

П. Ф. Забродский, Г.М. Мальцева

**Влияние на систему иммунитета м-
холиноблокаторов**

© П.Ф. Забродский, 2008

© Г.М. Мальцева, 2008

ISBN 978–5 –91272-254-02

УДК 612.014.46:617–012
ББК 52.84+52.54+52.8 Я 011
З–11

САРАТОВ-2008

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
Перечень сокращений	6
Введение	8
Глава 1. Современные представления о нарушениях физиологической регуляции иммуногенеза при действии холинотропных препаратов (обзор литературы)	16
1.1. Общая характеристика атропиноподобных препаратов	16
1.2. Токсикологическая характеристика атропина и метацина	18
1.3. Нарушение физиологической регуляции иммуногенеза атропиноподобными препаратами	22
Глава 2. Материал и методы исследований	40
2.1. Объекты исследования и применяемые препараты	41
2.2. Оценка влияния ТХВ на функцию стволовых кроветворных клеток	42
2.3. Исследование функционального состояния лимфоидных органов	43
2.3.1. Оценка лимфоидного индекса тимуса и селезенки	43
2.3.2. Определение содержания Т-лимфоцитов в тимусе и лимфоцитов в селезенке, лимфатических узлах и костном мозге	44
2.4. Оценка кооперации Т- и В- лимфоцитов in vitro	44
2.5. Исследование гуморального звена иммунного ответа	45
2.6. Исследование клеточного звена иммунного ответа	47
2.6.1. Оценка функции Т-лимфоцитов	47
2.6.2. Исследование реакции гиперчувствительности замедленного типа	48
2.6.3. Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности	49
2.7. Исследование естественной цитотоксичности (активности естественных клеток-киллеров - ЕКК)	51
2.8. Методы статистической обработки результатов исследований	53

Глава 3. Действие атропиноподобных препаратов на перераспределение иммуноцитов в лимфоидных органах	54
3.1 Влияние м-холиноблокаторов на изменение миграции колониеобразующих единиц в селезенку	54
3.2. Изучение функционального состояния тимуса	56
3.2.1. Исследование лимфоидного индекса	56
3.2.2. Определение числа Т-лимфоцитов в тимусе	57
3.3. Изучение функционального состояния селезенки	59
3.3.1. Оценка лимфоидного индекса	59
3.3.2. Определение числа лимфоцитов в селезенке	60
3.4. Действие атропиноподобных веществ на содержание лимфоцитов в лимфатических узлах и костном мозге	62
Резюме	66
Глава 4. Действие м-холиноблокаторов атропина и метацина на основные гуморальные иммунные реакции	71
4.1. Изучение влияния атропиноподобных препаратов на тимусзависимую гуморальную иммунную реакцию в индуктивной и продуктивной фазах иммунного ответа	71
4.1.1. Исследование воздействия атропина и метацина на антителообразование к тимусзависимому антигену в динамике по титру антител в крови	71
4.1.1.1. Действие атропиноподобных препаратов в индуктивную фазу гуморального иммунного ответа	71
4.1.1.2. Действие атропиноподобных препаратов в продуктивную фазу гуморального иммунного ответа	73
4.1.2. Оценка действия острого отравления м-холиноблокаторами на число антителообразующих клеток в селезенке	76
4.1.3. Влияние атропиноподобных препаратов на кооперацию Т- и В-лимфоцитов <i>in vitro</i>	78

4.2. Исследование острого действия атропина и метацина на тимуснезависимый гуморальный иммунный ответ	79
4.2.1. Оценка воздействия атропиноподобных препаратов на антителопродукцию к тимуснезависимому антигену в динамике по титру антител в крови	81
4.2.1.1. Действие атропиноподобных препаратов в индуктивную фазу гуморального иммунного ответа	81
4.2.1.2. Действие атропиноподобных препаратов в продуктивную фазу гуморального иммунного ответа	83
4.2.2. Изучение действия острого отравления атропиноподобных препаратов на число антителообразующих клеток в селезенке к тимуснезависимому антигену	85
Резюме	87
Глава 5. Оценка воздействия атропиноподобных препаратов на основные клеточные иммунные реакции	91
5.1. Оценка функции Т-лимфоцитов	91
5.2. Исследование функции гиперчувствительности замедленного типа	92
5.3. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности	96
Резюме	97
Глава 6. Влияние острой интоксикации атропином и метацином на функцию естественных клеток-киллеров	100
6.1. Действие атропиноподобных препаратов на активность ЕКК	100
6.2. Влияние атропина и метацина на активность ЕКК in vitro	102
Резюме	103
Глава 7. Коррекция нарушений физиологической регуляции иммунного гомеостаза при остром отравлении атропиноподобными препаратами	105

7.1. Обоснование применения Т-активина для коррекции нарушений физиологической регуляции иммунного гомеостаза после острого отравления атропиноподобными препаратами	105
7.2 . Действие Т-активина на основные показатели В-звена иммунитета	107
7.3. Оценка влияния Т-активина на основные параметры клеточного иммунитета	109
Резюме	110
Заключение	111
Выводы	129
Практические рекомендации	131
Литература	132

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

АЗКЦ - антителозависимая клеточная цитотоксичность

АОК - антителообразующие клетки

БОВ – боевые отравляющие вещества

ГАМК – гамма-аминомасляная кислота

ГГНС - гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система

ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа

ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота

ЕКК - естественные клетки-киллеры

ЕЦ - естественная цитотоксичность

ИКК – иммунокомпетентные клетки

ИЛ-1 (2 и т.д.) - интерлейкин-1 (2 и т.д.)

К-клетки – лимфоциты, определяющие АЗКЦ

КМ - костный мозг

КОЕ - колониеобразующая единица

КОЕс - колониеобразующая единица селезенки

КонА - конканавалин А

ЛИ – лимфоидный индекс

НРО - неспецифическая резистентность организма

ОДЛТА – отрицательный двоичный логарифм титра антител

ПЯЛ – полиморфноядерные лейкоциты

РНК – рибонуклеиновая кислота

РОК – розеткообразующие клетки

РТМЛ – реакция торможения миграции лейкоцитов

СКК - стволовые клетки крови

ТХВ - токсичные химические вещества

Th1 – Т-лимфоциты- хелперы типа 1

Th2 – Т-лимфоциты- хелперы типа 2

ФГА – фитогемагглютинин

ФОС - фосфорорганические соединения

ХТП – холинотропные препараты

СКК - стволовые клетки крови

ЦНС - центральная нервная система

ЭБ - эритроциты барана

ЭК - эритроциты кур

Ig - иммуноглобулин

LD₅₀ - средняя смертельная доза, вызывающая смертельный исход у 50%
отравленных

Vi-антиген (Vi-Ag) - тимуснезависимый Vi - антиген брюшнотифозной
вакцины

ВВЕДЕНИЕ

Одной из актуальных проблем иммунотоксикологии является оценка нарушения иммунного гомеостаза после отравлений токсическими химическими веществами (ТХВ) [Денисенко П.П., 1980; Забродский П.Ф., 1993; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 2001; Descotes G., 1986; Luster M. J. et al., 1987; Sullivan J. B., 1989]. Исследование изменений физиологических механизмов регуляции системы иммунитета под влиянием м-холиноблокаторов (атропиноподобных препаратов – АП) является актуальной задачей физиологии и иммунологии в связи со следующими обстоятельствами: м-холиноблокаторы используются как антидотные средства при интоксикации фосфорорганическими соединениями (ФОС) - антихолинэстеразными инсектицидами и боевыми фосфорорганическими отравляющими веществами, так и в качестве наркотических средств. Синтетический холиноблокатор хинуклидинил-3-бензилат (BZ) является боевым отравляющим веществом (БОВ) [Крылов С.С. и соавт., 1999] и подлежит уничтожению. Алкалоиды некоторых ядовитых грибов содержат довольно сложную композицию, в которую входят АП [Липницкий С.С., Пилуй А.Ф., 1991].

Широкое использование антихолинэстеразных фосфорорганических соединений в сельском хозяйстве и быту, увеличение аварий на химических объектах, возможность массовых поражений при транспортировке и хранении ФОС, рост острых и хронических интоксикаций данными соединениями, сопровождается применением основного антидота ФОС – атропина [Голиков С.Н., 1968]. При этом возможно снижение гуморальных и клеточных иммунных реакций, что обуславливает различные инфекционные, онкологические и аллергические заболевания [Забродский П. Ф., 1993; 1995; 1998; 2002; 2007; Хаитов Р. М. и соавт., 1995; Ferluga J., 1972; Loose L.D., Kimber I., 1996]. Особую значимость задача, связанная с изучением влияния

АП на иммунный гомеостаз приобрела в связи с тем, что в последнее время частота острых интоксикаций данными ядами, особенно в виде наркотических рецептур, существенно увеличилась. Отравление атропином относится к наиболее распространенным лекарственным интоксикациям [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Это связано со случайным использованием АП, в качестве наркотического средства или одного из его компонентов, а также с суицидальными целями. Возможно ошибочное употребление АП в больших дозах при необоснованном подозрении на отравление ФОС или при интоксикации фосфорорганическими соединениями легкой степени тяжести [Бадюгин И.С., 1974]. Кроме того, возможно случайное (ошибочное) применение холиноблокаторов, являющихся лекарственными препаратами. Наиболее важно изучение влияния АП на нарушение физиологических механизмов регуляции иммунного гомеостаза в связи с возможностью аварий на химических объектах, занимающихся уничтожением огромных запасов боевых отравляющих веществ (БОВ), и использованием атропина в больших дозах при отравлении ФОС, либо применением его ошибочно при подозрении на поражение БОВ.

Не вызывает сомнения, что в возникновении инфекционных осложнений и заболеваний после интоксикации АП, также как и при острых отравлениях ядами, стимулирующими холинергическую систему (при данных отравлениях атропин применяется в очень больших дозах в качестве антидотного средства [Саватеев Н.В., 1978; Лужников Е.А., 1982; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А. и Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Маркова И.В. и соавт., 1998]), существенную роль играет изменение физиологической регуляции иммуногенеза [Забродский П.Ф., 1993; 1995; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 2001]. В настоящее время влияние АП на показатели системы иммунитета практически не изучено.

Несомненно, исходя из изложенных положений, доказывающих

актуальность проблемы, изучение нарушений иммунного гомеостаза при остром отравлении АП, и, в частности, атропином нуждается в изучении.

Особую опасность АП в виде ВЗ могут представлять при аварийных ситуациях с загрязнением местности в случае аварий на химических объектах или террористических актов. Поражения данными ядами вызывает прежде всего нарушение функции центральной нервной системы (острые психозы) и предназначено для временного выведения из строя живой силы определенной категории (штабов, узлов связи, караулов, разведовательных и десантных подразделений) [Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990]. Отравление АП в больших дозах может вызывать смертельные исходы. У больных, поступивших в лечебные учреждения, и получающих большие дозы антидотных (антихолинэстеразных препаратов) и других лекарственных средств, могут возникать инфекционные осложнения, в результате постинтоксикационного иммунодефицитного состояния [Descotes G., 1986].

Изучение формирования иммунодефицита вследствие острой интоксикации АП (в частности, атропина и синтетического АП метацина), приводящего к инфекционным осложнениям и заболеваниям, позволит существенно улучшить схемы лечения, направленные на их снижение.

Исследование основных постинтоксикационных нарушений различных показателей системы иммунитета имеет важное значение для целенаправленного применения иммуномодуляторов из большого арсенала известных сейчас веществ данного класса [Утешев Б.С., 1984; 1995].

Необходимо констатировать, что вопрос о коррекции нарушений иммунного гомеостаза, вызванных АП в постинтоксикационном периоде, до сих пор совершенно не изучен. Представляет интерес исследование возможности восстановления параметров иммунной системы, редуцированных в результате действия АП, одним из перспективных иммуностимуляторов Т-активином.

Таким образом, учитывая достаточно широкое использование АП в медицине, применение данных соединений как наркотических средств, а хинуклидинил-3-бензилата (вещество ВЗ) - в качестве БОВ, в частности, при террористических актах, возможность поражения работающих на объектах по уничтожению вещества ВЗ, наиболее часто встречающееся отравление в клинической практике атропином, неизученные особенности действия АП (в частности, атропина и синтетического холиноблокатора метацина) на систему иммунитета, следует заключить, что проблема исследования нарушения иммунного гомеостаза под влиянием АП в постинтоксикационный период с целью разработки способов фармакологической коррекции этих сдвигов актуальна и важна как в теоретическом, так и в практическом отношении.

Цель исследования: изучение нарушений системы иммунитета под влиянием атропиноподобных препаратов (атропина и метацина) для обоснования их коррекции путем применения иммуностимулирующей терапии.

ГЛАВА 1

СОВРЕМЕННЫЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ О ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИММУНОГЕНЕЗА ПРИ ДЕЙСТВИИ ХОЛИНОТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ

1.1. Общая характеристика атропиноподобных препаратов

К атропиноподобным препаратам (АП) относятся алкалоиды растений семейства пасленовых, а также их листья: атропин, скополамин, гомотропина гидрохлорид, листья дурмана и белены и платифиллин. Кроме того, к АП относят синтетические м-холиноблокаторы (метацин, тровентол, пиренцепин и др.), нейропсихотропные препараты (в том числе, боевое отравляющее вещество ВЗ), нейролептики, малые транквилизаторы, трициклические антидепрессанты, антигистаминные препараты, анестетики типа кетамина и другие соединения [Крылов С.С. и соавт., 1999].

Лечебное действие и интоксикация этими веществами обладают общими свойствами – они имеют характерные признаки, связанные с их атропиноподобным действием на холинергические механизмы функционирования органов и систем. Это позволило за счет схожести фармакологических и токсикологических эффектов (токсикокинетики и токсикодинамики) объединить их в единую группу средств (лекарственных и отравляющих веществ – психотомиметиков) – группу АП [Крылов С.С. и соавт., 1999]. В узком смысле, на наш взгляд, к АП следует относить только вещества, влияющие на м-холинорецепторы.

Мускариновый холинорецептор, выделенный из мозга млекопитающих, представляет собой сложный белок с молекулярной массой 75-89 к Д. Белковая часть м-холинорецептора является мономером с молекулярной массой в пределах 50-66 кД, которая связана с углеводами,

причем содержание последних в общей макромолекуле рецептора достигает 20%. В настоящее время с помощью генетической технологии установлен аминокислотный состав белков четырех подтипов (m_1 - m_4) мускариновых рецепторов, определены места гликозирования этих пептидов, выяснен характер “упаковки” макромолекулы в составе клеточной мембраны, определены вероятные участки, с которыми связываются G-белки, и вероятная локализация анионного участка активного центра рецептора. Однако идентифицировать активный (или узнающий) центр м-холинорецептора пока не удалось, несмотря на широкий размах таких изысканий [Долго-Сабуров В.Б., Шорохов Ю.А., 1989].

Клиника АП проявляется сухостью во рту и глотке, расстройствами речи и глотания, нарушением ближнего зрения, диплопией светобоязнью, сердцебиением, одышкой, головной болью. Кожа имеет красный цвет, сухая, пульс частый, зрачки расширены, на свет не реагируют. В больших дозах АП вызывают психическое и двигательное возбуждение, зрительные галлюцинации, бред, эпилептиформные судороги с последующей потерей сознания и развитием комы с выраженным холинолитическим синдромом. В зависимости от вещества, блокирующего холинорецепторы (следует отметить, что в больших дозах все м-холинолитики действуют и на н-холинорецепторы) могут возникать бради- и тахикардия, атриовентрикулярная блокада, фибрилляция желудочков, острая сердечная и сосудистая недостаточность (коллапс). Возможно развитие токсической гепатопатии, гипергликемии, пареза кишечника [Саватеев Н.В., 1978; Лужников Е.А., 1982; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А. и Костомарова Л.Г., 1989, 2000].

Признаки поражения веществом ВЗ характеризуются расширением зрачков, сухостью во рту, мышечной слабостью (курареподобный эффект). Через 30-60 мин наблюдается ослабление памяти, внимания, снижение реакции на внешние раздражители. Пораженный теряет ориентацию,

возникает психомоторное возбуждение, периодически сменяющееся галлюцинациями. Теряется контакт с окружающим миром, развивается негативизм (пораженный делает противоположное тому, что ему предлагают). В этот период не редки вспышки гнева. Острый психоз сопровождается полной потерей памяти. Отдельные признаки поражения сохраняются до пяти суток. Психотоксический эффект достигает максимума через 30-60 мин после поступления вещества ВЗ в организм и продолжается 1-4 сут в зависимости от дозы и состояния пораженного [Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990].

1.2. Токсикологическая характеристика атропина и метацина

Атропин (*atropinum sulfuricum*) представляет собой трипиновый эфир d, l – троповой кислоты. Алкалоид, содержащийся в различных растениях пасленовых (*Solanaceae*): красавке (*Atropa Belladonna* L.), белене (*Hyosciamus niger* L.), разных видах дурмана (*Datura stramonium* L.) и др. В медицинской практике применяют атропина сульфат (*Atropini sulfas*). Белый кристаллически или зернистый порошок без запаха. Легко растворим в воде и спирте. Атропин оптически не активен: состоит из активного левовращающего и правовращающего изомеров. Левовращающий изомер называется гиосциамин и примерно в 2 раза активнее атропина. Естественным алкалоидом, содержащимся в растениях, является гиосциамин. При химическом выделении алкалоида он в основном превращается в рацемическую форму – атропин. Атропин – экзогенный лиганд-антагонист м-холинорецептора. Способность связываться с холинорецептором объясняется наличием в его структуре фрагмента сходного с молекулой эндогенного линганда – ацетилхолина.

Широко применяется в клинике, как спазмолитик, антидот отравлений ФОС, расслабления гладких мышц желудочно-кишечного тракта и бронхов.

Высшие разовые дозы для взрослых составляют: внутрь и под кожу - 1 мг [Аничков С.В., 1982; Машковский М.Д., 1993].

Основной особенностью атропина является его способность действовать на м-холинорецепторы, хотя он также действует (значительно слабее и в больших дозах) на н-холинорецепторы. Эффекты атропина противоположны эффектам, возникающим при возбуждении парасимпатической части вегетативной нервной системы [Виноградов В.М. и соавт., 1986; Долго-Сабуров В.Б., Шорохов Ю.А., 1989; Машковский М.Д., 1993].

Выделяют субпсихические формы интоксикаций АП, легкую, среднюю, тяжелую и сверхтяжелую степени отравлений, варианты клинической картины средней степени отравлений атропиноподобными препаратами [Крылов С.С. и соавт., 1999].

Имеются лишь единичные описания сверхтяжелой степени отравления АП, так как это состояние, сопровождающееся сопором или комой редко попадает в поле зрения практического врача. Атропиновая кома изучалась в основном психиатрами, а не токсикологами, так как вызывалась искусственно с лечебной целью. Сопорозные и коматозные состояния возникают после внутримышечных инъекций 35-100 мг атропина. Минимальная доза атропина, вызывающая кому, составляет 75 мг *pro dosi*, что в 7,5 раза больше дозы, вызывающей атропиновый делирий [Бажин Е.Ф., 1984]. Атропиновая кома, как и всякая другая, характеризуется исключением сознания. Кома и делирий – качественно иные состояния и требуют разного лечебного подхода. В отличие от делирия при коме тахикардия относительно не велика (пульс до 100-110 в минуту), не отмечается значительного увеличения артериального давления (повышается только на 10-20 мм. ртутного столба) и гипертермии, отчетливого учащения дыхания. Спонтанное протекание токсической (коматозной) степени поражения АП изучено мало, так как через 3-4 ч атропиновую кому искусственно купируют. В случае отравления тропинбензилатом или хинуклидинилбензилатом

(вещество ВЗ) для выведения из комы кроме обратимых ингибиторов холинэстеразы требуются реанимационные мероприятия [Крылов и соавт., 1999], без которых возможны смертельные исходы.

Дозы атропина, вызывающие выраженное холинолитическое действие, составляют для собаки при внутривенном и подкожном введении соответственно 0,01 и 0,03 мг/кг, под наркозом – соответственно 0,2 и 0,3 мг/кг. Холинолитическое действие для кошки обеспечивают при внутривенном и подкожном введении дозы, составляющие соответственно 0,2-2,0 мг/кг и 0,5-3,0 мг/кг, для кролика – 5-100 мг/кг (при подкожном введении) и 1,0-5,0 мг/кг (при внутривенном введении) для белой крысы – 100-300 мг/кг (внутрижелудочное введение) и 50-200 мг/кг (подкожное введение). Токсикометрические параметры атропина для животных по приведены в табл. 1 [Западнюк И.П. и соавт., 1983].

Из данных таблицы следует, что крысы более устойчивы к действию атропина, подтверждается известная закономерность – возрастание летальной (среднелетальной) дозы в последовательности: внутрижелудочное, подкожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное введение, токсикометрические параметры весьма переменчивы, наиболее чувствительна к действию атропина собака, наименее – лягушка.

Метацин – белый или желтоватый кристаллический порошок, трудно растворимый в воде. Обладает сильным, исключительно периферическим холинолитическим и слабым н-холиноблокирующим действием. Спектр его применения менее широк, чем у атропина (практически не используют для усиления действия анестетиков, уменьшения секреции потовых желез, брадикардии, для расширения зрачка в виде глазных капель, в качестве антидота ФОС). Высшие разовые дозы для взрослых в два раза больше, чем у атропина и составляют: внутрь – 5 мг, под кожу, внутримышечно и в вену – 2 мг [Аничков С.В., 1982; Машковский М.Д., 1993].

Таблица 1

**Токсикометрические параметры (летальные дозы) атропина для
различных видов животных**

Вид животного	Способ введения	Доза, мг/кг; Токсикометрический параметр
Собака	Подкожно	14-20 (ЛД ₁₀₀)
Собака	Внутривенно	6-7 (ЛД ₁₀₀)
Кошка	Подкожно	30 (ЛД ₁₀₀)
Кролик	Внутрь	1400-1500 (ЛД ₁₀₀)
Кролик	Подкожно	500-750 (ЛД ₁₀₀)
Кролик (взрослый, масса 2-5 кг)	Внутривенно	70-75 (ЛД ₁₀₀)
Кролик (молодой, масса 250-300 г)	Внутривенно	240 (ЛД ₁₀₀)
	Внутримышечно	588 (ЛД ₅₀)
Морская свинка	Подкожно	600 (ЛД ₁₀₀)
Морская свинка	Внутривенно	85 (ЛД ₁₀₀)
Белая крыса	Подкожно	750 (ЛД ₁₀₀)
Белая крыса	Внутрибрюшинно	600 (ЛД ₁₀₀)
Белая крыса	Внутривенно	220 (ЛД ₅₀)
Белая мышь	Внутрь	1500-1800 (ЛД ₁₀₀)
Белая мышь	Подкожно	264 (ЛД ₀)
Белая мышь	Подкожно	560 (ЛД ₅₀)
Белая мышь	Внутрибрюшинно	221 (ЛД ₅₀)
Белая мышь	Внутривенно	72 (ЛД ₅₀)
Белая мышь	Подкожно	300-750 (ЛД ₁₀₀)
Белая мышь	Внутрибрюшинно	275 (ЛД ₁₀₀)
Голубь	Подкожно	390 (ЛД ₁₀₀)
Лягушка	Подкожно	1000-2500 (ЛД ₁₀₀)

1.3. Нарушение физиологической регуляции иммуногенеза атропиноподобными препаратами

В литературе практически не описано действие холиноблокаторов, и, в частности, м-холиноблокаторов на иммуногенез, функцию Т- и В-системы иммунитета и естественных клеток-киллеров, исключая работы 40-х и 50-х годов прошлого столетия, большинство из которых представляют лишь исторический интерес, поскольку из-за чрезвычайной противоречивости их результатов они не поддаются обобщающему анализу [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985]. Поэтому целесообразно наряду с кратким описанием этих исследований рассмотреть работы, в которых холиноблокаторы использовались в качестве «фармакологического инструмента» для оценки физиологической регуляции функции системы иммунитета под влиянием веществ, оказывающих активирующее влияние на холинорецепторы лимфоидных органов и популяций иммунокомпетентных клеток (ИКК).

По данным А.А. Климентова (1950) и И.А. Учитель (1951) введение ацетилхолина приводило к подъему антител, а результаты исследований М.Д. Буяновского (1952) свидетельствуют о противоположном эффекте. М-хлиномиметик пилокарпин действует аналогично м-холиноблокатору атропину, не влияя на антителообразование [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985]. В работе Е.А. Шпанько (1956) пилокарпин и атропин стимулируют антителогенез.

В исследованиях П.П. Денисенко и Р.П. Чередниченко (1970; 1974; 1975; 1977) и обобщенных в монографии Денисенко П.П. (1980) показано, что атропин в опытах на мышах в дозе 1 мг/кг и метацин (1 и 2 мг/кг) вызывали снижение антителопродукции к тимусзависимому антигену эритроцитам барана (ЭБ), а в дозах 5 и 10 мг/кг атропин вызывал противоположный эффект. Активация антителообразования холиномиметиками не зависела от действия соответствующих центральных

м- и н-холиноблокаторов и во всех случаях блокировалась мощным м-холиноблокатором периферического действия метацином. На основании этих результатов экспериментальных исследований авторы делают заключение, что стимуляция антителопродукции обусловлена возбуждением периферических м-холинореактивных систем. В то же время, продолжительная блокада м-холинореактивных систем использованием больших доз АП оказывала такое же действие.

Стимуляция м-холиномиметиком ареколином и угнетение холинолитиками продукции антител у мышей установлена при введении холинергических препаратов за 2 сут до антигенного стимула, в день иммунизации и в течение 2 сут после нее. Это свидетельствует о супрессии антителообразования холиноблокаторами как в индуктивный, так и в продуктивный период иммуногенеза. Снижением антителопродукции обладают и центральные м- и н-холинолитики соответственно амизил и педифен [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985].

Различными исследователями рассматривается возможность транс- и парагипофизарного влияния холинотропных препаратов (ХТП) на иммуногенез. Доказательством парагипофизарного пути стимуляции и супрессии антителообразования являются работы, в которых установлено стимулирующее влияние *in vitro* ацетилхолина и карбохолина (10^{-7} – 10^{-6} М) на формирование антителообразующих клеток (АОК) и блокирование этого процесса атропином [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985]. В опытах *in vivo* на мышцах линии СВА при введении холиноблокаторов за 2 сут до иммунизации и затем на протяжении 6 сут их антителосупрессирующий эффект был подтвержден при изучении образования розеткообразующих клеток (РОК) в селезенке [Гущин Г.В., Шхинек Э.К., 1979].

Реакции клеточного иммунитета под влиянием холиноблокаторов *in vivo* практически не исследованы. Показано, что данные препараты практически не влияют на приживление кожного аллотрансплантата

[Денисенко П.П. и Чередниченко Р.П., 1975]. Большие трудности возникают при сопоставлении экспериментов по изучению холинотропных препаратов, в частности, при использовании холинолитиков *in vivo* и *in vitro*. Ряд результатов экспериментальных работ противоречит данным других исследований. Так, установлено, что атропин в концентрациях 10^{-11} – 10^{-8} М повышает миграционную активность лейкоцитов, предупреждая отрицательное влияние на нее холиномиметика армина [Барышников И.И., Смирнова О.И., 1981].

В 1974 году в США было доказано, а затем многократно подтверждено в лабораториях других стран наличие м- и н-холинорецепторов на Т-лимфоцитах мышей, крыс (и других животных), а также человека [Strom T.B. et al., 1974; Gordon M.A. et al., 1978; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979]. Роль м-холинорецепторов более выражена в цитотоксических Т-лимфоцитах, которая реализуется путем повышения внутриклеточного содержания цГМФ, так как применение м-холиноблокатора атропина (10^7 пМ) на фоне карбомилхолина снижает цитотоксичность Т-клеток в большей степени, чем использование н-холиноблокаторов α -бунгаротоксина (1 мкМ) и d-тубокурарина (0,1 мкМ). Холинергические агонисты увеличивают способность сенсibilизированных лимфоцитов повреждать клетки-мишени [Strom T.B. et al., 1974]. В 1980 году было установлено, что культура клеток, обогащенная Т-лимфоцитами реагирует деполяризацией мембраны на ацетилхолин (1 нМ) и карбомилхолин (100 рМ), причем эффект ацетилхолина отменяет атропин (10 нМ). Изолированное действие атропина (10 нМ) не оказывало влияние на деполяризацию мембраны. На деполяризацию мембраны культуры лимфоцитов, обогащенную В-клетками, ацетилхолин влияния не оказывал [Shapiro H.M., Strom T.B., 1980]. Однако, эти данные отнюдь не свидетельствуют об отсутствии м-холинорецепторов на В-лимфоцитах. Многочисленными исследованиями

под руководством А.Д. Адо (1983-1995), а также данными зарубежных авторов установлено, что ацетилхолин повышает иммунный ответ, зависимый от Т-клеток, и оказывает влияние на функциональную активность В-клеток [Maslinski W., 1989]. М-холинорецепторы обнаружены как на Т-, так и на В-лимфоцитах мыши [Gordon M.A. et al., 1978].

D.P. Richman. и B.G.W. Arnason (1979), используя карбомилхолин в качестве агониста м- и н-холинорецепторов, а в качестве их антагонистов α -бунгаротоксин (1 мкМ) и d-тубокурарин (0,1 мкМ) [для н-холинорецепторов], а также атропин (для м-холинорецепторов) в концентрации 10 мкМ установили, что на пролиферацию лимфоцитов *in vitro* стимуляция м-холинорецепторов оказывает активирующее действие, а н-холинорецепторов – противоположный эффект. Авторы предположили, что определенную роль в реализации эффектов стимуляции н-холинорецепторов, подавляющие пролиферацию тимоцитов могут играть Т-супрессоры. Действительно, данная гипотеза оказалась обоснованной. В 1987 году L. Menard et al. установили, что никотин в концентрациях 10^{-9} и 10^{-5} М *in vitro* индуцирует супрессорные Т-клетки. Антагонист никотина d-тубокурарин частично тормозил активность Т-супрессоров, вызванную стимуляцией их н-холинорецепторов. На тимоцитах никотиновых рецепторов в 5-7 раз (250 на клетку) меньше, чем Т-лимфоцитах лимфоузлов (1500 на клетку) [Maslinski W. et al., 1992].

Повышение пролиферативного ответа лимфоцитов здоровых людей под влиянием ацетилхолина отмечали и другие исследователи [Domianjanovic M. et al., 1989]. Аналогичные результаты получены в опытах на мышах [Maslinski W. et al., 1990]. Стимуляции м-холинорецепторов лимфоцитов снижает их численность на поверхности клетки, а атропин отменяет этот эффект [Costa L. et al., 1990].

