of humoral immunity in inbred mice / G.P. Casale, S.D. Cohen, R.A. DiCapva. // *Toxicol. Lett.*-1984.-Vol. 23, N 2.-P. 239-247.

214. Claman H. N. Corticosteroids and lymphoid cells / H.N. Claman // *New Engl. J. Med.*-1972.- Vol.287.-No 8.- P. 388-397.

215. Claman H.N. Corticosteroids as immunomodulators / H.N. Claman // *Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* – 1993.-Vol. 685. –P. 288-292.

216. Delves P.J. The immune system (Part 1) / P.J. Delves, I.M. Roitt // N. Engl. J. Med. - 2000. – Vol. 343, N2. – P. 37-49.
217. Descotes J. Immunotoxicology of drugs and chemicals / J. Descotes. – Amsterdam- -N. Y-. Oxford: Elsvier, 1986.- 400 p.
218. Desi I. Immuntoxikologische Untersuchungen der Pestizide von hygienischen Standpunkt / I. Desi, L. Varga //Zbl. Pharm. Pharmakotherap. und Laboratoriumsdiagn.-1983.-Vol. 122, N 2 (22 Jahrestag Yes. Pharmakol. und Toxicol. DDR, Neubrandenburg, 2-4, Sept., 1982), P. 154-155.
219. Devens B.H. O,O,S-trimethyl phosphorothionate effects on immunocompetence / B.H. Devens, H.M. Grayson, T. Imamura, K.E. Rodgers //Pestic. Biochem. and Phisiol.-1985.-Vol. 24, N 2.- P. 251-259.
220. Dhabhar F. S. Stress –induced in blood leukocyte distribution: A role of adrenal steroid hormones/ F.S. Dhabhar, A.H. Miller, B.S. Mc Even, R.L. Spenser // J. Immunol.-1996. – Vol.157.- No 4.- P. 1638-1644.
221. Dulis B.H., Gordon M.A., Wilson J.B. Identification of muscarinic binding sites in human neutrophils by direct binding / B.H. Dulis, M.A. Gordon, J.B. Wilson //Molec. Pharmacol.-1979.-Vol. 15, N 1.-P. 28-34.
222. Durant S. In vivo effects of catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis / S. Durant // Cell Immunol. -1986.- Vol. 102, N 1. -P. 136-143.
223. Dyakonova V.A. Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells / V.A. Dyakonova, V.A. Dambaeva, S.V. Dambaeva, R.M. Khaitov // Int. Immunopharmacol. – 2004.- Vol. 15;4 , N 13. – P. 1615-1623.
224. Ellman G.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity/ G.M. Ellman, K.D. Countney, V. Anders // Biochem. Pharm. -1961.- Vol. 7, N 1. – P. 88.
225. Ellmeier W. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development / W. Ellmeier, S. Sawada, D.R. Littman // Ann. Rev. Immunol. – 1999. – Vol. 17, N 3.- P. 523-554.

226. 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.- N 4. - P. 577 - 590.
227. Fleisher T.A. Functional and molecular evaluation of lymphocytes / T.A. Fleisher, J.B. Oliveira // J. Allergy Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 114, N 4. – P. 227-234.
228. Frasch S.C. Lysophospholipids of different classes mobilize neutrophil secretory vesicles and induce redundant signaling through G2A / S.C. Frasch., K. Zemski-Berry, R.C. Murphy // J. Immunol.- 2007.- Vol. 178, N 10. – P. 6540-6548.
229. French A.R. Natural killer cells and viral infection / A.R. French // Curr. Opin. Immunol. - 2003. - Vol. 15. - P. 45
230. Galloway T., Handy R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides immunotoxicity / T. Galloway, R. Handy // Ecotoxicology. - 2003.- Vol. 12, N 1-4 .- P.- 345-363.
231. Garoroy M.R. Antibody-dependent lymphocyte mediated cytotoxicity mechanism and modulation by cyclic nucleotides/ M.R. Garoroy, T.B. Strom, M. Kaliner, C.B. Carpenter //Cell. Immunol.-1975.-Vol. 20, N 2.-P. 197-204.
232. Garrity D. The activating NK/C2D receptors assemble in membrane with two signaling dimmers into hexameric structure / D. Garrity, M.E. Call, J. Feng, K.W. Wucherpfenning // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2005. - Vol. 102. - P. 7641-7646.
233. Georgiev V.St., Albright J.E. Cytokines / V.St. Georgiev, J.E. Albright // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P.284-602.
234. Gilbert R.V. cAMP is essential signal in the induction of antibody production by B cells but inhibits helper function of T cells / R.V. Gilbert, M.K. Hoffmann // J. Immunol.-1985.-Vol.135, №3.-P.2084-2089.

