

П. Ф. ЗАБРОДСКИЙ

**Иммунотоксикология
фосфорорганических соединений**

Монография

Саратов
«САРАТОВСКИЙ ИСТОЧНИК»
2016

УДК 615.917

ББК 52.84

З–12

З 12 Забродский П.Ф. Иммунотоксикология фосфорорганических соединений. Саратов. Издательство «Саратовский источник». 2016. 289 с.

ISBN 978-5-91879-561-3

Монография посвящена рассмотрению токсических и иммунотоксических свойств фосфорорганических соединений (ФОС), в частности, боевых отравляющих веществ и инсектицидов. Описан открытый автором феномен, который реализуется вследствие «холинергического противовоспалительного пути (механизма)»: показано, что активация ацетилхолином $\alpha 7$ н-холинорецепторов ($\alpha 7$ nAChR) макрофагов, моноцитов и нейтрофилов при интоксикации ФОС приводит к подавлению продукции ими провоспалительных цитокинов, вызывающей снижение летальности животных при сепсисе и различных инфекционных процессах. Исследовано комбинированное действие различных ФОС с их антидотами на врожденный и адаптивный иммунитет. Проведена оценка иммунокорректирующих свойств Т-активина, миелопида и полиоксидония на иммунные реакции, сниженные интоксикацией ФОС. В монографии представлены данные литературы и собственных исследований о механизмах действия ФОС на систему иммунитета, а также способах коррекции постинтоксикационных нарушений иммунного гомеостаза.

Монография адресована токсикологам, иммунологам, фармакологам, биологам, физиологам, терапевтам и химикам.

Табл. 81. Ил. 36. Библиогр. 538 названий.

Рецензенты:

доктор медицинских наук, профессор Бородавко В.К.

доктор медицинских наук, профессор Сидорин Г.И.

ISBN 978-5-91879-561-3

© П.Ф. Забродский 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	9
Предисловие	10
	12
Глава 1. Основные положения иммунологии и иммунотоксикологии	
1.1. Доиммунные биологические факторы резистентности	13
1.1.1. Рецепторы распознавания «чужого»	13
1.1.2. Система комплемента	14
1.1.3. Белки острой фазы	16
1.1.4. Лизоцим	17
1.1.5. Тромбоцитарный катионный белок	17
1.1.6. Фагоцитоз	18
1.2. Иммунитет	19
1.2.1. Индукция иммунного ответа	21
1.2.2. Т-клеточные иммунные реакции	24
1.2.3. Гуморальный иммунный ответ	25
1.2.4. Естественные клетки-киллеры	26
1.2.5. Цитокины	27
	38
Глава 2. Экспериментальные методы оценки доиммунных факторов резистентности организма и иммунного статуса	
2.1. Интегральное состояние неспецифической резистентности Организма	38
2.2. Интегральное состояние неспецифической и иммунологической резистентности организма	38
2.3. Бактерицидная активность сыворотки крови	39
2.4. Сывороточная активность лизоцима	40
2.5. Тромбоцитарный катионный белок сыворотки крови	41
2.6. Комлементарная активность сыворотки крови	41
2.7. Определение фагоцитарной активности	41
2.8. Оценка функции стволовых кроветворных клеток	42
2.9. Определение лимфоидного индекса тимуса и селезенки	42
2.10. Оценка содержания лимфоцитов в органах системы Иммунитета	44
2.11. Исследование индукции макрофагами гуморального иммунного Ответа	44
2.12. Изучение кооперации Т- и В- лимфоцитов	44
2.13. Оценка гуморальных иммунных реакций	45
2.14. Исследование функции Т-лимфоцитов	46
2.15. Изучение формирования гиперчувствительности замедленного Типа	46
2.16. Исследование активности естественных клеток-киллеров	48

2.17. Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности	49
2.18. Оценка активности ацетилхолинэстеразы в Т-клетках	49
2.19. Определение показателей ПОЛ, концентрации кортикостерона и катехоламинов в крови	50
Глава 3. Фосфорорганические соединения	52
3.1. Общая характеристика фосфорорганических соединений	52
3.2. Основные токсикометрические характеристики антихолинэстеразных токсикантов и холиномиметиков	55
3.3. Токсикологические свойства хлорофоса	57
3.4. Токсикологические свойства диметилдихлорвинилфосфата	58
3.5. Токсикологическая характеристика метафоса	59
3.6. Свойства карбофоса	60
3.7. Токсикологическая характеристика фосфорорганических веществ, относящихся к боевым отравляющим веществам	62
	64
Глава 4. Изменение показателей неспецифической резистентности организма (врожденного иммунитета) под влиянием ФОС. Холинергический противовоспалительный путь.	
4.1. Неспецифическая резистентность организма (врожденный иммунитет). Система комплемента	64
4.2. Влияние ФОС на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов, клеточных иммунных реакций и концентрацию провоспалительных цитокинов в крови	66
4.3. Влияние ФОС на показатели летальности мышей при экспериментальной инфекции	74
4.4. Роль ацетилхолина в реализации «холинергического противовоспалительного пути (механизма)» при острой интоксикации ФОС	79
4.5. Роль м- и н-холинорецепторов в реализации холинергического противовоспалительного механизма в ранней фазе сепсиса	83
4.6. Влияние обратимого ингибирования холинэстеразы и никотина на летальность мышей и содержание в крови провоспалительных цитокинов в ранней фазе сепсиса	86
4.7. Значение $\alpha 7n$ -ацетилхолинорецепторов ($\alpha 7nAChR$) в реализации «холинергического противовоспалительного пути (механизма)» при острой интоксикации ФОС	89
4.8. Влияние активации $\alpha 7n$ -ацетилхолинорецепторов ($\alpha 7nAChR$) и антител к фактору некроза опухоли- α на летальность мышей и концентрацию провоспалительных цитокинов в крови в ранней фазе сепсиса	95

4.9. Роль альфа7- никотиновых ацетилхолиновых рецепторов В-клеток в реализации иммунотоксического эффекта фосфорорганических соединений	99
4.10. Сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка при хронической интоксикации ФОС	99
Глава 5. Характеристика иммуномодуляторов. Иммуномодулирующие свойства Т-активина, имунофана и полиоксидония	101
Глава 6. Влияние иммуномодуляторов на показатели врожденного иммунитета	107
6.1. Влияние иммуномодуляторов на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови при хронической интоксикации фосфорорганическими веществами	107
6.2. Фармакологическая коррекция сывороточной активности лизоцима при воздействии ФОС	109
6.3. Коррекция сывороточной активности тромбоцитарного катионного белка при хронической интоксикации ФОС	110
Резюме	112
Глава 7. Влияние ФОС на адаптивный иммунитет	113
7.1. Изменение содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета под влиянием ФОС	113
7.2. Изменение миграции колониеобразующих единиц в селезенку	117
7.3. Перераспределение лимфоцитов между органами системы иммунитета и циркулирующей кровью	118
7.4. Действие ФОС на гуморальные и клеточные иммунные реакции	122
7.5 Роль холинергической и цитокиновой регуляции функции т-лимфоцитов в формировании активации и редукции иммунных реакций при отравлениях разными дозами фосфорорганических соединений	145
7.6. Роль симпатико-адреналовой системы в супрессии иммунных реакций при отравлении ФОС	149
7.7. Специфические и неспецифические механизмы редукции иммунных реакций при интоксикации ФОС	151
7.8. Роль альфа7- никотиновых ацетилхолиновых рецепторов В-клеток в реализации иммунотоксического эффекта фосфорорганических соединений	158
7.9. Нарушение иммунного статуса у людей после отравления ФОИ	161
Резюме	163

Глава 8. Влияние комбинированного острого действия ФОС и их антидотов на показатели врожденного иммунитета	165
8.1. Фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов после острой интоксикации ФОС в комбинации с антидотами	165
8.2. Сывороточная активность лизоцима при остром отравлении ФОС в комбинации с их антидотами	168
8.3. Сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка при остром действии ФОС в сочетании с антидотами	170
Резюме	171
Глава 9. Влияние острого отравления фосфорорганическими соединениями в комбинации с их антидотами на систему иммунитета	173
9.1. Оценка содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови под влиянием ФОС в комбинации с их антидотами	173
9.2. Воздействие острого отравления фосфорорганическими соединениями в комбинации с их антидотами на клеточные иммунные реакции	177
9.2.1. Изучение функции Th1-лимфоцитов	177
9.2.2. Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности	179
9.2.3. Оценка активности ЕКК селезенки	181
9.3. Действие фосфорорганических соединений в комбинации с их антидотами на гуморальные иммунные реакции	184
9.3.1. Исследование Т-зависимой гуморальной иммунной реакции	184
9.3.2. Оценка влияния острого отравления ФОС в комбинации с антидотными средствами на число антителообразующих клеток в селезенке, синтезирующих IgG	187
9.3.3. Изучение тимуснезависимого антителообразования	188
Резюме	190
Глава 10. Изменение функции Th1- и Th2-лимфоцитов, кооперации Т- и В-лимфоцитов, концентрации в крови кортикостерона, активности ацетилхолинэстеразы лимфоцитов, состояния перекисного окисления липидов под влиянием ФОС в комбинации с антидотами	193
10.1. Исследование активности Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов под влиянием ФОС в комбинации с антидотами	193
10.2. Изменение функции лимфоцитов и содержания цитокинов в крови под влиянием атропина при остром отравлении малатионом	196
10.3. Оценка кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования ex vivo под влиянием ФОС в комбинации с антидотами	199
10.4. Изучение содержания кортикостерона в плазме крови	200

