

П.Ф. Забродский, В.Г. Мандыч, А.М. Кадушкин, В.В.Серов, С.В. Балашов

ОСОБЕННОСТИ НАРУШЕНИЯ ФУНКЦИИ TH1- И TH2- ЛИМФОЦИТОВ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ РАЗЛИЧНЫМИ ТОКСИЧНЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

*Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической
защиты*

В экспериментах на крысах Wistar установлено, что острая интоксикация токсичными химическими веществами в дозе 0,75 LD₅₀ зарин, ипритом и метанолом снижает гуморальные и клеточные иммунные реакции и продукцию Th1- и Th2-лимфоцитами соответственно ИФН-γ и ИЛ-4. Зарин в большей степени уменьшает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-лимфоцитов, для метанола характерен противоположный эффект, а серистый иприт вызывает редукцию функции Th1- и Th2-лимфоцитов в равной степени.

Ключевые слова: зарин, сернистый иприт, метанол, Th1, Th2-лимфоциты, цитокины

Введение. Существуют основания полагать, что токсичные химические вещества (ТХВ), в частности, фосфорорганическое вещество зарин, сернистый иприт (СИ) и метанол могут обладать различным влиянием на функцию Th1, Th2-лимфоцитов, определяя особенности нарушения гуморального и клеточного иммунного ответа, приводящие к инфекционным осложнениям и заболеваниям [2,3,4,6].

Токсичные химикаты (ТХ) зарин, сернистый иприт (СИ) подлежат уничтожению согласно международным соглашениям на специальных химических объектах [1,5]. При этом не исключена возможность аварий на данных объектах, кроме того, существует вероятность использования ТХ в террористических и криминальных целях, что может привести к массовым поражениям людей. [5,11,12,14].

Метанол используется в качестве топлива для двигателей, в лабораторной практике, как растворитель в химической промышленности, для

денатурирования этилового спирта, входит в состав ряда антифризов. Отравления могут быть связаны с использованием его ошибочно вместо этилового спирта с целью опьянения (при этом возможны групповые и даже массовые интоксикации) [3,4].

Разработка наряду с антидотными средствами способов снижения поражения системы иммунитета различными ТХВ предполагает дальнейшее изучение их иммуотропных эффектов [2,4].

Целью исследования являлась оценка особенностей нарушения функции Th1, Th2-лимфоцитов (Т-хелперов первого и второго типов) и редукции продуцируемых ими цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4) в формирование супрессии гуморальных и клеточных иммунных реакций при остром отравлении различными токсикантами.

Материал и методы исследования. Эксперименты проводили на крысах Wistar обоего пола массой 180-240 г. ТХВ вводили подкожно в дозе 0,75 DL₅₀ однократно через 3 сут после иммунизации Т-зависимым антигеном. (DL₅₀ зарина, СИ и метанола составляли соответственно 0,21±0,02, 5,5±0,3 мг/кг и 9,1±1,2 г/кг). Зарин вводили подкожно в водном растворе, СИ подкожно – в растворе диметилсульфоксида, метанол – перорально). Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии [2]. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому (эритроцитам барана - ЭБ) антигену определяли на 5 сут по числу АОК в селезенке после острой интоксикации ТХ с одновременной внутрибрюшинной иммунизацией крыс данными антигенами в дозах 2·10⁸ клеток. В использованном тесте гуморальная иммунная реакция на введение ЭБ характеризует способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции В-лимфоцитами (плазматическими клетками) IgM [6,8]. АОК к ЭБ, синтезирующие IgG, определяли в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле на 8 сут [6,8]. Данные литературы позволяют полагать, что данный метод характеризует преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, обеспечивающих синтез IgG₁, составляющих около 70% общего числа

молекул данного этого класса [6]. Следует отметить, что Th1-лимфоциты обеспечивают возможность образования в этот период антителогенеза кроме IgM так же и IgG_{2a}, составляющих не более 20% от всех подклассов IgG [6,9].

Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК), существенное влияние на которую оказывает ИЛ-2, продуцируемый лимфоцитами Th1-типа [6,8,9], определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) через 4 сут после введения ТХВ спектрофотометрически. Формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), характеризующую функцию Th1-лимфоцитов [8], исследовали у животных по приросту массы стопы задней лапы в %. При этом крыс внутрибрюшинно иммунизировали 10^8 ЭБ через 30 мин после введения ТХВ. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч.

Для оценки изменения функции лимфоцитов Th1- и Th2-типа под влиянием ТХВ наряду с исследованием иммунных реакций определяли концентрацию продуцируемых ими цитокинов (соответственно ИФН- γ и ИЛ-4) [6,8,9] в периферической крови крыс через 4 и 7 сут после иммунизации методом иммуноферментного анализа по протоколам, указанным в инструкции по применению наборов (BioSource Int. ELISA Kits).

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

Результаты и их обсуждение. Под влиянием ТХВ (табл. 1) происходило снижение гуморального иммунного ответа через 4 сут к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов, по сравнению с контрольным уровнем под влиянием зарина, СИ и метанола соответственно в 2,25; 3,90 и 1,90 раза ($p < 0,05$), а через 7 сут отмечалось супрессия продукции IgG, отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов - соответственно в 1,52; 3,84 и 2,44 раза ($p < 0,05$). При действии зарина, СИ и метанола отмечалась также существенная редукция активности ЕКК, зависящая от функции лимфоцитов Th1-типа, соответственно в 2,29; 3,64 и 1,79 раза ($p < 0,05$) и реакции ГЗТ

(функция Th1-клеток и макрофагов) [6,8] - соответственно в 1,86; 3,71 и 1,53 раза ($p < 0,05$).

Таблица 1

Влияние острой интоксикации ТХВ (0,75 DL₅₀) на показатели системы иммунитета крыс (M $\pm$ m, n = 8-11)

Серии опытов	АОК к ЭБ (IgM), 10 ³	АОК к ЭБ (IgG), 10 ³	ЕЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	40,2 $\pm$ 3,7	17,3 $\pm$ 1,6	30,9 $\pm$ 3,1	36,0 $\pm$ 2,6
Зарин	17,8 $\pm$ 1,8*	11,4 $\pm$ 1,1*	13,5 $\pm$ 1,8*	19,3 $\pm$ 2,1*
Иприт	10,3 $\pm$ 0,9*	4,5 $\pm$ 0,8*	8,5 $\pm$ 0,9*	9,7 $\pm$ 1,0*
Метанол	21,2 $\pm$ 1,9*	7,1 $\pm$ 0,9*	17,3 $\pm$ 2,1*	23,5 $\pm$ 2,2*

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

Показатели, характеризующие различные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии зарина в среднем снижались соответственно в 2,13 и 1,52 раза, при отравлении СИ - в 3,75 и 3,84 раза соответственно, а метанолом - в 1,74 и 2,44 раза. Это свидетельствует о том, что под влиянием антихолинэстеразного токсиканта зарина в существенно большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов, при действии СИ - функция Th1- и Th2-лимфоцитов нарушается в равной степени, а метанол вызывает редукцию активности преимущественно лимфоцитов Th2-типа. При действии метанола иммунотоксический эффект, преимущественно связанный с продукцией IgG, обусловлен также и супрессией функции В-лимфоцитов вследствие нарушения обмена фолиевой кислоты [3,10].

