

ГОД: 2010, ТОМ 6 НОМЕР: №1 СТРАНИЦЫ: 046-048
РУБРИКА: ФИЗИОЛОГИЯ И ПАТОФИЗИОЛОГИЯ ТИП СТАТЬИ: ОРИГИНАЛЬНАЯ
СТАТЬЯ
АВТОРЫ: П.Ф. ЗАБРОДСКИЙ, В.Ф., В.Г. ЛИМ, И.Х. ЯФАРОВА
ОРГАНИЗАЦИЯ: САРАТОВСКИЙ ВОЕННЫЙ ИНСТИТУТ БИОЛОГИЧЕСКОЙ И
ХИМИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ, ГБОУ ВПО САРАТОВСКИЙ ГМУ ИМ. В.И.
РАЗУМОВСКОГО МИНЗДРАВСОЦРАЗВИТИЯ РОССИИУДК 615.9.092

**АКТИВАЦИЯ Р-450-ЗАВИСИМЫХ МОНООКСИГЕНАЗ ИЗМЕНЯЕТ
ИММУНОТОКСИЧНОСТЬ ФОСФОРООРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ В
ЗАВИСИМОСТИ ОТ ХАРАКТЕРА ИХ МЕТАБОЛИЗМА.**

П.Ф. Забродский - Саратовский военный институт биологической и химической безопасности, заслуженный деятель науки РФ, профессор кафедры технологии уничтожения химического оружия и токсичных веществ Саратовского военного института биологической и химической безопасности, профессор, доктор медицинских наук; В.Г. Лим - ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, доцент кафедры наркологии Саратовского государственного медицинского университета, доктор медицинских наук; И.Х. Яфарова - ГОУ ВПО Саратовский ГМУ Росздрава, старший преподаватель кафедры Военной и экстремальной медицины. E-mail: pz@renet.com.ru

**ACTIVATION OF P-450-DEPENDED MONOOXYGENASES CHANGE
IMMUNOTOXICITY OF PHOSPHOROORGANIC COMPOUNDS DEPENDING
ON THEIR METABOLISM CHARACTER.**

P.F. Zabrodskii, Saratov Military Institute of Biological and Chemical Safety, Honored Worker of Science of the Russian Federation, Faculty of Technology of Destruction of Chemical Weapon and Toxic Substances; Professor; Doctor of Medical Science; V.G. Lim - Saratov State Medical University, Department of Narcology; Senior Lecturer, Doctor of Medical Science; I.H. Yafarova - Saratov State Medical University, Department of Military and Extreme Medicine; Senior Lecturer. E-mail: pz@renet.com.ru

Ответственный автор - Забродский Павел Францевич

В экспериментах на беспородных белых крысах установлено, что применение индукторов монооксигеназной системы (ИМС) фенобарбитала и бензонала до острого отравления животных хлорофосом в дозе 1,0 ЛД₅₀, метаболизирующегося в организме до соединений с более высокой токсичностью, вызывает увеличение его иммунотоксических свойств. Острое отравление диметилдихлорвинилфосфатом (ДДВФ) (1,0 ЛД₅₀), биотрансформация которого протекает с образованием

малотоксичных и нетоксичных соединений после введения ИМС вызывает снижение его супрессирующего влияния на показатели системы иммунитета.

Ключевые слова: цитохром Р-450, карбофос, диметилдихлорвинилфосфат, иммунотоксичность, фенобарбитал, бензонал.

It was established in experiments on outbred white rats, that the application of the monooxygenase system (IMS) inducers of phenobarbital and benzonal up to acute poisoning of animals by trichlorfom in a dose 1,0 LD₅₀, metabolized in an organism to chemicals with higher toxicity, causes its immunotoxic properties increase. The acute dimethyldichlorvinylphosphate (1,0 LD₅₀) poisoning, which biotransformation proceeds with formation of less-toxic and non-toxic compounds after IMS introduction causes its decrease of suppression influence on immunity system indices.

Keywords: cytochrome P-450, chlorophos, dimethyldichlorovinylphosphate, immunotoxicity, phenobarbital, benzonal.