10.5. Исследование активности ацетилхолинэстеразы Т-клеток под влиянием ФОС в комбинации с антидотами	203
10.6. Изменение показателей перекисного окисления липидов после острого отравления ФОС в комбинации с антидотами	205
Резюме	207
	209
Глава 11. Коррекция нарушений иммунного статуса после острого действия ФОС в комбинации с антидотами	
11.1. Изменение иммунотоксичности фосфорорганических соединений в зависимости от характера их метаболизма при активация Р-450-зависимых монооксигеназ	209
11.2. Влияние иммуностимуляторов на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и показатели иммунного ответа при острой интоксикации ФОС с применением антидотов	212
11.3. Влияние полиоксидония на показатели системы иммунитета после острого отравления фосфорорганическим соединениями	216
Резюме	217
	219
Глава 12. Снижение клеточных иммунных реакций, продукции цитокинов после хронического воздействия фосфорорганических веществ. Фармакологическая коррекция	
12.1. Изучение функции Th1-лимфоцитов и оценка эффективности коррекции нарушений	219
12.2. Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности и эффективности иммунокоррекции	222
12.3. Оценка активности ЕКК селезенки. Фармакологическая коррекция	223
Резюме	226
Глава 13. Влияние хронической интоксикации ФОС на гуморальные иммунные реакции, кооперацию Т- и В-лимфоцитов и содержание цитокинов в крови. Иммунокоррекция	227
13.1. Исследование Т-зависимой гуморальной иммунной реакции содержание ИФН-γ в крови	227
13.2. Влияние хронического отравления ФОС на число антителообразующих клеток в селезенке, синтезирующих IgG, и на концентрацию ИЛ-4 в крови. Коррекция нарушений	230
13.3. Нарушение кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования ex vivo под влиянием ФОС и его коррекция	232
13.4. Изучение тимуснезависимого антителообразования. Фармакологическая коррекция нарушений	235
Резюме	237

Глава 14. Изменение функции Th1- и Th2-лимфоцитов, концентрации в крови кортикостерона, активности эстераз Т-лимфоцитов состояния перекисного окисления липидов после хронической интоксикации ФОС	239
14.1. Исследование активности Th1- и Th2-лимфоцитов и содержания цитокинов в крови после хронической интоксикации ФОС в течение 30 сут	239
14.2. Исследование активности Th1- и Th2-лимфоцитов и содержания цитокинов в крови после хронической интоксикации ФОС в течение 60 сут	241
14.3. Фармакологическая коррекция концентрации в крови цитокинов после хронической интоксикации ФОС	244
14.4. Изучение содержания кортикостерона в плазме крови	246
14.5. Исследование активности ацетилхолинэстеразы Т-клеток после хронической интоксикации ФОС	248
14.6. Изменение показателей антиоксидантной системы перекисного окисления липидов после хронического отравления ФОС. Коррекция нарушений	249
Резюме	251
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	253
Литература	257

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЗКЦ - антителозависимая клеточная цитотоксичность
АКТГ – адрено-кортикотропный гормон
АОК - антителообразующие клетки
АХЭ – ацетилхолинэстераза
БОВ – боевые отравляющие вещества
ГГНС - гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система
ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа
ДДВФ-диметилдихлорвинилфосфат
ЕКК - естественные клетки-киллеры
ЕЦ - естественная цитотоксичность
ИАН - индекс активности нейтрофилов
ИКК – иммунокомпетентные клетки
ИЛ-1 (2 и т.д.) - интерлейкин-1 (2 и т.д.)
К-клетки – клетки-киллеры (лимфоциты, определяющие АЗКЦ)
НРО – неспецифическая резистентность организма
ОВ- отравляющие вещества
ПЯЛ- полиморфноядерные лейкоциты
РНК – рибонуклеиновая кислота
Th0-, Th1-, Th2 – Т-лимфоциты- хелперы типа 0,1,2
ТКБ- тромбоцитарный катионный белок
ТХ- токсичные химикаты
ФМАН – фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов
ФОС - фосфорорганические соединения
ФОП - фосфорорганические пестициды
ФОВ – фосфорорганические отравляющие вещества
ХО – химическое оружие
ЭБ - эритроциты барана
ЭК- эритроциты кур
DL₅₀ - средняя смертельная доза, вызывающая смертельный исход у 50%
отравленных
Vi-антиген (Vi-Ag) - Т-независимый Vi - антиген брюшнотифозной
вакцины

ПРЕДИСЛОВИЕ

Исследование воздействия фосфорорганических соединений (ФОС) на гомеостаз иммунной системы, а также изучение возможностей коррекции его нарушений является одной из наиболее актуальных проблем токсикологии и иммунологии [Смирнов В.С и соавт., 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 2005, 2007, 2012]. Это определяется необходимостью уничтожения десятков тонн ФОС, относящимся к боевым отравляющим веществам, возможностью химически опасных аварий с поражением людей [Жуков В.Е. и соавт., 2002; Петров А.Н. и соавт. 2004], наличием и использованием антихолинэстеразных химических веществ в промышленности, сельском хозяйстве, медицине, быту, а также ростом отравлений ФОС, формирующих вторичные постинтоксикационные иммунодефицитные состояния [Хаитов Р.М. и соавт., 1995б; Агапов В.И. и соавт., 2004; Забродский П.Ф., 2002; Loose L.D., 1985; Luster M.J. et al., 1987; Sullivan J. B., 1989; Kimber I., 1996; Gunnell D., 2007; Salazar K.D., 2008; Patel V. et al., 2012].

Нельзя полностью исключить и возможность применения ХО, включающего ФОС, в террористических и криминальных целях [Петров А.Н. и соавт. 2004; Masuda N. et al, 1995; Morita H. et al., 1995], а также в локальных вооруженных конфликтах [Balali-Moode M. et at., 2005; McManus J., Huebner K. M., 2005; Amitai G. et al., 2006; Saladi R.N et al., 2006; Sellestrom A. et al., 2013]

Из ксенобиотиков, способных вызвать массовые отравления, ФОС наиболее опасны [Саватеев Н.В., Куценко С.А., 1993; Куценко С.А., 2004; Schans M. J. et al., 2004; Rosenberg Y.J., 2005]. Частота смертельных исходов у больных, получивших острую интоксикацию ФОС, в лечебных учреждениях составляет 20-25% [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Не вызывает сомнения, что одной из причин смерти отравленных при острых интоксикациях ФОС существенную роль играет снижение неспецифической резистентности организма (НРО) и депрессия иммунного статуса [Забродский П.Ф. и соавт., 2005; Descotes J., 1986; Salazar K.D., 2008]. Возможна также реализация аллергических, аутоиммунных и онкологических заболеваний [Хаитов Р. М. и соавт., 1995б; Забродский П. Ф., 2002, 2010; Kimber I., 1996; Rosenberg Y.J., 2005; Boers D. et al., 2008; Proskolil B.J. et al., 2008].

В настоящее время не исследованы особенности редукции факторов НРО и иммунных реакций в зависимости от особенностей токсикокинетики (характера метаболизма) различных ФОС [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], которые следует учитывать при назначении антидотов антихолинэстеразных соединений.

Известно, что после острого отравления ФОС, в частности, при групповых и массовых острых отравлениях, предусмотрено применение м-холиноблокаторов и реактиваторов холинэстеразы [Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Schans M. J. et al., 2004; Kuca K. et al, 2006]. При этом их коррегирующее влияние на нарушения иммунного

статуса ФОС практически не исследовано [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф. и соавт., 2005, 2015].

Результаты исследований, опубликованные различными авторами, зачастую противоречивы, не ясна роль механизмов, реализующихся на уровне органов и систем, а также при взаимодействии иммунокомпетентных клеток в присутствии ФОВ [Алимова М. Т. и соавт., 1991; Гущин Н.В. и соавт. 1991, Хусинов А.А. и соавт., 1991, Забродский П.Ф., 1993, 2007, 2010, 2015; Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006]. Практически не исследовано хроническое действие боевых ФОВ. В достаточной степени не определена роль Th1- и Th2-лимфоцитов, ацетилхолинэстеразы Т-клеток, кортикостерона, ПОЛ и интерлейкинов в реализации основных иммунных реакций после хронического действия ФОВ, в частности, зарина и вещества VX. Уточнение данных литературы и получение новых результатов исследований в отношении иммунотоксичности ФОВ позволит оценить существующие возможности иммунокоррекции, адекватные характеру нарушений регуляции иммуногенеза под влиянием ФОВ для профилактики постинтоксикационных инфекционных осложнений и заболеваний. Это позволит существенно снизить смертность больных вследствие осложнений при отравлении антихолинэстеразными соединениями в лечебных учреждениях.

Исходя из особенностей нарушений НРО (показателей врожденного иммунитета), гуморального и клеточного иммунного ответа при отравлениях ФОС в комбинации со средствами специфической терапии, следует изучить возможность применения эффективных иммуностимуляторов [Хаитов Р. М. и соавт., 1995а; 2002; 2006], которые позволят существенно снизить частоту постинтоксикационных осложнений и заболеваний, и, следовательно, уменьшить смертность пораженных ФОС.

Таким образом, учитывая широкое использование ФОС в промышленности и сельском хозяйстве, существующую вероятность поражения людей при аварийных ситуациях на объектах по уничтожению ФОС, возможность применения ряда ФОС при террористических актах, а также недостаточно изученные патогенетические особенности действия различных ФОС в сочетании со средствами специфической терапии на гомеостаз иммунной системы и возможность его коррекции, следует заключить, что данная проблема актуальна и важна как в теоретическом, так и в практическом отношении.