235. Grabczewska E. Receptory muskarinowe na limfocytach ludzkich stymulowanych fitohemaglutynina / E. Grabczewska, H. Lascowska-Bozek, M. Maslinski, J. Ryzewski // *Rreumatologia*.-1990.-T. XXVIII, N 4.-P. 171-179.

236. Grandmont M.J. Intravenous immunoglobulins induce the in vitro differentiation of human B lymphocytes and the secretion of IgG / M.J. Grandmont, C. Racine, A. Roy, R. Lemieux // *Blood*. – 2003. – Vol. – 101. – P. 3065-3073.

237. Hageman J.J. Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects / J.J. Hageman, A. Bast, N.P.E. Vermeulen // *Chem. Biol. Interact.*- 1992.- Vol.82. – P. 243-293.

238. Hansasuta P. Recognition of HIA-A3 and HIAa11 by KIR3DL2 is peptide specific / P. Hansasuta, T. Dong, H. Thananchai // *Eur. J. Immunol.* - 2004. - Vol. 34. - P. 1673-1679.

239. Hausmann S. Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens / S. Hausmann, K.W. Wucherpfennig // *Curr. Opin. Immunol.* 1997.- Vol. 9, N4.- P. 831-838.

240. Heideman M., Bentgson A. Immunological interference of high dose corticosteroids / M. Heideman, A. Bentgson // *Acta chir. scand.*-1985.-Vol.151, N 526.-P. 48-55.

241. Henson P.M. Activation of platelets by platelet-activating factor (PAF) derived from IgE-sensitized basophils. II. The role of serine proteases, cyclic nucleotides, and contractile elements in PAF-induced secretion / P.M. Henson, Z.G. Oades // *J. Exp. Med.*-1976.-Vol. 143, N 4.-P.953-968.

242. Hermanowicz A., Kossman S. Neutrophil function and infectious disease in workers occupationally exposed to phosphoorganic pesticides: role of mononuclear-derived chemotactic factor for neutrophils/ // *Clin. Immunol. and Immunopathol.*-1984.-Vol. 33, N 1.- P. 13-22. 79.

243. Hokland M. Natural effector cells in patients with acute myeloid leukemia treated with the immunomodulator Linomide after autologous bone

marrow transplantation / A. Hermanowicz, S. Kossman // Eur. J. Haematol. – 1999.-Vol. 63, N 4.- P. 251-258.

244. Iamele L. Evaluation of an automated spectrophotometric assay for reactive oxygen metabolites in serum / L. Iamele, R. Kocchi, A. Vernocchi // Clin. Chem. Lab. Med.- 2002.- Vol. 40. – P. 673-676.

245. Ibuki Y. Enhancement of NO production from resident peritoneal macrophages by in vitro gamma-irradiation and its relationship to reactive oxygen intermediates/ Y. Ibuki, R. Goto.// Free Radic. Biol. Med. . – 1997. – Vol. 22, N 6.- P. 1029-1035.

246. Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury / H. Jaeschke // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. - 1995.-Vol. 209.- P. 104-111.

247. Janik G. Levamisol-induced neopterin synthesis / G. Janik W.C. Kopp // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. – P.252-258.

248. Jerne N.K. Plaque formation in agar by sirgte antibody producing cells / N.K. Jerne, A.A. Nordin //Seince.- 1963.- Vol. 140.- No 4. - P. 405.

249. Khaitov R.M. Vaccines based on synthetic polyions and peptiles / R.M. Khaitov // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.- Vol. 685. –P. 788-802.

250. Kimball E.S. Experimental modulatio of IL-1 production and cell surface molecule expression by levamisol / E.S. Kimball //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P.259-268.

251. Kimber I. Chemical – Induced Hypersensitivity / I. Kimber //Exper. Immun.- Boca Raton, New York, London, Tokyo.- 1996.- P. 391-417.

