

ИЗМЕНЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ИММУНОТОКСИЧНОСТИ ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ ПОД ВЛИЯНИЕМ 2,4,6-ТРИФЕНИЛ- 4Н-СЕЛЕНОПИРАНА И ИХ СВЯЗЬ С Р-450-ЗАВИСИМОЙ МОНООКСИГЕНАЗНОЙ СИСТЕМОЙ

П.Ф. Забродский, Б.И. Древко, В.Г. Мандыч, С.В. Балашов

Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической защиты

В экспериментах на неинбредных крысах установлено, что 2,4,6-трифенил-4Н-селенопиран (пероральное введение в дозе 0,8 мг/кг в течение 3 сут) вследствие индукции цитохрома Р-450 увеличивает токсичность и иммунотоксичность тетрахлорметана, метаболизирующегося по типу «летального синтеза», и снижает данные свойства карбофоса, биотрансформация которого происходит с образованием малотоксичных и нетоксичных метаболитов.

Ключевые слова: 2,4,6-трифенил-4Н-селенопиран, тетрахлорметан, карбофос, цитохром Р-450, иммунотоксичность

В настоящее время интерес к изучению иммуномодулирующих свойств селена и его соединений не уменьшается [8,10,11,13]. Известно, что препараты селена в относительно малых дозах способны усиливать гуморальные и клеточные иммунные реакции (пролиферацию Т-лимфоцитов, ответ Т-лимфобластов на ИЛ-2 и тимоцитов на ИЛ-1, продукцию ИЛ-2 лимфоцитами и ИЛ-1 макрофагами, активность естественных клеток-киллеров – ЕКК) [8], приводя к повышению устойчивости организма животных и человека к различным инфекциям [12]. Синтезированы и широко используются в животноводстве, а также в качестве ингредиентов лекарственных средств селеносодержащие органические вещества (диацетофенонилселенид и селенопиран), которые в

отличие от неорганических препаратов селена, характеризуются значительно меньшей токсичностью, высокой липофильностью, обеспечивающую возможность их пролонгированного действия [6,7].

Иммуномодулирующие и антимикробные эффекты селеноорганических препаратов [8,10,11,13], в частности, 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана [1], предполагает изучение их влияния на токсичность и иммунотоксичность различных химических веществ, которые при отравлении ими способны приводить к формированию вторичных иммунодефицитных состояний и вызывать возникновение различных инфекционных осложнений и заболеваний [4,5].

Целью исследования являлась оценка влияния селеноорганического препарата 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана (ТФСП) при его профилактическом использовании на токсичность и иммунотоксические эффекты химических соединений (с различной токсикокинетикой и токсикодинамикой – тетрахлорметана и карбофоса) и связь данных эффектов с системой цитохрома Р-450.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на беспородных крысах обоего пола массой 180-240 г. Оценивали влияние ТФСП на среднелетальную дозу (DL_{50}) тетрахлорметана (ТХМ) и карбофоса (0,0-диметил-S-1,2-дикарбоэтоксиэтилдитиофосфата). ТФСП, ТХМ и карбофос вводили внутрижелудочно. ТФСП – в растворе оливкового масла в дозе 0,8 мг/кг в течение 3 сут до введения токсикантов. Эффекта ТФСП сравнивали с действием индуктора Р-450-зависимых монооксигеназ фенобарбитала (ФБ) [2,3], который применяли *per os* в дозе в течение 3 сут в дозе 50 мг/кг до моделирования острого отравления ТХМ и карбофосом. Использование данных токсикантов обусловлено тем, что ТХМ в отличие от карбофоса метаболизируется с участием цитохрома Р-450 с образованием более токсичных метаболитов, чем исходное соединение («летальный синтез») [5, 9,14,15].