Индукции цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ барбитуратами, зиксорином и другими средствами является одним из способов терапии отравлений фосфорорганическими соединениями (ФОС) [1,2]. Монооксигеназная система – МС – (система цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ) тесно связана с иммунологическими механизмами в системе поддержания химического гомеостаза [3,4]. Ферменты МС содержатся в основном в печени, в меньших количествах они находится и в других тканях (лимфоидных органах, почках, коже). Барбитураты и другие соединения, индуцируя энзимную активность МС, увеличивают ее способность осуществлять биотрансформацию ксенобиотиков в десятки раз [3,5,6]. В лимфоидной ткани животных и человека идентифицированы следующие формы цитохрома Р-450: Р-450PB-1, Р-450PB-4, Р-450MC-1 α , Р-450MC-1 β , а также бензпиренгидроксилаза, этоксирезоруфин-О-деэтилаза, аминопирин-н-деметилаза [5].

Данные литературы позволяют полагать, что под влиянием индукторов МС токсичные химические вещества (TXB), не метаболирующиеся 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 приводить к обратному эффекту [3,4].

Целью исследования являлось изучение влияния индукторов Р-450-зависимых монооксигеназ (фенобарбитала, бензонала) на иммунотоксические свойства метаболитов фосфорорганических соединений - хлорофоса и

диметилдихлорвинилфосфата (ДДВФ), которые метаболизируются до более (хлорофос) и менее (диметилдихлорвинилфосфата (ДДВФ) токсичных веществ.

Материал и методы исследования. Опыты проводили на неинbredных крысах обоего пола массой 180-250 г. В течение трех суток до острой интоксикации ФОС животным внутрижелудочно вводили индукторы микросомальных энзимов печени фенобарбитал (ФБ) или бензонал (БЗ) в дозах 50 и 70 мг/кг соответственно. После введения хлорофоса и ДДВФ подкожно в дозе 1,0 DL₅₀, которая для данных токсикантов составляла соответственно 430±27,2 и 64,5±2,3 мг/кг, показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии [3]. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому (эритроцитам барана - ЭБ) и тимуснезависимому (брюшнотифозному Vi-антителу - Vi-Ag) антигенам оценивали через 5 суток по числу АОК в селезенке после острой интоксикации ТХВ с одновременной внутрибрюшинной иммунизацией крыс данными антигенами в дозах 2·10⁸ клеток и 8 мкг/кг соответственно. В использованном тесте гуморальная иммунная реакция на введение ЭБ характеризует способность Т-хелперов типа 1 (Th1) участвовать в продукции В-лимфоцитами (плазматическими клетками) IgM, а гуморальный иммунный ответ на Vi-Ag отражает активность синтеза этими клетками IgM без участия Th1 [3]. Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) через 48 ч после острого отравления ФОС спектрофотометрически. Функцию К-клеток оценивали по показателю антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) через 5 сут после иммунизации крыс 10⁸ ЭБ, используя их спленоциты, спектрофотометрическим методом. Формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) определяли у животных по приросту массы стопы задней лапы (в %). При этом крыс внутрибрюшинно иммунизировали 10⁸ ЭБ через 30 мин после введения ТХВ. Разрешающую дозу ЭБ (5·10⁸) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут. Реакцию ГЗТ определяли через 24 ч.

Ферментиндуцирующие свойства ФБ и БЗ оценивали по длительности сна, вызванного гексобарбиталом в дозе 80 мг/кг. По методикам, описанным [7,8], в микросомальной фракции печени определяли содержание белка и цитохромов Р-450 и b-5 через 3 сут после применения индукторов МС.

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

Результаты исследования. Применение ФБ (табл.1) приводило к 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 БЗ – соответственно в 1,24; 1,16; 1,31 и 1,22 раза ($p>0,05$). Под влиянием ФБ и БЗ активность ЕКК повышалась соответственно в 1,24 и 1,36 раза ($p<0,05$). Иммуностимулирующие эффекты ФБ и БЗ практически не отличались.

Острая интоксикация ДДВФ вызывала снижение Т-зависимого, Т-независимомого ответа 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 ($p<0,05$).

Таблица 1.

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

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 ТХВ без применения индукторов МС.