252. Knight J.A. Diseases related to oxygen-derived free radicals / J.A. Knight // Ann. Clin. Lab. Sci.- 1995.-Vol. 25.- P.111-121.

253. Koller L.D. Immunological surveillance and toxicity in mice exposed to the organophosphate pesticide coptophos / L.D. Koller, J.H. Exon, J.G. Roan // Envir. Res.-1976.-Vol. 12, N 12.- P. 238.



254. Kossman S. Immunoelktroforogram oraz sterenie immunoglobulin G, A, M, W surowicy krwi procownikow zatrunionych przy produkcji pestycydow fosforoorganicznych / S. Kossman, B. Konieczny, E. Panek // Med. pr. -1985.-Vol. 36, N 1.-P. 27-30.
255. Kote P. Use of avian lymphocytes to detect toxicity: effects of a commonly utilized deltamethrin preparation / P. Kote, V. Ravindra, R.S.Chauhan // J. Immunotoxicol. - 2006.- Vol. 3, N 2.- P.- 101-109.
256. Kuca K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators / K. Kuca, D. Jun, K. Musilek // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. – 2006.- Vol. 6, N 3. P. 269-277.
257. Kullenkampff J. Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T-lymphocytes / J. Kullenkampff, G. Janossy, M.F. Greanes // Brit. J. Haemat.-1977.-Vol. 36, N 2.-P. 231-240.
258. Kutty K. M. Acethylcholinesterase in erythrocytes and lymphocytes: its contribution to cell membrane structure and function / K.M. KuttyChandra, R. K. Chandra, S. Chandra // Experientia. - 1976.- Vol. 32.- No 3. - P. 289.
259. Lanier L.L. Natural killer cell receptor signaling / L.L. Lanier // Curr.. Opin. Immunol. - 2003. - Vol. 15. - P. 308-314.
260. Lee T.P. Effects of pesticides on human leukocyte functions / T.P. Lee, R. Moscati, B.H. Park // Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.-1979.-Vol. 23, N 1.-P. 597-601.
261. Lee J. C., Lee K. M., Kim D.W., Heo D. S. Elevated TGF- $\beta$  secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired of NK cytotoxicity in cancer patients / J.C. Lee, K.M. Lee, D.W. Kim, D.S. Heo // J. Immunol. - 2004. -Vol. 172. - P. 7335-7340.
262. Lenz D.E. Protection against soman or VX poisoning by human butyrylcholinesterase in guinea pigs and cynomolgus monkeys / D.E. Lenz, D.M. Maxwell, I. Korlovich // Chem. Biol. Interact 2005.- Vol. 157-158. P.-158:205-210.

263. Li C.G. Esterases in human leucocytes / C.G. Li , R.W. Lam, L.T. Gam // J. Histochem. Cytochem.- 1973.- Vol. 21.- No 1. - P. 1-12.
264. Li Q. The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells / Q. Li, T. Kawada // Cell. Mol. Immunol. – 2006.- Vol. 3, N 3. – P. 171-178.
265. Li Q. New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity / Q. Li // J. Nippon. Med. Sch. - 2007.- Vol. 74, N 2 .- P.- 92-105.
266. Loose L.D. Immunotoxicology-1985 / L.D. Loose //Year Immunol.- 1985-1986.-Vol. 2.-Basel e.a., 1986.- P. 365-370.
267. Luster M.J. Molecular and cellular basis of chemically induced immunotoxicity / M.J. Luster, J.A. Blank, J.H. Dean //Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol.-Vol. 27.-Palo Alto, Calif.-1987.-P. 23-49.
268. MacFarlane A.W. Signal transduction in natural killer cells/ A.W. MacFarlane, K.S. Campbell // Curr. Top. Microbiol. Immunol. - 2006.- Vol. 298. - P. 3-57.
269. MacManus J.P. Aceetylcholine-induced initiation of thymic lymphoblast DNA synthesis and proliferation / J.P. MacManus, A.L. Bounton, J.F. Whitefield // J. Cell. Physiol.-1975.- Vol. 85, N 2.-P. 321-330.
270. Maekawa Y., Yasutomo K. Antigen-driven T-cell repertoire selection / Y. Maekawa, K. Yasutomo // Crit. Rev. Immunol. – 2005. – Vol. 25, N 5. – P. 59-74.
271. Marx J.L. How killer cells kill their targets / J.L. Marx //Science.- 1986.-Vol. 231, N 4744.-P. 1367-1369.
272. Masuda N. Sarin poisoning in Tohyo subway / N. Masuda, M. Tahatsu, Y. Mjnnau, T. Ozawa // Lancet.- 1995.- N 8962.- P. 1446-1447.
273. McManus J. Vesicants / J. McManus, K.M. Huebner // Crit. Care Clin.- 2005. Vol. 21, N 4. –P. 707-718.
274. Maslinski W. Cholinergic receptors of lymphocytes / W. Maslinski //Brein. Behav. And Immunol. -1989.- Vol.3, N 1.- P. 1-14.