ГЛАВА 1. ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ИММУНОЛОГИИ И ИММУНОТОКСИКОЛОГИИ

Механизмы сохранения иммунного гомеостаза, иначе говоря, освобождение организма от повреждения собственных клеток и от инфекций включают неспецифические (неспецифическая резистентность организма - НРО) и специфические (иммунные) реакции. В англоязычной литературе термин «врожденный иммунитет» (innate immunity) соответствует используемому в русскоязычной литературе термину «доиммунные механизмы резистентности» [Хаитов Р.М. и соавт., 2002], или «неспецифическая резистентность организма - НРО» [Петров Р.В., 1987, 1991]. В связи с продолжающейся 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., 2002]. Новое определение понятия иммунного ответа характеризует его как «процесс взаимодействия антигена и организма, распознавания поврежденных патогеном клеток и тканей лимфоцитами с целью деструкции и выведения их из организма» [Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Ряд авторов считают понятие «иммунный гомеостаз» неприемлемым в связи с тем обстоятельством, что система иммунитета постоянно находится в изменении, обусловленном влиянием антигенных, физических и других факторов. Это, безусловно, так, но существуют такие состояния иммунной системы, которые вполне можно охарактеризовать, как патологические. Не вызывает сомнения, что патология иммунной системы – первичные и вторичные иммунодефицитные состояния – это состояния дисфункции системы иммунитета, которое можно определить, как нарушение иммунного гомеостаза. Иммунный ответ тесно связан с доиммунными механизмы резистентности. Это обусловлено участием системы фагоцитоза (моноцитарно-макрофагальной системы - ММС), системы комплемента, лизоцима, эозинофильной цитотоксичности и других факторов в иммунном ответе, первой стадией которого является доиммунное воспаление. Доиммунные механизмы резистентности определяется несколькими факторами защиты организма, к которым относятся биологические барьеры (кожные и слизистые оболочки), микробицидные экзосекреты (соляная кислота желудка, ферменты кишечника, бактерицидные компоненты слюны, гидролитические ферменты, лактопероксидаза, лактоферрин), сосудистые реакции (локальный отек), белки острой фазы (С-реактивный белок, маннансвязывающий лектин), доиммунный фагоцитоз. Факторами НРО являются также бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК), лизоцим, комплемент, тромбоцитарный катионный белок (β -лизин), система пропердина, интерфероны, а также эндогенные пептиды-антибиотики. Ментальная поведенческая защита (правила асептика и антисептики, защита от переохлаждения организма, исключение контактов с инфицированными

лицами т.п.).

Важную роль в обеспечении НРО играют нервная и эндокринная системы, а также пассивные механизмы защиты, определяемые генетическим контролем синтеза клеточных структур и т.п. [Петров Р.В., 1987; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Система иммунитета – это в первую очередь лимфоцитарный иммунитет, который обеспечивает иммунологическую защиту и определяет реализацию таких форм специфических реакций, как синтез иммуноглобулинов, формирование различных видов гиперчувствительности, иммунологической памяти, иммунологической толерантности, идиотип-антиидиотипических взаимодействий [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

1.1. Доиммунные биологические факторы резистентности

1.1.1. Рецепторы распознавания «чужого»

Рецепторы распознавания «чужого» – это первичные рецепторы для патогенов PRR (pattern recognition receptors – рецепторы, распознающие «картинку» (узор) на поверхности патогена) и Toll (в переводе с английского – звон колокольчика у входных дверей). При попадании патогена (в частности, микроорганизмов) в организм они могут быть инактивированы доиммунными биологическими механизмами резистентности. Если данная система не справляется с патогеном, включаются механизмы лимфоцитарного иммунитета. Для реакции организма на патоген должна поступить информация для реализации процессов доиммунного воспаления. Эту информацию распознавания клетки доиммунной резистентности получают при помощи двух типов рецепторов реакциями [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Diamond G., 2000, Holgate S.T., 2000, Medzhitov R., 2000, Bals R., 2004].

Первый тип – растворимые рецепторы для патогенов PRR. Эти белки распознают микроорганизмы и продукты их жизнедеятельности. Соединясь с патогеном одним концом рецептор PRR другим «хвостом» связывается со специальными рецепторами фагоцитов, что обеспечивает передачу информации о патогене из раствора в клетки доиммунного воспаления (доиммунных механизмов защиты). На поверхности микроорганизмов присутствуют повторяющиеся карбогидратные и липидные структуры, которых нет на клетках организма хозяина. По ним и распознается микробная клетка. Для распознавания микробных структур на клетках млекопитающих имеются 4 растворимые молекулы, являющиеся рецепторами для микробных структур (MBL –маннансвязывающий лектин; CRP – С-реактивный протеин; LBP – липолисахаридсвязывающий липид; C1g – компонент системы комплемента [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Medzhitov R., 2000, Bals R., 2004].

Второго типа Toll-рецепторы встроены во внешнюю мембрану

дендритных клеток и макрофагов и обеспечивают либо проведение сигналов о патогенах в клетку, либо сами непосредственно связывают продукты патогенов. Рецепторы Toll открыты в процессе работ с дрозофилами в 1985-1988 годах С. Nusselein-Vollhardt и К.В. Anderson и соавторами и не имели отношения к иммунитету. В последующем в 1991-1995 годах гомологичные сигнальные последовательности в цитоплазматических участках Toll-рецепторов были обнаружены у млекопитающих в цитоплазматическом участке рецептора для ИЛ-1 и получили название TIR (Toll/interleukin-1 receptor) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Diamond G., 2000, , Bals R., 2004].

Рецепторы PRR и Toll являются носителями эволюционной памяти многоклеточных о том, что «не свое является чужим». У человека по завершении программы «Геном человека» нашли 10 гомологичных (аналогичных) кодирующих последовательностей нуклеотидов и соответствующих Toll-подобных белков, которые получили название TLR (Toll-like receptors). Эти рецепторы выявлены на дендритных клетках и макрофагах и имеют в зависимости от клетки хозяина и особенностей их реакции на различные микроорганизмы следующие варианты: TLR-2, TLR-4, TLR-7, TLR-9, [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Holgate S.T., 2000, Bals R., 2004]. Активация TLR приводит к инициации в клетке фактора транскрипции NFκB с последующей экспрессией продуктов генов противовоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли-α – TNFα. или ФНОα), ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и костимуляторы молекул для выполнения дендритными клетками и макрофагами антигенпредставляющей функции для Т-лимфоцитов (начало развития лимфоцитарного иммунного ответа) [Fleisher T.A., 2004, Reljic R., 2005].

Активация «доиммунных» рецепторов для патогенов приводит к развитию локальных сосудистых реакций, управляемых медиаторами дегранулирующих тучных клеток (гистамином, ФНОα) и ферментными каскадами, запускаемыми активированным травмой и инфекцией эндотелием (кининовая система и система коагуляции), в результате которых наступает эксудация в ткани белков сыворотки крови, в том числе опсонинов; фагоцитоз патогена и его переваривание; хемотаксис в очаг нейтрофилов, моноцитов и других лейкоцитов; индукция биосинтеза в нейтрофилах антибактериальных пептидов (α- и β-дифензинов); биосинтез цитокинов доиммунного воспаления, обеспечивающих развитие лимфоцитарного иммунного ответа) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Robert C., Kupper T.S., 1999, Delves P.J., Roitt I.M., 2000, Moore B.B. et al., 2001, Reljic R. et al., 2005].

1.1.2. Система комплемента

Комплемент был открыт в начале века Jules Bordet вскоре после открытия антител. Комплемент представлял собой феномен присутствия в сыворотке крови «чего-то», что инактивируется прогреванием сыворотки крови при 56 °С, опсонировывает бактерии для фагоцитоза, содействует лизису бактерий в присутствии антибактериальных антител. Этот фактор дополнял антитела для реализации лизиса бактерий и активации фагоцитоза бактерий

(to complement – дополнить).

В дальнейшем установили, что комплемент представляет собой сложную биологическую систему из 20 компонентов, активация которой может иметь два основных последствия: необратимое повреждение мембран чужеродных клеток и инициацию специфических функций иммуноцитов. Компоненты комплемента C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 существуют в плазме в неактивной форме и активируются в строгой последовательности (каскадный механизм). Известны два пути активации комплемента - классический, запускаемый реакцией антиген-антитело, и альтернативный (неспецифический). Система комплемента играет важную роль в защите организма от инфекции, принимая участие в неспецифической и иммунологической резистентности организма [Кульберг А.Я., 1986; Осипов С.Г., Титов В.Н., 1984; Kondo M. et al., 1986, Ройт и соавт., 2000, Хаитов В.М. и соавт., 2000]. Разносторонняя биологическая активность комплемента обеспечивает высвобождение гистамина и других вазоактивных аминов, стимуляцию окислительного метаболизма, активацию внутриклеточных процессов, инициацию направленной миграции лейкоцитов, антителозависимую клеточную цитотоксичность, потенцирование фагоцитоза, модуляцию иммунных реакций, лизис бактерий и вирусов. Бактерии уничтожаются либо в результате прямого литического действия, либо путем фиксации на их поверхности фрагментов комплемента, которые распознаются рецепторами фагоцитов. Опухолевые клетки лизируются комплементом при активации классического пути антителами, а в ряде случаев – по альтернативному механизму. Существует еще и лектиновый путь активации комплемента.

Различные фрагменты 3-го компонента комплемента (C3) оказывают селективное действие на разные субпопуляции лимфоцитов и могут моделировать иммунный ответ на многих уровнях, включая рециркуляцию, переработку антигена, пролиферацию и дифференцировку клеток [Петров Р.В., 1987; Ройт А., 1991; Kondo M. et al., 1986].

