

**РОЛЬ ХОЛИНЕРГИЧЕСКОЙ И ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ
ФУНКЦИИ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ФОРМИРОВАНИИ АКТИВАЦИИ И
РЕДУКЦИИ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ ОТРАВЛЕНИЯХ
РАЗЛИЧНЫМИ ДОЗАМИ ФОСФОРОГАНИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ**

П.Ф. Забродский, В.Г. Лим, И.Х. Яфарова, А.В. Кузьмин

Саратовский государственный медицинский университет

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что применение ацетилхолина (АХ) и ацеклидина (АЦ) в дозе 0,1 DL₅₀ в течение 3 сут и фосфороганического соединения (ФОС) диметилдихлорвинилфосфата (ДДВФ) в дозе 0,05 DL₅₀ однократно повышают функцию Th1- и Th2- лимфоцитов и продукцию ими цитокинов. ДДВФ в дозе 0,5 DL₅₀ (однократно) вызывал обратный эффект. АХ и АЦ увеличивали активность ацетихолинэстеразы (АХЭ) в Т-лимфоцитах, а ДДВФ (0,5 DL₅₀, однократно) вызывал ее снижение. При остром отравлении ФОС может в зависимости от дозы реализовать, как увеличение иммунных реакций (действия ацетилхолина), так и их снижение (ингибиция АХЭ Т-лимфоцитов).

Ключевые слова: холиномиметики, ФОС, иммунотоксичность, Th1-, Th2-лимфоциты, цитокины

В сельском хозяйстве, в различных отраслях промышленности и медицине используется большое число антихолинэстеразных веществ. В основном, это вещества, относящиеся к фосфороганическим соединениям (ФОС). Широкое использование данных токсикантов может приводить к загрязнению окружающей среды, вызывать интоксикации людей и животных [3,4]. Не исключено возникновение аварийных ситуаций на объектах, занимающихся уничтожением химического оружия (ХО), в частности, ФОС, относящихся к боевым отравляющим веществам в соответствии с международными соглашениями [2,4]. Это может сопровождаться

выбросом в окружающую среду ФОС, а также поражением персонала объектов и населения прилегающих к ним территорий [5]. Не вызывает сомнения, необходимость исследования механизмов формирования постинтоксициационного иммунодефицитного состояния при отравлениях ФОС с целью профилактики и лечения, возникающих при этом различных инфекционных осложнений и заболеваний [4].

Несмотря на уничтожение ХО, в настоящее время за рубежом продолжаются разработки высокоэффективных антидотных средств при поражении боевыми ФОС [9], анализируются их отдаленные эффекты [13]. Вероятно, это связано с существующей возможностью использования ХО в террористических и криминальных целях [4,5], а также в локальных вооруженных конфликтах [12].

Изучение иммунотропных свойств ФОС неразрывно от исследования роли холинергических рецепторов в функции иммунокомпетентных клеток (ИКК), а также их взаимосвязи с продукцией Т-клетками цитокинов [1]. Известно, что активация м-холинорецепторов Т-лимфоцитов сопровождается увеличением продукции γ -интерферона (ИФН- γ) и ИЛ-4 [1], активирующих соответственно клеточные (а также синтез IgM) и гуморальные иммунные реакции (продукцию IgG и других классов) [10, 11], а ингибирование ацетилхолинэстеразы (АХЭ) Т-клеток сопровождается снижением их функции и редукцией связанного с ними иммунного ответа [3]. Вероятно, с возможностью реализации этих противоположных по своим последствиям эффектами ФОС исследователи в ряде случаев отмечают, не редуцирующее, а активирующее действие ФОС на гуморальные и клеточные иммунные реакции [4].