275. Maslinski W. Nicotinic receptors of rat lymphocytes during adjuvant polyarthritis / W. Maslinski, H. Laskowska –Bozek, H. Ruzewski // J. Neurosci. Res.-1992.- Vol.31, N 2.- P. 336-340.
276. Masini E. Mast cell heterogeneity in response to cholinergic stimulation / E. Masini, R. Fantozzi, A. Conti // Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol.-1985.-Vol. 77, N 1-2.-P. 184-185.
277. Morita H., Yanagisawa N., Nakajima T. Zarin poisoning in Matsumoto, Japan / H. Morita, N. Yanagisawa, T. Nakajima // Lancet.- 1995.- P. 290-293.
278. Newcombe D.S. Immune surveillance, organophosphorus exposure, and lymphomagenesis/ D.S. Newcombe // Lancet.-1991.-N 8792.-P. 539-541.
279. Nogueira N. Intracellular mechanisms of killing / N. Nogueira // Immunobiol. Parasit. and Parasitic. Infec.-New York-London, 1984.-P. 53-69.
280. Padgett E.L. Desparate effects of representative dithiocarbamates on selected immunological parameters in vivo and cell survival in vitro in female B6C3F1 mice / E.L. Padgett, D.B. Barnes, S.B Pruett. // J. Toxicol. and Environ. Health.-1992.-Vol. 37, N 4.-P. 559-571.
281. Pfeifer C. Selective activation of Th1- and Th2-like cells in vivo: Response to human collagen IV / C. Pfeifer, J. Murrey, J. Madri, K. Bottomly // Immunol. Rev. –1991.- Vol. 123, N 2. - P. 65-84.
282. Proskolil B.J., Bruun D.A., Lorton J.K. Antigen sensitization influences organophosphorus pesticide-induced airway hyperreactivity/ B.J. Proskolil, D.A. Bruun, J.K. Lorton // Environ. Health. Perspect. - 2008.- Vol. 116, N 3.- P.- 331-338.
283. Pruett S. Urinary corticosterone as an indicator of stress-mediated immunological changes in rats / S . Pruett // J. Immunotoxicol. - 2008.- Vol. 5, N 1.- P.- 17-22.
284. Rey A. del, Besedovsky H., Sorkin E. Endogenous blood levels of corticosterone control the immunologic cell mass and B cell activity in mice / A.

del Rey, H. Besedovsky, E. Sorkin // J. Immunol. - 1984. - Vol. 133. - No 2. - P. 572-575.

285. Rey A. del.. The role of noradrenergic nerves in the development of the lymphoproliferative disease in Fas-deficient, *lpr/lpr* mice / A. del Rey, E. Rogero, A. Kabiersch // J. Immunol.- 2006. – Vol. 176, N 11. - P. 7079-7086.

286. Richman D.P., Arnason B.G.W. 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.

287. Rinner I. Cholinergic signals to and from the immune system / I. Rinner, P. Felsner, A. Falus // Immunology Letters.-1995.-Vol. 44. -P. 217-220.

288. Rinner I, Schauenstein K. The parasympathic nervous system takes part in the immuno-neuroendocrine dialogue / I. Rinner, K. Schauenstein // J. of Neuroimmunology.-1991.-Vol. 34, N 2-3. -P. 165-172.

289. Rodgers K.E. Effects of subchronic treatment with O,O,S-trimethyl phosphorothioate on cellular and humoral immune response systems / K.E. Rodgers, T. Imamura, B.H. Devens // Toxicol. and Appl, Pharmacol.-1985.-Vol. 81, N 2.-P. 310-318.