Учитывая важную роль макрофагов в переработке и представлении антигена на поверхности клетки для обеспечения их кооперации с Т- и В-

лимфоцитами, данные литературы позволяют полагать, что под влиянием стимуляции ацетилхолином м-холинорецепторов макрофагов, происходит повышение их активности [Quliroz L., Oliveina L., 1975; Pearlman D.S., 1969; Maslinski W. et al., 1983; Masini E. et al., 1985; Mody-Corbett F., Brehm P., 1987]. Активирующее или ингибирующее действие ацетилхолина на клетки крови зависит от его концентрации [Забродский П.Ф., 1998]. В определенном диапазоне доз фармакологические средства, обладающие холиномиметическим действием, способны оказывать стимулирующее влияние на функцию В-лимфоцитов и Т-хелперов в результате повышения внутриклеточного содержания цГМФ под влиянием стимуляции м-холинорецепторов ацетилхолином [Денисенко П.П., 1980; Абрамов В.В. и соавт., 1986; MacManus J.P. et al., 1975].

Установлено, что экзогенные очень низкие концентрации цГМФ (10^{-11} – 10^{-10} М и 10^{-7} – 10^{-6} М) стимулируют синтез ДНК и увеличивают пролиферацию тимоцитов. Позже было доказано, что ацетилхолин в концентрациях $5 \cdot 10^{-9}$ – $5 \cdot 10^{-7}$ М вызывает кальций независимую стимуляцию синтеза ДНК и пролиферации лимфобластов крыс *in vitro* [Witfield J.F. et al., 1971]. Более высокие концентрации ацетилхолина $5 \cdot 10^{-5}$ М *in vitro* также стимулируют синтез ДНК и пролиферацию в лимфобластах тимуса, но этот эффект кальций зависимый. Этот эффект ацетилхолина не является опосредованным только цГМФ или цАМФ, а зависит от соотношения их концентраций в клетке у крыс. Атропин *in vitro* в концентрации 10^{-6} М ингибирует включение ^3H -тимидина в ДНК тимоцитов, а также синтез цГМФ, вызванные ацетилхолином ($5 \cdot 10^{-8}$ М), но не влияет на концентрацию цАМФ [MacManus J.P. et al., 1975].

Ацетилхолин и его агонисты (бензоилхолин, фосфорилхолин) при концентрациях 10^{-8} – 10^{-5} М тормозили иммунное розеткообразование, а при концентрациях 10^{-14} – 10^{-12} М – увеличивали. Концентрации, составляющие 10^{-8} – 10^{-5} М, оказывали угнетающее действие преимущественно на В-

лимфоциты. Выявленные эффекты связаны с действием холиномиметиков на м-холинорецепторы лимфоцитов, так как атропин их отменял [Адо А.Д., Алексеева Т.А., 1983]. Ацетилхолин индуцировал подвижность В-лимфоцитов мыши и веществами увеличивающими уровень цГМФ и кальция в клетке [Адо А.Д. и соавт., 1984]. Данный препарат в концентрации 1 мкМ *in vitro* стимулировал прохождение В-лимфоцитами мышей клеточного цикла в целом: начало синтеза ДНК, выход клеток из S-фазы в митоз. В реализации данного механизма участвует внутриклеточный кальций. Установленный авторами эффект выражен в первые часы, а затем нивелируется. Роль цГМФ заключается в стимуляции перехода В-лимфоцитов из G₁ в S фазу (фазу пролиферации). Ацетилхолин увеличивает частоту митозов, но только в течение первого часа [Адо А.Д. и соавт., 1985в]. Вполне логично предположить, что атропин будет блокировать данные физиологические эффекты ацетилхолина, определяя в конечном счете синтез плазмочитами иммуноглобулинов. Действительно, в последующих работах А.Д. Адо и соавт. (1985а) это доказано. При исследовании влияния фосфорилхолина на взаимодействие поверхностных мембранных иммуноглобулинов лимфоцитов периферической венозной крови доноров и больных поллинозом с антиглобулиновой и с IgE-антисывороткой в реакции прямой иммунофлюоресценции не обнаружено разницы в содержании Ig-несущих В-лимфоцитов у исследуемых групп. Однако, установлено что преинкубация с фосфорилхолином (10^{-8} – 10^{-5} М) приводила к зависимому от дозы снижению Ig-несущих В-лимфоцитов у доноров к увеличению преимущественно порции IgE-положительных лимфоцитов у больных поллинозом. Преинкубация с атропином (10^{-6} М) отменяла эффект фосфорилхолина при его действии на В-лимфоциты как здоровых людей, так и больных поллинозом.

Предполагают, что в процессе иммунного ответа происходит взаимодействие между м-холинорецепторами и рецепторами на мембране

В-лимфоцита, способными взаимодействовать с антигенами [Адо А.Д. и соавт., 1986].

Меченый ^3H ВZ (хинуклидинил-3-бензилат) специфический мускариновый агонист и атропин (10^{-3} М) тормозят иммунное розеткообразование (РОК лимфоцитов селезенки и РОК В-лимфоцитов). Это связано с м-холинорецепторами лимфоцитов. ^3H -хинуклидинил-3-бензилат в прямой зависимости от дозы тормозил розеткообразование в концентрации $10^{-9} - 10^{-14}$ М. Атропин в концентрации 10^{-3} М тормозит и отменяет эффект ^3H ВZ [Адо А.Д. и соавт., 1985б]. Результаты, полученные и соавт., подтверждены и в других его работах [Адо А.Д. и соавт., 1985г, 1987]. В 1995 году Адо А.Д. подвел итог материалам многочисленных исследований его школы, где обобщил влияние макромолекулярных агентов (антигенов) на активность мембран лимфоцитов и соответственно на их способность присоединять ацетилхолин, его аналоги и антагонисты (холиноблокаторы), рассмотрел некоторые вопросы нервной регуляции иммунных и аллергических реакций. С 90-х годов прошлого столетия по настоящее время сформировалось одно из наиболее перспективных направлений на стыке нескольких наук – психонейроиммунология, одной из задач которой является изучение передачи сигналов от нервных к иммунным клеткам (и наоборот), исходя из наличия в нервной и иммунной системе общих медиаторов и рецепторов к ацетилхолину, норадреналину, дофамину, серотонину и γ -аминомасляной кислоте (ГАМК) [Neveu P.J., Le Moal M., 1990].

Действие ацетилхолина неоднозначно и не всегда проявляется только стимуляцией иммунных реакций. Выявлено ингибирующее влияние этого медиатора на высокий иммунный ответ у мышей, которое опосредованно фракцией прилипающих к пластику спленоцитов (макрофагами). Ацетилхолин подавляет фагоцитарную активность макрофагов и экспрессию СЗ-рецепторов на их мембране, не изменяя экспрессии Fc-

рецепторов. Блокада синтеза простангландинов отменяет супрессивное влияние ацетилхолина на гуморальный иммунный ответ. Ацетилхолин индуцирует синтез интерферона спленоцитами и увеличивает ИЛ-1 подобную активность макрофагов [Гонтова И.А. и соавт., 1989]. Данный эффект оказывает иммуностимулирующее действие.

Существуют основания предположить, что блокада м-холинорецепторов тимуса может привести к усилению действия катехоламинов на адренергические рецепторы тимоцитов, увеличивая их запрограммированную гибель (апоптоз) и уменьшая таким образом размер тимуса [Durant S., 1986].

При изучении влияния адреномиметиков и ХТП, в частности, атропина в дозе 10 мг/кг на содержание субпопуляций Т-лимфоцитов в крови и лимфоидных органах мышей установлено, что через 90 и 150 мин после инъекции данного холиноблокатора в тимусе на 16 и 8% по сравнению с контролем снижается содержание L3T4 (субпопуляция Т-хелперов) [Tschima H. et al., 1991]. По сравнению с содержанием исследованной субпопуляции в органе через 30 мин через 90 и 150 мин она уменьшалась соответственно и на 23 и 13% ($p < 0,05$), при этом в крови количество лимфоцитов L3T4 увеличивалось на 9% по сравнению с их содержанием в тимусе через 30 мин и по сравнению с контролем ($p < 0,05$). В селезенке содержание лимфоцитов L3T4 существенно не изменялось. В данном органе по сравнению с практически не подвергшимся изменению содержания лимфоцитов в тимусе и крови уменьшалось количество (субпопуляция Т-хелперов) на 6% ($p < 0,05$) через 90 мин по сравнению с содержанием клеток через 30 мин (по сравнению с контролем отмечалось незначительное снижение лимфоцитов Lyt 1 на 4%). Незначительно, но статистически значимо, под влиянием атропина снижалось количество субпопуляции Lyt 2 (цитотоксических Т-лимфоцитов/Т-супрессоров) в селезенке (на 10% через 30 и 190 мин по сравнению с контролем).

Ацетилхолин (1 мг/кг) уменьшал через 90 мин по сравнению с показателем на 30 мин содержание в тимусе лимфоцитов L_{yt} 2 на 54% ($p < 0,05$), в крови на 5% ($p < 0,05$). Через 30 мин в тимусе по сравнению с контролем снижалось содержание субпопуляций Т-клеток L3T4 и L_{yt} 1 соответственно на 16 и 7% ($p < 0,05$). В селезенке по сравнению с контролем на 8% увеличивалось только количество лимфоцитов L_{yt} 1 ($p < 0,05$) [Techima H. et al., 1991].

Приведенные данные свидетельствуют о довольно сложных механизмах, определяющих миграцию субпопуляций Т-клеток при незначительно превышающей физиологическую концентрацию ацетилхолина и очень небольшой холиноблокирующей дозе (для мышей) атропина. Ацетилхолин по сравнению с атропином вызывает более выраженное шестидесятиминутное снижение основных субпопуляций Т-лимфоцитов в тимусе вследствие их миграции в циркулирующую кровь. Результаты исследований, полученные Н. Techima et al. (1991), вряд ли могут быть использованы для предположения о действии на Т-лимфоциты тимуса и других лимфоидных органов высоких (сублетальных) концентраций ХТВ, и, в частности АП.

В опытах на мышах *in vitro* карбохолин в концентрации 10^{-5} М приблизительно на 30% ($p < 0,05$) снижал формирование АОК к ЭБ, атропин в такой концентрации не оказывал влияния на тимусзависимую гуморальную иммунную реакцию [Rinner I, Schauenstein K., 1991]. Атропин при получении его крысами в дозе 1,2 мг с пищей ежедневно в течение 5 сут в 6 раз ингибировал включение ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов, практически не влиял на включение меченого тимидина в тимоциты. Физостигмин (холиномиметик, обратимый ингибитор холинэстеразы) в дозе 12 мкг (получение препарата животными обеспечивалось также, как и атропина) не влиял на включение ^3H -тимидина в ДНК спленоцитов и повышал этот показатель при исследовании тимоцитов [Rinner I, Schauenstein K., 1991]. Отмечали снижение пролиферации спленоцитов

крыс по включению ^3H -тимидина в ДНК этих клеток при однократной дозе атропина, составляющей 125 мг/кг, в 7 раз. Эта же доза атропина увеличивает апоптоз тимоцитов в 2 раза [Rinner I. и соавт., 1995].

Представляют интерес работы в которых холиноблокаторы использовались в качестве антидотов при отравлениях ФОС. В опытах на мышах при изучении иммунотоксичности ФОС показано, что острая интоксикация ФОИ диметоатом в сублетальных дозах вызывает существенное снижение синтеза антител к тимусзависимому антигену ЭБ. При этом атропин в дозе 75 мг/кг не оказывал защитного действия на синтез антител [Tiefenbach B., Lange P., 1980].

Установлено [Забродский П.Ф., Мышкина А.К., 1989] что при применении ФОС за 1 ч до введения разрешающей дозы антигена существенно уменьшалось формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Атропин в дозе 50 мг/кг практически не изменял проявления данной реакции. Применение атропина не оказывало существенного влияния на содержание Т-клеток в крови. В локальной адоптивной реакции гиперчувствительности замедленного типа атропин вызывал уменьшение массы стопы, то есть снижения формирования ГЗТ в данной экспериментальной модели. Существуют все основания считать, что это обусловлено блокадой м-холинореактивных структур клеток-эффекторов реакции гиперчувствительности замедленного типа (Т-хелперов первого типа -Th1 [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Kimber I., 1996]. При переносе спленоцитов иммунизированных доноров реципиентам с последующим введением эритроцитов барана и оценкой ГЗТ установлено существенное снижение прироста массы лапы под влиянием атропина [Забродский П.Ф., Мышкина А.К., 1989]. Редукция реакции гиперчувствительности замедленного типа у реципиентов под влиянием атропина можно объяснить уменьшением способности спленоцитов доноров к реализации вторичного иммунного ответа под влиянием блокады

м-холинорецепторов иммунокомпетентных клеток [Witfield J.F. et al., 1971; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979]. При изучении влияния атропина на формирование супрессоров в селезенке не выявлено изменения супрессорной активности спленоцитов через 5 сут после введения холиноблокатора. В данных исследованиях использована лишь одна доза атропина, что не дает полного представления о формировании ГЗТ под влиянием АП.

Представляют интерес данные, свидетельствующие о том, что ацетил- и карбамилхолин усиливают пролиферацию и синтез белков в клеточной линии TAD3, их действие полностью подавляется при предварительной обработке культуры α -бунгаротоксином. Результаты свидетельствуют о влиянии холинергических агонистов на дифференцировку и созревание Т-лимфоцитов через имеющиеся на эпителиальных клетках тимуса никотиновые ацетилхолиновые рецепторы [Tomimasa K. et al., 1989].

Роль только м-холинорецепторов в активации Т-лимфоцитов признается не всеми исследователями. Так, показано, что лишь PNA-тимоциты (зрелые клетки) пролиферировали в ответ на карбамилхолин (10^{-12} М) или никотин при инкубации 24 ч, тогда как PNA+ (незрелые тимоциты) или фракционированные клетки не отвечали на эти агенты. Таким образом, селективная активация тимоцитов может осуществляться через стимуляцию холинергических рецепторов. В митогенную активацию вовлечены никотиновые рецепторы (эффект ингибируется d-тубокурарином), а мускариновые, по-видимому, нет. Основными конечными внутриклеточными регуляторами функции иммунных клеток, через которые реализуется действие нейромедиаторов и пептидных гормонов, являются цГМФ и цАМФ. Они опосредуют также выделение и действие лимфокинов и других внутрисистемных факторов регуляции иммунного ответа [Rossi A., et al., 1989].

Показано, что обработка *in vitro* в течение 60 мин В-клеток крови доноров веществами, увеличивающими внутриклеточное содержание цГМФ (ФОС, ацетилхолин, левамизол, дибутил-цГМФ, супероксиддисмутаза), индуцировали проявление хелперной активности у интактных В-клеток, усиление активности В-клеток памяти и частичное или полное подавление активности В-супрессоров, индуцированных антигеном [Калинкович А.Г., Борисова Л.С., Инжеваткина С.М. и др. , 1988].

Повышение под влиянием холинергической стимуляции (ацетилхолина) активности естественных клеток-киллеров (ЕКК) и К-клеток, обеспечивающих антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), [Garoroy M.R., 1975; Grabczewska E. et al., 1990], являющихся одним из основных факторов, определяющих антиинфекционную неспецифическую резистентность организма [Забродский П.Ф., 1995]

В отношении АЗКЦ достоверно установлено, что увеличение цАМФ в клетках-киллерах приводит к редукции, а возрастание уровня цГМФ - к росту активности антителозависимой клеточной цитотоксичности [Garoroy M.R., 1975].

Установлено, что под влиянием ацетилхолина (5 мг/кг) происходит усиление миграции стволовых кроветворных клеток (СКК) из костного мозга (КМ) в селезенку. Вероятно, механизм индукции ацетилхолином миграции СКК аналогичен описанному при изучении подвижности В-лимфоцитов данным медиатором [Адо А.Д и соавт., 1983]. Ацетилхолин вызывал уменьшение Т-клеток в тимусе, так как данный медиатор является сигналом для выхода тимоцитов из тимуса вследствие стимуляции их холинорецепторов [Maslinski W.. et al., 1987]. Ацетилхолин несущественно увеличивал АЗКЦ, а также гуморальную иммунную реакцию, вероятно, вследствие механизмов, описанных в работах [Адо А.Д. и соавт, 1983; , Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979 Maslinski W.. et al., 1987].

При определении влияния на гуморальный и клеточный иммунный ответ атропина при острой интоксикации диметилдихлорвинилфосфатом (ДДВФ) установлено [Забродский П.Ф., 1995], что под влиянием ДДВФ существенно увеличивалось содержание колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс). Введение после яда атропина не изменяло характера миграции СКК из костного мозга по сравнению с контролем. Холинергическая стимуляция, вызванная ДДВФ, приводила к значительному снижению Т-клеток в тимусе. Антидотная терапия атропином острой интоксикации ФОС отменяла данный эффект.

Представленные результаты [Забродский П.Ф., 1995] позволяют считать, что увеличение миграции стволовых кроветворных клеток из костного мозга и снижение Т-клеток в тимусе связаны с активацией м-холинореактивных структур. При этом снижение Т-клеток в тимусе зависит как от активации их миграции ацетилхолином, действующим на м-холинорецепторы тимоцитов, так и от эффекта глюкокортикоидов, концентрация которых в крови при действии ФОС увеличивается [Хусинов А.А. и соавт., 1991; Забродский П.Ф., 1993].

Реакция ГЗТ при острой интоксикации ДДВФ существенно снижалась, причем применение атропина не восстанавливало ее до контрольного уровня (отмечается даже незначительное увеличение супрессии иммунных реакций). Аналогично изменению ГТЗ при интоксикации ДДВФ без применения и с использованием атропина изменялись ЕЦ и АЗКЦ. Можно предположить, что супрессия данных иммунных реакций реализуется путем ингибирования эстераз Т-эффекторов ГЗТ, естественных киллеров и К-клеток [Гущин Н.В. и соавт., 1991; Ferluga J. et al., 1972], причем блокирование при этом их м-холинореактивных структур может приводить лишь к некоторому усилению выявленных эффектов, так как атропин снижает формирование ГЗТ [Забродский П.Ф., Мышкина А.К., 1989] и пролиферацию лимфоцитов [MacManus J.P. et al.,

1975]. Число АОК в селезенке при действии ДДВФ значительно снижалось, при использовании в качестве антидота атропина супрессия гуморального иммунного ответа усиливалась. При исследовании влияния острой интоксикации ДДВФ без применения и с применением атропина на продукцию антител к тимуснезависимому Vi-антигену установлено [Забродский П.Ф., 1995], что атропин практически не влияет на формирование постинтоксикационной иммуносупрессии. Сопоставляя влияние лечения атропином острой интоксикации ФОС на гуморальный иммунный ответ к тимусзависимому и Т-независимому антигенам можно заключить, что усиление супрессии гуморальной иммунной реакции атропином при действии ДДВФ в отношении тимусзависимого антигена выражено в большей степени. Это свидетельствует о снижении атропином функции Т-хелперов.

Роль исследованных иммунных реакций при острой интоксикации ДДВФ в реализации гуморального и клеточного иммунных ответов различна [Забродский П.Ф., 1995]. Увеличение миграции СКК из костного мозга является фактором, способным снижать реализацию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния. Выявленное под влиянием ДДВФ снижение Т-клеток в тимусе, реакции ГЗТ, ЕЦ, АЗКЦ, числа АОК в селезенке и продукции антител к тимуснезависимому Vi-антигену свидетельствует о выраженной супрессии гуморального и клеточного иммунитета. При этом атропин, сохраняя содержание Т-клеток в тимусе, тем не менее, увеличивает проявления постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Данные различных исследователей свидетельствуют, что ацетилхолин, связываясь с холинорецепторами, ведет к вовлечению системы вторичных месенджеров и модуляции ряда иммунологических процессов, таких как иммунотоксичность, подвижность лимфоцитов, индукция антител, пролиферация, активация супрессорных клеток. Число

рецепторов ацетилхолина на лимфоцитах изменяется под влиянием инкубационной среды, митогенов, мускариновых антагонистов (м-холиноблокаторов), с возрастом и при патологических процессах [Maslinski W., 1989].

Доказано, что при стрессе атропин увеличивает степень лимфопении, а м-холиномиметик ацеклидин ее уменьшает [Дешевой Ю.Б., 1985]. Стимуляция м-холинорецепторов крыс ацеклидином увеличивала, а блокада их атропином задерживала миграцию зрелых костномозговых эозинофилов в кровь. Атропин увеличивал за счет снижения миграции эозинофилов содержание их в костном мозге в 2 раза, а ацеклидин увеличивал выход из костного мозга в кровь на 80% [Дешевой Ю.Б., 1982]. В дальнейшем было доказано, что ацетилхолин в дозах 0,5-2,0 мг/кг (для усиления его эффекта вводили в малой дозе, составляющей 0,05 мг/кг, обратимый ингибитор холинэстеразы прозерин) увеличивал содержание эозинофилов в циркулирующей крови крыс Вистар до 140- 220%, уменьшая их количество в костном мозге на 60%. Атропин (100 мг/кг) отменял эффект ацетилхолина и даже увеличивал содержание эозинофилов в костном мозге (бедренной кости) на 220%, уменьшая их количество в циркулирующей крови до 20%. Автор предполагает и в дальнейшем доказывает, что выявленный эффект связан с действием ХТП на м-холинорецепторы холинореактивных структур костного мозга или на м-рецепторы эозинофилов, а активация гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, приводящая к увеличению синтеза и выделения в циркулирующую кровь гормонов надпочечников, не оказывают влияния на выявленные эффекты [Дешевой Ю.Б., 1985], так как у адреналэктомированных крыс отмечалось такое же действие исследованных ХТП [Дешевой Ю.Б., 1984]..

Анализ данных литературы по иммунотоксическому действию м-холиноблокаторов позволяет заключить, что механизмы их иммунотоксических эффектов в сублетальных дозах определяются, по-

видимому, перераспределением иммуноцитов между органами системы иммунитета, снижением функции Т-хелперов и макрофагов, нарушением кооперации Т- и В-лимфоцитов и другими механизмами. Изложенные предположения нуждаются в экспериментальном подтверждении.

Таким образом, из представленного обзора литературы видно, что исследование изменений физиологических механизмов регуляции системы иммунитета под влиянием м-холиноблокаторов (атропиноподобных препаратов – АП) является актуальной задачей физиологии и иммунологии в связи со следующими обстоятельствами: м-холиноблокаторы используются как антидотные средства при интоксикации фосфорорганическими соединениями - ФОС, как антихолинэстеразными инсектицидами, так и боевыми фосфорорганическими отравляющими веществами, в качестве наркотических средств, синтетический холиноблокатор хинуклидинил-3-бензилат (BZ) является боевым отравляющим веществом (БОВ) [Крылов С.С. и соавт., 1999] и подлежит уничтожению.

Особую значимость задача, связанная с изучением влияния АП на иммунный гомеостаз приобрела в связи с тем, что в последнее время частота острых интоксикаций данными ядами, особенно в виде наркотических рецептур существенно увеличилась [Крылов С.С. и соавт., 1999]. АП являются алкалоидами, определяющими картину острых отравлений некоторыми ядовитыми грибами. Отравление атропином относится к наиболее распространенным лекарственным интоксикациям [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. При острых отравлениях ФОС возникают психоневрологические нарушения, нарушения дыхания, функции сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, печени, почек и других органов [Голиков С.Н, 1968; Лужников Е.А. и Костомарова Л.Г., 1989, 2000], а также нарушение иммунного гомеостаза [Забродский П.Ф., 1986; 1993; 1995; 1998, Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт. 2001]. Особую опасность АП в виде BZ могут представлять при аварийных ситуациях с загрязнением

местности в случае аварий на химических объектах или террористических актов.

Не вызывает сомнений, что одной из причин инфекционных осложнений и заболеваний после острого отравления (особенно тяжелой и сверхтяжелой степени) м-холиноблокаторами является нарушение механизмов физиологической регуляции системы иммунитета [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985].

Ограниченные данные литературы в отношении иммунотоксических эффектов холиноблокаторов предполагает изучение целого ряда неисследованных вопросов в отношении нарушения физиологических механизмов регуляции при острой интоксикации м-холиноблокаторами (атропином и метацином). Некоторые данные различных исследователей противоречивы, не ясна роль механизмов, реализующихся на уровне органов и систем и при взаимодействии иммунокомпетентных клеток (ИКК) *in vitro*, практически не исследованы особенности перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета при острой интоксикации атропиноподобными веществами (АП), не определена роль кооперации Т- и В-лимфоцитов в реализации супрессии антителообразования после действия холиноблокаторов основных иммунных реакций.

Получение новых и уточнение полученных данных в отношении иммунотоксичности АП позволит обосновать адекватную характеру нарушений иммунного гомеостаза возможность использования из большого арсенала иммуностимуляторов [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985; Земсков В.М., 1991; Осипова Л.О., 1990; Хавинсон В.Х. и соавт., 1990; Петров Р.В., 1991; Яковлев Г.М. и соавт., 1990; Гюллинг Э.В. и соавт., 1991; Юшков В.В. и соавт., 1993; Ширинский В.С., Жук Е.А., 1991; 1994; Ершов Ф.И., 1995; Невидимова Т.И. и соавт., 1995; Утешев Б.С. и соавт., 1995; Старченко А.А. и соавт., 1996; Семина О.В. и соавт., 1993, 1995, 1997; Забродский

П.Ф.и Киричук В.Ф., 1999; Забродский и соавт., 2001 и др.] наиболее перспективных и обоснованных результатами проведенных исследований фармакологических препаратов для профилактики постинтоксикационных инфекционных осложнений и заболеваний.

Следует отметить, что вопрос о фармакологической коррекции нарушений иммунного гомеостаза под влиянием АП в постинтоксикационном периоде до сих пор достаточно полно не изучен и нуждается в дальнейшей разработке [Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 2001].

Неясность многих вопросов, противоречивость и неоднозначность результатов исследований иммуностропных свойств АП, в частности, иммунотоксичности атропина и метацина предполагает дальнейшее изучение этой проблемы, решение которой позволит существенно снизить частоту инфекционных осложнений отравленных АП в лечебных учреждениях.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1. Объекты исследования и применяемые препараты

Исследования проводились на 735 беспородных крысах и крысах Wistar и на 260 беспородных белых мышах обоего пола. Масса крыс и мышей составляла соответственно 180-240 и 18-24 г.

Атропин и метацин вводили подкожно в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 LD₅₀. Максимальная доза АП ограничена уровнем 0,5 LD₅₀, так как дальнейшее увеличение дозы в связи с выраженным психотическим эффектом и коматозным состоянием способно реализовать неспецифические эффекты, характеризующие активацию систем, модулирующих иммунные реакции иначе, чем м-холиноблокаторы [Крылов С.С. и соавт., 1999]. Выбор атропина обусловлен его наиболее характерными свойствами, как м-холиноблокатора, кроме того, отравления им наиболее часты в клинической практике. Метацин использовался в связи с его в отличие от атропина исключительно периферическим действием, а также синтетическим происхождением и широким использованием в медицине.

Среднелетальные дозы атропина для крыс и мышей при подкожном введении составляли соответственно 725 ± 38 и 497 ± 29 мг/кг, а метацина – соответственно - 1134 ± 75 и 775 ± 35 мг/кг. Следует отметить, что холинолитические дозы атропиноподобных соединений (АП) для грызунов меньше среднелетальных в 10-20 раз [Западнюк И.П. и соавт., 1983]. Высокие дозы холиноблокаторов объясняются видовой чувствительностью грызунов к АП. Так, атропин и другие АП в 1000 раз токсичнее для человека, чем для мышей и крыс [Ludevig R., 1984].

Опыты на мышах в связи с особенностями экспериментальной модели оценки функции стволовых кроветворных клеток проводили только при

исследовании миграции колониеобразующих клеток из костного мозга в селезенку, а также при оценке кооперации Т- и В-лимфоцитов *in vitro*.

Как иммуностимулятор использовали Т-активин, который вводили внутримышечно в дозе 5 мкг/кг ежедневно в течение 3 сут. Первую дозу животные получали через 30 мин после острой интоксикации с применением и без применения антидотного средства. Иммуностимулирующая доза Т-активина обоснована исследованиями, приведенными в литературе [Большаков И.Н. и соавт., 1991], а также расчетными данными, исходя из формул, предложенных Ю.Р. Рыболовлевым (1982).

Кровь для исследования титра антител забирали из подъязычной вены животных. Лимфоидные органы извлекали у животных после цервикальной дислокации в различные сроки после интоксикации.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Женевской конвенции "International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals" (Geneva, 1990).

2.2. Оценка влияния ТХВ на функцию стволовых кроветворных клеток

Согласно теории клональной саксессии (последовательная смена кроветворных клонов в результате созревания одной за другой стволовых кроветворных клеток - СКК) [Чертков И.Л. и соавт., 1990] число колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс), мигрировавших из костного мозга (КМ) в селезенку, отражает функциональное состояние клона кроветворных клеток и, следовательно, функции СКК, продуцирующей этот клон. Кроме того, по числу КОЕс можно судить и о функции лимфоидных стволовых клеток, обеспечивающих иммунопоз [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1981].

В литературе [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1972; Петров Р.В. и соавт., 1981; Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 1997; Забродский П.Ф., 1993; 1998; 2000] описывают содержание КОЕ в селезенке после летального облучения мышей с экранированием $\frac{1}{2}$ голени, как отражение функции стволовых кроветворных клеток.

Острое действие АП на функцию СКК проводили путем определения миграции КОЕс из КМ в селезенку методом эндогенного колониеобразования после летального облучения мышей в дозе 8 Гр при экранировании костного мозга задней конечности до уровня $\frac{1}{2}$ голени. Через 8 сут извлекали селезенку, фиксировали ее в растворе Боуэна и макроскопически подсчитывали число колониеобразующих единиц (КОЕс) [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1972; Till J. E., Mc Culloch E. A., 1961], используя лупу с увеличением в 2 или 4 раза. АП (изолированно и с антидотом аминостигмином) вводили через 30 мин после облучения животных, Т-активин применяли по описанной методике.

2.3. Исследование функционального состояния лимфоидных органов

2.3.1. Оценка лимфоидного индекса тимуса и селезенки

С целью оценки лимфоидного индекса (ЛИ) тимуса и селезенки определяли их массу гравиметрическим методом. Лимфоидный индекс вычислялся общепринятым способом [Гольдберг Е. Д. и соавт., 1972; Тихонов В. Н., 1981, Германчук В.Г., 2000; Беликов В.Г., 2001], путем деления массы органа (в мг) на массу тела (в г) через 1, 2 и 3 сут после интоксикации АП. Данные показатели являются косвенными критериями оценки состояния иммунной системы и могут отражать ее функциональное состояние в целом [Александров В. Н., 1983].

2.3.2. Определение содержания Т-лимфоцитов в тимусе и лимфоцитов в селезенке, лимфатических узлах и костном мозге

Содержание Т-клеток в тимусе крыс определяли общепринятым методом подсчета ядросодержащих клеток в органе, учитывая то обстоятельство, что лимфоциты в вилочковой железе представлены практически только Т- популяцией [Петров Р. В., 1987; Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. Лимфоциты в селезенке, лимфатических узлах (для изучения брали паховые лимфоузлы) и костного мозга (исследовали клетки костного мозга бедренной кости) подсчитывали, исходя из их относительного содержания в мазках данного органа, окрашенных по Романовскому-Гимзе. Для определения содержания в лимфоцитов лимфоидных органах клеточные суспензии готовили после интоксикации АП через 1, 2 и 3 сут, учитывая данные литературы, свидетельствующие о том, что в эти сроки после острых интоксикаций и экстремальных воздействий отмечается, как правило, снижение массы исследуемого органа [Александров В. Н., 1983; Забродский П.Ф., 1998; Германчук В.Г., 2000; Descotes J., 1986].