Целью исследования являлась оценка возможности как усиления под влиянием ФОС гуморального и клеточного иммунного ответа, так и его супрессии в зависимости, с одной стороны, от соотношения активации м-холинореактивных структур Т-клеток и связанной с ними продукцией

цитокинов, и степени инактивации ацетилхолинэстеразы Th1- и Th2-лимфоцитов, с другой стороны.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на беспородных белых крысах обоего пола массой 180-240 г. М-холиномиметик ацеклидин (АЦ) вводили однократно подкожно в дозе 0,1 DL₅₀ ежедневно в течение 3 сут через 1 сут после внутрибрюшинной иммунизации животных эритроцитами барана – ЭБ (2·10⁸ клеток). Ацетилхолин хлорид (АХ) применяли подкожно в дозе 0,1 DL₅₀ ежедневно двукратно (в связи с быстрым гидролизом) в течение 3 сут через 1 сут после иммунизации ЭБ. (DL₅₀ АЦ и АХ при подкожном введении составляли соответственно 4,1±0,2 и 215±18 мг/кг). ФОС диметилдихлорвинилфосфат (ДДВФ) применяли подкожно однократно в дозах 0,05 и 0,5 DL₅₀ (DL₅₀ - 64,5±2,3 мг/кг) через 2-е сут после иммунизации крыс, то есть в продуктивной фазе иммуногенеза. Контрольным группам крыс через 1 сут после иммунизации ЭБ подкожно вводили 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия, объем которого соответствовал объему, получаемых животными подопытных групп растворов холинергических веществ (ХВ). Показатели системы иммунитета оценивали методами общепринятыми в экспериментальной иммунотоксикологии [2,3,4,6]. Функцию Th1-лимфоцитов оценивали по гуморальной иммунной реакции к Т-зависимому антигену (числу антителообразующих клеток к ЭБ в селезенке, синтезирующих IgM) на 5 сут после иммунизации ЭБ [6], а также по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Формирование ГЗТ, исследовали у животных по приросту массы стопы задней лапы в %. Разрешающую дозу ЭБ (5·10⁸ клеток в 0,05 мл изотонического раствора хлорида натрия) вводили под апоневроз стопы задней лапы на 4 сут контрольной и подопытной группам крыс. Реакцию ГЗТ определяли через 1 сут. Функцию Th2-лимфоцитов оценивали на 8 сут по числу АОК к ЭБ в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле, характеризующим синтез IgG [6,14].

Концентрацию цитокинов ИФН- γ и ИЛ-4, которые синтезируют соответственно Th1- и Th2-лимфоциты [6,7], определяли в плазме крови крыс на 5 и 8 сут после первой инъекции ХВ (иммунизацию ЭБ контрольной и подопытной групп проводили за 1 сут до введения ХВ) методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) [6], используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int. Контрольная группа животных получала подкожно вместо ХВ 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Учитывая статистически незначимое ($p>0,05$) изменение концентрации цитокинов на 5 и 8 сут после первой инъекции ХВ и в контроле, в контрольной группе вычисляли среднее значение их содержания в плазме крови на 5 и 8 сут.

Исследовали способность ингибировать АХЭ Т-лимфоцитов ДДВФ в дозах 0,05 и 0,5 DL_{50} , который вводили подкожно однократно. Активность АХЭ в Т-лимфоцитах определяли на 5 сут после первого введения ХВ, выделяя клетки путем фильтрования селезеночной сусpenзии через нейлоновую вату (“Нитрон”) [8] и осуществляя реакции и расчеты по методу [15]. За единицу активности АХЭ (ЕД) принимали мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл сусpenзии, содержащей 10^9 Т-лимфоцитов. Контрольной группе крыс через 1 сут после иммунизации ЭБ подкожно вводили 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия, объем которого соответствовал объему, получаемых животными подопытных групп растворов ХВ. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t -критерия достоверности Стьюдента

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Под влиянием АХ (табл. 1) происходило увеличение гуморального иммунного ответа на 5 сут к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов, а также формирования ГЗТ по сравнению с контрольным уровнем соответственно в 1,37 и 1,30 раза ($p<0,05$), а на 8 сут после иммунизации отмечалось возрастание продукции IgG (по числу АОК в селезенке) в 3,37

раза ($p<0,05$), свидетельствующее о повышении активности Th2-лимфоцитов. Аналогичные данные получены при введении АЦ.