290. Rodgers K.E. Organophosphorus pesticide immunotoxicity: effects of O,O,S-trimethylphosphorothioate on cellular and humoral immune response systems / K.E. Rodgers, T. Imamura, B.H. Devens // Immunopharmacology.-1986.-Vol. 12, N 3.-P. 193-202.

291. Rodica G. Effects of some insecticides on the bursa of Fabricius in chicken / G. Rodica, M. Srefania // Arch. Exp. Vetetinarmed.-1973.-Vol. 27, N 4.-P. 723-728.

292. Rowe A.M. Developmental immunotoxicity of atrazine in rodents / A.M. Rowe // Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol. - 2008.- Vol. 102, N 2 .- P.- 139-145.

293. Rossi A.,Tria M.A., Baschieri S. et al. Cholinergic agonists selectively of inducen proliferative responses in the mature subpopulation of murine

thymocytes in the mature subpopulation of murine thymocytes / A. Rossi, M.A. Tria, S. Baschieri // J. Neurosci. Res.-1989.-Vol. 24, N 3.-P. 369-373.

294. Rosenberg Y.J. A pretreatment or post exposure treatment for exposure to a toxic substance by pulmonary delivery (inhaler) of a bioscavenger / Y.J. Rosenberg // PCT Int. Appl. WO 2005000195 A2. – 2005. – Vol. 6, N 1. – P. 22-27.

295. Saladi R.N. Mustard: a potential agent of chemical warfare and terrorism / R.N. Saladi E. Smith, A.N. Persaud // Clin. Exp. Dermatol. –2006 – Vol. 1.-N 6. –P. 1-5.

296. Salazar K.D. A review of the immunotoxicity of the pesticide 3,4-dichloropropionanilide / K.D. Salazar, I.A. Ustyugova, K.M. Blundage // J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev. - 2008.- Vol. 8, N 11.- P.- 630-645

297. Schans M. J. van der. Retrospective detection of exposure to nerve agents: analysis of phosphofluoridates originating from fluoride-induced reactivation of phosphorylated BuChE / M. J. Schans van der, M. Polhuijs, C. Dijk van // Archives of Toxicology. - 2004. - Vol.78, № 9. - P. 508-524.

298. Sharp D. Long-term effects of sarin / D. Sharp // Lancet. – 2006.- Vol. 14, N 367 (9505). P.-95-97.

299. Shin T.M. In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents / T.M. Shin, R.K. Kan, J.H. McDonough // Chem. Biol. Interact. – 2005.- Vol. 157-158.- P.293-303.

300. Singh N. Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses / N. Singh, J.R. Perfect // Lancet Infect. Dis. –2007.- Vol. 7, N 6.- P. 395-401.

301. Stephen B. P. Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol / B.P. Stephen, F. Ruping, Z. Qiang // Toxicol. Sci., 2003.- Vol. 75, N 10.-P. 343-354.

302. Street J.C. Alteration of induced cellular and humoral immune responses by pesticides and chemicals of environmental concern: quantitative

studies of immunosuppression by DDT, aroclor 1254, cirbarul / J.C. Street, R.P. Sharma // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*-1975.-Vol. 32, N 3.-P. 587-602.

303. Suke S.G. Melatonin treatment prevents modulation of cell-mediated immune response induced by propoxur in rats / S.G. Suke // *Indian J. Biochem. Biophys.* - 2008.- Vol. 45, N 4.- P.- 278-281.

304. Sullivan J. B. Immunological alterations and chemical exposure / J.B. Sullivan // *J. Toxicol-Clin. Toxicol.*-1989.-Vol. 27, N 6.-P. 311-343.

305. Sunil K.B. Chromosomal aberrations induced by methyl parathion in human peripheral lymphocytes of alcoholics and smokers K.B. Sunil, R. Ankathil, K.S. Devi // *Hum. and Exp. Toxicol.*- 1993.-Vol. 12, N 4.-P. 285-287.

306. Szelenyi J.G. Acetylcholinesterase activity of lymphocytes: 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.

307. Szot R.J. Phenobarbital and doxamethasone inhibition of the adrenocortical response of rats to toxic chemicals and other stresses/ R.J. Szot, S.D. Murphy // *Toxicol. Applied Pharmacol.*-1970.- Vol. 17, N 3.-P. 761-773.