2.4. Оценка кооперации Т- и В- лимфоцитов *in vitro*

Для получения Т-клеток использовали метод фильтрования селезеночной суспензии через нейлоновую вату (“Нитрон”) [Ширшев С.В., 1998]. Для выделения В-лимфоцитов применяли реакцию комплементзависимого масс-цитоллиза. В качестве цитотоксической сыворотки использовали моноклональные антитела против Thy 1.2 антигенов Т-лимфоцитов мыши (Cedarlane Laboratories Limited; London, Canada) [Marshak-Rothstein A. et al., 1979]. Из суспензии спленоцитов макрофаги удаляли методом негативной селекции, используя их

способность прилипать к стеклянной поверхности [Ширшев С.В., 1998]. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим (она составляла 95-98%). Инкубируемая по методу J. K. Thomas, T. Imamura [1986] культура содержала 10^6 и $5 \cdot 10^5$ В- и Т-клеток соответственно и 10^7 эритроцитов барана в 0,15 мл среды Хенкса. Т- и В-лимфоциты с целью обеспечения сингенности клеток для каждого опыта получали из суспензии спленоцитов одной мыши. Антителообразующие клетки (АОК) подсчитывали в инкубационных камерах через 4 сут [Thomas J. K., Imamura T., 1986]. Данный тест отражает синтез IgM В-клетками селезенки при участии Т-хелперов типа 1 (Th1-лимфоцитов). Роль Т- и В-лимфоцитов в обеспечении антителопродукции определяли путем сравнения числа АОК после инкубации той или иной популяции лимфоцитов в течение 1 ч с различными концентрациями АП (10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М).

2.5. Исследование гуморального звена иммунного ответа

Гуморальных иммунные реакции оценивались, используя два вида антигенов: тимусзависимый - эритроциты барана (ЭБ) и тимуснезависимый - брюшнотифозный Vi-антиген (Vi-Ag). Данный метод оценки синтеза антител В-клетками (плазмоцитами) в настоящее время является общепринятым и наиболее часто используется в иммунотоксикологии и других прикладных областях медицины и биологии, исследующих влияние и химических факторов на систему иммунитета [Утешев Б. С., 1984; Долгушин И.И. и соавт., 1989; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1999; 2001; Descotes G., 1986; Luster M. J. et al., 1987; Sullivan J. B., 1989]

Использование данных антигенов позволяет рассмотреть влияние АП преимущественно на Т-зависимый или тимуснезависимый гуморальный иммунный ответ, а также оценить роль Т-хелперов в реализации гуморального звена иммунного ответа [Утешев Б. С., 1984; Плещитый К. Д. и

соавт., 1984; 1985; Забродский П. Ф., Киричук В.Ф., 1998] Исследование показателей тимусзависимого гуморального иммунного ответа проводили через 5, 8 и 11 суток после острой интоксикации. Иммунизацию ЭБ проводили путем их внутрибрюшинного введения в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия при изучении действия АП в индуктивную фазу гуморального иммунного ответа одновременно с их введением. Оценка влияния АП на продуктивную фазу антителопродукции проводилась при их введении через 3 сут после иммунизации. Титры антител к ЭБ определяли в реакции гемолиза эритроцитов в присутствии комплемента. Все реакции проводились на стерильных пластиковых микропланшетах. Гуморальный иммунный ответ оценивали по отрицательному двоичному логарифму титра антител (ОДЛТА). Данный тест отражает способность органов системы иммунитета синтезировать Ig M через 5 сут и Ig G через 8 и 13 сут [Ройт А., 1991].

Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому и тимуснезависимому антигенам оценивали также через 5 суток по числу АОК в селезенке [Белокрылов Г. А. и соавт., 1980; Jerne N. K., Nordin A. A., 1963] после введения АП, с одновременной (оценка индуктивной фазы гуморального иммунного ответа) внутрибрюшинной иммунизацией крыс ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия или Vi-Ag в дозе 8 мкг/кг (использованный тест отражал синтез Ig M В-клетками селезенки), а также с иммунизацией, проведенной за 3 сут до введения АП (оценка продуктивной фазы антителогенеза) .

Для определения АОК к Vi-антигену последний нагружали на ЭБ при температуре 37^0 С в течении 1,5 часов. Конечная концентрация антигена в растворе составляла 20 мкг/мл. С целью освобождения от несвязавшегося с эритроцитами Vi-антигена эритроциты отмывали изотоническим раствором хлорида натрия на менее 8 раз. Введение АП (изолированно и с антитодом) и

иммуностимуляцию Т-активином проводили через 30 мин после иммунизации.

2.6. Исследование клеточного звена иммунного ответа

Состояния клеточного звена системы иммунитета под влиянием АП проводилось с использованием методов исследования, наиболее широко применяемых для определения влияния фармакологических препаратов на систему иммунитета и иммуотоксичности различных соединений: оценка функции Т-лимфоцитов, реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) и показатель антителозависимой клеточной цитотоксичности [Петров Р.В., 1987; Забродский П. Ф., 1998; Descotes J., 1986]. Формирование ГЗТ при воздействии АП позволяет прежде всего оценить их влияние на функцию Th1-лимфоцитов [Kimber I., 1996]. Данный тест также широко используется для получения интегральной характеристики клеточного иммунитета [Фримель Х., Брок Й., 1986; Descotes J., 1986]. Реакция ГЗТ изучалась в общепринятой модели, а также адоптивных моделях, связанных с переносом клеток от животного-донора к животному-реципиенту.

2.6.1. Оценка функции Т-лимфоцитов

Исследование функции Т-лимфоцитов проводили по реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) периферической крови в присутствии конконавалина А (КонА). РТМЛ основана на способности сенсibilизированных Т-лимфоцитов в реакциях с антигеном или митогенами (ФГА, КонА) *in vitro* выделять биологически активные субстанции – лимфокины, в том числе фактор, ингибирующий миграцию лейкоцитов (один из лимфокинов воспаления) [Фримель Х. и Брок Й., 1986].

Для исследования РТМЛ кровь у крыс забиралась из подъязычной вены через 1, 3 и 6 сут после интоксикации. В капилляры для определения С - реактивного белка набирали с часового стекла смесь, состоящую из гепаринизированной крови (0,2 мл) исследуемых крыс (опыт и контроль) и раствора КонА (0,5 мл). Концентрация митогена в растворе составляла 100 мкг/мл. Капилляры запаивали с одного конца парафином и центрифугировали 5 мин при 1500 об/мин, затем в вертикальном положении их инкубировали 24 ч в термостате при температуре 37⁰ С. Учет реакции проводили путем измерения длины зоны миграции основной массы лейкоцитов от границы эритроцитарного осадка в контроле и опыте [Гембицкий Е.В. и соавт., 1987]. Результат реакции выражали в виде процента миграции (ПМ), который :

Длина зоны миграции с КонА

$$\text{ПМ} = \frac{\text{Длина зоны миграции с КонА}}{\text{Длина зоны миграции в контроле}} \times 100$$

Длина зоны миграции в контроле

Величина ПМ обратно пропорциональна функции Т-клеток.

2.6.2. Исследование реакции гиперчувствительности замедленного типа

Для оценки влияния АП на формирование ГЗТ у крыс Вистар использовали модель данной реакции, в которой не применялся перенос сингенных иммуноцитов, и адоптивные (связанные с переносом клеток) модели. ГЗТ оценивали после иммунизации внутривенным введением $2 \cdot 10^8$ эритроцитов барана (ЭБ) в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия одновременно с АП. Разрешающую (вызывающую реакцию) дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$ в 0,05 мл изотонического раствора хлорида натрия) вводили под апоневроз задней лапы крысы через 4 сут после иммунизации. Оценку реакции осуществляли через 24 часа по приросту массы стопы задней лапы крыс по сравнению с контрольной - контрлатеральной [Брюхин Г.В. и соавт., 1990]. АП вводили за 1 сут до введения разрешающей дозы. Данный тест отражал

функцию Th1 лимфоцитов и способность их к продукции ИЛ-1, ИЛ-3, γ -интерферона, β -фактора некроза опухоли - лимфотоксина и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) [Georgiev V.St., Albright J.E., 1993].

Локальную адоптивную ГЗТ оценивали у крыс-реципиентов после введения им под апоневроз стопы смеси ЭБ ($5 \cdot 10^8$) и спленоцитов ($4 \cdot 10^8$) от сингенных интактных крыс (отрицательный контроль), животных, иммунизированных 10^8 ЭБ (положительный контроль) и спленоцитов крыс, получавших АП (опытная серия). Селезенку для получения клеток извлекали у доноров через 4 сут после иммунизации. Опытной группе за 1 сут до извлечения селезенки вводили АП (опытная серия). Суспензию спленоцитов готовили на среде 199.

При исследовании формирования ГЗТ у крыс-реципиентов после переноса им спленоцитов ($5 \cdot 10^8$), иммунизированных 10^8 ЭБ сингенных доноров, реципиентов через 1 ч сенсibilизировали внутривенным введением 10^8 ЭБ. Через 4 сут под апоневроз стопы реципиентов вводили разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) с последующей оценкой реакции через 24 ч. Спленоциты получали через 5 сут после иммунизации доноров. АП вводили реципиентам через 30 мин после иммунизации. В данном эксперименте формирование ГЗТ отражало влияние острой интоксикации АП на вторичный иммунный ответ в модели адоптивной реакции, связанной с переносом иммунных спленоцитов крысам-реципиентам [Фролов и соавт., 1985; Забродский П.Ф., Мышкина А.К., 1990; Германчук В.Г., 2000].

2.6.3. Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности

Антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), характеризующую функцию К-клеток (клеток-киллеров, относящихся к так называемым «нулевым» лимфоцитам [Фримель Х. и Брок Й., 1986]

определяли по методу Ю. И. Зимина, В. Ф. Ляхова (1985), через 5 сут после иммунизации, осуществляемой через 30 мин после отравления. Доказано, что К-клетки - это ЕКК, использующие для усиления реакции антитела [Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2000])

Крыс иммунизировали ЭБ ($5 \cdot 10^8$ клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия внутрибрюшинно) одновременно с введением АП. Через 5 сут селезенку, готовили клеточную суспензию в растворе Хенкса, который затем фильтровали через капроновую сетку. Суспензию клеток дважды отмывали изотоническим раствором хлорида натрия по 10 мин при 400 g. Жизнеспособность клеток определяли методом суправитальной окраски 0,1 % раствором трипанового синего. В качестве клеток-мишеней использовали трижды отмытые по 10 мин при 400 g ЭБ, которые в 2,5 % суспензии смешивали с равным объемом гипериммунной антисыворотки кролика в субагглютинирующем разведении (1:5000). Смесь инкубировали 30 минут при 37°C, а затем отмывали 3 раза раствором Хенкса и доводили до необходимой концентрации. Используемую антисыворотку предварительно инактивировали в течении 30 минут при 56°C. Спленоциты смешивали с ЭБ в соотношении 20 : 1 (абсолютные значения соответственно $20 \cdot 10^6$ и $1 \cdot 10^6$) в 2 мл раствора Хенкса без фенолового красного и инкубировали 4 ч при 37°C. После инкубации смесь клеток центрифугировали 20 минут при 200 g, собирали супернатант. Цитопатогенность киллеров оценивали спектрофотометрическим методом по выходу гемоглобина из лизированных эритроцитов. Контролем служили пробы, содержащие эффекторы и интактные ЭБ. Измерения оптической плотности проводили при длине волны 412 нм на спектрофотометре СФ-46. Уровень АЗКЦ оценивали по индексу цитотоксичности (ИЦ) по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_0 - E_k}{E_{\max}} \times 100, \text{ где}$$

E_0 - оптическая плотность проб, содержащих эффекторные клетки и сенсibilизированные клетки мишени;

E_k - оптическая плотность супернатантов проб, содержащих эффекторные клетки и интактные эритроциты;

E_{max} - оптическая плотность при максимальном гемолизе соответствующего числа эритроцитов (гемолиз проводили дистиллированной водой).

2.7. Исследование естественной цитотоксичности (активности естественных клеток-киллеров - ЕКК)

К ЕКК, открытым в 1976 году, относятся клетки, не имеющие антигенных маркеров Т- и В-лимфоцитов (так называемые, О-клетки). Предполагают, что ЕКК происходят из предшественников Т-лимфоцитов [Ройт А., 1991]. Поверхность ЕКК имеет маркерные молекулы CD16, CD56, CD57 и CD94 [Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. При контакте с клетками опухоли, клетками, пораженными вирусами или паразитами, ксеногенными клетками ЕКК способны уничтожать их. ЕКК не обладают способностью к фагоцитозу [Петров Р.В., 1983; Ройт А., 1991].

Цитолиз клетки-мишени осуществляется проникновением ферментов перфоринов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени [Nogueira N., 1984]. Кроме того, ЕКК способны обеспечивать уничтожение чужеродной клетки путем реализации "дыхательного взрыва" (поражение активными радикалами кислорода, гидроксильного радикала и т.п.) [Ройт А., 1991]. Активность ЕКК повышается интерферонами (особенно γ -интерфероном) и интерлейкинами (ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986].

Активность ЕКК может существенно снижаться при действии большого числа токсикантов [П.Ф.Забродский, 1993, 1997, 2000; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1998; Fergula J. et al., 1972].

Оценка естественной цитотоксичности осуществлялась нерадиометрическим методом [Гордиенко С. М., 1983, 1984], где клетками-эффекторами служили спленоциты крыс, а клетками-мишенями - эритроциты кур (ЭК) [Белокрылов Г. А. и соавт., 1980]. Очищенную взвесь лимфоцитов получали, удаляя прилипающие клетки инкубацией в колонках с нейлоновой ватой. Эффекторные клетки взвешивали в концентрации 10^7 клеток в 1 мл питательной среды следующего состава: среда № 199 с добавлением до 10% истощенной ЭК эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина (300 мкг/мл), стрептомицина (100 мкг/мл) и пенициллина (100 Ед/мл). В ходе опыта обеспечивали соотношение эффектор - мишень 10:1, при этом концентрация клеток-мишеней (ЭК) составляла 10^6 в 1 мл питательной среды. Цитотоксический тест ставили в пластиковых камерах «Linbro» (76-013-05) с круглым дном. Результаты реакции учитывали по спектрофотометрическому определению концентрации гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЭК. В опытные лунки добавляли по 0,1 мл взвеси эффекторных клеток и по 0,1 мл взвеси ЭК. Проводили 3 контроля: эффекторные клетки в питательной среде без ЭК; питательная среда; взвесь ЭК в питательной среде без эффекторов. В конце инкубации содержимое лунок осторожно ресуспендировали и камеры центрифугировали 5 мин при 100g. 0,2 мл надосадка переносили в другие свободные ряды микропластины, а к осадку приливали 0,2 мл 0,25% раствора додецилсульфата натрия (ДСН) для лизиса ЭК, оставшихся неразрушенными в ходе цитотоксической реакции. Оптическую плотность осадков измеряли в специально изготовленных микрокуветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 0,1 мл на СФ-46 при длине волны 413 нм. Определяли количество гемоглобина, выделившегося из неразрушенных

ЕКК ЭК, путем лизиса осадка 0,25% ДСН. Индекс цитотоксичности (ИЦ) определяли по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_k - E_0}{E_k} \times 100, \text{ где}$$

E_k - оптическая плотность лизированного осадка ЭК контрольной пробы без эффекторов против лизирующего раствора;

E_k - оптическая плотность лизированного осадка ЭК контрольной пробы без эффекторов против лизирующего раствора;

E_0 - оптическая плотность лизированных оставшихся в осадке опытной пробы неразрушенных ЭК против лизированного осадка эффекторных клеток без ЭК.

Естественную цитотоксичность *in vitro* определяли спектрофотометрически описанным методом после инкубации клеток-эффекторов (КЭ), получаемых из спленоцитов крыс, в течение 4 ч в среде 199 с содержанием АП в концентрациях 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} М. В ходе опыта обеспечивали соотношение эффектор - мишень 10:1. Результаты реакции учитывали по спектрофотометрическому определению концентрации гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЭК.

2.8. Методы статистической обработки результатов исследований

Полученные данные обрабатывались с использованием общепринятых статистических методов [Сепетлиев Д. Н., 1968; Урбах В. Ю., 1975; Гублер Е. В., 1978; Лакин Г. Ф., 1980]. При этом различия между средними значениями в опытной и контрольной группах считались значимыми при $p < 0,05$. Расчеты среднелетальных доз АП проводили по методу Миллера и Тейтнера [Беленький М. А., 1963].

В исследованиях использовались параметрические методы исследования с оценкой достоверности различий по t-критерию Стьюдента. Для статистического анализа экспериментальных данных с небольшим числом животных в сериях и при отсутствии нормального распределения показателей применялись также непараметрические методы [Гублер Е. В., 1978]. Расчеты проводились на персональном компьютере с использованием пакета программ Statgraphics.

ГЛАВА 3

ДЕЙСТВИЕ АТРОПИНОПОДОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ ИММУНОЦИТОВ В ЛИМФОИДНЫХ ОРГАНАХ

3.1 Влияние м-холиноблокаторов на изменение миграции колониеобразующих единиц в селезенку

До последнего времени в литературе содержание колониеобразующих единиц в селезенке (КОЕс) после летального облучения мышей с экранированием $\frac{1}{2}$ голени описывают, как отражение функции стволовых кроветворных клеток, в частности, их способность к миграции из костного мозга (КМ) [Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 1997; Забродский П.Ф., 1993]. Существуют три метода оценки содержания КОЕ в селезенке: метод эндогенного клонирования [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1972; Петров Р.В. и соавт., 1981; Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 1997; Забродский П.Ф., 1993; 1998; 2000], метод оценки КОЕс после сублетального тотального облучения в дозе 6 Гр [Петров Р. В. и соавт., 1970] и метод экзогенного клонирования, который предусматривает введение сингенных клеток КМ от мышей-доноров, подвергшихся воздействию ксенобиотика, мышам-реципиентам, облученным в летальной дозе (8 Гр) [Till J. E., Mc Culloch E. A., 1961]. Применявшийся нами метод исследования влияния токсикантов на КОЕс (функцию СКК) является одним из наиболее часто применяемых в прикладных областях иммунологии [Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 1997].

Наши исследования показали (табл. 2), что под влиянием атропина и метацина в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ происходит дозозависимое снижение числа КОЕс. Так, в дозах атропина 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ содержание КОЕс

Таблица 2

Влияние острого отравления атропином и метацином на число колониобразующих единиц в селезенке мышей через 8 сут ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	12,2 $\pm$ 2,7	
0,1	7,5 $\pm$ 2,8	9,0 $\pm$ 2,4
0,3	5,8 $\pm$ 2,1**	7,1 $\pm$ 2,0**
0,5	4,4 $\pm$ 1,5*	5,4 $\pm$ 1,7**

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 10 мышей; *, ** - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$, (*; ** - для расчета достоверности различий использовали соответственно t –критерий Стьюдента и непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна- Уитни).

уменьшалось соответственно на 38,5 ($p > 0,05$); 52,5 и 63,9% ($p < 0,05$). При действии метацина снижение показателя в эквивалентных дозах было менее выражено и составляло при исследованных дозах (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) соответственно 25,0 ($p > 0,05$); 41,8 и 55,7% ($p < 0,05$).

Уменьшение миграции КОЕс вследствие блокирования м-холинорецепторов костного мозга после острой интоксикации атропиноподобными препаратами объясняется устранением регулирующей функции ацетилхолина. Данный медиатор действует на м-холинорецепторы КОЕс (или структуры КМ, определяющие их миграцию), что приводит к увеличению их выхода из костного мозга [Забродский П. Ф., 1993].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 LD₅₀ происходит дозозависимое снижение числа КОЕс, что обусловлено блокадой м-холинореактивных структур костного мозга.

3.2. Изучение функционального состояния тимуса

3.2.1. Исследование лимфоидного индекса

Лимфоидный индекс тимуса является косвенным показателем содержания ядродержащих клеток в этом органе, то есть в определенной

степени характеризует процессы апоптоза тимоцитов и миграцию их в циркулирующую кровь [Гольдберг Е. Д. и соавт., 1972; Тихонов В. Н., 1981; Александров В. Н., 1983; Беликов В.Г., 2001].

Исследование влияния острой интоксикации АП на лимфоидный индекс (ЛИ) тимуса белых крыс проводилось через 1 и 2 сут после введения атропина и метацина в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀. В этот период при острых воздействиях ксенобиотиков на животных, как правило, происходит максимальное снижение ЛИ тимуса [Забродский П.Ф., 1998; Германчук В.Г., 2000; Descotes J., 1986].

Установлено (табл. 3,4), что при действии атропина и метацина через 1 и 2 сут существенного изменения ЛИ тимуса не отмечается ($p > 0,05$). Однако, при дозе АП 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут отмечалась тенденция к увеличению показателя, а через 2 сут - к уменьшению.

Таблица 3

Влияние острого отравления атропином и метацином на лимфоидный индекс (усл. ед.) тимуса белых крыс через 1 сут ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	2,12 $\pm$ 0,20	
0,1	2,18 $\pm$ 0,19	1,91 $\pm$ 0,23
0,3	2,01 $\pm$ 0,23	2,47 $\pm$ 0,24
0,5	2,34 $\pm$ 0,21	2,29 $\pm$ 0,25

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс.

Таблица 4

Влияние острого отравления атропином и метацином на лимфоидный индекс (усл. ед.) тимуса белых крыс через 2 сут ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	2,12 $\pm$ 0,20	
0,1	2,41 $\pm$ 0,27	2,11 $\pm$ 0,27
0,3	2,33 $\pm$ 0,20	2,23 $\pm$ 0,24
0,5	1,68 $\pm$ 0,25	1,79 $\pm$ 0,28

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс.

Таким образом, острая интоксикация АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ лимфоидный индекс тимуса существенно не изменяет.

3.2.2. Определение числа Т-лимфоцитов в тимусе

Число Т-лимфоцитов в тимусе также, как и ЛИ, характеризует влияние на его функциональное состояние различных ксенобиотиков [Забродский П.Ф., 1998]

Нами при исследовании числа Т-лимфоцитов в тимусе под влиянием АП установлено (табл. 5), что в дозах 0,1 и 0,3 ЛД₅₀ атропин и метацин через 1

Таблица 5

**Влияние острого отравления АП на содержание
Т-лимфоцитов ($\times 10^9$) в тимусе через 1 сут ($M \pm m$)**

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	1,32 $\pm$ 0,10	
0,1	1,25 $\pm$ 0,15	1,15 $\pm$ 0,12
0,3	1,21 $\pm$ 0,14	1,28 $\pm$ 0,13
0,5	1,81 $\pm$ 0,16*	1,73 $\pm$ 0,11*

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

сут после введения практически не влияют на содержание клеток в этом органе системы иммунитета. Статистически достоверное увеличение показателя ($p < 0,05$) происходило при дозе 0,5 ЛД₅₀ атропина и метацина соответственно на 37,1 и 31,1%. Существенных отличий показателя при сравнении действия атропина и метацина в эквивалентных дозах выявлено не было.

Несколько иная закономерность выявлена при оценке изменения числа лимфоцитов в селезенке через 2 сут (табл. 6).

Таблица 6

**Влияние острого отравления АП на содержание
Т-лимфоцитов ($\times 10^9$) в тимусе через 2 сут ($M \pm m$)**

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	1,26 $\pm$ 0,12	
0,1	1,12 $\pm$ 0,14	1,27 $\pm$ 0,13
0,3	1,37 $\pm$ 0,17	1,15 $\pm$ 0,14
0,5	0,83 $\pm$ 0,11*	0,90 $\pm$ 0,08*

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

При дозе АП 0,5 ЛД₅₀ отмечалось, не увеличение числа Т-клеток в тимусе, а их снижение при действии атропина и метацина соответственно на 34,1 и 28,6% ($p < 0,05$). Статистически значимых отличий показателя при сравнении действия атропина и метацина в эквивалентных дозах выявлено не было.

Через 3 сут влияние АП на содержание Т-лимфоцитов в тимусе выявлено не было (табл. 7).

Содержания Т-лимфоцитов в тимусе снижают механическая травма [Александров В.Н., 1983] и другие стрессорные воздействия, приводящие к увеличению концентрации кортикостероидов в плазме крови [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б]. Такой же эффект оказывает ацетилхолин (стимуляция м-холинорецепторов тимоцитов), вызывая выход зрелых Т-клеток из тимуса

Таблица 7

**Влияние острого отравления АП на содержание
Т-лимфоцитов ($\times 10^9$) в тимусе через 3 сут ($M \pm m$)**

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	1,22 $\pm$ 0,11	
0,3	1,25 $\pm$ 0,13	1,19 $\pm$ 0,15
0,5	1,30 $\pm$ 0,14	1,23 $\pm$ 0,16

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс.

[Maslinski W. et al., 1987]. Доза АП, составляющая 0,5 ЛД₅₀, блокируя м-холинорецепторы, приводит к накоплению тимоцитов в вилочковой железе. Снижение Т-клеток в тимусе при максимальной из исследованных доз АП через 2 сут, возможно, обусловлено реализацией апоптоза (запрограммированной гибели клеток) тимоцитов [Хаитов Р.М и соавт., 2000].

Таким образом, под влиянием АП в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут содержание лимфоцитов в тимусе увеличивается, а через 2 сут – уменьшается, восстанавливаясь до контрольного уровня через 3 сут. Статистически значимые отличия показателя при сравнении действия атропина и метацина в эквивалентных дозах отсутствуют.

3.3. Изучение функционального состояния селезенки

3.3.1. Оценка лимфоидного индекса

Под влиянием атропина и метацина в дозах 0,1; 0,2 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут ЛИ селезенки существенно не изменялся (табл. 8). Через 2 сут изменений данного параметра также зарегистрировано не было (табл.8). Обращает на

Таблица 8

Влияние острого отравления атропином и метацином на лимфоидный индекс (усл. ед.) селезенки белых крыс через 1 сут (M±m)

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	4,38±0,37	
0,1	4,78±0,35	4,86±0,37
0,3	5,12±0,32	4,90±0,33
0,5	4,36±0,31	5,08±0,39

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс.

Таблица 9

**Влияние острого отравления атропином и метацином на
лимфоидный индекс (усл. ед.) селезенки белых крыс через 2 сут ($M \pm m$)**

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	4,43 $\pm$ 0,38	
0,3	4,67 $\pm$ 0,33	4,95 $\pm$ 0,35
0,5	5,21 $\pm$ 0,37	5,17 $\pm$ 0,38

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс.

себя внимание незначительное увеличение ЛИ селезенки через 2 сут после действия АП в дозах, составляющих 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ ($p > 0,05$).

Таким образом, острая интоксикация АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ лимфоидный индекс селезенки существенно не изменяет.

3.3.2. Определение числа лимфоцитов в селезенке

При исследовании числа лимфоцитов в селезенке под влиянием АП установлено (табл. 10), что в дозах 0,1 и 0,3 ЛД₅₀ атропин и метацин через 1 сут после введения практически не влияют на содержание клеток в этом органе системы иммунитета. Статистически достоверное уменьшение показателя ($p < 0,05$) происходило при дозе 0,5 ЛД₅₀ атропина и метацина соответственно в 26,3 и 24,6%.

Таблица 10

**Влияние острого отравления АП на содержание
лимфоцитов ($\times 10^8$) в селезенке через 1 сут ($M \pm m$)**

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	3,65 $\pm$ 0,30	
0,1	3,25 $\pm$ 0,32	3,38 $\pm$ 0,31
0,3	3,99 $\pm$ 0,34	3,87 $\pm$ 0,35
0,5	2,69 $\pm$ 0,28*	2,75 $\pm$ 0,29*

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Через 2 сут (табл. 11) содержание лимфоцитов в селезенке при действии

Таблица 11

**Влияние острого отравления АП на содержание
лимфоцитов ($\times 10^8$) в селезенке через 2 сут ($M \pm m$)**

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	3,34 $\pm$ 0,31	
0,1	3,61 $\pm$ 0,30	3,43 $\pm$ 0,27
0,3	3,87 $\pm$ 0,33	3,76 $\pm$ 0,29
0,5	4,20 $\pm$ 0,34*	4,32 $\pm$ 0,35*

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

АП в дозах 0,1 и 0,3 ЛД₅₀ статистически значимо не изменялось, а дозе 0,5 ЛД₅₀ атропин и метацин увеличивали показатель соответственно в 1,26 и 1,29 раза ($p < 0,05$).

Через 3 сут под влиянием АП в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ (табл. 12) существенных различий в содержании лимфоцитов в селезенке по сравнению с контролем не выявлено.

Таким образом, под влиянием АП в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут содержание лимфоцитов в селезенке уменьшается, а через 2 сут — увеличивается,

Таблица 12

**Влияние острого отравления АП на содержание
лимфоцитов ($\times 10^8$) в селезенке через 3 сут ($M \pm m$)**

Доза, ЛД ₅₀	Атропин	Метацин
Контроль	3,01 $\pm$ 0,28	
0,1	3,05 $\pm$ 0,31	3,11 $\pm$ 0,29
0,3	2,98 $\pm$ 0,36	3,23 $\pm$ 0,34
0,5	3,22 $\pm$ 0,33	2,95 $\pm$ 0,28

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 6 крыс.

восстанавливаясь до контрольного уровня через 3 сут. Статистически значимых отличий показателя при сравнении действия атропина и метацина

в эквивалентных дозах выявлено не было (отмечается более выраженный эффект атропина при максимальной дозе).

Снижение лимфоцитов в селезенке при действии АП через 1 сут можно объяснить уменьшением их поступления из тимуса в кровь (и в последующем в селезенку) вследствие блокирования м-холинореактивных структур вилочковой железы [Maslinski W. et al., 1987] Через 2 сут после снижения миграции лимфоцитов из тимуса происходит ее компенсаторное увеличение под влиянием восстановленной холинергической иннервации тимуса.

3.4. Действие атропиноподобных веществ на содержание лимфоцитов в лимфатических узлах и костном мозге

Установлено (табл.13), что при действии атропина и метацина при

Таблица 13

Влияние острого отравления АП на число лимфоцитов в костном мозге и лимфатических узлах у белых крыс через 1 сут ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Органы системы иммунитета			
	Костный мозг ($\times 10^6$)		Лимфоузлы ($\times 10^8$)	
	Атропин	Метацин	Атропин	Метацин
Контроль	38,45 $\pm$ 2,63		0,14 $\pm$ 0,02	
0,1	36,76 $\pm$ 3,24	39,55 $\pm$ 3,08	0,12 $\pm$ 0,02	0,13 $\pm$ 0,02
0,3	43,65 $\pm$ 3,19	42,36 $\pm$ 3,41	0,10 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,02
0,5	47,72 $\pm$ 3,23*	45,08 $\pm$ 3,51**	0,08 $\pm$ 0,03**	0,09 $\pm$ 0,03**

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 10 крыс; *, ** - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$, (*; ** - для расчета достоверности различий использовали соответственно t – критерий Стьюдента и непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна- Уитни).

дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут после введения АП отмечается прямо связанное с дозой увеличение лимфоцитов в костном мозге и снижение этих клеток в лимфоузлах.

В дозе 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ атропин повышал содержание лимфоцитов в КМ соответственно в 1,14 ($p>0,05$) и 1,24 раза ($p<0,05$), в этих же дозах метацин увеличивал число лимфоцитов в костном мозге соответственно в 1,10 ($p>0,05$) и 1,17 раза ($p<0,05$).

В лимфоузлах атропин и метацин в дозе 0,3 ЛД₅₀ уменьшали количество лимфоцитов в 1,40 и 1,27 раза ($p>0,05$) соответственно, а в дозе 0,5 ЛД₅₀ снижали их число соответственно в 1,75 и 1,56 раза ($p<0,05$).

В дозе 0,1 ЛД₅₀ АП статистически значимого влияния на содержание лимфоцитов в КМ и лимфоузлах не оказывали.

Существенных различий между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах на содержание лимфоцитов в КМ и лимфоузлах не выявлено, хотя следует отметить, что в целом эффекты атропина незначительно превышают влияние метацина на миграцию лимфоцитов из органов системы иммунитета.

На основании данных литературы можно предположить, что через 1 сут после действия АП в высоких дозах блокируются м-холинореактивные структуры КМ, что приводит к снижению выхода из него в циркулирующую кровь лимфоцитов [Дешевой Ю. Б., 1983, 1984, 1985]. Уменьшение активности парасимпатического отдела вегетативной нервной системы вызывает повышение тонуса ее симпатического отдела, приводящее к увеличению лимфоцитов в костном мозге [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б]. Снижение выхода из тимуса и костного мозга лимфоцитов приводит к уменьшению их содержания в лимфоузлах [Петров Р.В. и соавт., 1972, 1981а, 1981б].

Через 2 сут АП в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ вызывают прямо связанное с дозой снижение лимфоцитов в костном мозге и увеличение их содержания в лимфоузлах (табл. 14).

Так, в дозе 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ атропин уменьшал содержание лимфоцитов в КМ соответственно в 1,16 ($p>0,05$) и 1,24 раза ($p<0,05$). В этих же дозах

метацин приводил к редукции числа лимфоцитов в костном мозге соответственно в 1,18 ($p>0,05$) и 1,28 раза ($p<0,05$).

Таблица 14

Влияние острого отравления АП на число лимфоцитов в костном мозге и лимфатических узлах у белых крыс через 2 сут ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Органы системы иммунитета			
	Костный мозг ($\times 10^6$)		Лимфоузлы ($\times 10^8$)	
	Атропин	Метацин	Атропин	Метацин
Контроль	38,45 $\pm$ 2,63		0,14 $\pm$ 0,02	
0,1	36,76 $\pm$ 3,24	35,44 $\pm$ 3,43	0,14 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,02
0,3	33,14 $\pm$ 3,05	32,51 $\pm$ 3,30	0,15 $\pm$ 0,02	0,17 $\pm$ 0,02
0,5	31,06 $\pm$ 3,07**	30,10 $\pm$ 3,20**	0,20 $\pm$ 0,03**	0,19 $\pm$ 0,03**

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 10 крыс.; * - различие с контролем достоверно - $p<0,05$, (для расчета достоверности различий использовали непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна- Уитни).

В лимфоузлах атропин и метацин в дозе 0,3 ЛД₅₀ через 2 сут увеличивали количество лимфоцитов в 1,33 и 1,31 раза ($p>0,05$) соответственно, а в дозе 0,5 ЛД₅₀ повышали их число соответственно в 1,43 и 1,36 раза ($p<0,05$). В дозе 0,1 ЛД₅₀ АП статистически значимого влияния на содержание лимфоцитов в КМ и лимфоузлах не оказывали.

Существенных различий между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах на содержание лимфоцитов в КМ и лимфоузлах не отмечалось, хотя следует отметить более выраженный эффект атропина.

Снижение числа лимфоцитов в КМ и увеличение их в селезенке через 2 сут после острого отравления АП связано с, так называемым, «синдромом отдачи», когда прекращение блокирования системы или ее стимуляции приводит к противоположному эффекту вследствие активации механизмов обратной связи регуляции системы [Судаков К.В., 1983]. Устранение блокирования рецепторов КМ и лимфоузлов приводит к их последующей активации. Проведенные нами опыты показали, что после прекращения

действия атропина эффекты, связанные с действием ацетилхолина в синапсах нервных окончаний холинергической системы, иннервирующей данные лимфоидные органы, временно усиливаются.

Через 3 сут после действия атропина и метацина содержание лимфоцитов в КМ и лимфоузлах восстанавливалось до контрольного уровня (табл. 15).

Таблица 15

Влияние острого отравления АП на число лимфоцитов в костном мозге и лимфатических узлах у белых крыс через 3 сут ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Органы системы иммунитета			
	Костный мозг ($\times 10^6$)		Лимфоузлы ($\times 10^8$)	
	Атропин	Метацин	Атропин	Метацин
Контроль	38,45 $\pm$ 2,63		0,14 $\pm$ 0,02	
0,1	37,56 $\pm$ 3,23	41,94 $\pm$ 3,12	0,13 $\pm$ 0,02	0,12 $\pm$ 0,02
0,3	40,72 $\pm$ 3,09	42,09 $\pm$ 3,43	0,14 $\pm$ 0,03	0,13 $\pm$ 0,03
0,5	39,98 $\pm$ 3,56	37,13 $\pm$ 3,03	0,11 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,03

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 10 крыс.

Таким образом, при действии (остром отравлении) АП в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут отмечается прямо связанное с дозой увеличение количества лимфоцитов в костном мозге и снижение содержания этих клеток в лимфоузлах, а через 2 сут реализуются противоположные эффекты. Через 3 сут содержание лимфоцитов в КМ и лимфоузлах восстанавливается до контрольного уровня. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах на содержание лимфоцитов в КМ и лимфоузлах отсутствуют (отмечается более выраженный эффект атропина).

Резюме

В ходе проведенных нами исследований установлено, что под влиянием острой интоксикации АП дозах 0,1; 0,3 и 0,5 LD₅₀ происходит дозозависимое снижение числа КОЕс, что обусловлено блокадой м-холинореактивных структур костного мозга..

Снижение миграции КОЕс вследствие блокирования м-холинорецепторов СКК (или м-холинореактивных структур КМ) после острой интоксикации АП объясняется устранением регулирующей функции ацетилхолина. Эта функция заключается в том, что данный медиатор при активации парасимпатического отдела вегетативной нервной системы, по-видимому, действует на м-холинорецепторы КОЕс, что приводит к увеличению их миграции из костного мозга [Забродский П. Ф., 1993]. Многочисленные данные литературы косвенно подтверждают это предположение [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б; Дешевой Ю. Б., 1983, 1984, 1985; Kutty K. M., 1976; Maslinski W. et al., 1983; 1985, 1986, 1987, 1989, 1990, 1992; Беликов В.Г., 2001]. После облучения мышей в летальной дозе из экранированного участка КМ под влиянием ацетилхолина мигрируют КОЕ в селезенку для обеспечения экстрамедуллярного кроветворения путем образования пяти типов колоний - миелоидных, мегакариоцитарных, эритроидных, недифференцированных и смешанных [Петров Р.В. и соавт., 1981а]. АП блокируют этот процесс.

Острая интоксикация АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ лимфоидный индекс тимуса существенно не изменяет. Однако, при дозе АП 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут отмечалась тенденция к увеличению показателя, а через 2 сут - к уменьшению.

АП в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут содержание лимфоцитов в тимусе увеличивают, а через 2 сут - уменьшают. Показатель восстанавливается до

контрольного уровня через 3 сут. Статистически значимые отличия показателя при сравнении действия атропина и метацина в эквивалентных дозах отсутствуют.

Под влиянием атропина и метацина в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут содержание лимфоцитов в селезенке увеличивается, а через 2 сут – уменьшается, восстанавливаясь до контрольного уровня через 3 сут. Статистически значимых отличий показателя при сравнении действия атропина и метацина в эквивалентных дозах выявлено не было.

На изменение содержания Т-лимфоцитов в тимусе влияют стрессорные воздействия [Александров В.Н., 1983], сопровождающиеся увеличением содержания кортикостерона в крови [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б] и действие ацетилхолина на м-холинорецепторы тимоцитов, что при дозе АП, составляющей 0,5 ЛД₅₀, вероятно, обусловлено блокированием м-холиностимулирующих эффектов ацетилхолина, который служит сигналом для выхода из вилочковой железы зрелых тимоцитов [Maslinski W. et al., 1987]. Противоположный эффект при максимальной из исследованных доз АП через 2 сут, возможно, обусловлен реализацией апоптоза (запрограммированной гибели клеток) тимоцитов. Это свидетельствует о том, что АП не влияют на позитивную или негативную селекцию тимоцитов и не реализуют индуцированную активацией смерть лимфоцитов [Хаитов Р.М и соавт., 2000] в дозах 0,1; 0,2 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут после воздействия. По-видимому, данными эффектами обусловлено снижение Т-лимфоцитов в тимусе через 2 сут при дозе АП, составляющей 0,5 ЛД₅₀. Не исключено, что уменьшение лимфоцитов в тимусе при действии АП в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 2 сут является проявлением обычной физиологической компенсаторной реакцией, направленной на восполнение числа Т-клеток в лимфоидных органах после их накопления в тимусе вследствие блокады м-холинореактивных структур.

После острого отравления АП в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут содержание лимфоцитов в селезенке уменьшается, а через 2 сут – увеличивается, восстанавливаясь до контрольного уровня через 3 сут. Статистически значимые отличия показателя при сравнении действия атропина и метацина в эквивалентных дозах отсутствуют.

Снижение лимфоцитов в селезенке при действии АП через 1 сут можно объяснить уменьшением их поступлением в кровь и в последующем в селезенку из тимуса вследствие блокирования м-холинореактивных структур тимуса [Maslinski W. et al., 1987]. Через 2 сут после снижения миграции лимфоцитов из тимуса происходит ее компенсаторное увеличение под влиянием восстановленной холинергической иннервации тимуса. К этому времени у крыс холинолитическое действие атропина заканчивается, учитывая то обстоятельство, что период полувыведения его у человека составляет 15 ч [Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н., 1991]. Закономерно содержание лимфоцитов в селезенке увеличивается. Следует отметить, что в организме, вероятно, происходят более сложные процессы, определяющие соотношение клеток в тимусе и селезенке. В частности, содержание лимфоцитов в селезенке зависит от функционального состояния α -адренорецепторных структур этого органа [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б]. Поэтому предложенное нами объяснение является безусловно неполным и в определенной степени механистичным. Следует отметить, что в селезенке холинергическая иннервация отсутствует, за исключением м-холинорецепторов, локализованных на пресинаптических мембранах α -адренергических нервных окончаний [Rinner I, Schauenstein K., 1991].

Не исключено, что снижение через 2 сут Т-клеток в тимусе обусловлено не только процессами миграции, но и апоптозом тимоцитов вследствие эффекта катехоламинов, так как блокада м-холинорецепторов тимуса может привести к усилению действия катехоламинов на адренергические

рецепторы тимоцитов, увеличивая их запрограммированную гибель (апоптоз) [Durant S., 1986].

При остром отравлении АП в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут отмечается прямо связанное с дозой увеличение лимфоцитов в костном мозге и снижение этих клеток в лимфатических лимфоузлах, а через 2 сут реализуются противоположные эффекты. Через 3 сут содержание лимфоцитов в КМ и лимфоузлах восстанавливается до контрольного уровня. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах на содержание лимфоцитов в КМ и лимфоузлах отсутствуют, хотя следует отметить, что в целом эффекты атропина незначительно превышают влияние метацина на миграцию лимфоцитов из органов системы иммунитета.

Выявленные факты и описанное в настоящее время действие холинотропных препаратов (ХТП) на лимфоидные органы позволяют полагать, что через 1 сут после действия АП в высоких дозах реализуются следующие механизмы: блокируются м-холинореактивные структуры КМ, что приводит к снижению выхода из него в циркулирующую кровь лимфоцитов [Дешевой Ю. Б., 1983, 1984, 1985; Забродский П. Ф., 1993], редукция активности холинергической системы вызывает повышение тонуса адренергической системы, что ведет к увеличению числа лимфоцитов в КМ вследствие стимуляции β -адренергических структур [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б]. Нельзя исключить роли в реализации данного механизма стимуляции большими дозами АП н-холинорецепторов симпатических ганглиев, что обуславливает активацию периферических адренергических рецепторов [Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н., 1991]. Снижение выхода лимфоцитов из КМ и тимуса приводит к уменьшению их числа в лимфоузлах [Петров Р.В. и соавт., 1972, 1981а, 1981б; Петров Р.В, 1987; Хаитов Р.М. и соавт., 2000].

Снижение числа лимфоцитов в КМ и увеличение их в селезенке через 2 сут связано с, так называемым, «синдромом отдачи», когда прекращение блокирования системы или ее стимуляции приводит к противоположному эффекту вследствие активации механизмов обратной связи регуляции системы [Судаков К.В., 1983]. Устранение блокирования рецепторов приводит к их последующей активации. В рассматриваемом нами случае после прекращения действия атропина эффекты ацетилхолина временно усиливаются.

Таким образом, АП (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) вызывают дозозависимое снижение числа КОЕс, что обусловлено блокадой м-холинореактивных структур костного мозга. При отравлении АП в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут происходит прямо связанное с дозой увеличение лимфоцитов в тимусе и костном мозге и снижение этих клеток в селезенке и лимфатических лимфоузлах, а через 2 сут реализуются противоположные эффекты. Через 3 сут содержание лимфоцитов в лимфоидных органах восстанавливается до контрольного значения. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах на содержание лимфоцитов в тимусе, селезенке, КМ, и лимфоузлах отсутствуют, хотя в целом эффекты атропина незначительно превышают влияние метацина на перераспределение лимфоцитов в органах системы иммунитета. Это можно объяснить наличием у метацина слабо выраженного н-холиноблокирующего эффекта, который может, приводя к активации адренергической системы (действие на н-холинорецепторы симпатических ганглиев и надпочечников), снижать эффекты обусловленные возбуждением м-холинореактивных структур.

ГЛАВА 4

ДЕЙСТВИЕ М –ХОЛИНОБЛОКАТОРОВ АТРОПИНА И МЕТАЦИНА НА ОСНОВНЫЕ ГУМОРАЛЬНЫЕ ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ

4.1. Изучение влияния атропиноподобных препаратов на тимусзависимую гуморальную иммунную реакцию в индуктивной и продуктивной фазах иммунного ответа

4.1.1. Исследование воздействия атропина и метацина на антителообразование к тимусзависимому антигену в динамике по титру антител в крови

4.1.1.1. Действие АП в индуктивную фазу гуморального иммунного ответа

В опытах на белых крысах оценивали действие острого отравления АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ на гуморальный иммунный ответ к тимусзависимому антигену эритроцитам барана (ЭБ) по титру антител через 5, 8 и 11 сут при иммунизации ЭБ, проводившейся одновременно с введением АП. Через 5 сут после введения ЭБ отмечается пик иммунного ответа, связанный с синтезом IgM, а через 8 и 13 сут титр антител отражает синтез преимущественно IgG, и в меньшей степени IgM [Петров Р.В. и соавт., 1981]. Учитывая то обстоятельство, что Th1-лимфоциты участвуют в синтезе Ig M, G₂, а Th2-лимфоциты способствуют синтезу Ig G₁, A, E [Pfeifer C. et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993], использованный тест дает представление о функциональной активности как Th1, так и Th2-лимфоцитов.

Проведенные нами эксперименты показали (табл. 16), что после острой интоксикации АП отрицательный двоичный логарифм титра антител (ОДЛТА) к эритроцитам барана (ЭБ) в периферической крови через 5 сут при дозе атропина, составляющей 0,1 ЛД₅₀, практически не изменялся ($p>0,05$).

Дозы атропина, составляющие 0,3 и 0,5 ЛД₅₀, вызывали прямо связанное с дозой снижение ОДЛТА соответственно в 1,25 и 1,35 раза ($p < 0,05$).

Таблица 16

Изменение титра антител у крыс к ЭБ ($-\log_2$ титра) при остром отравлении атропином в индуктивную фазу антителогенеза ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут		
	5	8	11
Контроль	5,25 $\pm$ 0,26	4,13 $\pm$ 0,22	3,33 $\pm$ 0,24
0,1	5,05 $\pm$ 0,27	4,02 $\pm$ 0,27	3,29 $\pm$ 0,28
0,3	4,21 $\pm$ 0,32*	3,76 $\pm$ 0,29	3,02 $\pm$ 0,35
0,5	3,89 $\pm$ 0,28*	3,34 $\pm$ 0,30*	3,15 $\pm$ 0,34

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Метацин в дозе 0,1 ЛД₅₀ практически не влиял на антителопродукцию, а в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 5 сут после введения вызывал уменьшение ОДЛТА соответственно в 1,21 и 1,33 раза ($p < 0,05$) [табл. 17].

Таблица 17

Изменение титра антител у крыс к ЭБ ($-\log_2$ титра) при остром отравлении метацином в индуктивную фазу антителогенеза ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут		
	5	8	11
Контроль	5,25 $\pm$ 0,26	4,13 $\pm$ 0,22	3,33 $\pm$ 0,24
0,1	5,23 $\pm$ 0,28	4,12 $\pm$ 0,23	3,32 $\pm$ 0,23
0,3	4,32 $\pm$ 0,34*	3,83 $\pm$ 0,31	3,21 $\pm$ 0,30
0,5	3,95 $\pm$ 0,29*	3,55 $\pm$ 0,32	3,37 $\pm$ 0,35

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Через 8 сут ОДЛТА под влиянием атропина в дозе 0,5 ЛД₅₀ оставался сниженным по сравнению с контролем в 1,22 раза ($p < 0,05$), а после острой интоксикации метацином в эквивалентной дозе отмечалась тенденция к редукции исследованного параметра, который уменьшался в 1,16 раза.

Снижение титра антител к ЭБ в контроле с 5 по 11 сут связано с особенностями формирования гуморального иммунного ответа к данному антигену у грызунов: максимальный синтез антител отмечается через 5 сут с последующим снижением к 8-11 сут после иммунизации [Петров Р.В. и соавт., 1981].

Статистически значимых отличий от контрольных значений при действии АП через 11 сут на титр антител к ЭБ не выявлено.

Эффект атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо при сравнении изменения соответствующих показателей с использованием t-критерия Стьюдента не отличается, хотя в целом эффект метацина выражен в меньшей степени, чем атропина.

Таким образом, острая интоксикация атропином и метацином в пределах доз от 0,3 до 0,5 ЛД₅₀ вызывала дозозависимое снижение ОДЛТА к ЭБ в индуктивной фазе антителогенеза. При действии атропина супрессия антителообразования сохранялась до 8 сут. Через 11 сут снижение ОДЛТА под влиянием АП отсутствовало, что свидетельствует о восстановлении антителообразования. Действие атропина по сравнению с метацином в целом проявлялось в большей степени.

4.1.1.2. Действие АП в продуктивную фазу гуморального иммунного ответа

В экспериментах на белых крысах титр антител к ЭБ определяли через 5, 8 и 11 сут при введении АП через 3 сут после иммунизации. Установлено (табл.18), что под влиянием атропина отмечалось дозозависимое снижение ОДЛТА к ЭБ через 5 и 8 сут после иммунизации. Так, через 5 сут ОДЛТА

при дозах атропина 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ снижался соответственно 1,32 и 1,43 раза ($p < 0,05$). При дозе атропина, составляющей 0,1 ЛД₅₀, отмечалась тенденция к редукции показателя в 1,15. Через 8 сут ОДЛТА уменьшался при дозах атропина 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ в 1,25 и 1,32 раза ($p < 0,05$) соответственно. При дозе атропина, составляющей 0,1 ЛД₅₀, отмечалась тенденция к супрессии

Таблица 18

Изменение титра антител у крыс к ЭБ ($-\log_2$ титра) при остром отравлении атропином в продуктивную фазу антителогенеза ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут		
	5	8	11
Контроль	5,25 $\pm$ 0,26	4,13 $\pm$ 0,22	3,33 $\pm$ 0,24
0,1	4,57 $\pm$ 0,29	3,75 $\pm$ 0,24	3,18 $\pm$ 0,23
0,3	3,95 $\pm$ 0,30*	3,31 $\pm$ 0,25*	2,98 $\pm$ 0,36
0,5	3,67 $\pm$ 0,29*	3,12 $\pm$ 0,23*	3,03 $\pm$ 0,31

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

параметра в 1,10 раза. Через 11 сут антителообразование в контроле и опытных группах при различных дозах атропина существенно не отличается.

Под влиянием метацина в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 5 сут ОДЛТА снижалась соответственно в 1,29 и 1,37 ($p < 0,05$). При дозе метацина, составляющей 0,1 ЛД₅₀, отмечалась тенденция к снижению параметра в 1,13 раза. Через 8 сут ОДЛТА статистически значимо уменьшалась при дозе метацина, равной 0,5 ЛД₅₀, в 1,29 ($p < 0,05$). При дозах метацина, составляющих 0,1 и 0,3 ЛД₅₀, отмечалась тенденция к супрессии параметра в 1,12 и 1,21 раза соответственно (табл 18). Через 11 сут антителообразование после острого отравления метацином восстанавливается.

Приведенные результаты исследований позволяют считать, что под влиянием АП в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом происходит более выраженная редукция функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих синтез IgM, а также в меньшей степени Th2-лимфоцитов [Pfeifer C. et al., 1991], участвующих в синтезе IgG, плазмочитами селезенки.

Таблица 19

Изменение титра антител у крыс к ЭБ ($-\log_2$ титра) при остром отравлении метацином в продуктивную фазу антителогенеза ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут		
	5	8	11
Контроль	5,25± 0,26	4,13± 0,22	3,33± 0,24
0,1	4,65±0,27	3,70± 0,25	3,28± 0,25
0,3	4,06± 0,32*	3,42± 0,27	3,17± 0,33
0,5	3,84± 0,30*	3,20± 0,24*	3,21± 0,35

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Эффект атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо при сравнении изменения соответствующих показателей с использованием t-критерия Стьюдента не отличается, хотя в целом эффект метацина выражен в меньшей степени, чем атропина.

Таким образом, острая интоксикация атропином и метацином в дозах 0,1; 0,3 до 0,5 ЛД₅₀ вызывала дозозависимое снижение ОДЛТА к ЭБ в продуктивной фазе антителогенеза (через 5 и 8 сут после иммунизации. Через 11 сут снижение ОДЛТА под влиянием АП практически отсутствовало. Атропин в эквивалентных дозах вызывал несущественную более выраженную редукцию антителопродукции.

4.1.2. Оценка действия острого отравления м-холиноблокаторами на число антителообразующих клеток в селезенке

При исследовании содержания антителообразующих клеток (АОК) в селезенке к ЭБ у крыс Вистар после острой интоксикации АП через 5 сут после иммунизации было установлено (табл. 20), что при введении атропина

Таблица 20

Влияние острого отравления атропином на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана ($\times 10^3$), синтезирующих Ig M, в селезенке крыс Вистар через 5 сут после иммунизации ЭБ ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время интоксикации по отношению к иммунизации, сут		
	0	1	3
Контроль	35,7 $\pm$ 3,1		
0,1	28,5 $\pm$ 3,3	26,7 $\pm$ 3,2	25,9 $\pm$ 3,4*
0,3	25,6 $\pm$ 3,1*	21,0 $\pm$ 2,7*	18,1 $\pm$ 2,9*
0,5	21,7 $\pm$ 2,8*	18,9 $\pm$ 2,8*	14,7 $\pm$ 2,6*

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ одновременно с ЭБ происходит дозозависимое уменьшение числа АОК в 1,25 ($p > 0,05$), 1,39 и 1,64 раза ($p < 0,05$) соответственно. При введении атропина в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут после иммунизации число АОК к ЭБ в селезенке крыс Вистар снижалось соответственно в 1,33 ($p > 0,05$), 1,70 и 1,89 раза ($p < 0,05$), а через 3 сут - соответственно в 1,38, 1,97 и 2,43 раза ($p < 0,05$).

При остром отравлении метацином в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ одновременно с иммунизацией происходила супрессия синтеза IgM, оцениваемых по числу АОК в селезенке крыс, соответственно в 1,35 и 1,52 раза ($p < 0,05$). При дозе

метацина, составляющей 0,1 ЛД₅₀, отмечалась тенденция к снижению параметра в 1,22 раза (табл. 21). При введении метацина в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут после иммунизации число АОК к ЭБ в селезенке крыс Вистар снижалось соответственно в 1,47 и 1,78 раза ($p<0,05$). При введении АП через 3 сут после иммунизации отмечалась редукция показателя соответственно в 1,36, 1,78 и 2,12 раза ($p<0,05$). При дозе метацина, составляющей 0,1 ЛД₅₀, отмечалась тенденция к снижению АОК в селезенке крыс в 1,28 раза.

Таблица 21

**Влияние острого отравления метацином на число
антителообразующих клеток к эритроцитам барана ($\times 10^3$),
синтезирующих Ig M, в селезенке крыс Вистар через 5 сут после
иммунизации ЭБ (M $\pm$ m)**

Доза, ЛД ₅₀	Время интоксикации по отношению к иммунизации, сут		
	0	1	3
Контроль	35,7 $\pm$ 3,1		
0,1	29,1 $\pm$ 2,8	28,9 $\pm$ 3,3	26,1 $\pm$ 3,2*
0,3	26,4 $\pm$ 2,4*	23,2 $\pm$ 2,9*	20,0 $\pm$ 2,5*
0,5	23,5 $\pm$ 2,9*	19,1 $\pm$ 2,7*	17,8 $\pm$ 2,7*

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p<0,05$.

Полученные нами результаты исследований свидетельствует о снижении под влиянием АП функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих синтез IgM [Pfeifer C. et al., 1991] плазмócитами селезенки, в большей степени в продуктивной фазе антителогенеза по сравнению с индуктивной.

Эффект атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо при сравнении изменения соответствующих показателей с использованием t-критерия Стьюдента не отличается, хотя в

целом эффект метацина выражен в меньшей степени, чем атропина. Так, при максимальной редукции антителообразования при дозе АП 0,5 ЛД₅₀ в продуктивной фазе иммуногенеза число АОК в селезенке крыс составляло при действии атропина и метацина соответственно $14,7 \pm 2,6$ и $17,8 \pm 2,7$ ($\times 10^3$) [$p > 0,05$].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации атропином и метацином (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) происходит дозозависимое снижение тимусзависимого антителообразования, оцениваемого по числу АОК к ЭБ в селезенке через 5 сут после иммунизации, преимущественно в продуктивную фазу антителогенеза (интоксикация проводилась через 3 сут после иммунизации). В целом эффект метацина выражен в меньшей степени, чем атропина.

4.1.3. Влияние атропиноподобных препаратов на кооперацию Т- и В-лимфоцитов *in vitro*

При изучении кооперации Т- и В-лимфоцитов мышей *in vitro* оценка функции этих популяций иммуноцитов в данной реакции осуществлялась по формированию АОК к ЭБ. Удельный вес Т- и В-клеток в обеспечении антителопродукции определяли путем сравнения числа АОК после инкубации той или иной популяции лимфоцитов в течение 1 ч с различными концентрациями АП.

В наших исследованиях показано (табл. 22), что атропин в концентрациях 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М уменьшает функцию В-клеток в кооперации с Т-лимфоцитами соответственно 1,14 ($p > 0,05$); 1,41 и 1,82 раза ($p < 0,05$), а функцию Т-клеток - в 1,32, 2,02 и 2,69 ($p < 0,05$) раза соответственно. Из данных, приведенных в табл. 21, следует, что атропин в большей степени снижает функцию Т-лимфоцитов ($p < 0,05$ при концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М).

Таблица 22

Нарушение кооперации Т- и В-лимфоцитов под влиянием атропина *in vitro* (по формированию АОК иммунocyтaми белых мышей на 10^6 В-клеток) [$M \pm m$]

Клетки	Контроль	Концентрация атропина, М		
		10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
В	47 ± 6	-	-	-
В+Т	312 ± 29	-	-	-
V^0+T		273 ± 27	$221 \pm 20^*$	$171 \pm 19^*$
$V+T^0$		$237 \pm 25^*$	$155 \pm 22^{**}$	$116 \pm 14^{**}$

Примечание: в каждой серии использовали клетки от 5-6 мышей. V^0 , T^0 - в течение 1 ч до добавления ЭБ клетки инкубировали с атропином, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем (В+Т); ** $p < 0,05$ по сравнению с V^0+T .

Аналогичное, но менее выраженное действие на кооперацию Т- и В-лимфоцитов оказывает метацин (табл. 23). Так, метацин в концентрациях 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М снижает функцию В-клеток в кооперации с Т-лимфоцитами соответственно 1,10 ($p > 0,05$); 1,33 и 1,67 раза ($p < 0,05$), а функцию Т-клеток - в 1,20 ($p > 0,05$); 1,91 и 2,44 ($p < 0,05$) раза соответственно. Полученные данные свидетельствуют, что метацин в большей степени снижает функцию Т-лимфоцитов ($p < 0,05$) при концентрациях 10^{-4} и 10^{-3} М.

Эффекты атропина и метацина в эквимолярных концентрациях отличались статистически не значимо. Так, действие атропина превышает влияние метацина на Т-лимфоциты в реализации эффекта кооперации Т- и В-клеток при концентрациях АП 10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М соответственно в 1,09; 1,05 и 1,10 раза, а на В-лимфоциты – соответственно в 1,03; 1,06 и 1,09 раза.

Таблица 23

Нарушение кооперации Т- и В-лимфоцитов под влиянием метацина in vitro (по формированию АОК иммуноцитами белых мышей на 10^6 В-клеток) [$M \pm m$]

Клетки	Контроль	Концентрация метацина, М		
		10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
В	47 ± 6	-	-	-
В+Т	312 ± 29	-	-	-
V^0+T		282 ± 28	$235 \pm 23^*$	$187 \pm 18^*$
$V+T^0$		260 ± 24	$163 \pm 24^{**}$	$128 \pm 17^{**}$

Примечание: в каждой серии использовали клетки от 5-6 мышей. V^0 , T^0 - в течение 1 ч до добавления ЭБ клетки инкубировали с метацином, * $p < 0,05$ по сравнению с контролем (В+Т); ** $p < 0,05$ по сравнению с V^0+T .