После действия ФОС с различным характером метаболизма (хлорофос и ДДВФ) после трехдневного введения ФБ и БЗ вызывали статистически значимую редукцию показателей системы иммунитета по сравнению с контролем и параметрами иммунного статуса только после интоксикации ТХВ без применения индукторов МС ($p<0,05$). При этом хлорофос, метаболизирующийся до более токсичного ДДВФ [6] после применения ФБ 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 БЗ - 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 (ФБ и БЗ) после острой интоксикации ТХВ, в частности хлорофосом, метаболизирующими до более токсичных соединений (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 (диметилfosфата, дихлорвинилового спирта, дихлорацетальдегида, а также дихлорэтанола, дихлоруксусной кислоты) [6] после индукции ФБ и БЗ цитохромом Р-450-зависимых монооксигеназ значительно снижалась по сравнению с действием диметилдихлорвинилfosфата без применения индукторов МС и была несущественно ниже контрольных значений ($p>0,05$). Под влиянием ФБ и БЗ статистически значимо уменьшилось время гексеналового сна, содержание белка и цитохромов Р-450 и b5 в печени (табл. 2), что, вероятно, обусловливает повышение показателей системы иммунитета.

Таблица 2.
Влияние фенобарбитала и бензонала на содержание белка и цитохромов в микросомах печени крыс ($M\pm m$, $n=9-12$)

Показатели	Контроль	Фенобарбитал	Бензонал
Гексобарбиталовый сон, мин	$21,4\pm2,5$	$5,3\pm1,8^*$	$9,1\pm2,1^*$
Белок, мг/орган	$54,7\pm6,1$	$145,2\pm14,3^*$	$135,3\pm12,9^*$
Цитохром Р-450, нмоль/г белка	$0,92\pm0,05^*$	$4,41\pm0,43^*$	$3,36\pm0,35^*$
Цитохром b5, нмоль/г белка	$0,38\pm0,03$	$0,63\pm0,04^*$	$0,78\pm0,07^*$

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

Обсуждение полученных результатов. Увеличение показателей, характеризующих состояние иммунного статуса у животных, при назначении ФБ и БЗ, может быть обусловлено индукцией цитохромом Р-450-зависимых монооксигеназ в лимфоидной ткани (иммунокомпетентных клетках - ИКК). Известно, что витамин А, левамизол, фенобарбитал и другие вещества, индуцирующие МС, способны повышать активность Т-лимфоцитов, ЕКК в результате индукции в ИКК цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ [4].

Цитохром Р-450-зависимые монооксигенены печени и лимфоидной ткани, значительно повышая биотрансформацию хлорофоса, превращают его в более токсичный ДДВФ (феномен «летального синтеза») [2,6], что существенно увеличивает иммунотоксичность подвергшегося биотрансформации хлорофоса.

Угнетение реакций иммунной системы ДДВФ, снижается предварительной индукцией МС, 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) [3,6]

Таким образом, в зависимости от характера метаболизма ФОС (образующихся при их биотрансформации продуктов) цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы могут повышать или снижать их иммунотоксичность.

Заключение.

1. 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, метаболизирующими в организме до высокотоксичного соединения диметилдихлорвинилфосфата (ДДВФ), вызывает увеличение его иммунотоксических свойств.
2. Применение индукторов цитохрома Р-450-зависимых монооксигеназ до острой интоксикации диметилдихлорвинилфосфата (ДДВФ), который биотрансформируется в организме до малотоксичных или нетоксичных веществ, существенно уменьшают его супрессирующее действие на показатели системы иммунитета.

Библиографический список:

1. Забродский, П.Ф. Оценка защиты фармакологическими средствами, индуцирующими монооксигеназные энзимы от пестицидов по показателям летальности / П.Ф. Забродский, М.Н. Линючев // Эксперим. и клин. фармакол. - 1993.- Т.56, №5.- С. 47-49.
2. Каган, Ю.С. 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.
3. Забродский, П.Ф. Иммунотоксикология ксенобиотиков/ П.Ф. Забродский, В.Г. Мандыч. - Саратов, СВИБХЗ, 2007.- С.420
4. 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, N 5.-С. 1276-1280.
5. Козлов, В.А. Активность цитохрома 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.

6. Общая токсикология. // Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. - М.: Медицина, 2002. - С. 608. 56-58.
7. 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
8. Власова, Т.А. Определение содержания белка, цитохромов Р-450 и b-5 после применения индукторов монооксигеназной системы / Т.А. Власова, А.И. Венгеровский, А.С. Саратиков // Хим.-фарм. журн. - 1994.- №3. -С.