Компонент комплемента C1g осуществляет связывание с комплексом антиген-антитело, C4b и C3b – связывание с мембраной бактерий и опсонизацию к фагоцитозу; C1r, C1s, C2b, B_d, D – являются протеазами, активирующими другие компоненты системы путем расщепления, медиаторы воспаления – C5a, C3a; C5b, C6, C7, C8, C9 - протеины, перфорирующие мембрану клетки-мишени; CR1, CR2, CR3; CR4, C1gR – рецепторы для белков комплемента на клетках организма; Clinh, C4bp, CR1, MCP, DAF, H, I, P, CD59 – ингибиторы активации и блокаторы активности. Клеточные рецепторы для компонентов комплемента экспрессированы на моноцитах, макрофагах, ПЯЛ, В-лимфоцитах, фолликулярных дендритных клетках, эритроцитах, тромбоцитах, тучных клетках и эндотелии сосудов. Соединение компонентов комплемента с рецепторами клеток вызывает реализацию различных реакций: опсонированный фагоцитоз, активацию В-лимфоцитов, транспорт иммунных комплексов на эритроцитах, активация макрофагов, дегрануляция и активация тучных клеток [Кульберг А.Я., 1986; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Данные литературы свидетельствуют, что ряд компонентов системы комплемента обладают эстеразной активностью [Кульберг А.Я., 1986; Becker E.Z. et al., 1956, 1964, 1966, 1967, 1971, 1976]. Антихолинэстеразные токсиканты, в частности ФОВ, а также хлорированные углеводороды способны ее существенно снижать [Тиунов Л.А., 1990; Забродский П.Ф. и соавт., 1997; 2003, 2004б], вызывая таким образом редукцию системы комплемента. Можно предположить, что слабо выраженным влиянием на ферменты системы комплемента могут обладать метаболиты спиртов и другие соединения.

1.1.3. Белки острой фазы

Белки острой фазы (БОФ) – С-реактивный протеин (CRP), маннансвязывающий лектин, фибриноген, сурфактанты SP-A, SP-D – являются растворимыми рецепторами для патогенов. Концентрация этих белков существенно возрастает при патологических процессах, затрагивающих весь организм в целом. Название С-реактивный протеин (CRP) происходит из наблюдения, что этот белок связывает стафилококков группы С. Однако этот белок способен связывать и другие бактерии и отправлять их на фагоцитам для поглощения и переваривания (связывание с белком для поглощения клеткой – фагоцитом называется опсонизацией (от лат. *orsonen* – делающий вкусным). Растворимые белки, связывающие одним концом (рецептором) микроб, а другим – фагоцит, называют опсонинами.

CRP – петраксин – белок, сформированный из 5 субъединиц. CRP имеет химическое сродство к фосфорилхолину, входящему в состав клеточных мембран бактерий и грибов. С фосфорилхолином, входящим в состав фосфолипидов, мембран клеток млекопитающих С-реактивный протеин не связывается. CRP способен, кроме опсонизации микроорганизмов, активировать систему комплемента по классическому пути (связывание с C1g). При этом С-реактивный протеин, будучи иммуноглобулином лишенным вариабельности, действует на иной рецептор молекулы C1g в отличие от специфических иммуноглобулинов.

Маннансвязывающий лектин (МСЛ) относится к семейству коллектинов – кальцийзависимых сахарсвязывающих протеинов (лектины – белки, связывающие с высокой аффинностью углеводы). МСЛ опсонизируют микробы для фагоцитоза моноцитами, которые от отличие от более зрелых макрофагов еще не экспрессируют собственный рецептор для маннозы. Поверхностные углеводы млекопитающих «экранированы» углеводородно-белковыми соединениями и не способны взаимодействовать с МСЛ. Маннансвязывающий лектин по вторичной структуре и по функции похож на молекулу C1g и способен активировать протеазы, инициируя каскад комплемента (расщепляет C4 и C2). Этот путь активации системы комплемента называется лектиновым.

Сурфактантные протеины легких SP-A, SP-D (surfactant protein A, D) имеют, вероятно, существенное значение в опсонизации легочного патогена

одноклеточного гриба *Pneumocystis carinii*.

Действие токсикантов на белки острой фазы практически не описано. Можно полагать, что ряд токсикантов способны взаимодействовать с БОФ. Однако вряд ли следует ожидать существенного изменения при этом влияния при доиммунных механизмов резистентности. Можно предположить возможность повреждения собственных тканей организма в результате взаимодействия ядов с «экранированными» поверхностными углеводами млекопитающих вследствие повреждения углеводородно-белковых соединений «экрана». Существуют основания считать возможным взаимодействие антихолинэстеразных токсичных химикатов с маннансвязывающим лектином по вторичной структуре и по функции похожим на C1g.

1.1.4. Лизоцим

Лизоцим (мурамидаза) - один из важных факторов неспецифической защиты организма. Он был открыт в 1909 г. П.К. Лащенко и изучен в 1922 г. А.Флемингом. Это термостабильный кристаллический белок типа муколитического энзима с молекулярной массой от 10000 до 25000 Д. Содержится во многих секретах, жидкостях и тканях [Диксон М., Уэбб Э., 1982]. Ферментативная специфичность лизоцима заключается в разрушении связи между N-ацетилмураминовой кислотой и N-ацетилглюкозамином в мукополисахариде, образующем оболочку многочисленных микроорганизмов, особенно грамположительных. Образующиеся гликопептиды обладают адьювантной активностью, стимулируют продукцию антител, повышают митотическую активность иммуноцитов, индуцируют гиперчувствительность замедленного типа. Источником лизоцима являются нейтрофильные гранулоциты и моноциты [О.В.Бухарин и Васильев Н.В., 1974; Гембицкий Е.В. и соавт., 1987]. Некоторые иммунологические реакции связаны с активностью лизоцима. Так, комплекс "IgA-антиген" проявляет антибактериальную и нейтрализующую активность после активации комплементом только в присутствии мурамидазы [Nouragargh S., Holt J.R.S., 1986].

Использование показателя лизоцимной активности для оценки действия ксенобиотиков на организм свидетельствует о высокой чувствительности данного теста [Денисенко П.П., 1980; Забродский П. Ф., 1998, 2000; Германчук В.Г., 2000].

1.1.5. Тромбоцитарный катионный белок

Одним из факторов сохранения и поддержания неспецифической резистентности организма является тромбоцитарный катионный белок (ТКБ) сыворотки крови, ранее известный как β -лизин [Бухарин О. В и соавт., 1977; 1985; 1998]. β -лизин – бактерицидное вещество сыворотки крови, избирательно активное в отношении грамположительных микроорганизмов и

спорообразующих бацилл. Открыт в 1886 г. G. Nuttal и изучен в 1926 г. A. Pettersson, назван β -лизином в отличие от α -лизина (комплемента). β -лизин обнаружен в сыворотке крови, слюне, секрете слезных желез и других жидкостях организма.

Источником ТБК являются тромбоциты. Механизм действия ТБК обусловлен изменением проницаемости мембран микроорганизмов и блокадой их окислительного метаболизма. Метод определения активности ТБК основан на избирательной чувствительности к его бактерицидному действию индикаторной культуры - *B. subtilis*.

1.1.6. Фагоцитоз

Фагоцитоз был открыт И.И. Мечниковым в 1882 году. Процесс фагоцитоза осуществляется микрофагами (гранулоцитами) и макрофагами (моноцитами крови, клетками пульпы селезенки, эндотелия кровеносных сосудов, полибластами, гистиоцитами и др.) [Хаитов Р.М., 2002; Solberg C. O., 1984].

В настоящее время фагоцитоз рассматривается как сложный многоступенчатый процесс, начинающийся с захвата фагоцитом чужеродной субстанции и кончающийся ее перевариванием (хемотаксис; адгезия; пиноцитоз; формирование фагосомы; слияние фагосомы с гранулами цитоплазмы, приводящее к активированию гидролаз, пироксидаз, протеиназ; гибель и переваривание объекта фагоцитоза, выброс продуктов деградации) [Хаитов Р.Я., Пинегин Б.В., 1995; Hong R., 1984].

Фагоцитоз подразделяется на неиммунный и иммунный (в случае наличия информации - антител к антигенам клетки мишени). Фагоцитоз может быть завершенным и незавершенным.

Помимо действия ферментов уничтожение чужеродной клетки может осуществляться путем "дыхательного" (кислородного) взрыва [Nogueira N., 1984]. В настоящее время получены данные, свидетельствующие о том, что в фагоцитарной реакции активное участие принимает радикал оксида азота ($\text{NO}^\cdot$), НАДФ-Н-оксидазы, супероксиддисмутаза, перекись водорода, супероксид анион, синглетный кислород, радикал гидроксила, гипохлорид. Агрессивные окислители работают внутри клетки, а на определенных этапах воспалительной реакции секретируются во внеклеточную среду. Макрофаги продуцируют ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12 и $\text{TNF-}\alpha$ (α -фактор некроза опухоли), простагландины, лейкотриен B_4 (LTB_4), фактор, активирующий тромбоциты. Нейтрофилы синтезируют и выделяют в кровь $\text{TNF-}\alpha$ и ИЛ-12, а также хемокин ИЛ-8 [Хаитов Р. М. и соавт., 2000].

Функция макрофагов включает не только фагоцитоз, но и представление переработанного (модифицированного) в лизосомах антигена Т-лимфоцитам. Взаимодействие макрофагов, реэкспрессирующих в модифицированном виде антиген на клеточной мембране, Т- и В-клеток обеспечивает синтез антител на тимусзависимые антигены. Макрофаги секретируют лизоцим, компоненты комплемента (C1 , C2 , C3 , C4 , C5 , C6 ,

фактор В), интерферон, эстеразы и пр.