По-видимому, более выраженное действие АП на Т-клетки связано с наличием на поверхности этих лимфоцитов м-холинорецепторов в большем числе, чем на В-клетках. Это подтверждают исследования Н.М. Shapiro и Т.В. Strom (1980). Снижение кооперации Т- и В-лимфоцитов может быть обусловлено модуляцией АП антигенсвязывающих рецепторов на поверхности иммуноцитов. О возможности данного эффекта косвенно свидетельствует структурное сходство ацетилхолиновых рецепторов, на которые действуют АП, и антигенсвязывающих рецепторов В-лимфоцитов [Адо А.Д., 1995].

Таким образом, под влиянием АП in vitro происходит прямо связанное с концентрацией (10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М) снижение кооперации Т- и В-лимфоцитов, вследствие преимущественного нарушения функции Т-клеток. Эффекты атропина и метацина в эквимоллярных концентрациях отличались статистически не значимо, хотя в целом действие атропина на антителопродукцию в модели кооперации иммуноцитов было более выражено.

4.2. Исследование острого действия атропина и метацина на тимуснезависимый гуморальный иммунный ответ

4.2.1. Оценка воздействия атропиноподобных препаратов на антителопродукцию к тимуснезависимому антигену в динамике по титру антител в крови

4.2.1.1. Действие АП в индуктивную фазу гуморального иммунного ответа

В экспериментах на белых крысах оценивали действие острого отравления АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ на гуморальный иммунный ответ к тимуснезависимому Vi-Ag по титру антител через 5 и 8 сут при иммунизации ЭБ, проводившейся одновременно с введением АП. Через 5 сут синтезируются IgM, содержание которых оценивалось косвенно по титру антител к ЭБ. Через 8 сут титр антител отражает также синтез IgM, учитывая, что Т-независимый антиген индуцирует продукцию иммуноглобулинов именно данного класса [Фримель Х., Брок Й., 1986].

Полученные нами результаты исследований показали (табл. 24), что после острой интоксикации АП отрицательный двоичный логарифм титра антител (ОДЛТА) к Vi-Ag в периферической крови через 5 сут после иммунизации при дозах атропина, составляющих 0,1 и 0,3 ЛД₅₀, практически не изменялся ($p > 0,05$).

Доза атропина, составляющая 0,5 ЛД₅₀, вызывала снижение ОДЛТА соответственно в 1,24 раза ($p < 0,05$). Через 8 сут ОДЛТА по сравнению с контролем после интоксикации атропином практически не изменялся, что свидетельствует о восстановлении тимуснезависимого антителобразования.

Метацин в дозах 0,1 и 0,3 ЛД₅₀ существенно не влиял на антителопродукцию, а в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 5 сут после введения вызывал уменьшение ОДЛТА в 1,28 раза ($p < 0,05$). ОДЛТА через 8 сут после

Таблица 24

Изменение титра антител у крыс к Vi-Ag ($-\log_2$ титра) при остром отравлении атропином в индуктивную фазу антителогенеза ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут	
	5	8
Контроль	4,20 $\pm$ 0,25	3,75 $\pm$ 0,21
0,1	4,11 $\pm$ 0,26	3,64 $\pm$ 0,23
0,3	3,69 $\pm$ 0,30	3,53 $\pm$ 0,24
0,5	3,38 $\pm$ 0,29*	3,46 $\pm$ 0,20

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

интоксикации метацином статистически значимо по сравнению с контролем не изменялся, что свидетельствует о восстановлении тимуснезависимого антителобразования (табл. 25).

Таблица 25

Изменение титра антител у крыс к Vi-Ag ($-\log_2$ титра) при остром отравлении метацином в индуктивную фазу антителогенеза ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут	
	5	8
Контроль	4,20 $\pm$ 0,25	3,75 $\pm$ 0,21
0,1	3,87 $\pm$ 0,32	3,70 $\pm$ 0,22
0,3	3,55 $\pm$ 0,31	3,63 $\pm$ 0,23
0,5	3,27 $\pm$ 0,33*	3,60 $\pm$ 0,30

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Эффект атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически достоверно при сравнении изменения соответствующих

показателей с использованием t-критерия Стьюдента не отличается. Так, при максимальной редукции антителообразования при дозе АП 0,5 ЛД₅₀ через 5 сут после иммунизации ОДЛТА в крови крыс составил при действии атропина и метацина соответственно $3,38 \pm 0,29$ и $3,27 \pm 0,33$ ($p > 0,05$).

Таким образом, острая интоксикация атропином и метацином в дозе 0,5 ЛД₅₀ вызывала снижение ОДЛТА к Vi-Ag в индуктивной фазе антителогенеза. Через 8 сут снижение ОДЛТА под влиянием АП отсутствовало. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах отсутствовали.

4.2.1.2. Действие АП в продуктивную фазу гуморального иммунного ответа

В опытах на белых крысах определяли титр антител к тимуснезависимому Vi-Ag через 5 и 8 сут при введении АП через 3 сут после иммунизации. Установлено (табл. 26), что под влиянием атропина в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ отмечалось снижение ОДЛТА к Vi-Ag через 5 сут после иммунизации соответственно в 1,07 ($p > 0,05$), 1,25 и 1,32 раза ($p < 0,05$).

Таблица 26

Изменение титра антител у крыс к Vi-Ag ($-\log_2$ титра) при остром отравлении атропином в продуктивную фазу антителогенеза ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут	
	5	8
Контроль	$4,20 \pm 0,25$	$3,75 \pm 0,21$
0,1	$3,91 \pm 0,24$	$3,32 \pm 0,25$
0,3	$3,35 \pm 0,28^*$	$3,43 \pm 0,22$
0,5	$3,18 \pm 0,23^*$	$3,16 \pm 0,20$

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Через 8 сут после введения тимуснезависимого антигена статистически значимых различий антителообразования, оцениваемого по ОДЛТА, после острого отравления атропином по сравнению с контролем не выявлено, что свидетельствует о его восстановлении.

Метацин в дозе 0,1 ЛД₅₀ не практически не влиял на ОДЛТА к тимуснезависимому антигену, а в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ существенно снижал на антителопродукцию соответственно в 1,24 и 1,30 раза. Через 8 сут после иммунизации статистически значимых различий антителопродукции после острого отравления атропином по сравнению с контролем не выявлено (табл. 27).

Действие атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо при сравнении изменения соответствующих показателей с использованием t-критерия Стьюдента не отличается. Так, при максимальной редукции антителообразования при дозе АП 0,5 ЛД₅₀ через 5 сут после иммунизации ОДЛТА в крови крыс составил при действии атропина и метацина соответственно $3,18 \pm 0,23$ и $3,23 \pm 0,29$ ($p > 0,05$).

Таблица 27

Изменение титра антител у крыс к Vi-Ag ($-\log_2$ титра) при остром отравлении метацином в продуктивную фазу антителогенеза ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут	
	5	8
Контроль	$4,20 \pm 0,25$	$3,75 \pm 0,21$
0,1	$3,90 \pm 0,31$	$3,46 \pm 0,27$
0,3	$3,38 \pm 0,28^*$	$3,55 \pm 0,25$
0,5	$3,23 \pm 0,29^*$	$3,27 \pm 0,26$

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Таким образом, острая интоксикация атропином и метацином в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ вызывала дозозависимое снижение ОДЛТА к Vi-Ag в продуктивной фазе антителогенеза через 5 сут после иммунизации, проведенной за 3 сут до введения АП. Через 8 сут после иммунизации снижение ОДЛТА под влиянием АП отсутствовало. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах не выявлены.

4.2.2. Изучение действия острого отравления атропиноподобных препаратов на число антителообразующих клеток в селезенке к тимуснезависимому антигену

При оценке содержания антителообразующих клеток (АОК) в селезенке к Vi-Ag у крыс Вистар после острой интоксикации АП через 5 сут было установлено (табл. 29), что атропин в дозе 0,1 ЛД₅₀ не влиял на синтез

Таблица 29

Влияние острого отравления атропином на число антителообразующих клеток к Vi-Ag ($\times 10^3$), синтезирующих Ig M, в селезенке крыс Вистар через 5 сут после иммунизации ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время интоксикации по отношению к иммунизации, сут		
	0	1	3
Контроль	26,5 $\pm$ 2,5		
0,1	27,1 $\pm$ 3,0	24,6 $\pm$ 2,9	22,1 $\pm$ 2,3
0,3	23,3 $\pm$ 2,7	20,8 $\pm$ 2,8	19,0 $\pm$ 2,3*
0,5	18,5 $\pm$ 2,5*	17,0 $\pm$ 2,2*	15,8 $\pm$ 2,0*

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

антител. При его введении в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ одновременно с антигеном происходит дозозависимое уменьшение числа АОК в 1,14 ($p > 0,05$) и 1,40

раза ($p < 0,05$) соответственно. При остром отравлении атропином в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут после иммунизации число АОК к Vi-Ag в селезенке крыс Вистар снижалось соответственно в 1,08, 1,28 ($p > 0,05$) и 1,56 раза ($p < 0,05$), а через 3 сут - соответственно в 1,20, 1,39 ($p > 0,05$) и 1,68 раза ($p < 0,05$).

При остром действии метацина в дозах 0,1, 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ одновременно с иммунизацией статистически значимых изменений в антителообразовании к тимуснезависимому антигену не выявлено (при дозе 0,5 ЛД₅₀ отмечалось редукция параметра на 24,2%). При дозах, составляющих 0,3 и 0,5 ЛД₅₀, происходила супрессия синтеза IgM, оцениваемых по числу АОК в селезенке крыс через 1 сут после иммунизации, соответственно в 1,24 ($p > 0,05$) и 1,46 раза ($p < 0,05$) [табл. 30]. Через 3 сут после введения метацина в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ после иммунизации число АОК к Vi-Ag уменьшалось соответственно в 1,12 ($p > 0,05$), 1,31 и 1,51 раза ($p < 0,05$).

Таблица 30

Влияние острого отравления метацином на число антителообразующих клеток к Vi-Ag ($\times 10^3$), синтезирующих Ig M, в селезенке крыс Вистар через 5 сут после иммунизации ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время интоксикации по отношению к иммунизации, сут		
	0	1	3
Контроль	26,5 $\pm$ 2,5		
0,1	25,0 $\pm$ 3,4	25,7 $\pm$ 2,8	23,5 $\pm$ 2,2
0,3	24,6 $\pm$ 2,8	21,4 $\pm$ 2,6	20,2 $\pm$ 2,1*
0,5	20,1 $\pm$ 2,7	18,2 $\pm$ 2,3*	17,5 $\pm$ 1,9*

Примечание: в каждой серии использовалось от 5 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Эффект атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо при сравнении изменения соответствующих показателей с использованием t-критерия Стьюдента не отличается, хотя в

целом эффект метацина выражен в меньшей степени, чем атропина. Так, при максимальной редукции антителообразования при дозе АП 0,5 ЛД₅₀ в продуктивной фазе иммуногенеза число АОК в селезенке крыс составляло при действии атропина и метацина соответственно $15,8 \pm 2,0$ и $17,5 \pm 1,9$ ($\times 10^3$) [$p > 0,05$].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации атропином и метацином в дозах, составляющих 0,3 и 0,5 ЛД₅₀, происходит дозозависимое снижение тимуснезависимого антителообразования, оцениваемого по числу АОК к Vi-Ag в селезенке через 5 сут, преимущественно в продуктивную фазу антителогенеза (при интоксикации, проводившейся через 3 сут после иммунизации). Действие атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо не отличается, хотя в целом супрессирующий эффект метацина выражен в меньшей степени.

Резюме

Нами установлено, что острая интоксикация атропином и метацином в пределах доз от 0,3 до 0,5 ЛД₅₀ вызвала дозозависимое снижение ОДЛТА к ЭБ в индуктивной фазе антителиогенеза. При действии атропина супрессия антителиообразования сохранялась до 8 сут. Через 11 сут снижение ОДЛТА под влиянием АП отсутствовало, что свидетельствует о восстановлении антителиопродукции.

Острая интоксикация атропином и метацином в дозах 0,1; 0,3 до 0,5 ЛД₅₀ вызвала дозозависимое снижение ОДЛТА к ЭБ в продуктивной фазе антителиогенеза (через 5 и 8 сут после иммунизации). Через 11 сут снижение ОДЛТА под влиянием АП практически отсутствовало, что свидетельствует о восстановлении антителиообразования. Атропин в эквивалентных дозах вызывал несущественную более выраженную редукцию антителиопродукции. Сравнение редукции ОДЛТА в индуктивной и продуктивной фазах гуморального иммунного ответа свидетельствует о преимущественном действии АП в продуктивный период синтеза антител.

При острой интоксикации атропином и метацином (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) происходит дозозависимое снижение тимусзависимого антителиообразования, оцениваемого по числу АОК к ЭБ в селезенке через 5 сут, преимущественно в продуктивную фазу антителиогенеза (интоксикация проводилась через 3 сут после иммунизации). Действие атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо не отличается, хотя в целом эффект метацина выражен в меньшей степени, чем атропина.

Наши результаты исследований позволяют полагать, что под влиянием АП в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом происходит более выраженная редукция функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих синтез IgM, а также в меньшей степени Th2-

лимфоцитов [Pfeifer C. et al., 1991], участвующих в синтезе IgG, плазмочитами селезенки. Снижение функции Т-зависимого антителообразования, вероятно, связано с блокированием их м-холинорецепторов АП [MacManus J.P. et al., 1975; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Maslinski W. et al., 1992]

Уменьшение тимусзависимой антителопродукции под влиянием АП связано с нарушением кооперации Т- и В-лимфоцитов. Проведенные нами исследования показали, что, под влиянием АП *in vitro* происходит дозозависимое (10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М) снижение кооперации Т- и В-лимфоцитов, вследствие преимущественного нарушения функции Т-клеток. Эффекты атропина и метацина при эквимоллярных концентрациях отличались статистически не значимо, хотя в целом действие атропина на антителопродукцию в модели кооперации иммуноцитов было более выражено.

Данные литературы позволяют полагать, что более выраженное действие АП на Т-клетки связано с наличием на поверхности этих лимфоцитов м-холинорецепторов в большем числе, чем на В-клетках [Shapiro H.M. и Strom T.B., 1980]. Редукция кооперации Т- и В-лимфоцитов может быть обусловлено модуляцией АП антигенсвязывающих рецепторов на поверхности иммуноцитов. Реализация данного эффекта обусловлена структурным сходством ацетилхолиновых рецепторов, на которые действуют АП, и антигенсвязывающих рецепторов В-лимфоцитов [Адо А.Д., 1995].

Острое отравление атропином и метацином в дозе 0,5 ЛД₅₀ вызывало уменьшение ОДЛТА к Vi-Ag в индуктивной фазе антителогенеза. Через 8 сут снижение ОДЛТА под влиянием АП отсутствовало. Статистически значимые различия, оцениваемые с использованием t-критерия Стьюдента, между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах отсутствовали.

Острое действие атропина и метацина в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ вызывало дозозависимую редукцию ОДЛТА к Vi-Ag в продуктивной фазе антителогенеза через 5 сут после иммунизации, проведенной за 3 сут до введения АП. Через 8 сут после иммунизации снижение ОДЛТА под влиянием АП отсутствовало. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах не выявлены (использование t-критерия Стьюдента).

Под влиянием острой интоксикации атропином и метацином в дозах, составляющих 0,3 и 0,5 ЛД₅₀, происходит дозозависимое снижение тимуснезависимого антителообразования, оцениваемого по числу АОК к Vi-Ag в селезенке через 5 сут, преимущественно в продуктивную фазу антителогенеза (при интоксикации, проводившейся через 3 сут после иммунизации). Действие атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо не отличается, хотя в целом супрессирующий эффект метацина выражен в меньшей степени, чем атропина.

Необходимо отметить, что несмотря на статистически незначимую редукцию антителопродукции в различных реакциях при минимальной дозе АП, при оценке эффектов атропиноподобных препаратов в дозе 0,1 ЛД₅₀ путем объединения всех сдвигов в единую совокупность и сравнении ее с контролем, принятым за 100%, установлено, что в целом в данной дозе уменьшение тимуснезависимого антителогенеза под влиянием атропина и метацина по сравнению с контролем статистически достоверно ($p < 0,05$).

Полученные нами результаты свидетельствует о снижении атропиноподобными препаратами преимущественно в продуктивной фазе антителогенеза, не связанной с участием в иммунной реакции Th1-лимфоцитов, функции В-лимфоцитов селезенки, синтезирующих IgM, и, возможно, о супрессии синтеза макрофагами ИЛ-1, индуцирующего тимуснезависимое антителообразование [Sinha A.A. et al., 1987]. Менее

выраженное действие АП на Т-независимый антителогенез обусловлено, видимо, наличием на мембране этих лимфоцитов м-холинорецепторов в большем числе, чем на В-клетках [Shapiro H.M., Strom T.B., 1980].

Таким образом, под влиянием АП происходит прямо связанная с дозой (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) редукция преимущественно тимусзависимого антителообразования. Действие АП более выражено в продуктивной фазе иммуногенеза (антителогенеза). Действие атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически достоверно не отличается, хотя в целом более выражено.

ГЛАВА 5

ОЦЕНКА ВОЗДЕЙСТВИЯ АТРОПИНОПОДОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ

5.1. Оценка функции Т-лимфоцитов

Изучение действия АП на функцию Т-лимфоцитов проводили по реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) периферической крови крыс, реализация которой связана с действием лимфокина воспаления [Фримель Х. и Брок Й, 1986] в присутствии Кона через 1 и 3 сут после острого действия атропина и метацина.

Установлено (табл. 31), что при оценке функции Т-лимфоцитов

Таблица 31

Влияние острого отравления АП на РТМЛ, % ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут			
	1		3	
	Атропин	Метацин	Атропин	Метацин
Контроль	55,9 $\pm$ 5,1			
0,1	70,2 $\pm$ 7,5	71,0 $\pm$ 7,3	56,1 $\pm$ 6,4	65,4 $\pm$ 6,3
0,3	76,7 $\pm$ 7,8*	74,5 $\pm$ 7,9	65,5 $\pm$ 7,5	60,8 $\pm$ 7,8
0,5	82,5 $\pm$ 9,3*	78,2 $\pm$ 8,9*	70,1 $\pm$ 6,3	69,7 $\pm$ 6,1

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 12 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

по РТМЛ у крыс через 1 сут после острой интоксикации атропином отмечается увеличение миграции лейкоцитов (снижение функции Т-клеток) при дозе 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ соответственно на 20,8 и 26,6% ($p < 0,05$). В дозе 0,1 ЛД₅₀ отмечалась тенденция к редукции показателя на 14,3%. При действии метацина в дозе 0,5 ЛД₅₀ снижение РТМЛ происходило на 22,3% ($p < 0,05$). В дозах 0,1 и 0,3 ЛД₅₀ отмечалась тенденция к супрессии параметра

соответственно на 15,1 и 18,6%. Снижение показателя при действии АП сохранялось до 3 сут, однако оно не было статистически значимым и не зависело от дозы. Существенных отличий в эффектах атропина и метацина не выявлено.

Редукция функции Т-клеток, оцениваемая по РТМЛ, вероятно, связана с блокированием их м-холинорецепторов АП [MacManus J.P. et al., 1975; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Maslinski W. et al., 1992], приводящее к изменению соотношения циклических нуклеотидов в лимфоцитах [Rossi A., et al., 1989], а также к апоптозу Т-лимфоцитов [Rinner I. и соавт., 1991].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации АП (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) просходит дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по ингибированию миграции лейкоцитов, через 1 сут.

5.2. Исследование реакции гиперчувствительности замедленного типа

Изучение формирования ГЗТ после острой интоксикации АП в модели, не связанной с переносом клеток, позволяет установить их действие на клеточный иммунитет, в частности на функцию Th1 и продукцию ими ИЛ-1, ИЛ-3, γ -интерферона, β -фактора некроза опухоли и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) лимфоцитов [Georgiev V.St., Albright J.E., 1993], а также на участвующие в реализации гиперчувствительности IV типа Т-клетки памяти и макрофагов [Ройт А., 1991]. В адоптивных реакциях (связанных с переносом клеток) существует возможность оценить действие АП на вторичный клеточный иммунный ответ и формирование Th1-лимфоцитов в селезенке.

Нами в результате экспериментов на крысах Вистар установлено (табл. 32), что при острой интоксикации атропином происходит дозозависимое

Таблица 32

Влияние острого отравления атропином на формирование гиперчувствительности замедленного типа у крыс Вистар по приросту массы задней стопы, % ($M \pm m$)

Модель	Серии опытов	Доза, ЛД ₅₀		
		0,1	0,3	0,5
ГЗТ без переноса клеток	Контроль	34,0 $\pm$ 3,1		
	Опыт	25,0 $\pm$ 2,2*	22,1 $\pm$ 2,1*	17,2 $\pm$ 2,3*
Адоптивные ГЗТ локальная	Отрицательный Контроль	18,3 $\pm$ 2,6		
	Положительный Контроль	41,3 $\pm$ 2,4		
	Опыт	30,1 $\pm$ 2,9*	25,1 $\pm$ 2,5*	20,5 $\pm$ 2,6*
Перенос спленоцитов после иммунизации	Контроль	85,4 $\pm$ 6,8		
	Опыт	61,3 $\pm$ 6,0*	52,3 $\pm$ 5,7*	45,6 $\pm$ 4,9*

Примечание: в каждой серии опытов использовалось 6-7 животных; * - различия достоверны по сравнению с контролем (или положительным контролем) - $p < 0,05$.

снижение реакции ГЗТ (без переноса клеток). Так, дозы атропина, составляющие 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀, вызывали редукцию формирования ГЗТ соответственно в 1,36; 1,54 и 1,98 раза ($p < 0,05$).

В локальной адоптивной реакции ГЗТ по сравнению с положительным контролем (с проведением за 4 сут иммунизацией крыс-доноров ЭБ; в отрицательном контроле вместо ЭБ донорам вводили изотонический раствор хлорида натрия) в опытных сериях в прямой зависимости от дозы

происходило статистически достоверное ($p < 0,05$) снижение исследуемой иммунной реакции. Так, в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ атропин снижал локальную ГЗТ, формирующуюся под кожей крыс реципиентов из сенсibilизированных лимфоцитов доноров и ЭБ, соответственно в 1,37; 1,64 и 2,01 раза.

Эксперименты, проведенные с использованием различных доз метацина показали (табл. 33), что в целом изменения формирования ГЗТ аналогичны

Таблица 33

Влияние острого отравления метацином на формирование гиперчувствительности замедленного типа у крыс Вистар по приросту массы задней стопы, % ($M \pm m$)

Модель	Серии опытов	Доза, ЛД ₅₀		
		0,1	0,3	0,5
ГЗТ без переноса клеток	Контроль	34,0 $\pm$ 3,1		
	Опыт	28,1 $\pm$ 2,4	24,0 $\pm$ 2,3*	18,3 $\pm$ 2,4*
Адоптивные ГЗТ локальная	Отрицательный Контроль	18,3 $\pm$ 2,6		
	Положительный Контроль	41,3 $\pm$ 2,4		
	Опыт	32,3 $\pm$ 2,9*	26,0 $\pm$ 2,6*	21,8 $\pm$ 2,8*
Перенос спленоцитов после иммунизации	Контроль	85,4 $\pm$ 6,8		
	Опыт	62,2 $\pm$ 6,3*	51,0 $\pm$ 5,1*	46,7 $\pm$ 4,8*

Примечание: в каждой серии опытов использовалось 6-7 животных; * - различия достоверны по сравнению с контролем (или положительным контролем) - $p < 0,05$.

таковым при остром отравлении атропином. Установлена статистически незначимая большая активность атропина в эквивалентных дозах по сравнению с метацином (t-критерий Стьюдента).

Полученные нами результаты по оценке формирования ГЗТ в различных моделях позволяют заключить, что АП вызывают супрессию Th1-лимфоцитов, как в первичном, так и вторичном клеточном иммунном ответе. Реализация реакции ГЗТ в основном связана с функцией Th1-лимфоцитов [Хаитов Р.М и соавт., 2000]. Полученные нами результаты в определенной степени позволяют полагать, что АП уменьшают способность Th1-лимфоцитов синтезировать ИЛ-1, ИЛ-3 и другие лимфокины, обеспечивающие формирование ГЗТ [Kimber I., 1996].

Таким образом, острая интоксикация АП дозозависимо снижает реакцию ГЗТ, характеризующую как первичный, так и вторичный клеточный иммунный ответ. Существенных отличий в эффектах атропина и метацина на формирование различных реакций ГЗТ не выявлено.

5.3. Изучение антителозависимой клеточной цитотоксичности

В использованной нами модели эксперимента исследовалась вся система АЗКЦ: ЕКК (большие зернистые лимфоциты), активированные связанными с клеткой-мишенью антителами, и полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ) - моноциты, базофилы, эозинофилы, сегментоядерные лейкоциты, а также другие фагоцитирующие и нефагоцитирующие миелоидные клетки [Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2000].

Установлено (табл. 34), что при действии атропина в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ АЗКЦ спленоцитов через 3 сут после интоксикации (на 5 сут после иммунизации ЭБ) снижается соответственно в 1,78 и 2,44 раза ($p < 0,05$). При дозе, составляющей 0,1 ЛД₅₀, атропин вызывал тенденцию к супрессии АЗКЦ

в 1,27 раза. Метацин в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ уменьшал активность К-клеток соответственно в 1,51 и 2,10 раза ($p < 0,05$). При действии метацина в дозе 0,1 ЛД₅₀ отмечалась тенденция к редукции показателя в 1,22 раза.

Таблица 34

**Влияние острого отравления АП на антителозависимую
клеточную цитотоксичность через 3 сут, % ($M \pm m$)**

Доза, ЛД ₅₀	К-клетки селезенки		К-клетки тимуса	
	Атропин	Метацин	Атропин	Метацин
Контроль	18,3 $\pm$ 1,3		10,2 $\pm$ 1,1	
0,1	14,4 $\pm$ 1,2*	15,0 $\pm$ 1,5	8,3 $\pm$ 1,4	8,5 $\pm$ 1,3
0,3	10,3 $\pm$ 1,4*	12,1 $\pm$ 1,2*	7,0 $\pm$ 1,0*	7,4 $\pm$ 1,2*
0,5	7,5 $\pm$ 1,1*	8,7 $\pm$ 1,4*	5,9 $\pm$ 0,8*	6,2 $\pm$ 1,0*

Примечание: АП вводили через 3 сут после иммунизации ЭБ; в каждой серии использовалось от 5 до 7 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

После острого отравления атропином в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ АЗКЦ тимоцитов через 3 сут после интоксикации (на 5 сут после иммунизации ЭБ) снижалась соответственно в 1,46 и 1,73 раза ($p < 0,05$), а при действии метацина в тех же дозах - в 1,38 и 1,69 ($p < 0,05$) раза соответственно. При дозе, составляющей 0,1 ЛД₅₀, атропин и метацин вызывали тенденцию к супрессии АЗКЦ соответственно в 1,23 и 1,20 раза.

Выявлено более выраженное уменьшение АЗКЦ спленоцитов по сравнению с уменьшением активности К-клеток тимоцитов.

Таким образом, острое отравление АП (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) в прямой зависимости от дозы уменьшало активность К-клеток селезенки и тимуса, оцениваемую по АЗКЦ. Отмечается более выраженная редукция АЗКЦ спленоцитов. Атропин обладал несколько большим, но статистически не значимым супрессирующим эффектом по сравнению с метацином.

Резюме

В результате проведенных нами исследований, изложенных в данной главе, установлено что, под влиянием острой интоксикации АП (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) просходит дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по ингибированию миграции лейкоцитов, до 3 сут.

Данные литературы позволяют утверждать, что снижение функции Т-клеток связано с блокированием их м-холинорецепторов АП [MacManus J.P. et al., 1975; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Maslinski W. et al., 1992].

Острая интоксикация АП дозозависимо снижает реакцию ГЗТ, характеризующую как первичный, так и вторичный клеточный иммунный ответ. Существенных отличий в эффектах атропина и метацина на формирование различных реакций ГЗТ не выявлено.

В настоящее время доказано, что функция Th1-лимфоцитов, наряду с другими факторами, обеспечивает реализацию реакции ГЗТ [Хаитов Р.М и соавт., 2000]. В основном эта субпопуляция Т-клеток регулирует физиологические механизмы, обеспечивающие функцию Т-звена иммунитета [Хаитов Р.М и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Kimber I., 1996]. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что АП уменьшают способность Th1-лимфоцитов синтезировать ИЛ-1, ИЛ-3, γ -интерферон, β -фактор некроза опухоли (лимфотоксин), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, участвующие в реализации реакции ГЗТ [Kimber I., 1996]. Кроме того, АП, вероятно, снижает активность и других клеток, обеспечивающих формирование ГЗТ (относящейся к реакциям гиперчувствительности IV типа), в частности, Т-клеток памяти и макрофагов [Ройт А., 1991].

Острое отравление АП (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) в прямой зависимости от дозы уменьшает активность К-клеток селезенки и тимуса, оцениваемую по АЗКЦ. Отмечается более выраженная редукция АЗКЦ спленоцитов по сравнению с

тимоцитами. В целом проявляется несколько больший эффект атропина по сравнению с метацином (наличие более выраженного м-холиноблокирующего эффекта [Аничков С.В, 1982; Машковский М.Д., 1993]) в отношении АЗКЦ, однако он статистически не значим.

Супрессия АЗКЦ под влиянием АП, по видимому, обусловлена снижением активности в клетках-киллерах цГМФ [Garoroy M.R., 1975].

Следует отметить, что в данной реакции оценивалась активность не только клеток-киллеров, активированных связанными с клеткой-мишенью антителами, но и полиморфноядерных лейкоцитов - моноцитов, базофилов, эозинофилов, сегментоядерные лейкоцитов, а также другие фагоцитирующих и нефагоцитирующих миелоидных клеток [Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2000].

Более выраженная редукция АЗКЦ спленоцитов по сравнению с уменьшением активности К-клеток тимоцитов объясняется отсутствием холинергической иннервации в селезенке, за исключением м-холинорецепторов, локализованных на пресинаптических мембранах α -адренергических нервных окончаний [Rinner I, Schauenstein K., 1991]. Учитывая данное обстоятельство, можно предположить, что антагонистичный АП эффект ацетилхолина в селезенке практически не реализуется (возможно действие ацетилхолина, находящегося в циркулирующей крови), что и обуславливает более выраженное действие м-холиноблокаторов на К-клетки спленоцитов.

Таким образом, острая интоксикация АП вызывает дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по реакции торможения миграции лейкоцитов, обеспечиваемой лимфокином воспаления; формирования ГЗТ, в моделях, характеризующих как первичный, так и вторичный клеточный иммунный ответ, активности Т-супрессоров в селезенке; преимущественно активности К-клеток селезенки по сравнению с клетками-киллерами тимуса, оцениваемую по АЗКЦ.