Таблица 1. Влияние холинергических веществ на функцию Th1- и Th2-лимфоцитов у крыс ($M\pm m$, $n = 9-11$)

Группа	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10^3	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10^3
Контроль	48,2 \pm 4,0	38,0 \pm 3,1	17,1 \pm 1,6
АХ (1)	65,9 \pm 5,4*	49,4 \pm 4,3*	23,4 \pm 2,3*
Ацеклидин (1)	68,5 \pm 6,1*	56,6 \pm 5,2*	26,8 \pm 2,1*
ДДВФ (2)	62,8 \pm 5,5*	48,3 \pm 4,2*	22,5 \pm 2,0*
ДДВФ (3)	11,4 \pm 1,3*	19,8 \pm 2,0*	12,2 \pm 1,5*

Примечание. ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа. Здесь и табл. 2 и 3: - 1, 2, 3 – дозы соответственно 0,1; 0,05 и 0,5 DL_{50} ; * - $p<0,05$ по сравнению с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что холиномиметики в дозе 0,1 DL_{50} (эта доза приблизительно соответствует терапевтической разовой дозе для человека) повышают функцию Th1- и Th2- лимфоцитов у крыс.

При воздействии ДДВФ в минимальной дозе (0,05 DL_{50}) отмечалось существенное активация функции как Th1-, так и Th2-лимфоцитов. Так, Т-зависимое антителообразование, реакция ГЗТ и число АОК к ЭБ, свидетельствующее об интенсивности продукции IgG увеличивались соответственно в 1,30; 1,27 и 1,32 раза ($p<0,05$).

ДДВФ в максимальной из применявшимся доз (0,5 DL_{50}) вызывал редукцию активности исследованных субпопуляций Т-клеток. Так, ФОС вызывало редукцию в селезенке крыс числа АОК к ЭБ, свидетельствующих о продукции IgM в 4,23 раза ($p<0,05$), супрессию реакции ГЗТ и синтеза IgG (оцениваемого по числу АОК на ЭБ) соответственно в 1,92 и 1,40 раза ($p<0,05$).

Таким образом, необратимые ингибиторы холинэстеразы, в частности, ФОС способны, как повышать активность Th1- и Th2- лимфоцитов у крыс в дозе 0,05 DL₅₀, вследствие действия АХ, так и снижать функцию этих субпопуляций Т-клеток в результате ингибирования АХЭ на их клеточной мембране [4,15] в дозах превышающих 0,05 DL₅₀ и близких к 0,5 DL₅₀.

Исследование концентрации цитокинов в плазме крови крыс (табл. 2) показало, что на 5 и 8 сут после иммунизации и последующего воздействия АХ выявлено увеличение содержания ИФН- γ соответственно в 1,53 и 1,51 раза (p<0,05), а ИЛ-4 - в 1,25 и 1,29 раза (p<0,05) соответственно. Аналогичные изменения были установлены при введении м-холиномиметика АЦ. Введение ДДВФ в дозе 0,05 DL₅₀ приводило на 5 и 8 сут после иммунизации к возрастанию ИФН- γ в 1,28 и 1,29 раза (p<0,05), а ИЛ-4 - в 1,10 и 1,16 раза (p>0,05) соответственно. Это данные подтверждают увеличение активности Th1- и Th2- лимфоцитов холиномиметиками в дозе 0,1 DL₅₀ и ДДВФ в дозе 0,05 DL₅₀.