Действие токсикантов на фагоцитоз изучено недостаточно [Забродский П.Ф., 1998; Luster M.J. et al., 1987]. При этом, как правило, отмечается снижение функции макрофагов и нейтрофилов. Однако в ряде случаев отмечается кратковременная активация фагоцитарной активности [Шубик В. М., 1976; Забродский П.Ф., 1998]. Кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита оценивают чаще всего в НСТ-тесте (тест восстановления нитросинего тетразолия – НСТ, основанный на способности поглощенного фагоцитом растворимого красителя НСТ в нерастворимый диформаза под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции.) [Nouragargh S., Holt J.R.S., 1986], а кислороднезависимые микробоцидные системы фагоцита - в лизосомально-катионном тесте [Elsbach P., Weise J., 1985].

Фагоцитарную активность можно определять, используя культуры различных микроорганизмов (определяют активность фагоцитоза – процент активно фагоцитирующих клеток, интенсивность фагоцитоза – среднее число микроорганизмов, приходящиеся на один фагоцит, завершенность фагоцитоза, эффективность фагоцитоза) [Новиков Л.В. и соавт., 1981]. Существует способ оценка фагоцитарной активности нейтрофилов и макрофагов, основанный на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия (НСТ) в нерастворимый диформаза под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции. НСТ-тест интегрально характеризует кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита [Маянский Д. Н., 1986; Segal A. W., 1974; Elsbach P., Weise J., 1985].

1.2. Иммуниет

Иммуниет определяют как процесс взаимодействия антигена и организма, распознавания поврежденных патогеном клеток и тканей лимфоцитами с целью деструкции и выведения их из организма [Хаитов Р.М. и соавт., 2000, 2010].

Иммунная система – это совокупность всех лимфоидных органов и скоплений лимфоидных клеток тела. Лимфоидная система организма представляет собой морфологический синоним иммунной системы и осуществляет иммунный ответ. В лимфоидной системе различают центральные (тимус, костный мозг) и периферические (лимфатические узлы, селезенка, кровь) органы. Клетки, осуществляющие иммунные реакции, называют иммуноцитами, или иммунокомпетентными клетками (ИМК).

Формирование специфического иммунного ответа происходит при соблюдении следующих условий:

1. Наличие чужеродного агента с достаточно сложной структурой, способного индуцировать начало процесса (антигена).
2. Наличие ИМК организма, способных к взаимодействию именно с данным антигеном, и, следовательно, отличающих его от всех других.

Каждая ИКК способна к взаимодействию с одним антигеном.

3. Способность клеток после контакта с антигеном размножаться, дифференцироваться в организме и дать начало более многочисленной и зрелой популяции клеток, обуславливающих иммунный ответ.

4. Неспособность организма вырабатывать иммунный ответ на собственные антигенные вещества (аутоотолерантность), т.к. в противном случае постоянно происходили бы аутоиммунные процессы, несовместимые с жизнью.

5. Наличие иммунологической памяти, обеспечивающей количественно и качественно более выраженный ответ на повторное действие антигена (вторичный ответ) или ареактивность, если к данному антигену организм обладает иммунологической толерантностью.

Выделяют три стадии иммуногенеза. Первый этап – дифференцировка клеток лимфоидного и миелоидного ряда до попадания в тимус или костный мозг. На этой стадии количество митозов составляет примерно 6–7. Второй этап начинается после выхода иммунокомпетентных клеток из тимуса и костного мозга и их взаимодействия. Классический пример кооперации иммуноцитов – взаимодействие Т-, В-клеток и макрофагов. На данном этапе происходит 2–3 митоза клеток. Третий этап – образование эффекторных клеток: памяти, киллеров, антителообразующих и других. При этом отмечается такое же количество митозов, как и на первом этапе [Хаитов Р.М. и соавт., 2000].

В основе иммунного ответа лежит функция лимфоцитов. Лимфоцитарный иммунитет впервые был открыт у высших позвоночных. Осуществляют его Т-, В-лимфоциты и вспомогательные клетки.

В ответ на попадание чужеродных или собственных антигенов, микроорганизмов, злокачественно трансформированных клеток, появляющихся при опухолях или внесенных при трансплантации чужеродных тканей, в организме возникают гуморальные и клеточные иммунные реакции. Гуморальные реакции требуют присутствия антител, комплемента, полиморфноядерных лейкоцитов и макрофагов. Поскольку антитела вырабатываются В-лимфоцитами (символы Т и В введены в иммунологическую литературу И. Ройтом в 1969 г. от определений на английском языке "тимусзависимая" и "бурсозависимая" система) гуморальные иммунные реакции определяют как В-клеточный иммунитет (В-система иммунитета).

Синтез антител – белков, относящихся к тому или иному классу иммуноглобулинов (М, G, A, E, D), продукция которых стимулируется после парентерального поступления антигена, отражает функцию В-системы иммунитета. Сравнительная характеристика Т- и В-лимфоцитов человека представлена в табл. 1.1

Таблиц а 1.1. Сравнительная характеристика Т- и В-лимфоцитов человека

Характеристика		Т-лимфоциты	В-лимфоциты
Происхождение		Костный мозг	Костный мозг
Созревание		Тимус	Костный мозг, лимфоидные образования кишечника
Содержание в крови, %		65-80	8-15
Продукты главного комплекса гистосовместимости	I класс II класс	+ — (после активации +)	+ +
Рецепторы для антигена Рецепторы для эритроцитов: барана мыши		CD3 + —	Иммуноглобулины — +
Митогены		ФГА, Кон-А, анти-Т- антитела	Липополисахариды антиглобулины
Участие в гуморальном ответе: индукция образование антител		+ —	+ +
Участие в клеточном иммунитете Клетки памяти:		+ —	+
Рецепторы для комплемента		—	+
Рецепторы для вируса Эпштейн-Барра		—	+
Рецепторы для вируса кори		+	—

1.2.1. Индукция иммунного ответа

В ответ на антигены патогена (микроорганизмы, поврежденные ткани) рецепторы В- и Т-клеток начинают генерироваться «вслепую». И только лимфоциты, специфичные для данного патогена, подвергаются отбору (селекции) и последующей клональной экспансии. Таким образом, важнейшим требованием для индукции иммунного ответа является транспорт антигена от места его проникновения в организм до соответствующей области лимфоузла. Хотя некоторые микроорганизмы могут «напрямую» поступать в эти зоны, транспортировка антигенов - это специализированная функция так называемых антигенпредставляющих клеток – важнейшего звена в интеграции доиммунных механизмов резистентности и иммунитета [Robert C., 1999; Delves P.J., 2000; Moore B.B., 2001; Fleisher T.A., 2004; Reljic R., 2005].

К антигенпредставляющим клеткам относят дендритные клетки, макрофаги и В-клетки (рис. 1.1).

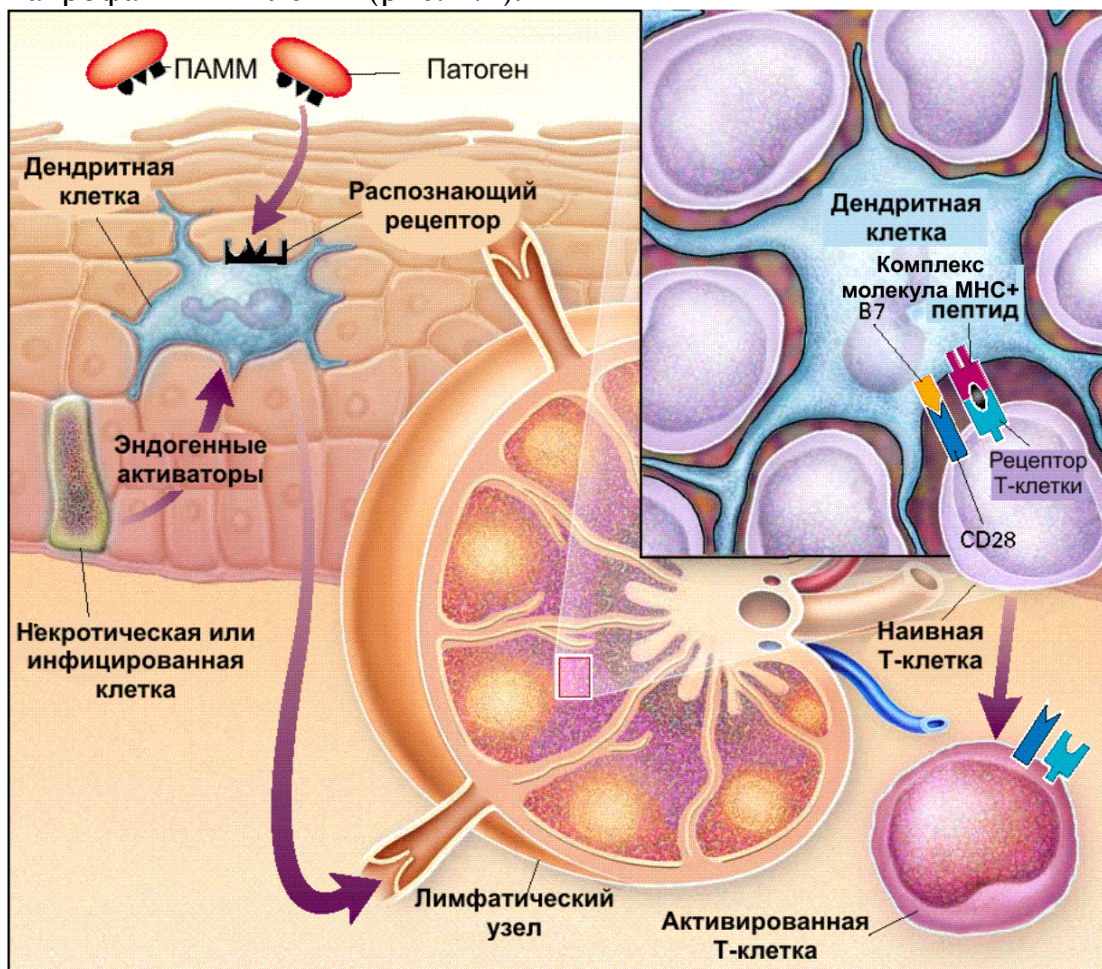


Рис. 1.1. Представление антигена Т-клетке (по Delves P.J., Roitt I.M., 2000).

