

**П.Ф. Забродский, И. Х. Яфарова, В.Г. Германчук,
В.Г. Лим**

**МОДУЛЯЦИЯ АНТИДОТАМИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ
СОЕДИНЕНИЙ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ И СИНТЕЗА
ЦИТОКИНОВ, СВЯЗАННЫХ С ФУНКЦИЕЙ TH1-, TH2-
ЛИМФОЦИТОВ**

*Саратовский военный институт химической и биологической безопасности
Минобороны России*

В экспериментах на крысах Wistar установлено, что при остром отравлении фосфорорганическими соединениями в дозе 1,0 DL₅₀ (веществом VX, метафосом) в продуктивной фазе иммуногенеза супрессия иммунных реакций и снижение концентрации в крови цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4) с уменьшением соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 свидетельствует о том, что редукция функции Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-клетками более выражена. Атропина сульфат (однократно, 10 мг/кг) увеличивал снижение активности Th1- и Th2-лимфоцитов и синтеза ими цитокинов в равной степени, а карбоксим (однократно, 10 мг/кг) частично восстанавливал преимущественно активность Th1-клеток и синтез ИФН- γ .

Ключевые слова: *фосфорорганические соединения, антидоты, иммуотоксичность, Th1, Th2-лимфоциты, цитокины*

Введение. Широкое использование фосфорорганических соединений (ФОС) в сельском хозяйстве и быту может приводить к загрязнению окружающей среды, вызывать острые, подострые и хронические интоксикации [2,3,15]. Отравления интоксикации могут вызывать также ФОС и различные антихолинэстеразные соединения (обладающие практически такой же токсикодинамикой, как ФОС), используемые в медицине. Кроме того, в настоящее время химическое оружие (ХО) на основе фосфорорганических

веществ - ФОВ (российского VX, зарина, зомана) уничтожаются согласно Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения ХО и его уничтожении [1,2,4]. При этом не исключена возможность возникновения аварийных ситуаций в процессе уничтожения ХО, в частности, ФОВ, которые могут приводить заражению почвы, воздуха, воды, приводить к поражению персонала химических объектов и населения прилегающих территорий. Существует вероятность использования ФОВ в террористических и криминальных целях [4,12].

В настоящее время за рубежом активно ведутся разработки высокоэффективных антидотных средств при поражении ФОВ [8,11,13], анализируются их отдаленные эффекты [12].

Модуляция нарушений функции иммунной системы, в частности, синтеза Т-клетками цитокинов при отравлении ФОВ их антидотами не исследована. Известно, антидоты при поражении ФОВ могут как уменьшать, так и усиливать их иммунотоксические эффекты [2]. Существует необходимость оценки комбинированного действия средств специфической терапии при поражении ФОВ на иммунные реакции и продукцию Th1- и Th2-лимфоцитами цитокинов с целью обоснования необходимости фармакологической коррекции постинтоксикационных нарушений иммунного гомеостаза [2].

Целью исследования являлась оценка острого действия ФОС в условиях применения антидотных средств (м-холиноблокатора атропина сульфата и реактиватора холинэстеразы карбоксима) на иммунные реакции, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов, а также на синтез продуцируемых этими клетками цитокинов (соответственно ИФН- γ и ИЛ-4).

Материал и методы исследования. Опыты проводили на крысах Wistar обоего пола массой 180-240 г. ФОС российский VX и метафос применяли в дозе 1,0 DL₅₀ через 3-е сут после иммунизации крыс эритроцитами барана – ЭБ ($2 \cdot 10^8$ клеток), то есть в продуктивной фазе иммуногенеза. DL₅₀ VX и метафоса при подкожном введении составляли

соответственно $0,018 \pm 0,004$ и $25,3 \pm 2,6$ мг/кг. Атропина сульфат (10 мг/кг), карбоксим (10 мг/кг) вводили однократно через 5-10 мин после введения ФОС. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунологии [2,5]. Функцию Th1-лимфоцитов оценивали по гуморальной иммунной реакции к тимусзависимому антигену (числу антителообразующих клеток к ЭБ в селезенке, синтезирующих IgM) через 5 сут после иммунизации ЭБ [5], а также по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Формирование ГЗТ, исследовали у животных по приросту массы стопы задней лапы в %. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы на 4 сут. 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 [5,14].