Таблица 2. Влияние холинергических веществ на концентрацию цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл (M \pm m, n =7)

Вещества		ИФН- γ	ИЛ-4	ИФН γ /ИЛ-4
Контроль (n=14)		856 \pm 71	126 \pm 12	6,8
АХ (1)	5	1307 \pm 75*	158 \pm 17*	8,3
	8	1294 \pm 85*	162 \pm 15*	8,0
Ацеклидин (1)	5	1406 \pm 87*	166 \pm 16*	8,5
	8	1320 \pm 90*	171 \pm 15*	7,7
ДДВФ (2)	5	1097 \pm 83*	139 \pm 14	7,9
	8	1107 \pm 89*	146 \pm 13	7,6
ДДВФ (3)	5	438 \pm 42*	80 \pm 7*	5,5
	8	429 \pm 37*	84 \pm 8*	5,1

Примечание: 5, 8 - время исследования после иммунизации, сут.

Увеличение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 характеризует повышение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток, а уменьшение данного соотношения свидетельствует о большей супрессии активности лимфоцитов Th2-лимфоцитов по сравнению с Th1-

клетками [6,7]. Нами установлено, что соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 при введении АХ, АЦ, ДДВФ в минимальной дозе составляло через 5 сут соответственно 8,3; 8,5 и 7,9, а через 8 сут – 8,0; 8,7 и 7,7 (контроль – 6,8). Максимальная доза ДДВФ приводила к снижению соотношению ИФН- γ /ИЛ-4 через 5 и 8 сут соответственно в 5,5 и 5,1 раза. Это свидетельствует о том, что холиномиметики и ДДВФ в дозах соответственно 0,1 и 0,05 DL₅₀ повышают активность Th1-клеток в большей степени, чем Th2-лимфоцитов, а ДДВФ в дозе 0,5 DL₅₀ приводит к относительному снижению функции Th1-клеток. Повышение активности Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами под влиянием АХ и АЦ позволяет предполагать наличие большего числа м-холинорецепторов на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа.

Установлено (табл. 3), что Т-лимфоциты, выделенные из селезенки, после воздействия АХ и АЦ вызывало статистически значимое увеличение активности АХЭ в Т-лимфоцитах соответственно в 1,35 и 1,30 раза (p<0,05). Воздействие ДДВФ в минимальной дозе практически не снижало содержание АХЭ в Т-клетках, а действие ФОС в дозе 0,5 DL₅₀ вызывало достоверное снижение активности АХЭ в Т-лимфоцитах в 2,79 раза (p<0,05).

Таблица 3. Влияние холинергических веществ на активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах спленоцитов крыс на 5 сут после иммунизации (M \pm m, n = 9-13)

Вещества	Активность АХЭ, нмоль /мл · мин /10 ⁹ Т-клеток
Контроль	52,2 \pm 4,5
АЦХ (1)	70,4 \pm 6,4*
Ацеклидин (1)	67,8 \pm 5,8*
ДДВФ (2)	47,6 \pm 4,9
ДДВФ (3)	18,7 \pm 2,0*

Полученные результаты свидетельствуют, что активность АХЭ в Т-клетках при действии АХ и АЦ была прямо связана с показателями

иммунных реакций, а при интоксикации ДДВФ дозе 0,5 DL₅₀ эта связь носила обратный характер.

Введение АХ и АЦ вызывало увеличение активности АХЭ в Т-клетках, вероятно, вследствие реализации механизмов, направленных на поддержание иммунного гомеостаза путем увеличения гидролиза АХ на мемbrane Т-лимфоцитов. При этом достигалось снижение данного медиатора на м- и н-холинорецепторы, наличие которых на Т-клетках доказано [1].

Супрессирующий эффект ФОС в относительно больших дозах в отношении преимущественно Th1-лимфоцитов обусловлен существенным увеличением в крови в крови концентрации кортикостерона [4], к которому в большей степени чувствительны лимфоциты Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [6].