Антигенпредставляющие клетки поглощают экстрацеллюлярные антигены, но активизируются только в том случае, если рецепторы на их поверхности распознают определенную патоген-ассоциированную молекулярную модель (ПАММ), то есть антиген, соединенный с молекулой главного комплекса гистосовместимости.

Патоген-ассоциированные молекулярные модели (ПАММ) позволяют рецепторам на дендритных клетках и макрофагах распознавать и различать как патогены. Активизированные дендритные клетки и макрофаги, становясь антигенпрезентирующей клеткой, образуют на своей поверхности соединение молекулы комплекса гистосовместимости (МНС) и пептидов, полученных в результате внутриклеточной обработки чужеродного антигена. Это соединение предназначено для рецепторов высоко специализированной CD28-Т-клетки – активного участника иммунного ответа. Активация также заставляет дендритные клетки увеличивать экспрессию В7-костимулирующих молекул (по Delves P.J., Roitt I.M., 2000).

Антигенпредставляющие клетки распознают, поглощают антиген. Затем происходит трансформация чужеродного антигена в иммуногенные

пептиды для последующего их объединения с молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС – major histocompatibility complex). Одним из крупнейших открытий в области иммунологии явилось доказательство того, что рецепторы Т-лимфоциты могут распознавать антиген исключительно в составе главного комплекса гистосовместимости (класса I или II), сопряженным (соединенным) с антигеном (иммуногенным пептидом) [Masten B.J., 1999; Rissoan M.C., Banchereau J., 2000; Lambrecht B.N., 2001; Santiago-Schwarz F., 2004].

Стволовые клетки непрерывно мигрируют из костного мозга в тимус, где они трансформируются в Т-клетки, подвергаясь при этом ряду процедур селекции (рис. 1.2.).

Т-клетки обнаруживают чужеродные антигены, представленные собственными МНС-молекулами (главным комплексом гистосовместимости). В результате случайного характера генерации рецепторов Т-клеток только малая (1–5%) их часть оказывается способной к выполнению этой задачи. Большинство незрелых CD4 и CD8 Т-клеток, не способных распознавать собственные (макроорганизма) МНС-молекулы, подвергаются апоптозу (негативная селекция). Т-клетки, рецепторы которых имеют определенную (среднюю и высокую аффинность) к собственным МНС-молекулам, отбираются корковыми эпителиоцитами (позитивная селекция). Однако многие из этих лимфоцитов потенциально опасны, так как их рецепторы имеют слишком высокое сродство к собственной МНС-молекуле.

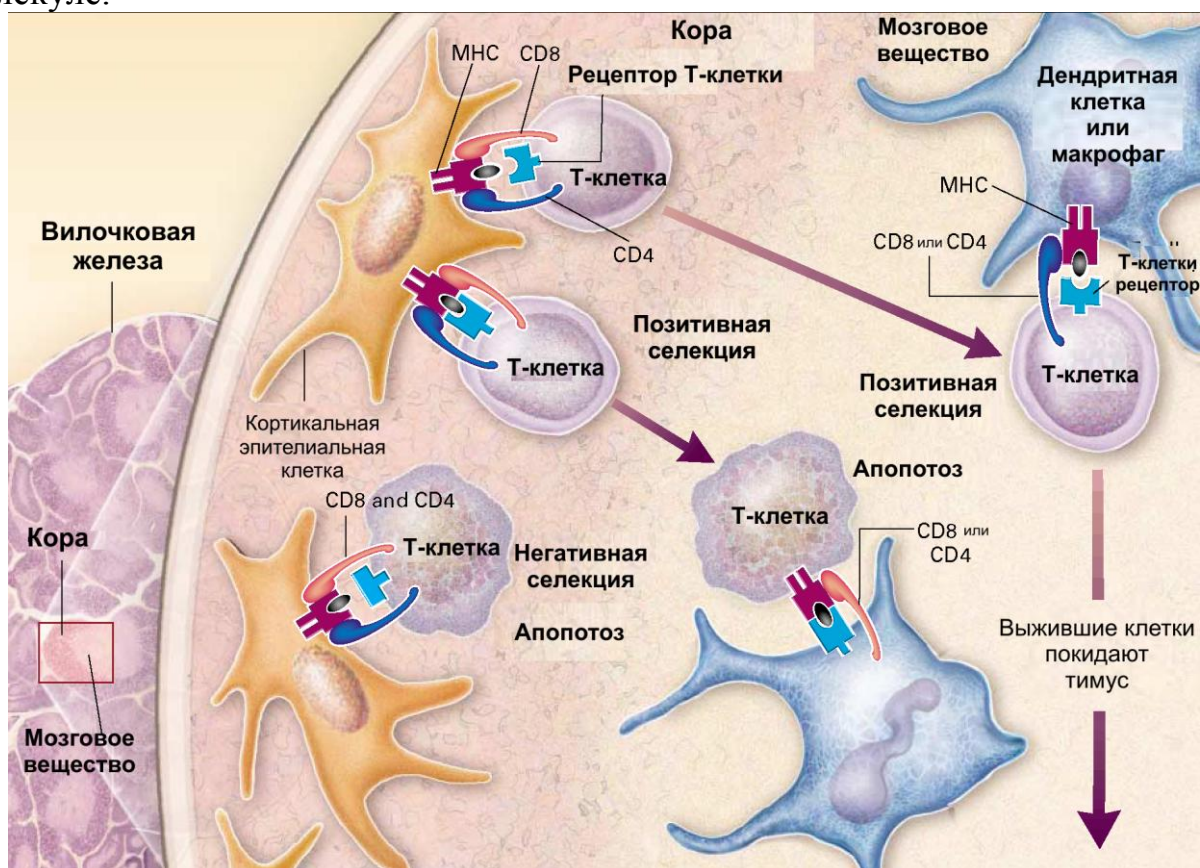


Рис. 1.2. Положительная и отрицательная селекция в тимусе (по Delves P.J., Roitt I.M., 2000).

Эти аутоагрессивные Т-клетки, взаимодействуя с дендритными клетками и макрофагами в мозговом веществе тимуса, отбираются и затем удаляются путем индукции апоптоза (негативная селекция). В результате «остаются» («позитивно» отбираются) Т-клетки с относительно невысокой (средней по силе) аффинностью к собственной МНС-молекуле. Эти лимфоциты и формируют пул Т-клеток, покидающих тимус в форме CD4 или CD8. На периферии они имеют достаточный потенциал для того, чтобы распознавать комплекс из чужеродного пептида плюс собственной МНС-молекулы и становятся активированными, если аффинность взаимодействия превышает некоторый порог [Delves P.J., Roitt I.M., 2000].

Таким образом, при отборе (селекции) Т-клеток происходит последовательно: «негативная селекция» (удаление клеток с низкой аффинностью к антигену), «позитивная селекция» (отбор клеток со средней и высокой аффинностью), «негативная селекция» (удаление клеток с высокой аффинностью к антигену).

При созревании (в пределах тимуса) на поверхности Т-клеток происходит экспрессия большого количества иммунологически значимых молекул. Многие из них были первоначально охарактеризованы на основе их реактивности к определенным (линейным) моноклональным антителам. Антитела, произведенные различными лабораториями, формировали набор (кластер) и могут быть сгруппированы вместе, если они распознают идентичную молекулу. Это привело к классификации, в которой данная молекула определялась как «антигены кластера дифференцировки клеток» или «кластер дифференцировки», или CD (cell differentiation antigens или cluster definition) и номер, например CD1, CD2 и CD3 [Ellmeier W., 1999; Goldrath A.W., 1999; Klein J., 1999; Andrian U.H., 2000; Maekawa Y., 2005].

1.2.2. Т-клеточные иммунные реакции

Рецепторы Т-лимфоцитов CD4- и CD8-молекулы формируют существенную часть рецепторного комплекса Т-клетки. CD4 Т-клетки обычно являются хелперными Т-клетками и распознают антигены, представленные МНС-молекулами II класса, в то время как CD8 Т-клетки - обычно цитотоксичны и распознают антиген, представляемый МНС-молекулой I класса.

Первый класс МНС-молекул экспрессируется во всех ядродержащих клетках. При этом существует возможность передавать информацию о повреждении клетки CD8 Т-киллерам (Т-эффекторам) путем близких межклеточных контактов, представляя комплекс из чужеродного пептида и МНС-молекулы на рецептор Т-эффектора. В то же время активированный в результате контакта с МНС-молекулой II класса CD4 Т-хелпер соответствующие цитокины.

Таким образом, эффекторная функция Т-клетки-хелпера не всегда зависит от близкого контакта с В-клеткой, которая должна отвечать на

определенный цитокин [Abbas A.K., 1996; Ellmeier W., 1999; Klein J., 2000; Benito J.M.; 2004, Parham P., 2005].

Клеточный иммунитет проявляется в реакциях клеток иммунной системы на чужеродные для данного организма клеточные формы. Клетками-мишенями в этом случае могут быть клетки трансплантата, опухолевые клетки, клетки, зараженные вирусом. Основными эффекторами в реакциях клеточного иммунитета являются Т-киллеры.