Иммунные реакции оценивали общепринятыми методами [4]. Гуморальный иммунный ответ к Т-зависимому (эритроциты барана – ЭБ) антигену оценивали через 4 сут по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке после внутрибрюшинной иммунизации крыс данным антигеном в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток. Активность ЕКК определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) спектрофотометрически по числу оставшихся неразрушенными в ходе цитотоксического теста клеток мишеней через 3 сут после введения токсикантов. Антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) исследовали через 4 сут после иммунизации (ЭБ в дозе 10^8 клеток) крыс, используя их спленоциты, 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 через 4 сут. Реакцию ГЗТ определяли через 24 часа. При исследовании гуморальных и клеточных иммунных реакций крыс иммунизировали практически одновременно с введением токсикантов в дозе $0,5 \text{ DL}_{50}$. При оценке иммунного ответа при действии ТФСП и ФБ животных иммунизировали на 4 сут после первого введения химического соединения. Изучение комбинированного действия ТФСП или ФБ с токсикантами на иммунные реакции проводили, иммунизируя крыс ЭБ, через 5-30 мин после отравления ТХМ или карбофосом.

Индукционные свойства ТФСП в отношении Р-450-зависимых монооксигеназ оценивали по длительности сна, вызванного гексобарбиталом в дозе 80 мг/кг. По методикам, описанным [2,3], в микросомальной фракции печени определяли содержание белка и цитохрома Р-450 через 3 сут после применения ТФСП. Ферментиндукционные свойства ТФСП сравнивали с действием ФБ.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Применение ТФСП и ФБ приводило к существенному снижению и увеличению DL_{50} соответственно ТХМ и карбофоса (табл. 1). Так, ТФСП и ФБ снижают DL_{50} ТХМ соответственно в 1,58 и 1,63 раза ($p < 0,05$) и увеличивают данный токсикометрический параметр карбофоса в 1,40 и 1,48 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Таблица 1. Влияние 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана и фенобарбитала на DL_{50} крыс после острого отравления тетрахлометаном и карбофосом

Серии опытов	DL_{50} , г/кг
ТХМ	$6,70 \pm 0,62$
ТХМ+ ТФСП	$4,24 \pm 0,33^*$
ТХМ+ фенобарбитал	$4,10 \pm 0,30^*$
Карбофос	$0,82 \pm 0,07$
Карбофос+ ТФСП	$1,15 \pm 0,08^*$
Карбофос + фенобарбитал	$1,21 \pm 0,09^*$

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

Известно, что ТХМ подвергается метаболическому разложению в мембранах эндоплазматического ретикулаума печени при участии системы цитохрома Р-450. В результате происходит образование свободных радикалов (CCl_3^+ ; $O-O-CCl$; $HO-OCCCl_3$; $HO-CCl_3$), из которых высокую активность имеет CCl_3^+ [9,14,15]. Снижение DL_{50} под влиянием ТФСП и ФБ при отравлении ТХМ, вероятно, связано с усилением метаболизма ТХМ и образованием упомянутых продуктов «летального синтеза». Полученные результаты позволяют предположить, что 2,4,6-трифенил-4Н-селенопиран обладает способность индуцировать цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы, участвующие в биотрансформации токсикантов [5,9,15]. Метаболизм карбофоса приводит к образованию относительно малотоксичных и нетоксичных соединений [4,5], поэтому DL_{50} данного фосфорорганического соединения увеличивается.

Под влиянием ТХМ и карбофоса в дозе 0,5 DL₅₀ (табл. 2) происходило снижение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену по сравнению с контрольным значением соответственно в 1,52 и 1,61 раза ($p<0,05$). Аналогично изменялись и другие иммунные реакции. Так, ТХМ уменьшал АЗКЦ, активность ЕКК и функцию Th1-лимфоцитов (а также моноцитов и макрофагов), оцениваемую по реакции ГЗТ, соответственно в 1,67; 1,47 и 1,41 раза ($p<0,05$), а карбофос - в 1,93; 1,75 и 1,40 раза ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 2. Влияние 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана и фенотарбита на показатели системы иммунитета крыс при острой интоксикации токсикантами с различным характером биотрансформации (0,5 DL₅₀) ($M\pm m$, $n = 8-11$)