Таким образом, применение АХ и АЦ (0,1 DL₅₀, в течение 3 сут) и фосфорорганического соединения ДДВФ в дозе 0,05 DL₅₀ (однократно) повышают функцию Th1- и Th2- лимфоцитов и продукцию ими цитокинов. ДДВФ в дозе 0,5 DL₅₀ (однократно) вызывал обратный эффект. АХ и АЦ увеличивали активность АХЭ в Т-лимфоцитах, ДДВФ в дозе 0,05 DL₅₀ не влиял на нее, а в дозе 0,5 DL₅₀ вызывал ее снижение. При интоксикации ФОС в зависимости от дозы могут реализоваться два основных противоположных эффекта: активация иммунных реакций вследствие действия АХ на м-холинорецепторы Т-клеток и редукция иммунного ответа в результате ингибиции АХЭ клеточной мембраны Т-лимфоцитов (как правило, активирующее действие ФОС на ИКК реализуется при дозах токсиканта в несколько раз меньших, чем среднелетальные).

ЛИТЕРАТУРА

1. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Мандыч В.Г. // Эксперим. и клин. фармакол.-2008. –Т.71, № 2. –С. 47-49.
2. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Мандыч В.Г., Кадушкин А.М. // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2007. – Т.144, №7. – С. 62-64.

3. Забродский П.Ф., Германчук В.Г. // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. – Т.131, №5. – С. 551-553.
4. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков: Монография. – Саратов, СВИБХБ, 2007. – 420 с.
5. Петров А.Н., Софронов Г.А., Нечипоренко С.П., Сомин И.Н. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. Хим. об-ва им Д.И. Менделева). – 2004. – Т. XLVIII, № 2. – С.110–116.
6. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. - М.: Мир, 2000. – 582 с.
7. Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед.-2005.-Т. 140, № 12.-С. 622-624.
8. Ширшев С.В. // Бюл. эксперим. биол. и мед. -1998.- №6.- с. 666-669.
9. Amitai G., Adani R., Fishbein E. et al. // J.Appl.Toxicol. –2006 – Vol. 26.-N 1. –P.81-87.
10. Georgiev V.St., Albright J.E. // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993. –Vol. 685. – P.284-602.
11. Pfeifer C., Murrey J., Madri J., Bottomly K. // Immunol. Rev. –1991.- Vol. 123, No 2. - P. 65-84.
12. Saladi R.N., Smith E., Persaud A.N. // Clin. Exp. Dermatol. –2006 – Vol. 1.- № 6. –P. 1-5.
13. Sharp D. // Lancet. – 2006. – Vol. 14, N 367 (9505). P. 95– 97.
14. Smialowicz R. J., Luebke R.W., Riddle M.M. // Toxicology. – 1992. – Vol.75, №5. – P.235-247.
15. Szelenyi J.G., Bartha E., Hollan S.R.// Brit. J. Haematol. – 1982.- Vol. 50, №2. – P. 241-245.

THE ROLE OF CHOLINERGIC AND CYTOKINE OF A REGULATION OF THE FUNCTION OF T-LYMPHOCYTES IN FORMATION OF AN ACTIVATION AND REDUCTION OF IMMUNE RESPONSES AT POISONING BY VARIOUS DOSES OF ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS

P. F. Zabrodskii, V.G. Lim, I.H. Yafarova, A.V. Kuzymin

Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410710, Russia

It was established in experiments on noninbreds rats that administration of acetylcholinum (ACH) and aceclidine (AC) in a dose 0,1 DL₅₀ (within 3 day) and organophosphorus compounds (OPC) - dimethyldichlorvinylphosphate (DDVP) - in a dose 0,05 DL₅₀ (in a single dose) increase of function of Th1- and Th2- lymphocytes and production by them cytokines. DDVP invoked revertive effect in a single dose 0,5 DL₅₀. ACH and AC increase of activity of acetylcholinesterase

(ACE) in T lymphocytes, and DDVP (0,5 DL₅₀, in a single dose) invoked its downstroke. At an acute venenating of OPC can in dependence on a dose be realized, as augmentation of immune responses (action of acetylcholinum), and their downstroke (inhibition ACH of T lymphocytes).

Keywords: cholinomimetics, organophosphorus compounds, immunotoxicity, Th1-, Th2-lymphocytes, cytokines