Данное заключение подтверждается исследованием концентрации цитокинов в периферической крови крыс (табл. 2). При интоксикации зарином выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ и ИЛ-4 на 5 сут соответственно в 2,04 и 1,49 раза ($p < 0,05$), а на 8 сут - в 2,49 и 1,87 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Влияние подострой интоксикации ТХВ (0,75 DL₅₀) на содержание цитокинов в периферической крови крыс, пг/мл (M±m, n =6)

Серии опытов		ИФН-γ	ИЛ-4	ИФНγ/ИЛ-4
Контроль		845±71	116±12	7,3
Зарин	5	414±45*	78±8*	5,3
	8	341±35*	62±7*	5,5
Иприт	5	297±30*	43±5*	6,9
	8	243±25*	32±4*	7,6
Метанол	5	682±54*	61±6*	11,2
	8	658±58*	69±7*	9,5

Примечание: 5, 8 - время исследования после иммунизации, сут; * - $p<0,05$ по сравнению с контролем.

Иприт снижал содержание в периферической крови ИФН-γ и ИЛ-4 на 5 сут соответственно в 2,85 и 2,70 раза ($p<0,05$), а на 8 сут - в 3,48 и 3,62 раза ($p<0,05$) соответственно. Концентрация в крови ИФН-γ и ИЛ-4 на 5 сут после действия метанола уменьшалась в 1,24 и 1,90 раза ($p<0,05$) соответственно, а на 8 сут - в 1,28 и 1,68 раза ($p<0,05$) соответственно. При отравлении ипритом снижение цитокинов в крови было более выражено по сравнению с действием зарина и метанола, при этом эффект зарина в отношении ИФН-γ превышал супрессирующее действие метанола ($p<0,05$).

Полученные данные свидетельствуют о том, что при действии зарина концентрация ИФН-γ по сравнению с ИЛ-4 в крови снижается в большей степени, при интоксикации СИ содержание в крови ИФН-γ и ИЛ-4 уменьшается в равной степени. Метанол вызывал редукцию ИФН-γ по сравнению с ИЛ-4 в меньшей степени.

Как уже указывалось, ИФН-γ продуцируют Th1-лимфоциты, а ИЛ-4 – Th2-лимфоциты [6,8,9]. Увеличение соотношения ИФН-γ/ИЛ-4 характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th2-типа по сравнению с функцией Th1-клеток, а уменьшение данного соотношения свидетельствует о большей редукции активности лимфоцитов Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-клетками [7]. Нами установлено, что соотношение ИФН-γ/ИЛ-4 при

отравлении заринном составляло на 5 и 8 сут соответственно 5,3 и 5,5; при действии СИ - 6,9 и 7,6 соответственно, а при интоксикации метаном - 11,2 и 9,5 (контроль – 7,3). Это подтверждает результаты, свидетельствующие об особенностях поражения Th1- и Th2-клеток различными токсикантами. Вероятно, супрессирующий эффект зарина в отношении преимущественно Th1-лимфоцитов обусловлен активацией гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы [2] и редукцией функции данной субпопуляции Т-лимфоцитов, которые более чувствительны к кортикостероидам (КС) по сравнению с Th1-лимфоцитами [6]. Поражение СИ лимфоцитов Th1- и Th2-типа связано с его алкилирующим действием в отношении ДНК этих клеток [4]. Более выраженный супрессирующий эффект метанола в отношении иммунной реакции, сопряженной с функцией Th2-лимфоцитов, а также редукция продукции ими ИЛ-4, вероятно, обусловлены мембранотоксическим действием метанола, взаимодействия с сульфгидрильными и аминокислотными группами ферментов высокотоксичных продуктов биотрансформации метанола - формальдегида и муравьиной кислоты, ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования именно данной субпопуляции лимфоцитов [4,15]. Существуют основания полагать, что при отравлении метанолом роль КС, снижающих функцию преимущественно Th1-лимфоцитов, менее значима, чем при действии антихолинэстеразного ТХ зарина [13].

