

П.Ф. Забродский, В.А. Гришин¹

ВЛИЯНИЕ РЕАКТИВАТОРА ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КАРБОКСИМА НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ Т-ЛИМФОЦИТОВ И ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

В экспериментах на неинбредных крысах установлено, что карбоксим (однократно, 10 мг/кг) существенно снижает, вызванную острым отравлением фосфорорганическими соединениями – ФОС (зарин, метафос) в дозе 1,0 LD₅₀, инактивацию ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, восстанавливая частично или практически полностью гуморальные и клеточные иммунные реакции. Карбоксим не оказывает влияния на Т-независимый гуморальный иммунный ответ, сниженный вследствие редукции ФОС функции В-лимфоцитов (плазмоцитов).

Ключевые слова: *реактиватор холинэстеразы, карбоксим, фосфорорганические соединения, ацетилхолинэстераза, Т-лимфоциты*

ВВЕДЕНИЕ

Применение фосфорорганических соединений (ФОС) в сельском хозяйстве и быту, уничтожение фосфорорганических веществ (российского VX, зарина, зомана) может приводить к отравлению отравлении данными веществами [1,2,4], приводящие к поражению иммунокомпетентных клеток [1,2,10] и формированию вторичного иммунодефицитного состояния [1,2]. Отравления интоксикации могут вызывать также ФОС и различные антихолинэстеразные соединения (обладающие практически такой же токсикодинамикой, как ФОС), используемые в медицине [1,15]. Существует вероятность использования ФОС в террористических и криминальных целях [1,4,9].

Реактиваторы холинэстеразы являются высокоэффективными антидотными средствами при отравлении ФОС. Синтез новых лекарственных средств этой группы [4,5,6,8,12,13] и изучение их активности, наряду с

¹ *Саратовский государственный медицинский университет, ул. Большая Казачья, 112, Саратов, 410012, Россия*

исследованием терапии интоксикации ФОС применением бутирилхолинэстеразы [11] и других препаратов является актуальной задачей фармакологии и токсикологии [1,2].

Влияние реактиваторов холинэстеразы (оксимов), и, в частности, карбоксима на нарушения функций иммунной системы, связанных отравлением антихолинэстеразными веществами и их связи с активностью ацетилхолинэстеразы (АХЭ) на фоне применения не изучено. Исследование данного вопроса представляет большой интерес для обоснования оптимальной фармакологической коррекции нарушений иммунного статуса после интоксикации ФОС [1,2].

Целью исследования являлась оценка влияния реактиватора холинэстеразы карбоксима при остром отравлении ФОС на активность АХЭ Т-лимфоцитов на основные иммунные реакции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на беспородных белых крысах обоего пола массой 180-240 г. ФОС - зарин и метафос - применяли подкожно в дозе 1,0 DL₅₀, которая составляла соответственно 0,24±0,02 и 28,4±2,8 мг/кг. Иммунизацию крыс проводили практически одновременно с введением крысам ФОС внутрибрюшинным введением эритроцитов барана – ЭБ (2·10⁸ клеток). Карбоксим (10 мг/кг) вводили однократно через 5-10 мин после введения ФОС. Активность АХЭ в Т-лимфоцитах определяли через 4 сут после интоксикации, выделяя клетки путем фильтрования селезеночной и тимусной взвеси через нейлоновую вату (“Нитрон”) и осуществляя реакции и расчеты по описанному методу [1]. За единицу активности АХЭ (ЕД) принимали мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл суспензии, содержащей 10⁹ Т-лимфоцитов.

Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии [1,2,3]. Гуморальный иммунный ответ к Т-зависимому (эритроцитам барана – ЭБ) и Т-независимому (Vi-Ag) антигенам определяли через 4 сут по числу антителообразующих клеток

(АОК) в селезенке после действия исследованных факторов с одновременной внутрибрюшинной иммунизацией крыс данными антигенами в дозах $2 \cdot 10^8$ клеток и 8 мкг/кг соответственно. Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) спектрофотометрически по числу оставшихся неразрушенными в ходе цитотоксического теста клеток мишеней через 4 сут после действия ФОС и ФОС в комбинации с карбоксимом. Антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) исследовали через 4 сут, используя спленоциты крыс, спектрофотометрическим методом. Формирование реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), отражающей функцию клеточного иммунного ответа (в частности, активность Th1-лимфоцитов), а также моноцитов и макрофагов, оценивали у крыс по приросту (в %) массы стопы задней лапы. При этом животных иммунизировали внутрибрюшинным введением 10^8 ЭБ. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы на 4 сут после иммунизации. Реакцию ГЗТ определяли через 24 часа.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После острой интоксикации заринном и метафосом активность АХЭ Т-лимфоцитов тимуса у крыс через 4 сут существенно снижалась соответственно в 8,43 и 6,62 раза ($p < 0,05$). Введение карбоксима после интоксикации заринном и метафосом увеличивало активность АХЭ Т-клеток соответственно в 3,73 и 4,05 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателями при интоксикации ФОС (табл. 1). При этом данный параметр оставался ниже контрольного значения при действии зарина в 2,26 раза ($p < 0,05$) и при отравлении метафосом – в 1,63 раза ($p < 0,05$). Аналогичная супрессия активности АХЭ Т-лимфоцитов после острого отравления ФОС и ее увеличение под влиянием карбоксима выявлены при исследовании спленоцитов.

Таблица 1. Влияние карбоксима после острой интоксикации ФОС (1,0 DL₅₀) на активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса и селезенки у крыс (мЕд/10⁹ Т-клеток) через 4 сут (M±m, n = 8- 9)

Серия опытов	Активность ацетилхолинэстеразы, мЕд/10 ⁹ Т-клеток	
	Тимус	Селезенка
Контроль	74,2±6,4	61,2±6,0
Зарин	8,8±1,8*	6,3±1,6*
Метафос	11,2±2,3*	8,6±1,8*
Зарин + карбоксим	32,9±3,4**	27,8±3,2**
Метафос + карбоксим	45,4±4,5**	38,0±3,6**

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

Под влиянием зарина и метафоса (табл. 2) происходило снижение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (по числу АОК к ЭБ в селезенке), характеризующему функцию Th1-лимфоцитов и синтез В-клетками (плазмоцитами) IgM, через 4 сут после интоксикации заринном и метафосом соответственно в 2,75 и 2,12 раза ($p < 0,05$). Снижение данного показателя косвенно характеризует редукцию Th1-лимфоцитов. Известно, что данные Т-клетки помимо клеточных иммунных реакций способны активировать синтез IgM и IgG2a [1,7].

Применение карбоксима увеличивало число АОК к ЭБ после отравления заринном и метафосом (по сравнению с показателями при интоксикации) соответственно в 1,66 и 1,44 раза ($p < 0,05$). При этом под влиянием зарина и метафоса при использовании их антидота карбоксима по сравнению с контролем Т-зависимое антителообразование (число АОК к ЭБ) оставалось сниженным соответственно в 1,65 и 1,47 раза ($p < 0,05$). Частичное восстановление гуморальной иммунной реакции к Т-зависимому антигену обусловлено восстановлением активности АХЭ Т-клеток карбоксимом.

После отравления заринном и метафосом отмечалась редукция Т-независимого антителообразования (число АОК к Vi-Ag) менее выраженная, чем Т-зависимой антителопродукции. Так, данные ФОС снижали исследованный показатель соответственно в 1,64 и 1,35 раза ($p < 0,05$).

Карбоксим не влиял на число АОК к Vi-Ag после отравления заринном и метафосом, так как для реализации данной иммунной необходимы только В-клетки (плазмоциты), которые не содержат АХЭ [1].