В целом больший эффект атропина на Т-звено иммунитета по сравнению с метацином, однако он статистически не значим ($p < 0,05$).

ГЛАВА 6

ВЛИЯНИЕ ОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ АТРОПИНОМ И МЕТАЦИНОМ НА ФУНКЦИЮ ЕСТЕСТВЕННЫХ КЛЕТОК КИЛЛЕРОВ

6.1. Действие атропиноподобных препаратов на активность ЕКК

В связи с продолжающей интенсивно развиваться иммунологией меняются подходы к определению некоторых понятий и определений. В настоящее время иммунитетом называются только те защитные процессы, которые реализуются с участием лимфоцитов [Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. Функцию ЕКК, которую рассматривали как один из факторов неспецифической резистентности организма [Descotes J., 1986] в связи с их возможностью уничтожать клетки опухоли, клетки, пораженные вирусами или паразитами и ксеногенные клетки без предварительного контакта с антигенами, находящимися на их поверхности, относят к клеточному иммунитету [Хаитов Р.М. и соавт., 2000].

При исследовании влияния атропина на ЕКК нами установлено (табл. 35), что через 1 сут происходит дозозависимое снижение активности ЕКК. Так, дозы атропина, составляющие 0,2; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀, вызывали уменьшение активности ЕКК в 1,57; 2,16 и 3,00 раза ($p < 0,05$). Через 3 сут функция ЕКК оставалась достоверно ($p < 0,05$) сниженной при дозе атропина, составляющей 0,5 ЛД₅₀ в 1,72 раза.. Через 6 сут происходило полное восстановление активности ЕКК.

Острое отравление метацином вызывало при дозах 0,2; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ редукцию активности ЕКК соответственно в 1,54; 1,83 и 2,55 раза ($p < 0,05$). Через 3 сут после отравления функция ЕКК оставалась достоверно ($p < 0,05$) сниженной при дозе метацина, составляющей 0,5 ЛД₅₀ в 1,66 раза. Через 6

Таблица 35

Влияние острого отравления атропином на активность естественных клеток-киллеров, % ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут		
	1	3	6
Контроль	33,2 $\pm$ 4,1		
0,1	21,2 $\pm$ 4,2*	26,7 $\pm$ 4,0	36,4 $\pm$ 4,5
0,3	15,4 $\pm$ 3,6*	23,4 $\pm$ 4,3	29,8 $\pm$ 4,0
0,5	11,0 $\pm$ 3,1*	19,3 $\pm$ 3,2*	30,0 $\pm$ 3,7

Примечание: в каждой серии использовалось от 6 до 7 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

сут существенных различий показателей в опытной и контрольной группах не выявлено (табл. 36).

Таблица 36

Влияние острого отравления метацином на активность естественных клеток-киллеров, % ($M \pm m$)

Доза, ЛД ₅₀	Время после интоксикации, сут		
	1	3	6
Контроль	33,2 $\pm$ 4,1		
0,1	21,5 $\pm$ 3,7*	25,9 $\pm$ 3,7	35,0 $\pm$ 4,3
0,3	18,1 $\pm$ 3,5*	24,7 $\pm$ 4,0	31,7 $\pm$ 3,8
0,5	13,0 $\pm$ 3,2*	20,0 $\pm$ 3,1*	32,5 $\pm$ 3,6

Примечание: в каждой серии использовалось от 6 до 7 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Снижение активности ЕКК, так же как и АЗКЦ, под влиянием АП, вероятно, связана со снижением активности в клетках-киллерах цГМФ [Garoroy M.R., 1975].

Таким образом, острое отравление АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ в прямой зависимости от дозы уменьшало активность ЕКК спленоцитов крыс Вистар через 1 сут. При максимальной дозе АП редукция ЕЦ сохранялась до 3 сут. В целом отмечалась более выраженная супрессия функции ЕКК при действии атропина по сравнению с метацином.

6.2. Влияние атропина и метацина на активность ЕКК in vitro

При изучении влияния АП на активность ЕКК селезенки (естественную цитотоксичность – ЕЦ – спленоцитов) крыс Вистар in vitro установлено (табл. 37), что при концентрациях атропина, составляющих 10^{-4} и 10^{-3} М,

Таблица 37

Влияние атропина и метацина на активность ЕКК селезенки (ЕЦ) крыс Вистар in vitro, % [M±m]

Клетки	Концентрация , М			
	Контроль	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}
Атропин	$27,8 \pm 2,9$	26,1+ 2,5	15,7+ 2,2*	12,5+ 1,9*
Метацин		25,4+ 2,7	17,3+ 2,4*	10,8+ 2,0*

Примечание: в каждой серии использовалось от 9 до 11 крыс; спленоциты в течение 1 ч инкубировали с АП; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

происходит прямо связанное с концентрацией уменьшение активности ЕКК соответственно в 1,77 и 2,22 раза ($p < 0,05$). При концентрациях метацина 10^{-4} и 10^{-3} М происходит прямо связанная с концентрацией редукция активности ЕКК селезенки соответственно в 1,61 и 2,57 раза ($p < 0,05$). При концентрации АП, составляющей 10^{-5} М, статистически значимых изменений активности ЕЦ спленоцитов не отмечалось. Отличия

супрессирующих эффектов атропина и метацин в эквимольных концентрациях *in vitro* в отношении функции ЕКК отсутствовали.

Обращает на себя внимание то обстоятельство, что действие АП на ЕКК обнаруживается только при их высоких концентрациях *in vitro*. В настоящее время на ЕКК холинергические рецепторы не обнаружены [Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2000], поэтому супрессирующий эффект АП на ЕЦ можно считать неспецифическим.

Таким образом, действие АП *in vitro* в концентрациях, составляющих 10^{-4} и 10^{-3} М, в прямой зависимости от концентрации уменьшало активность ЕКК спленоцитов (ЕЦ спленоцитов) крыс Вистар. В эквимольных концентрациях эффекты атропина и метацина практически не отличались.

Резюме

Полученные нами результаты, позволяют заключить, что острое отравление АП (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) в прямой зависимости от дозы уменьшало активность ЕКК спленоцитов крыс Вистар через 1 сут. При максимальной дозе АП редукция ЕЦ сохранялась до 3 сут. Действие АП *in vitro* в концентрациях, составляющих 10^{-4} и 10^{-3} М, в прямой зависимости от концентрации уменьшало активность ЕКК спленоцитов (ЕЦ спленоцитов) крыс Вистар. В эквилетальных дозах и эквимольных концентрациях эффекты атропина и метацина статистически значимо не отличались, хотя в целом отмечалась более выраженная супрессия функции ЕКК при действии атропина по сравнению с метацином.

Супрессия активности ЕКК, так же как и АЗКЦ, под влиянием АП, по видимому, обусловлена снижением активности в клетках-киллерах цГМФ [Garoroy M.R., 1975], учитывая, что данные последних исследований позволяют считать, что ЕЦ и АЗКЦ обеспечивается одними и теми же клетками, отличающимися лишь механизмами реализации киллинга (убийства) клеток-мишеней [Хаитов Р.М. и соавт., 2000].

Действие АП *in vitro* в концентрациях, составляющих 10^{-4} и 10^{-3} М, в прямой зависимости от дозы уменьшало активность ЕКК спленоцитов (ЕЦ спленоцитов) крыс Вистар. В эквимольных концентрациях эффекты атропина и метацина практически не отличались.

На ЕКК холинергические рецепторы не обнаружены [Хаитов Р. М. и соавт., 2000], хотя исключить их наличие на поверхностной мембране этих клеток нельзя, учитывая их возможное происхождение из предшественников Т-клеток [Ройт А., 1991]. Супрессирующий эффект АП в связи с действием только высоких концентраций *in vitro* АП можно расценить, как преимущественно неспецифический. Следует отметить, что в

использованной модели киллерный эффект зависел не только от ЕКК, но от ПЯЛ, имеющих м-холинорецепторы. Действие АП на активности ЕКК, вероятно, обусловлены блокированием проникновения гранзимов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (или снижением их синтеза) и нарушением процесса порообразования перфорином [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Nogueira N., 1984], а также индукцией апоптоза [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986].

ГЛАВА 7

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ГОМЕОСТАЗА ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ АТРОПИНОПОДОБНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

7.1. Обоснование применения Т-активина для коррекции нарушений физиологической регуляции иммунного гомеостаза после острого отравления атропиноподобными препаратами

Оценка влияния АП на изменение физиологической регуляции иммунного гомеостаза позволяет обосновать применение наиболее эффективного иммуностимулятора для коррекции нарушений системы иммунитета после острого отравления атропином и метацином.

Т-звено системы иммунитета, которое в наибольшей степени поражается при интоксикации АП, может корригироваться препаратами, полученными из тимуса, и их синтетическими аналогами [Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., 1978, 1983; Арион В.Я., 1981; Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. 1981, 1982; Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985; Виноградов В.М. и соавт., 1986; Яковлев Г.М. и соавт., 1987; Утешев Б.С. и соавт., 1995; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1999; Minich E. et al., 1983; Georgiev V.St. et al; 1993; Khaitov R.M., 1993; Kimball E. S., 1993; Janik J., 1993; Stevens G., 1993; Sosa A. et al., 1993] При поражении различными токсикантами доказана высокая эффективность тимогена (отравление дихлорэтаном, нитрилами, спиртами, ФОС) [Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1997; Германчук В.Г., 2000; Беликов В.Г., 2001], а также Т-активина (интоксикация хлорорганическими соединениями) [Вахидова Г.А. и соавт., 1990].

Вместе с иммуностимуляторами или вместо них могут применяться активаторы метаболических процессов (анаболические гормоны, рибоксил, плазмол, витамины и др.) [Плецитый К.Д., Сухих Г.Т., 1984, 1985; Лазарева

Д.Н., Алехин Е.К., 1985], которые называются средствами экстраиммунной терапии [Хаитов Р.М. и соавт., 1995]. Сравнительная характеристика действия иммуностимуляторов на Т- и В-звено иммунитета [Осипова Л.О., 1990; Хавинсон В.Х. и соавт., 1990; Яковлев Г.М. и соавт., 1990; Гюллинг Э.В. и соавт., 1991; Земсков В.М., 1991; Петров Р.В., 1991; Ширинский В.С., Жук Е.А., 1991; 1994; Семина О.В. и соавт., 1993, 1995, 1997; Юшков В.В. и соавт., 1993; Утешев Б.С. и соавт., 1995; Ершов Ф.И., 1995; Невидимова Т.И. и соавт., 1995; Жук Е.А. и соавт., 1996; Старченко А.А. и соавт., 1996; Забродский П.Ф. и Киричук В.Ф., 1999] позволяет констатировать, что наиболее эффективными средствами при нарушении Т- звена иммунитета является тимоген и Т-активин [Таранов В.А., Короткова М.И., 1989; Вахидова Г.А. и соавт., 1990; Большаков и соавт., 1991; Борисова А.М. и соавт., 1991; Ханафиева и соавт., 1992; Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993; Машковский М.Д., 1993]. Т-активин способствует индукции γ -интерферона, который активирует ЕКК и восстанавливает постинтоксикационное нарушение их функции, а также индуцирует экспрессию рецепторов ИЛ-2 на их поверхности [Сухих Г.Т. и соавт., 1984]. Препарат оказывает существенное иммуномодулирующее влияние на функцию макрофагов и антителообразование у мышей и крыс в широком диапазоне доз: от 0,001 до 5 мкг/кг. [Большаков и соавт., 1991; Кирилличева Г.Б. и соавт., 1993]. Описаны свойства Т-активина увеличивать пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность Т-клеток [Шляхов Э.Н., Гылка В.В., 1989; Арион В.Я. и соавт., 1989; Стасий Е.Д. и соавт., 1990; Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф., 1991]. Сравнительно недавно стало известно, что тимуснезависимый иммунный ответ на антигены 2-го класса, к которым относятся полисахариды бактериальных стенок и, в частности, Vi-Ag, обеспечивается взаимодействием В-лимфоцитов с так называемыми тимуснезависимыми Т-лимфоцитами ($T\gamma\delta$) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. Поэтому мы

предположили, что Т-активин способен стимулировать и тимуснезависимый гуморальный иммунный ответ, активируя $T_H\delta$. Без участия Т-клеток В-лимфоциты активируют только тимуснезависимые антигены 1-го класса, к которым относятся В-клеточные митогены (например, продукт из растения фитолакки американской – PWM – pokeweed mitogen) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000].

В связи с вышеизложенными фактами, а также полученными нами экспериментальными данными, мы предположили, что применение Т-активина в дозе 5 мкг/кг в течение 3 сут способно восстановить нарушения физиологической регуляции иммунного гомеостаза, вызванные АП. Доза препарата для крыс и мышей обоснована данными литературы и вычислениями, исходя из высшей суточной дозы для человека [Рыболовлев Ю.Р., 1982; Машковский М.Д., 1993].

7.2 . Действие Т-активина на основные показатели В-звена иммунитета

В экспериментах по изучению действия Т-активина на В-звено иммунитета исследовалось Т-зависимое и тимуснезависимое антителообразование через 5 сут после иммунизации, которую проводили одновременно с введением атропина, как АП, обладающим более выраженным иммуносупрессирующим эффектом, чем метацин. Установлено (табл. 38), что применение Т-активина практически полностью восстанавливает гуморальный иммунный к тимусзависимому (ЭБ) и тимуснезависимому (Vi-Ag) антигенам при остром отравлении атропином (0,5 ЛД₅₀) . Так, по сравнению с контролем острая интоксикация атропином снижала число АОК к ЭБ в селезенке крыс Вистар на 34,17% ($p < 0,05$), а применение Т-активина в дозе 5 мкг/кг ежедневно в течение трех суток приводило в увеличению показателя в 1,40 раза ($p < 0,05$). Острое действие атропина (0,5 ЛД₅₀) вызывало редукцию тимуснезависимого

антителообразования, оцениваемого по числу АОК к Vi-Ag, на 30,19% ($p < 0,05$), а Т-активин увеличивал параметр по сравнению с его значением после интоксикации в 1,32 раза. При этом по сравнению с контрольным уровнем число АОК к тимусзависимому и тимуснезависимому антигенам в селезенке животных после иммуностимуляции статистически значимо не отличалось.

Таблица 38

Влияние Т-активина на основные показатели В-звена иммунитета после острого отравления атропином (0,5 ЛД₅₀)
($M \pm m$)

Препараты	АОК к ЭБ, $\times 10^3$	АОК к Vi-Ag, $\times 10^3$
Контроль	35,7 $\pm$ 3,1	26,5 $\pm$ 2,5
Атропин	23,5 $\pm$ 2,9*	18,5 $\pm$ 2,2*
Атропин + Т-активин	32,8 $\pm$ 3,2	24,9 $\pm$ 2,3

Примечание: в каждой серии опытов использовалось 6-7 животных; * - различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Проведенные эксперименты подтвердили нашу гипотезу о возможности стимуляции Т-активином тимуснезависимого гуморального иммунного ответа на введение Vi-Ag.

Таким образом, применение после острого отравления атропином (0,5 ЛД₅₀) Т-активина в дозе 5 мкг/кг ежедневно в течение 3 сут восстанавливало основные показатели гуморального иммунитета.

7.3. Оценка влияния Т-активина на основные параметры клеточного иммунитета

Наши исследования показали (табл. 39), что использование Т-активина

Таблица 39

Влияние Т-активина на основные показатели клеточного иммунитета после острого отравления атропином (0,5 ЛД₅₀) (M±m)

Препараты	Реакция ГЗТ (прирост массы лапы, %)	ЕЦ, % (спленоциты)	АЗКЦ, %
Контроль	34,0±3,1	33,2± 4,1	18,3±1,3
Атропин	17,2±2,3*	20,0± 3,1*	7,5±1,1*
Атропин + Т-активин	31,3±2,5	30,3±2,8	17,8±1,6

Примечание: ЕЦ и АЗКЦ определяли через 3 сут; в каждой серии опытов использовалось 6-7 животных; * - различия достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

после интоксикации атропином в дозе 0,5 ЛД₅₀ существенно ($p < 0,05$) увеличивало реакцию ГЗТ, ЕЦ (активность ЕКК), АЗКЦ (активность К-клеток). Так, по сравнению с контролем острая интоксикация атропином снижала реакцию ГЗТ у крыс Вистар на 49,41% ($p < 0,05$), а применение Т-активина в дозе 5 мкг/кг ежедневно в течение трех суток приводило к увеличению показателя в 1,82 раза ($p < 0,05$). Действие атропина вызывало супрессию ЕЦ, отражающую функцию ЕКК, на 39,76% ($p < 0,05$), а применение иммуностимулятора увеличивало естественную

цитотоксичность в 1,52 раза ($p < 0,05$). Под влиянием острого отравления атропином АЗКЦ уменьшалась на 59,02% ($p < 0,05$), а применение Т-активина в дозе 5 мкг/кг ежедневно в течение трех суток приводило к увеличению показателя в 2,37 раза ($p < 0,05$). При этом по сравнению с контрольными значениями показатели клеточного иммунитета после иммуностимуляции статистически достоверно не отличались.

Таким образом, применение после острого отравления атропином ($0,5 \text{ ЛД}_{50}$) Т-активина в дозе 5 мкг/кг ежедневно в течение 3 сут восстанавливало основные показатели Т-звена иммунитета и функцию ЕКК.

Резюме

Применение после острого отравления атропином (0,5 ЛД₅₀) Т-активина в дозе 5 мкг/кг ежедневно в течение 3 сут восстанавливало основные показатели гуморального иммунного ответа, параметры Т-звена иммунитета и функцию ЕКК.

Проведенные эксперименты подтвердили наше предположение о возможности стимуляции Т-активином тимуснезависимого гуморального иммунного ответа на Vi-Ag. Необходимо отметить, что стимуляция Т-активином тимуснезависимого антителообразования при остром отравлении АП может быть обусловлена его действием на макрофаги [Таранов В.А., Короткова М.И., 1989], в результате которого они продуцируют ИЛ-1, являющийся помимо антигена фактором, участвующим в независимом от тимуса антителообразовании [Gillbert K. M. et al., 1985].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование изменений физиологических механизмов регуляции системы иммунитета под влиянием м-холиноблокаторов (атропиноподобных препаратов – АП) является актуальной задачей физиологии и иммунологии в связи со следующими обстоятельствами: м-холиноблокаторы используются как антидотные средства при интоксикации фосфорорганическими соединениями - ФОС, как антихолинэстеразные инсектициды, так и боевые фосфорорганические отравляющие вещества, в качестве наркотических средств, синтетический холиноблокатор хинуклидинил-3-бензилат (BZ) является боевым отравляющим веществом (БОВ) [Крылов С.С и соавт., 1999] и подлежит уничтожению.

Существенную значимость задача, связанная с изучением влияния АП на иммунный гомеостаз, приобрела в связи с тем, что в последнее время частота острых интоксикаций данными ядами, особенно в виде наркотических рецептур, существенно увеличилась [Крылов С.С и соавт., 1999]. АП являются алкалоидами, определяющими картину острых отравлений некоторыми ядовитыми грибами. Отравление атропином относится к наиболее распространенным лекарственным интоксикациям [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Выделяют субпсихические формы интоксикаций АП, легкую, среднюю, тяжелую и сверхтяжелую степени отравлений, различные варианты клинической картины средней степени отравлений атропиноподобными препаратами [Крылов С.С. и соавт., 1999]. В больших дозах АП вызывают психическое и двигательное возбуждение, зрительные галлюцинации, бред, эпилептиформные судороги с последующей потерей сознания и развитием комы с выраженным холинолитическим синдромом. В зависимости от вещества, блокирующего холинорецепторы (следует отметить, что в больших дозах все м-холинолитики действуют и на н-холинорецепторы) могут возникать бради- и тахикардия, гипергликемия,

атривентрикулярная блокада, фибрилляция желудочков, острая сердечная и сосудистая недостаточность (коллапс), токсическая гепатопатия, парез кишечника [Саватеев Н.В., 1978; Лужников Е.А., 1982; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Крылов С.С. и соавт., 1999].

Особую опасность АП в виде ВЗ могут представлять при аварийных ситуациях с загрязнением местности в случае аварий на химических объектах или террористических актов. При остром отравлении веществом ВЗ острый психоз сопровождается полной потерей памяти. Отдельные признаки поражения сохраняются до пяти суток [Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990].

Не вызывает сомнений, что одной из причин инфекционных осложнений и заболеваний после острого отравления (особенно тяжелой и сверхтяжелой степени) м-холиноблокаторами является нарушение механизмов физиологической регуляции системы иммунитета [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985].

Полученные различными исследователями результаты изучения влияния холинотропных препаратов на систему иммунитета позволяют полагать, что механизмы иммунотоксических эффектов м-холиноблокаторов на клеточном уровне определяются, по-видимому, изменением соотношения в иммунокомпетентных клетках (ИКК) цАМФ/цГМФ (это соотношение увеличивается), а также апоптозом тимоцитов [Денисенко П.П., 1980; MacManus J.P. et al., 1975; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Rinner I. и соавт., 1995].

Весьма ограниченные данные литературы в отношении иммунотоксических эффектов холинолитиков предполагает изучение целого ряда неисследованных вопросов в отношении нарушения физиологических механизмов регуляции при острой интоксикации м-холиноблокаторами (атропином и метацином). Некоторые данные

различных исследователей противоречивы, не ясна роль механизмов, реализующихся на уровне органов и систем и при взаимодействии иммунокомпетентных клеток (ИКК) *in vitro*, практически не исследованы особенности перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета при острой интоксикации атропиноподобными веществами (АП), не определена роль кооперации Т- и В-лимфоцитов в реализации после действия холиномиметиков основных иммунных реакций.

Получение новых и уточнение полученных данных в отношении иммунотоксичности АП позволит обосновать адекватную характеру нарушений иммунного гомеостаза возможность использования из большого арсенала иммуностимуляторов наиболее перспективных фармакологических препаратов для профилактики постинтоксикационных инфекционных осложнений и заболеваний.

Фармакологическая коррекция нарушений иммунного гомеостаза под влиянием АП в постинтоксикационном периоде до сих пор достаточно полно не изучена и нуждается в дальнейшей разработке [Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 2001].

Неясность многих вопросов, противоречивость и неоднозначность результатов исследований иммуотропных свойств АП, в частности, иммунотоксичности атропина и метацина предполагает дальнейшее изучение этой проблемы, решение которой позволит существенно снизить частоту инфекционных осложнений отравленных АП в лечебных учреждениях.

В ходе проведенных нами исследований установлено, что под влиянием острой интоксикации АП дозах 0,1; 0,3 и 0,5 LD₅₀ происходит дозозависимое снижение числа КОЕс, что обусловлено блокадой м-холинореактивных структур костного мозга.

Снижение миграции КОЕс вследствие блокирования м-холинорецепторов стоволовых кроветворных клеток (или м-

холинореактивных структур костного мозга) после острой интоксикации АП объясняется устранением регулирующей функции ацетилхолина. Эта функция заключается в том, что данный медиатор при активации парасимпатического отдела вегетативной нервной системы, по-видимому, действует на м-холинорецепторы КОЕс, что приводит к увеличению их миграции из костного мозга [Забродский П. Ф., 1993]. Многочисленные данные литературы косвенно подтверждают это предположение [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б; Дешевой Ю. Б., 1983, 1984, 1985; Kutty K. M., 1976; Maslinski W. et al., 1983; 1985, 1986, 1987, 1989, 1990, 1992; Беликов В.Г., 2001]. После облучения мышей в летальной дозе из экранированного участка костного мозга под влиянием ацетилхолина КОЕ мигрируют в селезенку для обеспечения экстрамедуллярного кроветворения путем образования пяти типов колоний - миелоидных, мегакариоцитарных, эритроидных, недифференцированных и смешанных [Петров Р.В. и соавт., 1981а]. АП блокируют этот процесс.

Острая интоксикация АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ лимфоидный индекс тимуса существенно не изменяет. Однако при дозе АП 0,1 и 0,3 ЛД₅₀ отмечалась тенденция к увеличению показателя, а при дозе, составляющей 0,5 ЛД₅₀, - к его увеличению.

Под влиянием атропина и метицина в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут содержание лимфоцитов в селезенке увеличивается, а через 2 сут - уменьшается, восстанавливаясь до контрольного уровня через 3 сут. Статистически значимых отличий содержания лимфоцитов в селезенке при сравнении действия атропина и метацина в эквивалентных дозах выявлено не было.

На изменение содержания Т-лимфоцитов в тимусе влияют стрессорные воздействия [Александров В.Н., 1983], сопровождающиеся увеличением содержания кортикостерона в крови [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б]. Действие ацетилхолина на м-холинорецепторы тимоцитов (при дозе АП,

составляющей 0,5 ЛД₅₀), вероятно, обусловлено блокированием м-холиностимулирующих эффектов ацетилхолина, который служит сигналом для выхода из вилочковой железы зрелых тимоцитов [Maslinski W. et al., 1987]. Противоположный эффект при максимальной из исследованных доз АП через 2 сут, возможно, обусловлен реализацией апоптоза (запрограммированной гибели клеток) тимоцитов. Это свидетельствует о том, что АП не влияют на позитивную или негативную селекцию тимоцитов и не реализуют индуцированную активацией смерть лимфоцитов [Хаитов Р.М и соавт., 2000] в дозах 0,1; 0,2 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут после воздействия. По-видимому, данными эффектами обусловлено снижение Т-лимфоцитов в тимусе через 2 сут при дозе АП, составляющей 0,5 ЛД₅₀. Не исключено, что уменьшение лимфоцитов в тимусе при действии АП в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 2 сут является проявлением обычной физиологической компенсаторной реакции, направленной на восполнение числа Т-клеток в лимфоидных органах после их накопления в тимусе вследствие блокады м-холинореактивных структур.

После острого отравления АП в дозе 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут содержание лимфоцитов в селезенке уменьшается, а через 2 сут – увеличивается, восстанавливаясь до контрольного уровня через 3 сут. Статистически значимые отличия показателя при сравнении действия атропина и метацина в эквивалентных дозах отсутствуют.

Снижение лимфоцитов в селезенке при действии АП через 1 сут можно объяснить уменьшением их поступления в кровь и в последующем в селезенку из тимуса вследствие блокирования м-холинореактивных структур тимуса [Maslinski W. et al., 1987]. Через 2 сут после снижения миграции лимфоцитов из тимуса происходит ее компенсаторное увеличение под влиянием восстановленной холинергической иннервации тимуса. К этому времени у крыс холинолитическое действие атропина заканчивается, учитывая то обстоятельство, что период полувыведения его у человека

составляет 15 ч [Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н., 1991]. Закономерно содержание лимфоцитов в селезенке увеличивается. Следует отметить, что в организме, вероятно, происходят более сложные процессы, определяющие соотношение клеток в тимусе и селезенке. В частности, содержание лимфоцитов в селезенке зависит от функционального состояния α -адренорецепторных структур этого органа [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б]. Поэтому предложенное нами объяснение является, безусловно, неполным и в определенной степени механистичным. Известно, что в селезенке холинергическая иннервация отсутствует, за исключением м-холинорецепторов, локализованных на пресинаптических мембранах α -адренергических нервных окончаний [Rinner I, Schauenstein K., 1991].

Не исключено, что снижение через 2 сут после острого воздействия АП Т-клеток в тимусе обусловлено не только процессами миграции, но и апоптозом тимоцитов вследствие не только блокирования их м-холинорецепторов [Rinner I. и соавт., 1995], но и в результате эффекта катехоламинов, так как блокада м-холинореактивных структур тимуса может привести к усилению действия катехоламинов на адренергические рецепторы тимоцитов, увеличивая их запрограммированную гибель (апоптоз) [Durant S., 1986].

При остром отравлении АП в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут отмечается прямо связанное с дозой увеличение количества лимфоцитов в костном мозге и снижение содержания этих клеток в лимфоузлах. Через 2 сут реализуются противоположные эффекты. Через 3 сут содержание лимфоцитов в костном мозге и лимфоузлах восстанавливается до контрольного уровня. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах на содержание лимфоцитов в костном мозге и лимфоузлах отсутствуют, хотя следует отметить, что в целом эффекты атропина незначительно превышают влияние метацина на миграцию лимфоцитов из органов системы иммунитета.

Выявленные факты и описанное в настоящее время действие холинотропных препаратов на лимфоидные органы позволяют полагать, что через 1 сут после действия АП в высоких дозах реализуются следующие механизмы: блокируются м-холинореактивные структуры костного мозга, что приводит к снижению выхода из него в циркулирующую кровь лимфоцитов [Дешевой Ю. Б., 1983, 1984, 1985; Забродский П. Ф., 1993]; редукция активности холинергической системы вызывает повышение тонуса адренергической системы, что ведет к увеличению числа лимфоцитов в костном мозге вследствие стимуляции β -адренергических структур [Горизонтов П.Д., 1981а, 1981б]. Нельзя исключить роли в реализации данного механизма стимуляции большими дозами АП н-холинорецепторов симпатических ганглиев, что обуславливает активацию периферических адренергических рецепторов [Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н., 1991]. Снижение выхода лимфоцитов из костного мозга и тимуса приводит к уменьшению их числа в лимфоузлах [Петров Р.В. и соавт., 1972, 1981а, 1981б; Петров Р.В., 1987; Хаитов Р.М. и соавт., 2000].

Снижение числа лимфоцитов в костном мозге и увеличение их в селезенке через 2 сут связано с, так называемым, «синдромом отдачи», когда прекращение блокирования системы или ее стимуляции приводит к противоположному эффекту вследствие активации механизмов обратной связи регуляции системы [Судаков К.В., 1983]. Устранение блокирования рецепторов приводит к их последующей активации. В рассматриваемом нами случае после прекращения действия атропина эффекты ацетилхолина временно усиливаются.

Таким образом, при действии АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ отмечается дозозависимое снижение числа КОЕс, что обусловлено блокадой м-холинореактивных структур костного мозга. При отравлении АП в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут отмечается прямо связанное с дозой увеличение лимфоцитов в тимусе и костном мозге и снижение этих клеток в селезенке и

лимфатических лимфоузлах, а через 2 сут реализуются противоположные эффекты. Через 3 сут содержание лимфоцитов в лимфоидных органах восстанавливается до контрольного значения. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах на содержание лимфоцитов в тимусе, селезенке, костном мозге и лимфоузлах отсутствуют. В целом эффекты атропина незначительно превышают влияние метацина на перераспределение лимфоцитов в органах системы иммунитета. Это можно объяснить наличием у метацина слабо выраженного н-холиноблокирующего эффекта, который может, приводя к активации адренергической системы за счет действия на н-холинорецепторы симпатических ганглиев и надпочечников, снижать эффекты, обусловленные возбуждением м-холинореактивных структур.