Цитотоксическое разрушение клеток-мишеней способны осуществлять и другие типы клеток – естественные киллеры, Т-клетки реакции гиперчувствительности замедленного типа, макрофаги, полиморфноядерные лейкоциты. В реакции антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) эффекторные клетки (ЕКК) разрушают клетки-мишени в присутствии специфических антител, направленных против их антигенных детерминант. Т-система контролирует работу В-системы. Для изучения влияния ксенобиотиков на Т-систему иммунитета исследуют содержание различных субпопуляций Т-лимфоцитов в органах системы иммунитета и крови, оценивают реакции бласттрансформации лимфоцитов, гиперчувствительности замедленного типа, отторжения аллотрансплантата, торможения миграции лейкоцитов, продукцию лимфокинов Т-клетками, естественную и антителозависимую клеточную цитотоксичность и др. [Ройт А. и соавт., 2000].

1.2.3. Гуморальный иммунный ответ

Гуморальный иммунитет относится к антителоопосредованным защитным иммунным реакциям. В-клетки - это антителопродуцирующие (синтезирующие иммуноглобулины) клетки иммунной системы. Их активирование может происходить в результате прямого взаимодействия поверхностных иммуноглобулинов (Ig) В-клетки с эпитопами патогена (Т-независимая активация). Т-независимые антигены являются, главным образом, компонентами стенок бактериальных клеток (например, липополисахарид - ЛПС). Однако главным защитным ответом в борьбе с патогенными микроорганизмами следует считать Т-зависимые иммунные реакции [Ales-Martinez J.E., 1991; Soro P.G., 1999; Xiao W., 2000; Jeurissen A., 2004; Baudler S., 2005].

Иными словами, гуморальный иммунный ответ на наиболее сложные антигены происходит с участием Т-клеток. Активация Т-зависимой иммунной реакции реализуется в результате сложного взаимодействия между антигенпредставляющей клеткой (АПК), антигеном, а также В- и Т-клетками. Типичный сценарий активации включает фагоцитоз чужеродного антигена АПК. Антигенпредставляющая клетка затем перерабатывает белковые компоненты антигена в пептидные фрагменты пептидов и экспрессирует их на своей поверхности (в связанной с МНС – молекулой форме). Этот комплекс распознается затем рецептором Т-клетки на ее поверхности [Parker DC., 1993; Tumang J.R., 1996; Garside P., 1998; Tsuji R.F.,

2002; Tangye S.G., 2004].

При гуморальным иммунном ответе на тимуснезависимые антигены определенную роль играет ИЛ-1, продуцируемый макрофагами. Как уже упоминалось, при тимусзависимой иммунной реакции необходима переработка и представление антигена макрофагами В-лимфоцитам при участии Т-клеток. Т-хелперы включают совместно с макрофагами В-лимфоциты в антителогенез, а различные клетки-супрессоры и супрессорные факторы тормозят этот процесс. При этом их миссия состоит в блокировании аутоиммунных реакций и торможении гиперактивности В-антителопродукции. Роль Т-супрессоров могут выполнять - $CD4^+$ или Th3-лимфоциты (хелперы 3-го типа) и, кроме того, – Th2-клетки (хелперы 2-го типа); $CD4-/CD8^+$ лимфоциты, продуцирующие интерлейкины, ингибирующие рецепторы Т-лимфоцитов (CTLA-4); особые Т-лимфоциты-киллеры.

В настоящее время исходя из функциональной принадлежности, выделяют Т-хелперы 1 типа - Th1-лимфоциты, участвующие в реализации реакций клеточного иммунитета, а также синтезе Ig M, G2a (и формировании ГЗТ), Т-хелперы 2 типа - Th2-лимфоциты, способствующие синтезу IgG1, A, E, D и Th3-лимфоциты, выполняющие регуляторные функции, основной из которых может являться супрессия иммунных реакций [Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Гуморальными факторами супрессии иммунного ответа являются кортикостероиды, интерлейкины и различные лимфокины. Осуществлять роль клеток-супрессоров могут и В-лимфоциты [Хаитова Р. М. и соавт., 2002]. В англоязычной литературе, рассматривая ИКК, участвующие в антителопродукции (синтезе иммуноглобулинов), используют термин «клеточная версия (составляющая)» иммунного ответа.

1.2.4. Естественные клетки-киллеры

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 (ЕКК представлены в основном клетками с маркерами CD16 и CD56) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Кроме данных маркеров, на ЕКК обнаружены следующие рецепторы (CD-маркеры): CD2, CD11b, CD16, CD27, CD30, CD39, CD56, CD57, CD62L, CD87, CD94, CD119 и CD132. При этом рецепторы CD2, CD27, CD30, CD62L, CD87, CD132 являются общими для ЕКК и Т-лимфоцитов [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Ингибируют цитотоксическую активность ЕКК субпопуляции нормальных (естественных) киллеров CD158a, CD158b [Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. При контакте с клетками опухоли и 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 из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (порообразование перфорином) [Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Nogueira N., 1984; Li Q., Kawada T., 2006]. Кроме того, ЕКК способны обеспечивать уничтожение чужеродной клетки путем реализации "дыхательного взрыва" (поражение активными радикалами кислорода, гидроксильного радикала и т.п.), а также индукцией апоптоза.

Активность ЕКК повышается интерферонами, интерлейкинами (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986; Li Q., Kawada T., 2006].

При контакте с клетками опухоли, клетками, пораженными вирусами или паразитами, ксеногенными клетками, ЕКК способны уничтожать их без предварительного контакта с антигенами, находящимися на их поверхности. Они узнают определенные структуры высокомолекулярных гликопротеидов, которые экспрессируются на мембране инфицированных вирусом клеток. В литературе 80–90-х годов прошлого столетия ЕКК относили к факторам неспецифической резистентности организма (НРО) [Descotes J., 1986], врожденному иммунитету, наряду с системой комплемента и фагоцитозом [Ройт А., 1991]. В настоящее время ЕКК характеризуют как популяцию лимфоцитов, определяющих лимфоцитарный иммунитет [Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Последние достижения в иммунологии, свидетельствующие о том, что ЕКК и К-клетки, обуславливающие антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) – это одни и те же клетки, отличающиеся лишь механизмами реализации поражения (киллинга, убийства) клеток-мишеней [Ройт А. и соавт, 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Функция ЕКК регулируется, наряду с интерферонами, также эндогенными нейромедиаторами (ацетилхолином, гормонами гипоталамо-гипофизарно-адреналовой и симпатико-адреналовой систем) [Забродский П.Ф., 1993; 1995; 2015; Ройт А. и соавт., 2000; Р. М. Хаитов и соавт., 2010].

1.2.5. Цитокины

Цитокины – это множество разнообразных биологически активных молекул, секретируемых клетками с целью воздействия через специфические рецепторы для каждого из цитокинов на рядом расположенную клетку (или на себя же) [Хаитов М.Р. и соавт., 2002]. При попадании антигена в организм выделяют следующие процессы: распознавание антигена, активация клеток, пролиферация и дифференцировка лимфоцитов. Указанные процессы подвергаются регуляции цитокинами (интерлейкинами – ИЛ и различными биологически активными молекулами).

Все интерлейкины представляют собой пептидные структуры, состоящие из 100 аминокислотных остатков. Большинство из них получено в виде генно-инженерных рекомбинантных препаратов, что позволяет широко использовать их не только в экспериментах, но и для создания тест-систем

обнаружения интерлейкинов, а также в качестве лечебных средств [Georgiev V.St., Albright J.E., 1993].

Цитокины не депонируются в клетках, а синтезируются импульсно «по запросу», начиная с транскрипции мРНК цитокина с соответствующего гена. Исключение составляет фактор некроза опухоли- α (ФНО α , TNF α), который депонируется в гранулах тучных клеток и ИЛ-1, депонирующийся в некоторых количествах в кератиноцитах [Хаитов М.Р. и соавт., 2002].

Существует 5 функциональных групп цитокинов: гемопоэтические, доиммунного воспаления, организаторы лимфоцитарного иммунного ответа, медиаторы иммунного воспаления, противовоспалительные (иммуносупрессорные) цитокины.

Гемопоэтические цитокины регулируют пролиферацию и дифференцировку всех клеток кроветворной системы – GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор- КСФ), M-CSF (макрофагальный КСФ), G-CSF (гранулоцитарный КСФ), эритропоэтин, тромбопоэтин, IL-3 – мульти-CSF, IL-5 – CSF для эозинофилов, IL-7 – CSF для лимфоцитов, SCF – стволово-клеточный фактор, или фактор роста предшественников тучных клеток. К гемопоэтическим цитокинам относят и ИЛ-1 – гемопоэтин-1 (поддерживает рост предшественников кроветворения). К негативным регуляторам гемопоэза относятся TNF α и TNF β . Хемокин MIP- α ингибирует ранние клетки предшественников гемопоэза.

Цитокины доиммунного воспаления делятся на две подгруппы. Первично провоспалительные цитокины – IL-1, TNF α , IL-6 (продуцируют макрофаги и лимфоидные дендритные клетки покровных тканей в очаге внедрения патогена). IL-1, TNF α действуют преимущественно локально, IL-6 индуцирует синтез белков острой фазы в печени. Вторично провоспалительные цитокины – хемокины обеспечивают локомоторное передвижение лейкоцитов в тканях, поддерживают ангиогенез и продукцию коллагенов соединительной тканью (регенерацию).

Цитокины организаторы лимфоцитарного иммунного ответа (IL-2, IL-4, IL-12, IL-15, IFN- γ) регулируют пролиферацию и дифференцировку Т- и В-лимфоцитов и ЕКК в периферических лимфоидных органах и тканях. Их продуцируют дендритные клетки и макрофаги, а затем и сами лимфоциты.

Цитокины медиаторы иммунного воспаления: IFN- γ – активатор макрофагов и ЕКК; IL-5 – индуктор и активатор эозинофилов; LT – активатор нейтрофилов; LT α – обеспечивает образование воспалительных гранул *in vivo*.