Таблица 2. Влияние карбоксима после острого отравления ФОС (1,0 DL₅₀) на гуморальные иммунные реакции крыс (M±m, n= 8-9)

Серия опытов	АОК к ЭБ, 10 ³	АОК к Vi-Ag, 10 ³
Контроль	43,5±4,3	29,7±2,8
Зарин	15,8±2,0*	18,1±1,9*
Метафос	20,5±2,2*	22,0±1,8*
Зарин + карбоксим	26,2±3,0**	21,4±2,1*
Метафос + карбоксим	30,2±2,8**	19,8±1,9*

Примечание. * – p<0,05 по сравнению с контролем; ** – p<0,05 по сравнению с контролем и показателем при интоксикации ФОС.

При воздействии зарины и метафоса происходила супрессия клеточных иммунных реакций (табл. 3). Так, зарин и метафос снижали по сравнению с контролем активность ЕКК (ЕЦ) соответственно в 2,21 и 1,89 раза (p<0,05), АЗКЦ - в 1,76 и 1,57 раза (p<0,05), а реакцию ГЗТ в 1,92 и 1,88 раза (p<0,05) соответственно. Это свидетельствует о том, что под влиянием

Таблица 3. Влияние карбоксима после острого отравления ФОС (1,0 DL₅₀) на клеточные иммунные реакции крыс (M±m, n= 8-9)

Серия опытов	ЕЦ, %	АЗКЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	31,0 ± 2,7	15,7±1,5	37,9±3,5
Зарин	14,0±1,5*	8,9±0,9*	19,7±1,8*
Метафос	16,4±1,6*	10,0±1,1*	20,2±2,0*
Зарин + карбоксим	20,0±2,1**	13,1±1,0°	27,1±2,6**
Метафос + карбоксим	22,3±2,0**	13,8±1,2°	29,5±3,0°

Примечание. * – p<0,05 по сравнению с контролем; ** – p<0,05 по сравнению с контролем и показателем при интоксикации ФОС; ° – p<0,05 по сравнению с показателем при интоксикации ФОС.

антихолинэстеразных ядов поражается функция Th1-лимфоцитов [1], что приводит к снижению ими клеточных иммунные реакции вследствие редукции синтеза γ-интерферона [3]. Использование карбоксима повышало

после интоксикации зарином и метафосом (по сравнению с параметрами при отравлении) активность ЕКК соответственно в 1,55 и 1,39 раза ($p < 0,05$), АЗКЦ – в 1,47 и 1,38 раза

($p < 0,05$), а формирование ГЗТ в 1,38 и 1,46 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Коэффициенты корреляции между активностью АХЭ в Т-лимфоцитах тимуса крыс (на 5 сут) АОК к ЭБ, и клеточными иммунными реакциями составляли от 0,709 до 0,770 ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что карбоксим восстанавливает функцию клеточных иммунных реакций, реактивируя АХЭ на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа. Известно, что АХЭ локализована не только Th1-клетках, определяющих реализацию ГЗТ, но и на ЕКК, от которых зависит ЕЦ и АЗКЦ [1]. Карбоксим частично восстанавливает активность ЕКК, АЗКЦ и реакцию ГЗТ, реактивируя их АХЭ. Известно, что ЕКК, а также К-клетки (ЕКК, осуществляющие реакцию АЗКЦ при помощи низких концентраций IgG), содержат этот фермент [3,14].

Несомненно, что ингибирование АХЭ Т-клеток, ЕКК и К-клеток ФОС имеет существенное значение в формировании постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Снижение Т-независимой иммунной реакции свидетельствует о том, что редукция активности гуморального иммунитета обусловлена не только ингибированием АХЭ Т-хелперов, но и поражающим действием ФОС на В-клетки (плазмоциты).

Таким образом, карбоксим существенно снижает, вызванную ФОС, инактивацию АХЭ Т-лимфоцитов, восстанавливая частично или практически полностью гуморальные и клеточные иммунные реакции. На Т-независимый гуморальный иммунный ответ, сниженный вследствие редукции функции В-лимфоцитов (плазмоцитов), карбоксим влияния не оказывает.