Токсиканты	АОК к ЭБ, · 10 ³	АЗКЦ, %	ЕЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	37,2±3,1	14,5 ± 1,5	33,1±3,0	36,5±2,4
ТФСП	44,8±3,7	16,8 ± 1,7	43,0±3,1*	41,4±2,6
ТХМ	24,5±2,2*	8,7±1,1*	22,5±2,6*	25,8±2,1*
ТХМ+ТФСП	17,4±1,9*°	5,6±0,8*°	16,2±1,5*°	19,2±2,0*°
Карбофос	23,1±2,2*	7,5±0,9*	18,9±1,9*	26,0±2,2*
Карбофос + ТФСП	30,2±2,7°	10,6±1,1°	25,5±2,3°	33,1±2,3°
ФБ	46,0±3,8	18,4 ± 1,8	42,4±2,9*	43,0±2,7
Карбофос + ФБ	32,0±2,6°	10,1±0,8°	27,0±2,4°	31,8±2,2

Примечание: в каждой серии использовалось 9-11 крыс; * - $p<0,05$ по сравнению с контролем; °- $p<0,05$ по сравнению с показателем при отравлении.

Данные литературы позволяют полагать, что уменьшение показателей системы иммунитета под влиянием ТХМ обусловлено действием на молекулы мембран, цитозоля, органелл иммунокомпетентных клеток и продукцию лимфокинов, регулирующие их функцию, как самой молекулы токсиканта, так и высокотоксичных продуктов его биотрансформации [4,5,9,14,15]. Карбофос вызывает редукцию параметров иммунной системы вследствие ингибирования эстераз Т-клеток, моноцитов и макрофагов и действия кортикостероидов (вследствие активации гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы) на иммуноциты [4,5].

Введение ТФСП приводило к существенному снижению и увеличению исследованных иммунных реакций ($p < 0,05$) соответственно при отравлении ТХМ и карбофосом по сравнению с показателями после интоксикации, вызванной изолированным действием токсиканта. Следует отметить, что ТФСП и ФБ при их изолированном воздействии увеличивали иммунные реакции, причем активность ЕКК – статистически значимо ($p < 0,05$), вероятно, вследствие индукции цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ лимфоцитов [5].

Под влиянием ТФСП статистически значимо увеличивалось содержание белка и цитохрома Р-450 в печени (табл. 3). Аналогичное действие оказывал ФБ. Это подтверждает наше предположение о ферментиндуцирующем действии ТФСП, с которым связано увеличение токсичности и иммунотоксичности ТХМ (реализация феномена «летального синтеза») и снижение данных свойств при назначении 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана до отравления карбофосом.

Таблица 3. Влияние 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана и фенobarбитала на содержание белка и цитохромов в микросомах печени крыс ($M \pm m$, $n=8-11$)

Показатели	Контроль	ТФСП	Фенобарбитал
Гексобарбиталовый сон, мин	$22,1 \pm 2,4$	$8,1 \pm 2,0^*$	$6,2 \pm 1,8^*$
Белок, мг/орган	$59,2 \pm 6,2$	$141,6 \pm 14,3^*$	$156,7 \pm 15,1^*$
Цитохром Р-450, нмоль/г белка	$0,97 \pm 0,05^*$	$3,09 \pm 0,41^*$	$3,98 \pm 0,46^*$

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

Таким образом, 2,4,6-трифенил-4Н-селенопиран способен индуцировать цитохром-Р-450-зависимые монооксигеназы, увеличивая и снижая токсичность и иммунотоксичность химических веществ, метаболизирующихся соответственно по типу «летального синтеза» (тетрахлорметана) и с образованием малотоксичных и нетоксичных метаболитов (карбофоса).