Концентрацию цитокинов ИФН- γ и ИЛ-4, которые синтезируют соответственно Th1- и Th2-лимфоцитов [6,9], определяли в плазме крови крыс на 5 и 8 сут после первой инъекции ФОС методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) [5], используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Под влиянием VX и метафоса (табл. 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 соответственно в 2,24 и 1,88 раза ($p < 0,05$). При отравлении VX и метафосом отмечалась также существенная редукция активности Th1-лимфоцитов, оцениваемая по реакции ГЗТ, соответственно в 1,78 и 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 VX и метафосом соответственно в 1,37 и 1,34 раза ($p < 0,05$).

Таблица 1

**Влияние интоксикации ФОС (1,0 DL₅₀) в продуктивной фазе
иммуногенеза на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов (M+m, n =8-9)**

Серии опытов	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10 ³	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10 ³
Контроль	43,1±3,5	39,1±3,2	18,2±1,7
VX	19,2±2,0*	22,0±1,9*	13,3±1,2*
Метафос	22,9±2,4*	25,4±2,3*	13,6±1,3*
VX +атропин	13,5±1,5**	16,2±1,7**	9,3±1,1**
VX +карбоксим	29,8±3,0**	22,4±2,3**	15,0±1,6

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

Параметры, характеризующие клеточную гуморальную иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии ФОС в среднем снижались соответственно в 1,86 и 1,35 раза. Это свидетельствует о том, что под влиянием антихолинэстеразных ядов в большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов.

Применение антидота ФОС атропина сульфата при отравлении VX 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 ($p<0,05$).

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 редуции активности Th1- и Th2-лимфоцитов при интоксикации ФОС, подтверждается оценкой концентрации цитокинов в крови крыс (табл. 2). При остром отравлении VX и метафосом в продуктивной фазе иммуногенеза выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ на 5 сут после иммунизации ЭБ в 2,23 и 1,95 раза ($p<0,05$), а ИЛ-4 - в 1,59 и 1,52 раза ($p<0,05$) соответственно. Аналогичные данные получены при исследовании концентрации цитокинов в крови на 8 сут. Это свидетельствуют о том, что по сравнению с ИЛ-4 концентрация ИФН- γ в крови под влиянием ФОС снижается в большей степени.

Таблица 2

Влияние интоксикации ФОС (1,0 DL₅₀) в продуктивной фазе иммуногенеза на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл (M $\pm$ m, n =6)

Серии опытов		ИФН- γ	ИЛ-4	ИФН γ /ИЛ-4
Контроль		902 $\pm$ 82	129 $\pm$ 12	7,0
VX	5	405 $\pm$ 49*	81 $\pm$ 8*	5,0
	8	367 $\pm$ 45*	78 $\pm$ 7*	4,7
Метафос	5	463 $\pm$ 42*	85 $\pm$ 9*	5,4
	8	409 $\pm$ 46*	83 $\pm$ 7*	4,9
VX + атропин	5	236 $\pm$ 34**	42 $\pm$ 6**	5,6
	8	227 $\pm$ 30**	39 $\pm$ 5**	5,8
VX + карбоксим	5	660 $\pm$ 60**	95 $\pm$ 8*	6,9
	8	671 $\pm$ 62**	97 $\pm$ 9*	6,9

Примечание: 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.

Применение атропина сульфата при отравлении VX существенно увеличивало редуцирующий эффект ФОВ в равной степени на секрецию Th1- и Th2-лимфоцитами соответственно ИФН- γ и ИЛ-4 ($p<0,05$). Назначение реактиватора холинэстеразы карбоксима снижало супрессию продукции ИФН- γ и ИЛ-4 ($p<0,05$), обусловленную действием ФОВ. При

этом концентрация ИФН- γ увеличивалась по сравнению с показателями после отравления ФОВ ($p < 0,05$), 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 VX. Использование атропина сульфата не изменяло соотношения ИФН- γ /ИЛ-4, а карбоксима - восстанавливало его до контрольного значения.

Уменьшение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [5,6]. Нами установлено, что при действии VX и метафоса соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 было существенно ниже контрольного уровня равного 7,0 и составляло в среднем 5,0 (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 [2,3]. При этом известно, что данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [5]. Возможно также, что ФОС способны ингибировать в большей степени ацетилхолинэстеразу на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа и α -нафтил-AS-ацетатэстеразу и α -нафтилбутиратэстеразу в цитозоле этих клеток, а также большей ролью эстераз в реализации функций лимфоцитов Th1-типа [2]. Последнее предположение в определенной степени подтверждается способностью карбоксима в большей степени восстанавливать функцию Th1-клеток (по сравнению с активностью Th2-лимфоцитов), так как значение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 возрастало с 5,0 (действие ФОС) до 6,9 (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 [2]. Карбоксим восстанавливает активность лимфоцитов Th1- и Th2-типа, вероятно, вследствие реактивации ацетилхолинэстеразы, локализованной на их клеточной мембране [10].