В опытах на белых крысах нами изучено действие острого отравления АП в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ на гуморальный иммунный ответ к тимусзависимому антигену - эритроцитам барана (ЭБ) по титру антител через 5, 8 и 11 сут при иммунизации ЭБ, проводившейся одновременно с введением АП. Известно, что через 5 сут после иммунизации синтезируются IgM, содержание которых оценивалось косвенно по титру антител к ЭБ. Через 8 и 13 сут после иммунизации титр антител отражает синтез преимущественно IgG, и в меньшей степени IgM. Учитывая то обстоятельство, что Th1-лимфоциты участвуют в синтезе Ig M, Ig G₂, а Th2-лимфоциты способствуют синтезу Ig G₁, Ig A, Ig E [Pfeifer C. et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993], использованный тест дает представление о функциональной активности как Th1, так и Th2-лимфоцитов.

Нами установлено, что острая интоксикация атропином и метацином в пределах доз от 0,3 до 0,5 ЛД₅₀ вызывала дозозависимое снижение отрицательного двоичного логарифма титра антител к ЭБ в индуктивной фазе антителогенеза. При действии атропина супрессия антителообразования

сохранялась до 8 сут. Через 11 сут снижение отрицательного двоичного логарифма титра антител под влиянием АП отсутствовало.

Острая интоксикация атропином и метацином в дозах 0,1; 0,3 до 0,5 ЛД₅₀ вызывала дозозависимое снижение отрицательного двоичного логарифма титра антител к ЭБ в продуктивной фазе антителогенеза (через 5 и 8 сут после иммунизации). Через 11 сут снижение отрицательного двоичного логарифма титра антител под влиянием АП практически отсутствовало, что свидетельствует о восстановлении антителопродукции. Атропин в эквивалентных дозах вызывал несущественную более выраженную редукцию антителообразования, чем метацин. Сравнение редукции отрицательного двоичного логарифма титра антител в индуктивной и продуктивной фазах гуморального иммунного ответа свидетельствует о преимущественном действии АП в продуктивный период синтеза антител.

При острой интоксикации атропином и метацином (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) происходит дозозависимое снижение тимусзависимого антителообразования, оцениваемого по числу антителообразующих клеток к ЭБ в селезенке через 5 сут, преимущественно в продуктивную фазу антителогенеза (интоксикация проводилась через 3 сут после иммунизации). Действие атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо не отличается, хотя в целом эффект метацина выражен в меньшей степени, чем атропина.

Наши результаты исследований позволяют полагать, что под влиянием АП в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом происходит более выраженная редукция функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих синтез IgM, а также, в меньшей степени, Th2-лимфоцитов [Pfeifer C. et al., 1991], участвующих в синтезе IgG плазмочитами селезенки. Снижение функции Т-зависимого антителообразования связано с блокированием их м-олинорецепторов АП

[MacManus J.P. et al., 1975; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Maslinski W. et al., 1992].

Уменьшение тимусзависимой антителопродукции под влиянием АП связано с нарушением кооперации Т- и В-лимфоцитов. Проведенные нами исследования показали, что, под влиянием АП *in vitro* происходит дозозависимое (10^{-5} , 10^{-4} и 10^{-3} М) снижение кооперации Т- и В-лимфоцитов, вследствие преимущественного нарушения функции Т-клеток. Эффекты атропина и метацина в эквимолярных концентрациях отличались статистически не значимо, хотя действие атропина на антителопродукцию в модели кооперации иммуноцитов было более выражено.

Вероятно, более выраженное действие АП на Т-клетки связано с наличием на поверхности этих лимфоцитов м-холинорецепторов в большем числе, чем на В-клетках. Это подтверждают исследования Н.М. Shapiro и Т.В. Strom (1980). Снижение кооперации Т- и В-лимфоцитов может быть обусловлено модуляцией АП антигенсвязывающих рецепторов на поверхности иммуноцитов. О возможности данного эффекта косвенно свидетельствует структурное сходство ацетилхолиновых рецепторов, на которые действуют АП, и антигенсвязывающих рецепторов В-лимфоцитов [Адо А.Д., 1995].

Острое отравление атропином и метацином в дозе 0,5 ЛД₅₀ вызывало уменьшение отрицательного двоичного логарифма титра антител к Vi-Ag в индуктивной фазе антителогенеза. Через 8 сут снижение отрицательного двоичного логарифма титра антител под влиянием АП отсутствовало. Статистически значимые различия, оцениваемые с использованием t-критерия Стьюдента, между действием атропина и метацина в эквилетальных дозах не выявлены.

Острое действие атропина и метацина в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ вызывало дозозависимую редукцию отрицательного двоичного логарифма титра антител к Vi-Ag в индуктивной фазе антителогенеза через 5 сут после иммунизации, проведенной за 3 сут до введения АП. Через 8 сут после

иммунизации изменение отрицательного двоичного логарифма титра антител под влиянием АП не отмечалось. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах не выявлены.

Под влиянием острой интоксикации атропином и метацином в дозах, составляющих 0,3 и 0,5 ЛД₅₀, происходит дозозависимое снижение тимуснезависимого антителообразования, оцениваемого по числу антителообразующих клеток к Vi-Ag в селезенке через 5 сут после иммунизации, преимущественно в продуктивную фазу антителогенеза (при интоксикации, проводившейся через 3 сут после иммунизации). Действие атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо не отличается, хотя в целом супрессирующий эффект метацина выражен в меньшей степени, чем атропина.

Необходимо отметить, что несмотря на статистически незначимую редукцию антителопродукции в различных реакциях при минимальной дозе АП, при оценке эффектов атропиноподобных препаратов в дозе 0,1 ЛД₅₀ путем объединения всех сдвигов в единую совокупность и сравнении ее с контролем, принятым за 100%, установлено, что в целом в данной дозе уменьшение тимуснезависимого антителогенеза под влиянием атропина и метацина по сравнению с контролем статистически достоверно ($p < 0,05$).

Полученные нами результаты свидетельствуют о снижении атропиноподобными препаратами преимущественно в продуктивной фазе антителогенеза, не связанной с участием в иммунной реакции Th1-лимфоцитов, угнетении функции В-лимфоцитов селезенки, синтезирующих IgM, и, возможно, о супрессии синтеза макрофагами ИЛ-1, индуцирующего тимуснезависимое антителообразование [Sinha A.A. et al., 1987]. Менее выраженное действие АП на Т-независимый антителогенез обусловлено, видимо, наличием на мембране этих лимфоцитов м-холинорецепторов в большем числе, чем на В-клетках [Shapiro H.M., Strom T.B., 1980].

Таким образом, под влиянием АП происходит прямо связанная с дозой (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) редукция преимущественно тимусзависимого антителообразования. Действие АП более выражено в продуктивной фазе иммуногенеза (антителогенеза). Действие атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически достоверно не отличается, хотя в целом более выражено.

В результате проведенных исследований нами установлено, что под влиянием острой интоксикации АП (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) происходит дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по ингибированию миграции лейкоцитов, через 1 сут после введения атропиноподобных препаратов.

Данные литературы позволяют утверждать, что снижение функции Т-клеток связано с блокированием их м-холинорецепторов АП [MacManus J.P. et al., 1975; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Maslinski W. et al., 1992].

Острая интоксикация АП дозозависимо снижает реакцию ГЗТ, характеризующую как первичный, так и вторичный клеточный иммунный ответ. Статистически значимые различия, оцениваемые с использованием t-критерия Стьюдента, между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах отсутствовали, хотя действие атропина в целом было более выражено.

В настоящее время доказано, что функция Th1-лимфоцитов, наряду с другими факторами, обеспечивает реализацию реакции ГЗТ [Хаитов Р.М и соавт., 2000]. В основном эта субпопуляция Т-клеток регулирует физиологические механизмы, обеспечивающие функцию Т-звена иммунитета [Хаитов Р.М и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Kimber I., 1996]. Полученные нами результаты косвенно свидетельствуют о том, что АП уменьшают способность Th1-лимфоцитов синтезировать ИЛ-1, ИЛ-3, γ -интерферон, β -фактор некроза опухоли (лимфотоксин), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, участвующие в реализацию реакции ГЗТ [Kimber I., 1996]. Кроме того, АП, вероятно,

снижают активность и других клеток, обеспечивающих формирование ГЗТ, в частности, Т-клеток памяти и макрофагов [Ройт А., 1991].

Острое отравление АП (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) в прямой зависимости от дозы уменьшает активность К-клеток селезенки и тимуса, оцениваемую по антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ). Отмечается более выраженная редукция антителозависимой клеточной цитотоксичности спленоцитов по сравнению с тимоцитами. В целом проявляется несколько больший эффект атропина по сравнению с метацином в отношении АЗКЦ за счет наличия более выраженного его м-холиноблокирующего эффекта [Аничков С.В, 1982; Машковский М.Д., 1993], однако он статистически не значим.

Супрессия антителозависимой клеточной цитотоксичности под влиянием АП, по видимому, обусловлена снижением активности в клетках-киллерах цГМФ [Garoroy M.R., 1975]. Следует отметить, что в данной реакции оценивалась активность не только клеток-киллеров, активированных связанными с клеткой-мишенью антителами, но и полиморфноядерных лейкоцитов - моноцитов, базофилов, эозинофилов, сегментоядерные лейкоцитов, а также другие фагоцитирующих и нефагоцитирующих миелоидных клеток [Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2000].

Более выраженная редукция антителозависимой клеточной цитотоксичности спленоцитов по сравнению с уменьшением активности К-клеток тимоцитов объясняется отсутствием холинергической иннервации в селезенке, за исключением м-холинорецепторов, локализованных на пресинаптических мембранах α -адренергических нервных окончаний [Rinner I, Schauenstein K., 1991]. Учитывая данное обстоятельство, можно предположить, что антагонистичный АП эффект ацетилхолина в селезенке практически не реализуется (возможно действие ацетилхолина, находящегося в циркулирующей крови), что и обуславливает более выраженное действие м-холиноблокаторов на К-клетки спленоцитов.

Таким образом, острая интоксикация АП вызывает дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по реакции торможения миграции лейкоцитов, обеспечиваемой лимфокином воспаления; редукцию реакции ГЗТ, в моделях, характеризующих как первичный, так и вторичный клеточный иммунный ответ; супрессию активности преимущественно К-клеток селезенки по сравнению с клетками-киллерами тимуса, оцениваемую по АЗКЦ. Эффект атропина несущественно превышает действие метацина на исследованные реакции.

Острое отравление АП (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) в прямой зависимости от дозы уменьшало активность естественных клеток-киллеров спленоцитов крыс Вистар через 1 сут. При максимальной дозе АП редукция естественной цитотоксичности сохранялась до 3 сут. Действие АП *in vitro* в концентрациях, составляющих 10^{-4} и 10^{-3} М, в прямой зависимости от концентрации уменьшало активность естественных клеток-киллеров спленоцитов (естественную цитотоксичность спленоцитов) крыс Вистар. В эквивалентных дозах и эквимольных концентрациях эффекты атропина и метацина статистически значимо не отличались, хотя в целом отмечалась более выраженная супрессия функции естественных клеток-киллеров при действии атропина по сравнению с метацином.

Супрессия активности естественных клеток-киллеров, так же как и антителозависимой клеточной цитотоксичности, под влиянием АП, по видимому, обусловлена снижением активности в клетках-киллерах цГМФ [Garoroy M.R., 1975], учитывая, что данные последних исследований позволяют считать, что естественная и антителозависимая клеточная цитотоксичность обеспечивается одними и теми же клетками, отличающимися лишь механизмами реализации киллинга (убийства) клеток-мишеней [Хаитов Р.М. и соавт., 2000].

Действие АП *in vitro* в концентрациях, составляющих 10^{-4} и 10^{-3} М, в прямой зависимости от дозы уменьшало активность ЕКК спленоцитов (ЕЦ

спленоцитов) крыс Вистар. В эквимолярных концентрациях эффекты атропина и метацина практически не отличались.

На естественных клетках-киллерах холинергические рецепторы не обнаружены [Хаитов Р. М. и соавт., 2000], хотя исключить их наличие на поверхностной мембране этих клеток нельзя, учитывая их возможное происхождение из предшественников Т-клеток [Ройт А., 1991]. Супрессирующий эффект АП в связи с действием только высоких концентраций *in vitro* АП можно расценить, как преимущественно неспецифический. Следует отметить, что в использованной модели киллерный эффект зависел не только от естественных клеток-киллеров, но от полиморфноядерных лейкоцитов, имеющих м-холинорецепторы. Действие АП на активности ЕКК, вероятно, обусловлены блокированием проникновения гранзимов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (или снижением их синтеза) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Nogueira N., 1984], а также индукцией апоптоза [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986]. Т-звено системы иммунитета, которое в наибольшей степени поражается при интоксикации АП, может корректироваться препаратами, полученными из тимуса, и их синтетическими аналогами [Морозов В.Г., Хавинсон В.Х., 1978, 1983; Арион В.Я., 1981; Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. 1981, 1982; Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985; Виноградов В.М. и соавт., 1986; Яковлев Г.М. и соавт., 1987; Утешев Б.С. и соавт., 1995; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1999; Minich E. et al., 1983; Georgiev V.St. et al; 1993; Khaitov R.M., 1993; Kimball E. S., 1993; Janik J., 1993; Stevens G., 1993; Sosa A. et al., 1993] При поражении различными токсикантами доказана высокая эффективность тимогена (отравление дихлорэтаном, нитрилами, спиртами, ФОС) [Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., 1997; Германчук В.Г., 2000; Беликов В.Г., 2001], а также Т-активина (отравление хлорорганическими соединениями) [Вахидова Г.А. и соавт., 1990].

Сравнительная характеристика действия иммуностимуляторов на Т- и В-звено иммунитета [Осипова Л.О., 1990; Яковлев Г.М. и соавт., 1990; Хавинсон В.Х. и соавт., 1990; Гюллинг Э.В. и соавт., 1991; Земсков В.М., 1991; Петров Р.В., 1991; Ширинский В.С., Жук Е.А., 1991; 1994; Семина О.В. и соавт., 1993, 1995, 1997; Юшков В.В. и соавт., 1993; Утешев Б.С. и соавт., 1995; Ершов Ф.И., 1995; Невидимова Т.И. и соавт., 1995; Жук Е.А. и соавт., 1996; Старченко А.А. и соавт., 1996; Забродский П.Ф. и Киричук В.Ф., 1999] позволяет констатировать, что наиболее эффективными средствами при нарушении Т-звена иммунитета является тимоген и Т-активин [Таранов В.А., Короткова М.И., 1989; Вахидова Г.А. и соавт., 1990; Большаков и соавт., 1991; Борисова А.М. и соавт., 1991; Ханафиева и соавт., 1992; Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993; Машковский М.Д., 1993]. Т-активин способствует индукции γ -интерферона, который активирует ЕКК и восстанавливает постинтоксикационное нарушение их функции, а также индуцирует экспрессию рецепторов ИЛ-2 на их поверхности [Сухих Г.Т. и соавт., 1984]. Препарат оказывает существенное иммуностимулирующее влияние в широком диапазоне доз: от 0,001 до 5 мкг/кг [Большаков и соавт., 1991; Кирилличева Г.Б. и соавт., 1993]. Описаны свойства Т-активина увеличивать пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность Т-клеток [Шляхов Э.Н., Гылка В.В., 1989; Арион В.Я. и соавт., 1989; Стасий Е.Д. и соавт., 1990; Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф., 1991;]. Сравнительно недавно стало известно, что тимуснезависимый иммунный ответ на антигены 2-го класса, к которым относятся полисахариды бактериальных стенок и, в частности, Vi-Ag, обеспечивается взаимодействием В-лимфоцитов с, так называемыми, тимуснезависимыми Т-лимфоцитами ($T_H\delta$) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. Поэтому нами было предположено, что Т-активин способен стимулировать и тимуснезависимый гуморальный иммунный ответ, активируя $T_H\delta$. Без участия Т-клеток В-лимфоциты активируют только тимуснезависимые антигены 1-го класса, к

которым относятся В-клеточные митогены (например, продукт из растения фитолакки американской –PWM – pokeweed mitogen) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000].

В связи с вышеизложенными фактами, а также полученными нами экспериментальными данными, можно предположить, что применение Т-активина в дозе 5 мкг/кг в течение 3 сут способно восстановить нарушения физиологической регуляции иммунного гомеостаза, вызванные АП. Доза препарата для крыс и мышей обоснована данными литературы и вычислениями, исходя из высшей суточной дозы для человека [Рыболовлев Ю.Р., 1982; Машковский М.Д., 1993].

Применение после острого отравления атропином (0,5 ЛД₅₀), как препаратом с более выраженным иммуносупрессивным эффектом по сравнению с метацином, Т-активина в дозе 5 мкг/кг ежедневно в течение 3 сут восстанавливало основные показатели гуморального иммунного ответа, параметры Т-звена иммунитета и функцию ЕКК.

Проведенные эксперименты подтвердили наше предположение о возможности стимуляции Т-активином тимуснезависимого гуморального иммунного ответа на Vi-Ag. Следует отметить, что стимуляция Т-активином тимуснезависимого антителообразования при остром отравлении АП может быть связана с его действием на макрофаги [Таранов В.А., Короткова М.И., 1989], в результате которого они продуцируют ИЛ-1, являющийся помимо антигена фактором, участвующим в независимом от тимуса антителообразовании [Gillbert K. M. et al., 1985]

Таким образом, острая интоксикация АП (атропином и метацином) в условиях эксперимента на животных в сублетальных дозах вызывает супрессию основных гуморальных и клеточных иммунных реакций. При остром отравлении м-холиноблокаторами отмечается супрессия антителообразования преимущественно к тимусзависимому антигену более выраженная в продуктивной фазе иммуногенеза. Действие

атропиноподобных препаратов *in vitro* в концентрациях, составляющих 10^{-4} и 10^{-3} М, в прямой зависимости от концентрации уменьшало активность естественных клеток-киллеров спленоцитов крыс Вистар. В эквимольных концентрациях и эквивалентных дозах эффекты атропина и метацина практически не отличаются. Основным механизмом нарушения физиологической регуляции иммуногенеза при действии АП является блокирование м-холинорецепторов иммуноцитов и м-холинореактивных структур лимфоидных органов, приводящее к снижению миграции колониеобразующих единиц в селезенку; перераспределение лимфоцитов между органами системы иммунитета; нарушение кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования, редукции гуморального и клеточного иммунного ответа. Коррекция нарушений физиологической регуляции системы иммунитета при острой интоксикации АП достигается применением иммуностимулятора Т-активина.

ВЫВОДЫ

1. Острая интоксикация атропиноподобными препаратами (атропином и метацином) в условиях эксперимента на животных вызывает нарушение физиологических механизмов регуляции иммуногенеза, супрессию основных гуморальных (преимущественно тимусзависимых) и клеточных иммунных реакций. Коррекция нарушений физиологической регуляции системы иммунитета при острой интоксикации АП достигается применением иммуностимулятора Т-активина.

2. При действии атропиноподобных препаратов в дозах 0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ отмечается дозозависимое снижение числа КОЕс. При отравлении атропиноподобными препаратами в дозах 0,3 и 0,5 ЛД₅₀ через 1 сут отмечается прямо связанное с дозой увеличение лимфоцитов в тимусе и костном мозге и снижение этих клеток в селезенке и лимфатических лимфоузлах, а через 2 сут реализуются противоположные эффекты. Через 3 сут содержание лимфоцитов в лимфоидных органах восстанавливается до контрольного значения. Статистически значимые различия между действием атропина и метацина в эквивалентных дозах на содержание лимфоцитов в тимусе, селезенке, костном мозге, и лимфоузлах отсутствуют.

3. Под влиянием атропиноподобных препаратов происходит прямо связанная с дозой (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) редукция преимущественно тимусзависимого антителообразования. Действие АП более выражено в продуктивной фазе иммуногенеза (антителогенеза). Действие атропина по сравнению с метацином в эквивалентных дозах статистически значимо не отличается.

4. Острая интоксикация атропиноподобными препаратами (атропином и метацином) вызывает дозозависимое снижение функции Т-клеток, оцениваемой по реакции торможения миграции лейкоцитов, обеспечиваемой лимфокином воспаления; редукцию реакции ГЗТ в моделях, характеризующих как первичный, так и вторичный клеточный иммунный

ответ; супрессию активности преимущественно К-клеток селезенки по сравнению с клетками-киллерами тимуса, оцениваемую по антителозависимой клеточной цитотоксичности. Эффект атропина несущественно превышает действие метацина на исследованные реакции.

5. Острое отравление атропиноподобными препаратами (0,1; 0,3 и 0,5 ЛД₅₀) в прямой зависимости от дозы уменьшало активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) крыс Вистар через 1 сут. При максимальной дозе атропина и метацина редукция естественной цитотоксичности (ЕЦ) сохранялась до 3 сут. Действие атропиноподобных препаратов *in vitro* в концентрациях, составляющих 10^{-4} и 10^{-3} М, в прямой зависимости от дозы уменьшало активность ЕКК спленоцитов (ЕЦ спленоцитов) крыс Вистар. В эквимолярных концентрациях и эквилетальных дозах эффекты атропина и метацина практически не отличаются.

6. Применение после острого отравления атропином (0,5 ЛД₅₀), как препаратом с более выраженным иммуносупрессивным эффектом по сравнению с метацином, Т-активина в дозе 5 мкг/кг ежедневно в течение 3 сут восстанавливало основные показатели гуморального иммунного ответа, параметры Т-звена иммунитета и функцию ЕКК.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В эксперименте на животных наиболее информативными тестами для оценки иммунотоксичности м-холиноблокаторов являются: определение содержания лимфоцитов в тимусе и селезенке, числа антителообразующих клеток в селезенке, эффекта кооперации Т- и В-лимфоцитов *in vitro*, реакции гиперчувствительности замедленного типа, естественной и антителозависимой клеточной цитотоксичности.

2. После острого отравления м-холиноблокаторами формируется вторичное постинтоксикационное иммунодефицитное состояние, требующее применения средств профилактики и лечения, так как может приводить к возникновению инфекционных осложнений и заболеваний.

3. После острого отравления атропиноподобными препаратами для восстановления основных показателей гуморального иммунного ответа, параметров Т-звена иммунитета и функции естественных клеток-киллеров у больных необходимо применять Т-активин в терапевтической дозе (1-2 мкг/кг) ежедневно в течение 5-6 сут.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов В.В., Ширинский В.С., Лозовой В.П., Козлов В.А. Влияние ацетилхолина на синтез Ig G и пролиферацию лимфоцитов в культуре моноклеаров, выделенных от больных ревматоидным артритом, раком молочной железы и здоровых доноров //Иммунология.-1986.-N 6.-С. 83-86.
2. Адо А.Д. Некоторые вопросы нервной регуляции иммунных и аллергических реакций (об отношении холиновых и антигенсвязывающих рецепторов // Эксперим. и клин. фармакология.-1995.- N 3.-С.43-45.
3. Адо А.Д., Алексеева Т.А. О влиянии некоторых соединений холина на розеткообразование лимфоцитов у мышей //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1983.-Т. 46, N 7.-С. 75-77.
4. Адо А.Д., Алексеева Т.А., Авдеева Т.А. О взаимодействии холиновых и иммунных рецепторов В-лимфоцитов человека //Иммунология. - 1985а.- N 4.-С. 57-59.
5. Адо А.Д., Алексеева Т.А., Кравченко С.А. О взаимодействии иммунных и медиаторных рецепторов лимфоцитов мышей //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1985б.-Т. 99, N 5.-С. 513-515.
6. Адо А.Д., Гольдштейн М.М., Донцов В.И. Ацетилхолининдуцированная подвижность лимфоцитов интактных и сенсibilизированных мышей //Бюл. эксперим. биологии и медицины.-1983.-N 4, -С. 66-67.
7. Адо А.Д., Гольдштейн М.М., Донцов В.И. Влияние холино- и адреномиметических веществ на пролиферацию В-лимфоцитов мыши во время первичного иммунного ответа на белковый антиген //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1985г.-Т. 100, N 5.-С. 587-588.

8. Адо А.Д., Донцов В.И. Индукция подвижности В-лимфоцитов мыши ацетилхолином и веществами, увеличивающими уровень цГМФ //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1984.-Т. 47, N 2.-С. 177-178.
9. Адо А.Д., Донцов В.И., Гольдштейн М.М. Регуляция клеточного цикла В-лимфоцитов мыши веществами, увеличивающими уровень внутриклеточного цАМФ и цГМФ //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1985в.-Т. 99, N 4.-С. 455-458.
10. Адо А.Д., Гольдштейн М.М., Кравченко С.А., Фомина Т.И. М-холинорецепторы В-лимфоцитов мыши в процессе иммунного ответа //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1986.-Т. 101, N 5.-С. 587-588.
11. Адо А.Д., Гольдштейн М.М., Кравченко С.А., Фомина Т.И. Влияние антиглобулиновой сыворотки на экспрессию М-холинорецепторов лимфоцитов селезенки интактных и иммунизированных крыс // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1987.-Т. 104, N 9.-С. 325-327.
12. Александров В. Н. Гуморальный иммунный ответ после травмы различной тяжести // Пат. физиол. и эксперим. терапия. – 1983. - №4. – с. 70-72
13. Александров В. Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества: Учебное пособие.- 2-е изд., перераб и доп. - М.: Военное издательство, 1990.- 271 с..
14. Аничков С.В. Нейрофармакология: (Руководство)/ АМН СССР.-Л.: Медицина, 1982.- 384 с.
15. Арион В.Я. Иммунологически активные факторы тимуса // Медиаторы иммунной системы.- М.: ВИНТИ, 1981. – (Итоги науки и техники. Сер. Иммунология; Т.9).- с. 232.
16. Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф. Принципы иммунокорректирующей терапии препаратом тимуса Т-активином // Хирургия.- 1984.- №11.- с. 44-48.

17. Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф. Принципы иммунокорректирующей терапии препаратом тимуса Т-активин: А. с. 1673122 СССР, МКИ⁵ А 61 К 35/26; Красноярский мед. ин-т. - № 4452382/12; Заявл. 31.05.88; Оpubл. 30.09.91, Бюл. №32.
18. Арион В.Я., Караулов Ю.В., Хроменков Ю.И. и др. Изменения некоторых иммунологических и биохимических параметров Т-активина у безмикробных животных // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1987.-Т. 104, N 9. -С. 332-334.
19. Бадюгин И.С. Токсикология синтетических ядов.- Казань, 1974. – 190 с.
20. Бадюгин И.С., Забродский П.Ф., Поляруш В.П. и др. Военная токсикология, радиология и защита от оружия массового поражения.- М.: Военное издательство, 1992. – с. 132-150.
21. Бажин Е.Ф. Атропиновые комы. Л.: Медицина, 1984.
22. Базарный В.В., Ястребов А.П. К механизму иммуностропного эффекта аспарагиновой кислоты //Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1990.-Т. 110, N 11. -С. 468-471.
23. Базарный В.В., Ястребов А.П. Действие некоторых иммуномодуляторов на гемопоэз // Бюл. эксперим. биол. и мед. - 1993.-Т. 115, N 2. -С. 53-54.
24. Барышников И.И., Смирнова О.И. Влияние холинергических препаратов на миграционную активность лейкоцитов // Фармакол. и токсикол.- 1981.- №1. – с. 85-87.
25. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта: 2-е изд. – Л.: Медицина, 1963.– 235 с.
26. Беликов В.Г. Коррекция тимогеном нарушений физиологических механизмов регуляции иммуногенеза при остром отравлении токсичными химическими веществами // Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СГМУ. -2001.- 149 с.

27. Белокрылов Г.А., Молчанов И.В. Левамин и церебролизин как иммуностимуляторы //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1991.-N 2.-С. 165-166.
28. Белокрылов Г.А., Попов Н.В., Молчанова О.А. и др. Неоднозначность действия пептидов и составляющих их аминокислот на антителообразование и фагоцитарную активность нейтрофилов у мышей //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1991.-N 1.-С. 53-55.
29. Белокрылов Г.А., Попова О.Я., Сорочинская Е.И. Сходство иммунофагоцитозмодулирующих и антитоксических свойств дипептидов и составляющих их аминокислот //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1999.-Т.127, № 6.-С. 674-676.
30. Белокрылов Г. А., Хавинсон В. Х., Морозов В. Г. Влияние веществ полипептидной природы, выделенных из тимуса и коры головного мозга, на первичный иммунный ответ у мышей к тимусзависимому и тимуснезависимому антигену // Журн. Микробиол. и эпидемиол.-1980.-№3.- с. 97-99.
31. Большаков И.Н. Хороших Л.В., Арион В.Я., Лопухин Ю.М. Влияние тактивина на антителообразующие клетки селезенки // Бюл. эксперим. биол. и мед.-1991.- № 6.-С. 644-646.
32. Брюхин Г. В., Михайлова Г. И. Антителообразующая способность клеток селезенки потомства крыс с хроническими поражениями печени // Физиол. журн.-Киев.-1989.-Т 35.-№2.- с. 97-99.
33. Буяновский М.Д. (1952); цит по Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета.- М.: Медицина, 1985.-256 с.
34. Вахидова Г.А., Мельстер Е.Ш., Васильева Ф.В. Иммуномодулирующая терапия при заболеваниях органов дыхания у больных с наличием в крови хлорорганических соединений (ХОС)

- // Тез. 1 Всесознного конгресса по болезням органов дыхания.- Киев, 9-12 окт., 1990.- Киев, 1990.- С. 750.
35. Виноградов В.М., Гембицкий Е.В., Мухин Е.А., Фролов С.Ф. Фармакология (общая, частная и основы клинической) / Под ред. В.М.Виноградова.- 2 изд., доп. и перераб.- Л.:Изд-во ВМА, 1986– 515 с.
 36. Гембицкий Е.В., Кожемякин Л.А., Королюк А.М., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Оценка иммунного статуса организма в лечебных учреждениях Советской Армии и Военно-Морского Флота/ Метод. пособ.- 1987.- М.: Изд-во ЦВМУ МО СССР. – С.24-25.
 37. Германчук В.Г. Нарушения регуляции физиологических механизмов иммуногенеза при остром отравлении нитрилами // Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СВРХБЗ. -2000.- 121 с.
 38. Голиков С.Н. Профилактика и терапия отравлений фосфорорганическими инсектицидами. –М., 1968. – 168 с.
 39. Гольдберг Е. Д., Штернберг И. Б., Михайлова Т. Н. Состояние лимфоидной ткани при введении рубомицина С //Пат. физиол. и эксперим. терапия.–1972.-№2.-с. 67-686.
 40. Гонтова И.А., Громыхина Н.Ю., Козлов В.А. Механизмы влияния ацетилхолина на интенсивность гуморального иммунного ответа // Иммунология. .-1989.- N 4.-С. 52-55.
 41. Горизонтов П. Д. Система крови как основа резистентности и адаптации организма // Физиол. журн. – Киев.- 1981а.-Т 27.-№3.-с. 317-321.
 42. Горизонтов П. Д. Стресс. Система крови в механизме гомеостаза. Стрес и болезни. / В кн.: Гомеостаз. – М.:Медицина, 1981б.- С. 538-573.