ЛИТЕРАТУРА

1. АС 1246566 СССР. Три- и тетразамещенные 4Н-селенопираны, проявляющие антимикробную и антифаговую активность / Харченко В.Г., Древко Б.И. Куликова Л.К., Крашенинникова М.К. // Бюлл. изобретений. – 1998. – № 10. – С.26.
2. Венгеровский А.И., Седых И.М., Саратиков А.С. // Эксперим. и клин. фармакол. – 1993. – Т.56, N 5. – С. 47– 49.
3. Власова Т.А., Венгеровский А.И., Саратиков А.С. // Хим.-фарм. журн. – 1994. – №3. – С. 56– 58.
4. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Мальцева Г.М., Молотков А.О.. Иммунотропные свойства холинергических веществ / Под редакцией П.Ф.Забродского. – Саратов: Издательство «Научная книга», 2005. – 251 с.
5. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – 608 с.
6. Пат. 2171110 РФ, 7А61 К 33/04. Средство для лечения и профилактики инфекционных заболеваний и отравлений животных и птиц, повышающих их продуктивность и сохранность / Древко Б.И., Древко Р.И., Антипов В.А., Чернуха Б.А., Яковлев А.Н. // Бюлл. изобретений. – 2001. – № 21. – С. 2.
7. Радионова Т.Н., Панфилова М.Н. // Ветеринария. – 2004. – №3. – С.31-33.
8. Artur J.R., Mckenzie R.C., Beckett G.J. // J. Nutr.- 2003.-Vol. 133, N 5.–P. 1457– 1459.
9. Bruckner J.V., Ramanathan R., Lee K.M., Muralidhara S. // J. Pharmacol. Exp. Ther. – 2002.– Vol. 30, N 2. – P.273–281.
10. Cunningham-Rundles S., McNeeley D.F., Moon A. // J. Allergy Clin. Immunol. – 2005. – Vol. 115, N 6.– P. 1119– 1128.
11. Ferencik M. Ebringer L. // Folia Microbiol. (Praga). – 2003. – Vol. 48, N 3. – P. 417– 426.
12. Rayman M.P., Rayman M.P. // Proc. Nutr. Soc. –2002.– Vol. 61, N 2. – P. 203– 215.
13. Ryan-Harshman M. Aldoori W. // Can. J. Diet. Pract. Res. – 2005. – Vol. 66, N 2. – P. 98– 102.
14. Sheweita S.A., El-Gabar M.A., Bastawy M. // Toxicology. – 2001. – Vol. 169, N 2. – P.83– 92.
15. Zangar R.C., Benson J.M., Burnett V.L., Springer D.L // Chem-Biol. Interact. – 2000. – Vol. 125 .– P. 233– 243.

**THE CHANGE OF A TOXICITY AND IMMUNOTOXITY OF
CHEMICALS UNDER INFLUENCE OF 2,4,6-TRIPHENYL-4H-
SELENOPYRANE AND THEIR CONNECTION WITH SYSTEM OF
CYTOCHROME P-450- DEPENDENT OF MONOOXYGENASES**

P. F. Zabrodskii, B.I. Drevko, V.G. Mandych, S.V. Balashov

Saratov Military Institute of Radiation, Chemical and Biological Defense, ul. 50 years of
October, 5, Russia

It was established in experiments on noninbred rats, that 2,4,6-triphenyl-4H-selenopyrane (per oral administration in a dose of 0,8 mg/kg during 3 cyт) in consequence of induction of cytochrome P450 increments a toxicity and immunotoxicity of carbon tetrachloride metabolized for phylum "of lethal synthesis", and reduces the given properties of carbophos, which biotransformation descends to formation there are not enough of toxiferous and non-toxic metabolites

Keywords: 2,4,6-triphenyl-4H-selenopyrane, carbophos, carbon tetrachloride, cytochrome P450, immunotoxicity