ВЫВОДЫ

1. Острая интоксикация ФОС (зарина и метафоса) в дозе, составляющей 1,0 DL_{50} , снижает Т-зависимую гуморальную иммунную реакцию,

вследствие ингибирования АХЭ Т-лимфоцитов, Т-независимый иммунный ответ в результате супрессии функции В-лимфоцитов (плазмоцитов).

2. Под влиянием острого отравления ФОС уменьшаются клеточные иммунные реакции вследствие инактивации АХЭ Th1-лимфоцитов, ЕКК, К-клеток.

3. Применение карбоксима (однократно в дозе 10 мг/кг) при острой интоксикации отравлении ФОС (1,0 DL₅₀) снижает редукцию Т-зависимого гуморального иммунного ответа и клеточных иммунных реакций вследствие реактивации АХЭ Т-клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. П.Ф. Забродский, В.Г. Мандыч, *Иммунотоксикология ксенобиотиков*.- СВИБХБ Саратов, (2007).
2. П.Ф. Забродский, И.Х. Яфарова, В.Г. Лим и др., *Эксперим. и клин. Фармакология*, **72**(6), 40-42 (2009).
3. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, *Иммунология* (Пер. с англ.), Мир, Москва, (2000).
4. А.Н. Петров, Г.А. Софронов, С.П. Нечипоренко, И.Н. Сомин, *Рос. хим. ж.*, **XLVIII**(2), 110-116 (2004).
5. G. Amitai, R. Adani, E. Fishbein, et al., *J.Appl.Toxicol.*, **26**(1), 81-87 (2006).
6. J. Bajgar, K.Kuca, D. Jun, et al. // *Curr Drug Metab.*, **8**(8), 803-809 (2007).
7. V.St. Georgiev, J.E. Albright, *Immunomodulation drugs, Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.*, **685**, 284– 602 (1993).
8. D. Jun, L. Musilova, K. Kuca, et al. // *Chem Biol Interact.*, **175**(1-3), 421-424 (2008).
9. D.E. Lenz, D.M. Maxwell, I. Korlovich, et al., *Chem. Biol. Interact.*, **157-158**, 205-210 (2005).
10. Q. Li, T. Kawada // *Cell Mol Immunol.*, **3**(3), 171-178 (2006). D. Sharp, *Lancet*, **14** (367) (9505), 95-97 (2006).
11. D. Sharp, *Lancet*, **14** (367) (9505), 95-97 (2006).
12. T.M. Shin, R.K. Kan., J.H. McDonough, *Chem. Biol. Interact.*, **157-158**, 293-303 (2005).
13. T.M. Shih, J.W. Skovira, J.C. O'Donnell and J.H. McDonough // *Toxicol Mech Methods.*, **19**(6-7), 386-400 (2009).
14. A. Tomoiu, A. Larbi, C. Fortin, et al. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1100**, 98-110 (2007).
15. N. J. Wardle, S.W. Bligh , H.R. Hudson // *Curr Med Chem.*, **15**(22), 2230-

P.F.Zabrodskii, V.A. Grishin

**INFLUENCE OF THE REACTIVATOR OF CHOLINESTERASE
KARBOXIME ON ACTIVITY OF ACETYLCHOLINESTERASE T-
LYMPHOCYTES ON IMMUNE RESPONSES UNDER CONDITIONS OF
ACUTE INTOXICATION BY ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS**
Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410012, Russia

It was established in experiments on noninbred rats, that the karboxime (in single dose of 10 mg/kg) essentially reduce of inactivation of acetylcholinesterase of T lymphocytes invoked of acute intoxication of organophosphorus compounds (sarin, metaphos) in dose 1,0 LD₅₀, recovering particulate or almost completely humoral and cellular immune responses. The karboxime does not render influence on the T-independent humoral immune response reduced owing to supression of organophosphorus compounds of function of B-cells (plasmocytes).

Key words: cholinesterase reactivator, karboxime, organophosphorus compounds, acetylcholinesterase, T lymphocytes

Саратовский государственный медицинский университет, ул. Большая Казачья, 112,
Саратов, 410710, Россия