308. Taurog J.D. IgE mediated triggering of rat basophil leukemia cells: lack of evidence for serine esterase activation / J.D. Taurog, C. Fewtrell, E.L. Becker // *J. Immunol.*-1979.-Vol. 122, N 6.- P. 2150-2153.

309. Thomas I.K. Immunosuppressive effect of an impurity of malathion: inhibition of murine side effect of an impurity of malathion inhibition of murine T and B lymphocyte responses by O,O,S-trimethyl phosphorothioate/ I.K. Thomas, T. Imamura // *Toxicol. and Appl. Pharmacol.*-1986a.-Vol. 83, N 3.-P. 456-464.

310. Thomas I.K. Modulation of cellular and humoral immune responses by O,O,S-trimethyl phosphorodithioate, an impurity of commercial malathion / I.K. Thomas, T. Imamura // *Toxicologist.*-1986b.- Vol.6, N 1.-P. 169.

311. Tiefenbach B. Zum Mechanismus der akuten Wirkungen phosphororganischer Pestizide auf das Immunsystem / B. Tiefenbach, G. Hennighausen, P. Lange // *Zbl. Pharm.*-1983.-Bd. 122, H. 2.-S. 156.

312. Tiefenbach B. Dosisabhängigkeit und Mechanismus der acuten Wirkung von Methamidophos auf das Immunsystem der Maus / B. Tiefenbach, S. Wichner // *Z. gesamte Hyg. und Grenzdeb.*-1985.-Bd. 31, N 4.-S. 228-231.

313. Tominaca K. Effects of cholinergic agonists on the protein synthesis in a cultured thymic epithelial cell line / K. Tominaca, K. Tominaca, Y. Kinoshita, F. Hato // *Cell. and Mol. Biol.*-1989.-Vol. 35, N 6.-P. 679-686.

314. Tomoiu A. Do membrane rafts contribute to human immunosenescence? / A. Tomoiu, A. Larbi, C. Fortin, G. Dupuis, T.Jr. Fulop // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*- 2007.- Vol. 1100. – P. 98-110.

315. Trinchievi G. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in humans III. Effect of protease inhibitors and substrates/ G. Trinchievi, M. Marchi de // *J. Immunol.*-1976.-Vol. 116, N 4.-P. 885-891.

316. Tumang J.R. T helper cell-dependent, microbial superantigen-mediated B cell activation in vivo / J.R. Tumang, J.L. Zhou, D. Gietl // *Autoimmunity.* – 1996. –Vol. 24. – P. 247-255.

317. Urban T., Yurbain I., Urban M. et al. Oxidants and antioxidants. Biological effects and therapeutic perspectives / J.R. Tumang, J.L. Zhou, D. Gietl // *Ann. Chir.* - 1995. – Vol. 49, N 5.- P. 427-434.

318. Wiltrout R.W. Humoral immunity in mice following oral administration of selected pesticides / R.W. Wiltrout, C.D. Ercegovich, W. S. Ceglowski // *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*-1978.-Vol. 20, N 3.-P. 423-431.

319. Woodin A.M. The inhibition of locomotion of the polymorphonuclear leukocyte by organophosphorus compounds / A.M. Woodin, A. Harris // *Exp. cell Research.*-1973.-Vol. 77, N. 1-2.- P. 41-46.

320. Woodin A.M., Wieneke A.A. The action of phosphonates on the leukocyte in relation to the mode of action of leucocidin. The properties of the potassium pump and the inhibition of chemotaxis / A.M. Woodin, A.A. Wieneke // *Brit. J. Exp. Path.*-1969.-Vol. 50, N 3.-P. 295.-308.

321. Woof J.M., Kerr M.A. IgA function-variations on a theme / J.M. Woof, M.A. Kerr // *Immunology.* – 2004. – Vol. 113. – P. 175-177.

322. Xiao W., Chirmule N., Schnell M.A. et al., Route of administration determines induction of T-cell-independent humoral responses to adeno-associated virus vectors / W. Xiao, N. Chirmule, M.A. Schnell // Mol. Ther. – 2000. – Vol. 1. – P. 323-329.