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) [5,7,9], а при использовании карбоксима возможность возникновения вирусных и микробных инфекционных заболеваний, по-видимому, одинакова.

Выводы. 1. Острое действие ФОС (VX и метафоса) в продуктивной фазе иммуногенеза в дозе, составляющей 1,0 DL₅₀, в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток.

2. Под влиянием ФОС в крови концентрация ИФН-γ, продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем концентрация ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками.

3. Применение атропина сульфата (однократно в дозе 10 мг/кг) при острой интоксикации отравлении ФОС (1,0 DL₅₀) увеличивало супрессию функции Th1- и Th2-лимфоцитов и синтеза ими соответственно ИФН-γ и ИЛ-4 в равной степени, а использование карбоксима (однократно, 10 мг/кг) частично восстанавливало преимущественно активность Th1-клеток и синтез ИФН-γ по сравнению с функцией Th2-лимфоцитов и продукцией ими ИЛ-4.

Список литературы

1. Жуков В.Е., Клаучек В.В., Шкодич П.Е. // *Токсикол. вестник*, 2002.- №5.- С. 31-35.
2. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. *Иммунотоксикология ксенобиотиков.*- Саратов, 2007. – 420 с.

3. *Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – 608 с.*

4. **Петров А.Н., Софронов Г.А., Нечипоренко С.П., Сомин И.Н.** // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. Хим. об-ва им Д.И. Менделеева), 2004. – Т. XLVIII. – № 2. – С.110-116.*

5. **Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.** *Иммунология. Пер. с англ. – М.: Мир, 2000. – 582 с.*

6. **Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др.** // *Бюл. эксперим. биол. и мед., 2005. –Т. 140. – № 12.-С. 622-624.*

7. **Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г.** *Иммунология. – 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2002.- 536 с.*

8. **Amitai G., Adani R., Fishbein E. et al.** // *J.Appl.Toxicol., 2006 – V. 26. – № 1. –P.81-87.*

9. **Asquith B., Zhang Y., Mosley A.J., de Lara C.M.** // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007. – V. 104. – № 19. – P. 8035-8040.*

10. **Kutty, K. M., Chandra K., Chandra S.** // *Experientia, 1976. – V. 32.- № 3. - P. 289.*

11. **Lenz D.E., Maxwell D.M., Korlovich I. et al.** // *Chem. Biol. Interact., 2005.- V. 157-158. – P.205-210.*

12. **Sharp D.** // *Lancet. – 2006. – V. 14. – № 367 (9505). P.-95-97.*

13. **Shin T.M., Kan R.K., McDonough J.H.** // *Chem. Biol. Interact., 2005. – V. 157-158. – P.293-303.*

14. **Smialowicz R. J., Luebke R.W., Riddle M. M.** // *Toxicology, 1992. - V. 75. – №5. – P.235-247.*

15. **Tremolada P., Finizio A., Villa S. et al.** // *Aquat. Toxicol., 2004. – V 67. – № 1. – P. 87-103.*

THE MODULATION BY ANTIDOTES OF ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS OF IMMUNE RESPONSES AND SYNTHESIS OF CYTOKINES ASSOCIATED WITH FUNCTION OF TH1-, TH2-LYMPHOCYTES

P. F. Zabrodskii, I.H. Yafarova, V.G. Germanchuk, V.G. Lim

Saratov Military Institute of Biological and Chemical Safety, Saratov, 410037, Russia

It was established in experiments on Wistar rats that acute at poisoning by organophosphorus compounds (agent VX, metaphos) in single dose of LD₅₀ in productive phase of immunogenesis results to suppression of immune responses, to decrease of concentration in a blood of cytokines (IFN γ , IL-4) and results in a reduction of interrelation IFN γ / IL-4 in comparison with the control, that testifies to the greater lesion of Th1-cells in comparison with Th2-lymphocytes. Atropin sulphate (in single dose of 10 mg/kg) increases of reduction of activity Th1- both Th2-lymphocytes and synthesis by them cytokines equally, and karboxime (in single dose of 10 mg/kg) particulate restored mainly activity of Th1-cells and synthesis IFN γ .

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