Выводы. 1. Острое действие ТХВ (0,75 DL₅₀) в продуктивный период иммуногенеза (через 3 сут после иммунизации) снижает гуморальные и клеточные иммунные реакции и продукцию Th1- и Th2-лимфоцитами соответственно ИФН- γ и ИЛ-4. 2. Острое отравление заринном в большей степени уменьшает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-лимфоцитов. 3. Иммунные реакции, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов, при острой интоксикации сернистым ипритом супрессируются в равной степени. 4. Острое действие метанола в дозе 0,75 DL₅₀ в продуктивный период иммуногенеза вызывает редукцию иммунных реакций, обусловленных

активностью Th1-лимфоцитов, в меньшей степени по сравнению с иммунным ответом, связанным с функцией Th2-клеток.

Список литературы

1. **Жуков В.Е., Клаучек В.В., Шкодич П.Е.** // *Токсикол. вестник.*-2002.-№5. - С. 31-35.
2. **Забродский П.Ф., Лим В.Г., Мальцева Г.М., Молотков А.О.** *Иммуотропные свойства холинергических веществ / Под редакцией П.Ф.Забродского.* – Саратов: Издательство «Научная книга», 2005. - 251 с.
3. **Забродский П.Ф., Лим В.Г., Трошкин Н.М.** // *Эксперим. и клин. фармакология.* – 2005.-Т. 68.-№4.-С. 46-48.
4. *Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова.* – М.: Медицина, 2002. – 608 с.
5. **Петров А.П., Софронов Г.А., Нечипоренко С.П., Сомин И.Н.** // *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. Хим. об-ва им Д.И. Менделеева).* - 2004. – Т. XLVIII, № 2. – С.110-116.
6. **Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.** *Иммунология. Пер. с англ.* - М.: Мир, 2000. – 582 с.
7. **Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др.** // *Бюл. эксперим. биол. и мед.*-2005.-Т. 140, № 12.-С. 622-624.
8. **Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г.** *Иммунология.* – 2-е изд., перераб. и доп. -М.: Медицина, 2002.- 536 с.
9. **Georgiev V.St., Albright J.E.** // *Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* – 1993. - Vol. 685. – P.284-602.
10. **Johlin F.C., Fortman C.S., Nghiem D.D., Tephly T.R.** // *Mol. Pharmacol.* 1987.- Vol. 31.- P. 557-561.
11. **Masuda N., Tahatsu M., Mjnnau Y., Ozawa T.** // *Lancet.*- 1995.- N 8962.- P. 1446-1447.
12. **McManus J., Huebner K. M.** // *Crit. Care Clin.*- 2005. Vol. 21, N 4. –P. 707-718.

13. **Pruett S.B., Fan R., Zheng Q. et al.** // *Toxicol. Sci.*- 2003. - Vol. 75, N 10. - P. 343 - 354.
14. **Saladi R.N., Smith E., Persaud A.N.** // *Clin. Exp. Dermatol.* –2006 – Vol. 1.-N 6. –P. 1-5.
15. **Tephly T.R.** // *Life Sci.* – 1991.- Vol. 48.- P. 1031-1041.

P. F. Zabrodsky, V.G. Mandych, V.V. Serov, S.V. Balashov

THE FEATURES OF DISRUPTION OF FUNCTION OF TH1- AND TH2-LYMPHOCYTES AT ACUTE POISONING OF TOXIC CHEMICALS

Institute for Radiation, Chemical and Biological Defense, Saratov, Russia

It was established in experiments on Wistar rats that acute poisoning of toxic chemicals of sarin, sulphur mustard and methanol in a single dose 0,75 LD₅₀ reduces humoral and cellular immune responses and decrease production of Th1- and Th2-lymphocytes of cytokines IFN γ and IL- 4. The sarin in the greater degree reduces immune responses bound with function of Th1-lymphocytes in comparison with the immune responses caused by activation of Th2-lymphocytes, the opposite effect is characteristic for methanol, and sulphur mustard invoked the suppression functions Th1- and Th2-lymphocytes equally.

Keywords: sarin, sulphur mustard, methanol, Th1, Th2-lymphocytes, cytokines