43. Гущин Г.В., Шхинек Э.К. Участие холинергических механизмов в регуляции иммунологических реакций иммунитета // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1979.- №6. – с. 635-639.
44. Денисенко П.П. , Чередниченко Р.П. Взаимное влияние нервных и иммунных процессов // В кн.: Фармакологическая регуляция жизнедеятельности через холинергические системы: Тезисы докладов к конференции 23-25 сентября 1970 г. – Л., Ленинградский сан.-гиг. мед. институт.-1970. – с. 25.
45. Денисенко П.П., Чередниченко Р.П. Влияние синаптотропных препаратов на специфический и неспецифический гуморальный иммунитет // Фармакол. и токсикол.- 1974.- №1. – с. 66-70.
46. Долго-Сабуров В.Б., Шорохов Ю.А. Молекулярные механизмы функционирования мускариновых холинорецепторов // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Сер. Фармакология. Химиотерапевтические средства. - 1989. –Т. 19.- с. 156
47. Германчук В.Г. Нарушения регуляции физиологических механизмов иммуногенеза при остром отравлении нитрилами// Дисс. ... канд. мед. наук. – Саратов, СВРХБЗ. -2000.- 121 с.
48. Гордиенко С.М. Приемлемый для клинической практики метод оценки активности естественных антителозависимых киллерных клеток //Лаб. дело.-1983.-N 9.-С. 45-48.
49. Гордиенко С. М. Нерадиометрические методы оценки естественной цитотоксичности на эритроцитарные клетки-мишени // Иммунология.-1984.-№1.-с. 31-36.
50. Горизонтов П. Д. Система крови как основа резистентности и адаптации организма // Физиол. журн. – Киев.- 1981.-Т 27.-№3.-с. 317-321.

51. Горизонтов П. Д. Стресс. Система крови в механизме гомеостаза. Стресс и болезни. / В кн.: Гомеостаз. – М.: Медицина, 1981.- С. 538-573.
52. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. – Л.: Медицина, 1978.-296 с.
53. Гюллинг Э.В., Гоц Т.Ю., Гремяков В.А. Модуляция реактивности базофилов низкомолекулярными тимическими преператами //Докл. АН УССР.-1991.-N 6.-С. 174-175.
54. Денисенко П.П. Роль холинореактивных систем в регуляторных процессах.-М: Медицина, 1980.- 296 с.
55. Денисенко П.П. , Чередниченко Р.П. Холино- и адренергические системы как одно из звеньев нервной регуляции интенсивности реакций гуморального иммунитета / В кн.: Нейрогуморальная и фармакологическая коррекция иммунологических реакций в эксперименте и клинике. Л.: 1975. – с. 21-22.
56. Денисенко П.П. , Чередниченко Р.П. Состояние холино- и адренергических структур, циклические нуклеотиды и интенсивность иммунных реакций / В кн.: Тез. докладов 2 Всесоюзного симпозиума «Физиология иммунного гомеостаза».- Ростов- на –Дону.- 1977. – с. 60-61.
57. Дешевой Ю.Б. Ранняя реакция кроветворных органов на стресс-воздействие в зависимости от состояния периферических М-холинорецептивных систем// Пат. Физиол. и эксперим. терапия.- 1982. -№3.- с. 25-27
58. Дешевой Ю.Б. Горизонтов П.Д. Влияние препаратов, действующих преимущественно в области периферических М-холинореактивных систем на эозинофилы костного мозга // Бюл. эксперим. биол. и мед.-1982.-Т. 94, N 5.-С. 61-63.

59. Дешевой Ю.Б. Реакция эозинофилов костного мозга у интактных и адреналэктомизированных крыс на введение препаратов, действующих преимущественно в области периферических М-холинорецепторов // Бюл. эксперим. биол. и мед.-1984.- N 10.-С. 512. (Реф. рукописи, деп. в ВИНТИ 23.05.1984 г., № 3344-84 Деп).
60. Дешевой Ю.Б. Влияние ацетилхолина на миграцию зрелых эозинофилов из костного мозга в циркулирующую кровь // Пат. Физиол. и эксперим. терапия.- 1985. -№5.- с. 48-50.
61. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты : Пер. с англ. -М.: Мир, 1982.-Т 2.- 806 с.
62. Долгушин И.И., Эберт Л.Я., Лифшиц Р.И. Иммунология травмы. Свердловск, Изд-во Урал. Ун-та.- 1989.- 188 с.
63. Жук Е.А., Галенюк В.А. Тимоген в лечении сахарного диабета I типа// Тер. Архив.- 1996.-Т.68,№10.- С.12-14.
64. Ершов Ф.И. Иммуномодуляторы – новое поколение противовирусных средств // Эксперим. и клин. фармакол.-1995.- Т.58, N 2.2.-С. 74-78.
65. Забродский П. Ф. Иммуотропные свойства ацетилхолинэстеразных веществ// Проблемы охраны здоровья населения и защиты окружающей среды от химических вредных факторов. Тез. докл. I Всес. съезда токсикологов.-Ростов н/Д, 1986.-С. 342-343.
66. Забродский П. Ф. Механизмы иммуотропных эффектов фосфорорганических соединений //Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1993.-Т 116.-№8.-С. 181-183.
67. Забродский П.Ф. Влияние антидотных препаратов на иммунные реакции при острой интоксикации диметилдихлорвинилфосфатом //Эксперим. и клин. фармакология.-1995.-N 2.-С. 49-51.

68. Забродский П.Ф. Изменение антиинфекционной неспецифической резистентности организма под влиянием холинергической стимуляции. //Бюл. эксперим. биол. и мед.-1995.-N 8.-С. 164-167.
69. Забродский П.Ф., Мышкина А.К. Влияние холинергической стимуляции на формирование гиперчувствительности замедленного типа //Иммунология.-1989.-N 6.-С. 88.
70. Забродский П. Ф., Киричук В.Ф., Германчук В.Г. Роль антихолинэстеразного механизма в супрессии антителобразования при острой интоксикации фосфорорганическими соединениями этиленгликолем // Бюлл. exper. биол. и мед.-2001.-Т.131, №5.- С.551-553.
71. Забродский П. Ф., Киричук В. Ф., Грызунов А. В. Изменение неспецифической и иммунологической резистентности организма при остром отравлении дихлорэтаном //Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1997.-Т 123.-№1.-С. 51-53.
72. Забродский П. Ф. Иммуотропные свойства ядов и лекарственных средств.- Саратов : Изд. СГМУ, 1998.-213 с.
73. Забродский П. Ф., Киричук В. Ф. Изменение показателей неспецифической резистентности организма, гуморальных и клеточных иммунных реакций после острого отравления ацетонитрилом //Бюл. эксперим. биол. и мед. – 1998.-Т 125.-№5.-С. 548-550.
74. Забродский П. Ф. Влияние тимогена на постинтоксикационное иммунодефицитное состояние, вызванное острым отравлением ацетонитрилом //Эксперим. и клин. фармакол. – 1999.-Т 62.-№3.-С. 48-49.
75. Забродский П. Ф., Киричук В.Ф. Фармакологическая коррекция постинтоксикационных иммунодефицитных состояний // Докл. АВН.- 1999.-№2.-С.45-54.

76. Западнюк И.П., Западнюк В. И., Захария Е.А., Западнюк Б. Д. Лабораторные животные. Разведение, содержание , использование в эксперименте. – 3-е изд., перерабоб. и доп. - Киев, Вища кола, Головное изд-во.- 1983. – 345 с.
77. Земсков В.М. Неспецифические иммуностимуляторы //Успехи современной биологии.-1991.-Т. 111, N 5.-С. 707-721.
78. Зимин Ю. И., Ляхов В. Ф. Эффект кооперации в реакции зависимой от антител клеточной цитотоксичности // Иммунология.-1985.-№1.- с. 27-30.
79. Каган Ф.С. Токсикология фосфорорганических пестицидов.-М.: Медицина, 1977.-296 с.
80. Калинин А.Г., Борисова Л.С., Инжеваткина С.М. и др. Влияние веществ, увеличивающих внутриклеточное содержание цГМФ, на функциональную активность В-клеток у мышей //Иммунология.- 1988.-N 4.-С. 33-36.
81. Кирилличева Г.Б., Батурина И.Г., Митькин В.В. и др. Особенности влияния Т-активина на активность 5- нуклеотидазы макрофагов и уровень кортизола крови в зависимости от времени суток // Бюл. эксперим. биол. и мед. -1990.-Т. 110, N 11. -С. 468-471.
82. Климентова А.А. (1950) ; цит по [Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета.- М.: Медицина, 1985.-256 с.].
83. Корнева Е.А. Нарушение нейрогуморальной регуляции функций иммунной систем // Вест. АМН СССР.- 1990.- №11.- С. 36-42.
84. Крылов С.С., Ливанов Г.А., Петров А.П. и др. Клиническая токсикология лекарственных средств. Холинотропные препараты.- СПб.: Издательство «Лань», 1999. – 160 с.
85. Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета.- М.: Медицина, 1985.-256 с.
86. Лакин Г. Ф. Биометрия.- М.: Высш. шк., 1980.- 293 с.

87. Лоуренс Д.Р., Беннитт П.Н. Клиническая фармакология: в 2-х т. Т.2: Пер. с англ.- М.: Медицина, 1991.- 704 с.
88. Любимова Н.Б., Леонова Г.Н. Гормоны тимуса в лечении и профилактике флавивирусной инфекции в условиях эксперимента//Ж. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. –1995.- №5.- С.105-108.
89. Машковский М.Д. Лекарственные средства. Ч.1. Ч2. – 12-е изд., перераб. и доп.- М.: Медицина, 1993.- 736 с.- 688 с.
90. Маянский Д.Н. Система фагоцитов: методические проблемы //Патол. физиол. и эксперим. терапия.-1986, вып. 2.-С. 83-86.
91. Маркова И.В., Афанасьева В.В., Цыбульский Э.К., Неженцев М.В. Клиническая токсикология детей и подростков. – Санкт-Петербург, Интермедика, 1998. – 304 с.
92. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Характеристика и изучение механизма действия фактора тимуса (тимарина) // Докл. АН СССР. – 1978.- Т.240, № 4. – С. 339-346.
93. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем - цитомедины // Успехи совр. биологии.- 1983.- Т. 96, №3. – 1004-1007.
94. Михеева А.Н. Кардос В.С., Клионский А.Г. и др. О нормах ферментативной активности лейкоцитов //Лаб. дело.-1970.-N 1.-С. 5-7.
95. Невидимова Т.И. Психотропные эффекты тимогена // Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1995.- Т.119, №2.-С. 199-200.
96. Осипова Л.О. Исследование влияния иммуномодулятора тимогена на функцию «активных» розеткообразующих лимфоцитов in vitro у больных туберкулезом легких // Матер. 18 науч.-практич. конф. учен. и спец. КГИУВ/Киев. гос. ин-т усо- верш. врачей.-Киев, 1990.- С 3-4.

97. Парк Д. В. Биохимия чужеродных соединений.-М.: Медицина, 1973.
- 82 с.
98. Петров Р. В. Иммунология. – М.; Медицина, 1987.- 416 с.
99. Петров Р.В. Синтетические иммуномодуляторы .-М., 1991.-199с.
100. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Миграция стволовых клеток из экранированного костного мозга у неравномерно облученных мышей // Радиология.-1972.-N 1.-С. 69-76.
101. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Манько В. М., Михайлова А. А. Контроль и регуляция иммунного ответа. – М.: Медицина, 1981а. – 312 с.
102. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Сеславина Л.С. Подавление эндоколонизации селезенки у сублетально облученных мышей при трансплатации аллогенных лимфоидных клеток // Радиология.- 1970.-N 4.-С. 532-535.
103. Петров Р. В., Хаитов Р. М. Иммунологические механизмы клеточного гомеостаза // В кн. Гомеостаз. – М.: Медицина, 1981б.- с. 312-365.
104. Плещитый К.Д., Сухих Г.Г. Витамин А стимулирует иммунный ответ к тимусзависимым антигенам и повышает активность естественных киллеров //Докл. АН СССР.-1984.-Т. 278, N 4.-С. 1017-1019.
105. Плещитый К.Д., Сухих Г.Т. Экспериментальный анализ иммуностимулирующих свойств витамина А. // Бюл. экспер. биол. и медицины.– 1985.- Т 100.- №11.- с. 600-602.
106. Резников К.М., Винокурова О.В. Антиаритмические свойства тимогена // Эксперим. и клин. фармакология.-1994.-Т.57,N 6.-С. 31-33.
107. Ройт А. Основы иммунологии: Пер. с англ. М.: Мир, 1991.-327 с.

108. Рыболовлев Ю.А. Прогнозирование действия ксенобиотиков на человека // Фармакология и токсикология- 1982.- №1.-С. 110-114.
109. Семина О.В., Семенец В.И. Замена акцессорных Т-лимфоцитов синтетическими пептидами в процессе формирования селезеночных кроветворных колоний //Бюл. эксперим. биол. и мед.- 1993.- №2.-С. 298-299.
110. Семина О.В., Семенец В.И., Дейгин В.И. Стимуляция тимогеном (GW- дипептидом) восстановления кроветворения у облученных и подвергнутых действию цитостатика мышей//Иммунология.- 1997.-№1.- С.33-35.
111. Сепетлиев Д. Н. Статистические методы в научных медицинских исследованиях.-М.: Медицина, 1975.- 296 с.
112. Старченко А.А., Красковская С.В. Система индивидуальной психо- и иммунотерапии в нейроанестезиологической практике// Анестезиол. и реаниматол.- 1996. -№3.- С.53-57.
113. Стасий Е.Д., Балаболин И.И., Ботвиньева, Степаненко Р.Н. Иммуномодулирующая терапия при пищевой инфекции у детей // Иммунология. – 1990. - №5. – С. 45-48.
114. Страйер Л. Биохимия : Пер. с нем. –М.: Мир, 1985.-Т 2.- с. 71-82.
115. Судаков К.В. Основы физиологии функциональных систем.- М.: Медицина, 1983.- 272 с.
116. Сухих Г.Т., Малайцев В.В. Богданова И.М. Интерлейкин-2 и его возиожная роль в патогенезе стрессорных изменений иммунной системы //Докл. АМ СССР, 1984.-Т. 278, N 3.-С. 762-765.
117. Таранов В.А., Короткова М.Н. Действие Т-активина на макрофаги *in vitro* // Интерлейкины и другие медиаторы в клинической иммунологии. – М., 1989. – С. 56-60.

118. Тиунов Л. А. Вопросы общей промышленной токсикологии // Ферменты и яды.- Л.: Ак. наук СССР, 1961.- с. 168-185.
119. Тихонов В. Н. К оценке изменений массы внутренних органов животных в токсикологических исследованиях //Гигиена и санит. – 1981.-№7.-с. 58-59.
120. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. – М.: Медицина, 1975.- 295 с.
121. Утешев Б. С. О некоторых методологических вопросах скрининга иммуотропных средств // Фармак. и токсикол.- 1984.- №3.- с. 5-13.
122. Утешев Б.С., Сергеев А.С., Коростелев С.А. Анализ современных направлений в создании иммуотропных средств // Эксперим. и клин. фармакол.-1995.-Т.58, №3.- С.3-7.
123. Учитель И.А. (1951); цит по [Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета.- М.: Медицина, 1985.-256 с.].
124. Фримель Х., Брок Й. Основы иммунологии: Пер. с нем. –5-е изд. – М.: Мир, 1986.- 254 с.
125. Хавинсон В.Х, Морозов В.Г. Серый С.В. Иммунокорректирующая терапия тимогеном при заболеваниях и травмах// Взаимодействие нервной и иммунной систем. Тез. Докладов всесоюзного симпозиума (Оренбург, 28-30 августа 1990 г.- Л. – Ростов- на- Дону.- 1990,-С.163.
126. Фролов Б.А., Филиппов В.К., Меерсон Ф.З. Активирующее влияние стрессорного воздействия на формирование гиперчувствительности замедленного типа // Иммунология-1985.-N 2.-С. 39-41.
127. Фримель Х., Брок Й. Основы иммунологии: Пер. с нем. –5-е изд. – М.: Мир, 1986.- 254 с.

128. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Иммуномодулирующее действие фактора тимуса в патологии // Иммунология. – 1981. - № 5. – С. 28-31.
129. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Экспериментальное клиническое изучение нового иммуномодулирующего препарата - тималина // Воен.-мед. журн. –1982.-№ 5. – С. 37-39.
130. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология.- М.: Изд-во ВНИРО, 1995.- 219 с.
131. Хаитов Р. М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. – М.: Медицина, 2000.- 430 с.
132. Ханафиева И.В., Добржанская Р.С., Хусейнова Х.Х. Воздействие Т-активина и тималина на лейшманийную инфекцию в эксперименте // Докл. 5 Всес. Съезда протозоологов, Витебск, сент., 1992 // Цитология. – 1992. – Т. 34, N 4.-С. 158.
133. Хусинов А.А., Хайдарова Д.С., Гущин Г.В., Лесникова М.П. Нейроэндокринная система и специфические факторы иммунитета при отравлении пестицидами //Бюл. эксперим. биологии и мед.- 1991.-Т. 111, N 12.-С. 623-624.
134. Чейдо М.А., Идова Г.В., Папсуевич О.С. Участие низкомолекулярных пептидов и их аналогов в иммуномодуляции //Ин-т. физиол. СО АМН СССР.-Новосибирск, 1990.-12 с.-Деп. в ВИНТИ 27.07.9., N 4278-В90.
135. Чертков И.Л., Дерюга Е.И., Дризе Н.И. Примитивная стволовая кроветворная клетка// Вест. АМН СССР. –1990.- №9. С.35-37. 54. 55.
136. Ширинский В.С., Жук Е.А. Проблемы иммуностимулирующей терапии //Иммунология.-1991.-N 3.-С. 7-10.

137. Ширинский В.С., Жук Е.А. Проблемы фармакодинамики и фармакокинетики иммуностимулирующих препаратов //Иммунология.-1994.-N 6.-С. 27-29.
138. Ширшев С.В. // Зависимость внутриклеточного уровня цАМФ интактных спленоцитов от популяционного состава клеточной суспензии и активности циклооксигеназы // Бюл. эксперим. биол. и мед. -1998.- №6.- с. 666-669.
139. Шляхов Э. Н., Гылка В.В. Тактивин – иммуномодулирующий препарат тимуса // Здравоохранение (Кишинев).-1989.- С. 20-23.
140. Шпанько Е.А. (1956); цит по Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета.- М.: Медицина, 1985.-256 с.
141. Юшков В.В., Хавинсон В.Х. Выявление и анализ противовоспалительной активности иммуномодуляторов//Патол. физиол. и эксперим. терапия.-1993.-N 2.-С. 11-13.
142. Яковлев Г.М., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Современные представления о цитомединах и проблемы биорегулирующей терапии // Воен.-мед. журн. – 1987.- № 6. –С.37-40.
143. Яковлев Г.М., Новиков В.С., Хавинсон В.Х.//Резистентность, стресс, регуляция. Л., Наука, 1990.-237 с.
144. Яковлев Г.М., Хавинсон В.Х. Коррекция тимогеном стресс-индуцированных дисфункций иммунной системы//Стресс и иммунитет: Тез. Докл. Всес. Конф. «Стресс и иммунитет (психонейроиммунол.)», Ростов на Дону, 31 авг.-1 сент., 1989.-Л., 1989.-С. 54.
145. Costa L. G., Kaylor G., Murphy S.D. In vitro and in vivo modulation of cholinergic muscarinic receptors in rat lymphocytes and brain by cholinergic agents // Int. J. Immunofarmacol.- 1990.-Vol. 12, N 1.-P. 67-75.

146. Denning D. W., Webster A., David B. Detrimental effect of propylene glycol on natural killer cell and neutrophil function //J. Pharm. and Pharmacol.-1987.-Vol. 39, N 3.-P. 236-238.
147. Descotes J. Immunotoxicology of drugs and chemicals. – Amsterdam- -N. Y-. Oxford: Elsiver, 1986.- 400 p.
148. Descotes J., Mazue G. Immunotoxicology // Adv. Vet. Sci. a Comp. Med. –1987.- Vol. 31.- P. 95-119.
149. Desi I., Varga L., Farkas I. The effect of DDVP, on organophosphorus pesticide on the humoral and cell-mediated immunity of rabbits /Further studies in the assessment of toxic action //Arch. Toxicol.-1980.-Suppl. 4.-P. 171-174.
150. Desi I., Varga L. Immuntokologische Untersuchungen der Pestizide von hygienischen Standpunkt //Zbl. Pharm. Pharmakotherapie und Laboratoriumsdiagn.-1983.-Vol. 122, N 2 (22 Jahrestag Yes. Pharmakol. und Toxicol. DDR, Neubrandenburg, 2-4, Sept., 1982), P. 154-155.
151. Dhabhar F. S., Millerr A. H., Mc Even B. S., Spenser R. L. Stress – induced in blood leukocyte distribution: A role of adrenal steroid hormones // J. Immunol.-1996. – Vol.157.- No 4.- P. 1638-1644.
152. Domijanjanovic M., Vidakovic et al., Fhjstolski S. et al. The influence of acethycholinne upon lymphocyte activation // Acta biol. iugosl. C.-1989.- Vol. 25, N 3.-P. 238-243.
153. Durant S. In vivo effects of catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis// Cell Immunol. -1986.- Vol. 102, N 1. -P. 136-143.
154. Fergula J., Ashercon G. L., Becker E. L. The effect of organophosphorus inhibitors, p-nitrophenol and cytocholasin-B on cytotoxic killing of tumor cells and the effect of shaking //Immunol. - 1972.- Vol. 23.- No 4. - P. 577 - `590.

155. Galante P., Ardreana A., Perna P. et al. Decreased phagocytic and bactericidal activity of the hepatic reticuloendothelial system during chronic ethanol treatment and its restoration by levamisole //J. Reticuloendoth. Soc.-1982.-Vol. 32, N 2.-P. 179-186.
156. Garoroy M.R., Strom T.B., Kaliner M., Carpenter C.B. Antibody-dependant lymphocyte mediated cytotoxicity mechanism and modulation by cyclic nucleotides //Cell. Immunol.-1975.-Vol. 20, N 2.-P. 197-204.
157. Georgiev V.St., Albright J.E. Cytokines // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P.284-602.
158. Gilbert R.V., Hoffmann M.K. cAMP is essential signal in the induction of antibody production by B cells but inhibits helper function of T cells// J. Immunol.-1985.-Vol.135, №3.-P.2084-2089.
159. Gordon M.A., Cohen J.J., Wilson I.B. Muscarinic cholinergic receptors in murine lymphocytes: demonstration by direct binding lymphocytes //Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1975.-Vol. 76, N 6.-P. 2902-2904..
160. Grabczewska E., Lascowska-Bozek H., Maslinski M., Ryzewski J. Receptory muskarinowe na limfocytach ludzkich stymulowanych fitohemaglutynina //Reumatologia.-1990.-T. XXVIII, N 4.-P. 171-179.
161. Janik G. Kopp W.C. Levamisole-induced neopterin synthesis //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P.252-258.
162. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells //Science.- 1963.- Vol. 140.- No 4. - P. 405.
163. Khaitov R.M. Vaccines based on synthetic polyions and peptides//Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 788-802.

164. Kimball E.S. Experimental modulation of IL-1 production and cell surface molecule expression by levamisole //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P.259-268.
165. Kimber I. Chemical – Induced Hypersensitivity //In.: Exper. Immun.- Boca Raton, New York, London, Tokyo.- 1996.- P. 391-417.
166. Loose L.D. Immunotoxicology-1985 //Year Immunol.- 1985-1986.- Vol. 2.-Basel e.a., 1986.-P. 365-370.
167. Luster M. J., Blank J. A., Dean J. H. Molecular and cellular basis of chemically induced immunotoxicity //Annu. Rev. Pharmacol. and Toxicol.-Vol. 27.-Palo Alto, Calif.-1987.-P. 23-49.
168. Ludewig R. Principles of the generation of the application of toxicological data-examples from research and practice // In.: Top. Forensis and Anal. Toxicol. – Amsterdam et al.- 1984. –P. 69-79.
169. MacManus J.P., Bounton A.L., Whitefield J.F. et al. Acetylcholine-induced initiation of thymic lymphoblast DNA synthesis and proliferation //J. Cell. Physiol.-Vol. 85, N 2.-P. 321-330.
170. Marshak-Rothstein A., Fink P., Gridley T. et al. Properties and application of monoclonal antibodies directed against determinants of the Thy-1 locus // J.Immunol. -1979.-Vol.122.-P. 2491-2497.
171. Masini E., Fantozzi R., Conti A. et al. Mast cell heterogeneity in response to cholinergic stimulation //Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol.-1985.-Vol. 77, N 1-2.-P. 184-185.
172. Maslinski W. Cholinergic receptors of lymphocytes //Brain. Behav. And Immunol. -1989.- Vol.3, N 1.- P. 1-14.
173. Maslinski W, Grabczewska E., Bartgai T. Rysewski J. Muscarinic antagonist binding to intact rat thymocytes // Acta chem. scand. - 1990.-Vol. 44, N 2.-P. 147-151.

174. Maslinski W, Grabczewska E., Laskowska –Bozek H., Ruzewski H. Expression of muskarinic cholinergic receptors during T cell maturation in the thymus // Eur. J. Immunol. -1987.-Vol. 17, N 7.-P. 1059-1053.
175. Maslinski W., Krystyniak K., Grabczewska E. et al. Muscarinic acetylcholine receptors of rat lymphocytes //Biochim. biophys. Acta.-1983.-Vol. 758, N 1.-P. 93-97.
176. Maslinski W., Laskowska –Bozek H., Ruzewski H. Nicotinic receptors of rat lymphocytes during adjuvant polyarthritis // J. Neurosci. Res.-1992.- Vol.31, N 2.- P. 336-340.
177. Marx J.L. How killer cells kill their targets. //Science.-1986.-Vol. 231, N 4744.-P. 1367-1369.
178. Menard L. Rola-Pleszczynski M. Nicotine induces T-suppressor cell: modulation by the nicotinic antagonist d-tubocurine and myasthenic serum// Clin. Immunol. And Immunopathol. .-1987.- Vol. 44, N 1.-P. 107-113.
179. Minich E., Fefer A. Biologocal, response modifiers: subcombite report //Nat. Cancer Inst. Monograf. – 1983.-Vol. 63. – P. 1-252.
180. Moody-Corbert F., Brehm P. Acethylholine reduces rectification on thymus-derived macrophage cells in culture //Can. J. Phisiol. and Pharmacol.-1987.-Vol. 65, N 3.-P. 348-351.
181. Nogueira N. Intracellular mechanisms of killing /Immunobiol. Parasit. and Parasitic. Infec.-New York-London, 1984.-P. 53-69.
182. Pfeifer C., Murrey J., Madri J., Bottomly K. Selective activation of Th1- and Th2-like cells in vivo: Response to human collagen IV // Immunol. Rev. –1991.- Vol. 123, No 2. - P. 65-84.
183. Quliroz L., Oliveina L. Immunologic phagocytosis by macrophages: effect of cholinergic drugs and cyclic GMP //Rev. brasil. pes quesis med. biol.-1975.-Vol. 8, N 2.-P. 119-123.

184. Richman D.P., Arnason B.G.W. Nicotinic acetylcholine receptor: evidence for a functionally distinct receptor on human lymphocytes //Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1979.-Vol. 76, N 9.-P. 4632-4635.
185. Rinner I, Felsner P., Falus A. et al. Cholinergic signals to and from the immune system//Immunology Letters.-1995.-Vol. 44. -P. 217-220.
186. Rinner I, Schauenstein K. The parasympathic nervous system takes part in the immuno-neuroendocrine dialogue // J. of Neuroimmunology.-1991.-Vol. 34, N 2-3. -P. 165-172.
187. Rossi A.,Tria M.A., Baschieri S. et al. Cholinergic agonists selectively of induced proliferative responses in the mature subpopulation of murine thymocytes in the mature subpopulation of murine thymocytes //J. Neurosci. Res.-1989.-Vol. 24, N 3.-P. 369-373.
188. Shapiro H.M., Strom T.B. Electrophysiology of T lymphocyte cholinergic receptors// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-1980.-Vol. 77, N 1.-P. 4317-4321.
189. Sinha A.A., Guados C., Loo Kwok-Choy, Diener E. Function of accesser cells in B cell responses to thymus-independant antigenes // J. Immunol.-1987.-.-Vol. 138, N 12.-P. 4143-4149.
190. Sosa M., Sana A. Immunopharmacologic properties of inosine 5'-methyl monophosphate (MIMP) //Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 458-463.
191. Stevens G. Immunomodulation drugs: where and whither // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993.-Vol. 685. –P. 430-431.
192. Strom T.B., Sytkowski A.T., Carpenter C.B., Merrill J.P. Cholinergic augmentation of lymphocyte-mediated cytotoxicity. A study of the cholinergic receptor of cytotoxic T lymphocytes// Proc. Natl. Acad. Sci. USA.- 1974.-Vol. 71, N 4.-P. 1330-1333.

193. Techima H., Sogawa H., Navagava T. Chenges in T-cell subpopulations induced by autonomic neurotransmitters and hormone// Fufuoka acta med.-1991.-Vol. 82, N 7.-P. 428-436.
194. Thomas I.K., Imamura T. Immunosuppressive effect of an impurity of malathion: inhibition of murine side effect of an impurity of malathion inhibition of murine T and B lymphocyte responses by O,O,S-trimethyl phosphorothioate //Toxicol. and Appl. Pharmacol.-1986.-Vol. 83, N 3.-P. 456-464.
195. Tiefenbach B., Hennighauzen G., Lange P. Zum Mechanismus der akuten Wirkungen phosphororganischer Pestizide auf Las Immunsystem //Zbl. Pharm.-1983.-Bd. 122, H. 2.-S. 156.
196. Tiefenbach B., Lange P. Studies on the action of dimethoate on the immune system //Arch. Toxicol.-1980.- Suppl. 4.- P. 167-170.
197. Tiefenbach B., Wichner S. Dosisabhängigkeit und Mechanismus der acuten Wirkung von Methamidophos auf das Immunsystem der Maus //Z. gesamte Hyg. und Grenzdeb.-1985.-Bd. 31, N 4.-S. 228-231.
198. Tominaca K., Kinoshita Y., Hato F. et al. Effects of cholinergic agonists on the protein synthesis in a cultured thymic epithelial cell line //Cell. and Mol. Diel.-1989.-Vol. 35, N 6.-P. 679-686.
199. Till J. E., Mc Culloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of mouse bone marrow cells //Radiat. Res. - 1961.- Vol. 14.- No 2. - P. 213-222.
200. Witfield J.F., MacManus J.P. Franks D.J. et al. The possible variation by cyclic AMP of the stimulation of thymocyte proliferation by cyclic GMP // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. -1971. 1971.-Vol. 137, N. 2.- P. 453-457.
201. Woodin A.M., Wieneke A.A. The action of phosphonates on the leukocyte in relation to the mode of action of leucocidin. The properties

of the potassium pump and the inhibition of chemotaxis //Brit. J. Exp. Path.-1969.-Vol. 50, N 3.-P. 295.-308.