Противовоспалительные (иммуносупрессорные) цитокины: IL-10 – продуцируется макрофагами и ингибирует макрофаги, TGF- β – продуцируется иммунными CD4⁺ Т-лимфоцитами (Th3-лимфоцитами) и ингибирует дальнейшую пролиферацию лимфоцитов; IL-4 и IL-13 ингибируют макрофаги, и в определенных реакциях проявляют себя как противовоспалительные цитокины.

Различают интракринный, аутокринный, паракринный и эндокринный

механизмы действия цитокинов.

Интракринный механизм - действие цитокинов внутри клетки-продуцента; связывание цитокинов со специфическими внутриклеточными рецепторами.

Аутокринный механизм - действие секретируемого цитокина на саму секретирующую клетку. Например, интерлейкины-1, -6 -18, ФНО α являются аутокринными активирующими факторами для моноцитов/макрофагов.

Паракринный механизм - действие цитокинов на близкорасположенные клетки и ткани. Например, ИЛ-1, -6 -12 и -18, ФНО α , продуцируемые макрофагом, активируют Т-хелпер (Th0), распознающий антиген и МНС макрофага

Эндокринный механизм - действие цитокинов на расстоянии от клеток-продуцентов. Например, ИЛ-1, -6 и ФНО α , помимо ауто- и паракринных воздействий могут оказывать дистантное иммунорегуляторное действие, пирогенный эффект индукцию выработки белков острой фазы гепатоцитами, симптомы интоксикации и мультиорганные поражения при токсико-септических состояниях.

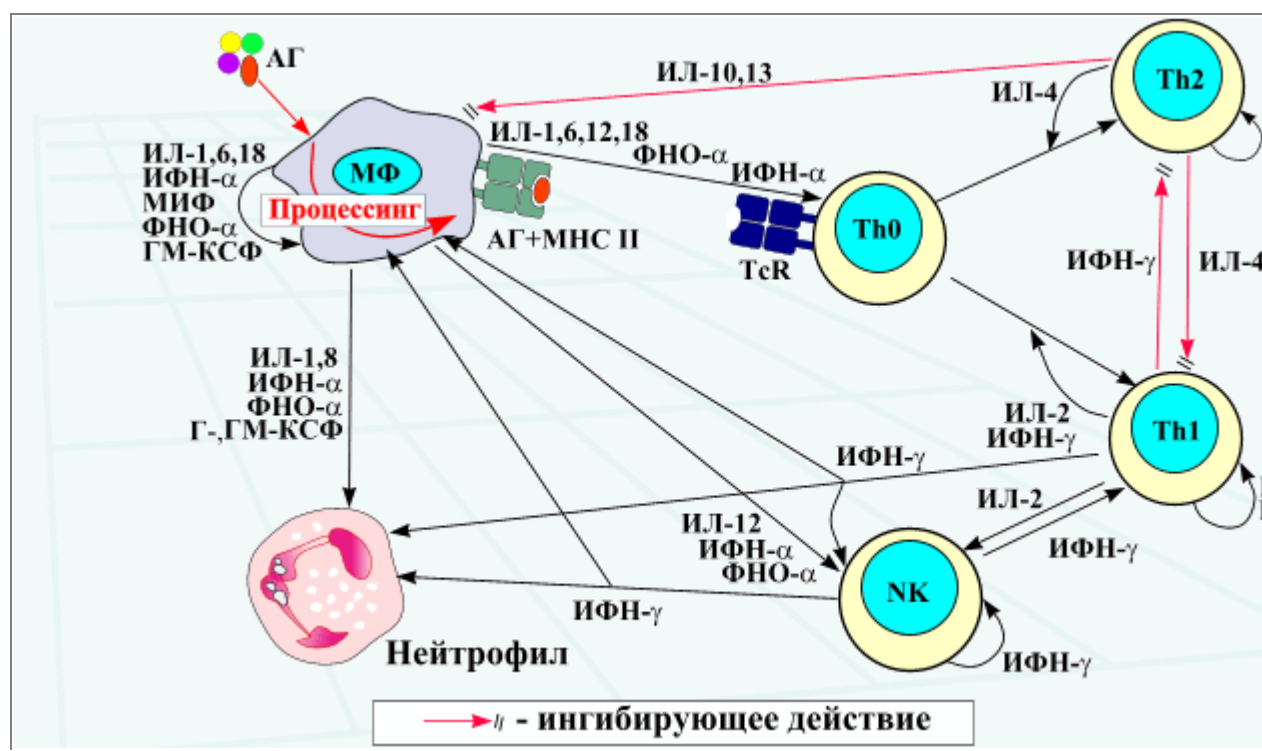


Рис. 1.3. Аутокринно-паракринная регуляция иммунного ответа

Примечание. АГ — антиген; ИФН — интерферон; IgE — иммуноглобулин E; ИЛ — интерлейкин; NK-клетки — естественные киллерные клетки; Тс-клетки — цитотоксические Т-лимфоциты; Th-клетки — хелперные Т-лимфоциты; МНС — главный комплекс гистосовместимости; МФ — макрофаг; МИФ — макрофагингибирующий фактор; ГМ-КСФ — гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор; Г-КСФ — гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; ФНО — фактор некроза опухоли; ТсR — антигенраспознающий рецептор Т-лимфоцитов(T-cell receptor)

На клетках продуцентах цитокинов и их биологических эффектах в моделях на мышах следует остановиться подробнее.

Интерлейкин-1 (ИЛ-1) продуцируется активированными макрофагами и моноцитами, оказывая при этом воздействие на многие клетки структуры. Он активирует гипоталамический центр терморегуляции, являясь эндогенным пирогеном. Весьма существенно, что ИЛ-1 активирует Т-лимфоциты: способствует созреванию тимоцитов, стимулирует продукцию Т-клетками интерлейкина-2, гамма-интерферона и других медиаторов. ИЛ-1 снижает супрессорную активность Т-лимфоцитов повышает их цитотоксичность, активирует созревание В-лимфоцитов и продукцию ими антител. ИЛ-1 способствует продукции простагландинов, активирует моноциты, нейтрофилы, эндотелиальные и другие клетки, способствует воспалительной реакции. Многие эффекты ИЛ-1 осуществляет в комплексе с другими медиаторами.

В настоящее время под названием ИЛ-1 объединены два полипептида обозначаемые ИЛ-1 α и ИЛ-1 β . У человека главной формой секретируемого активированными макрофагами/моноцитами является ИЛ-1 β . ИЛ-1 α существует в основном в виде мембранной формы. Кроме активации В- и Т-лимфоцитов, ИЛ-1 способен стимулировать стволовые клетки, усиливает пролиферацию только преактивированных антигеном лимфоцитов, играя роль второго сигнала в стимуляции пролиферации лимфоцитов.

ИЛ-1 является главным медиатором развития местной воспалительной реакции. Пирогенность является одним из важных его свойств. ИЛ-1 очень быстро активирует практически все типы клеток, участвующих в формировании локальной воспалительной реакции, включая фибробласты, эндотелий, резидентные макрофаги и все типы лейкоцитов крови.

ИЛ-1 регулирует функции эндотелия и системы свертывания крови, индуцирует прокоагулянтную активность, синтез провоспалительных цитокинов, вызывает экспрессию на поверхности эндотелия адгезионных молекул, обеспечивающих прикрепление нейтрофильных лейкоцитов и лимфоцитов, стимулирует выход нейтрофилов в очаг воспаления. ИЛ-1 влияет на ПЯЛ активируя их активность. Он усиливает адгезию, хемотаксис, фагоцитоз, продукцию свободных форм кислорода. Прямо не влияя на перечисленные функции нейтрофильных гранулоцитов, проявляет свое действие опосредованно путем индукции синтеза макрофагами, эндотелиальными клетками и фибробластами других цитокинов, главным образом ИЛ-8.

Таким образом, ИЛ-1 является индуцибельным белком, синтез которого начинается в ответ на внедрение микроорганизмов либо повреждение тканей и необходим для развития и осуществления всего комплекса защитных реакций, именуемых острофазным воспалительным ответом

Интерлейкин-2 (ИЛ-2) продуцируется Т-лимфоцитами как CD4⁺ (лимфоцитами Th0- типа), так и некоторыми CD8⁺; стимулируют

пролиферацию В-клеток и синтез J-цепи молекулы иммуноглобулина, оказывает пролиферирующее и активирующее воздействие на Т-лимфоциты и ЕКК. Проявляет активность после связывания со специфическим клеточным рецептором ИЛ-2R.

ИЛ-2 также принимает участие во всех воспалительных и аллергических реакциях, противоопухолевом иммунитете. Недавно появились сообщения о существовании сходных циркулирующих в крови рецепторах (при ВИЧ-инфекции, раке, отторжении трансплантатов, артрите отмечается существенное увеличение уровня свободного рецептора). ИЛ-2 содействует активности ЛАК-клеток («лимфокин-активированных киллеров») и ТИЛ-клеток («тумор-инфильтрирующих лимфоцитов»).

ИЛ-2 невидоспецифичен, поэтому содержащие его препараты, в том числе и рекомбинантный ИЛ-2, активны для клеток человека. ИЛ-2 успешно применяется для лечения злокачественных опухолей. Поскольку введенный ИЛ-2 сохраняется в организме менее 30 минут, препарат вводят многократно или используют для активации лимфоцитов больного *in vitro* с последующим возвратом активированных клеток хозяину.

Интерлейкин-3 (ИЛ-3) продуцируется Т-лимфоцитами (Th1- и Th2-типа), некоторыми CD8⁺. Стимулирует пролиферацию стволовых клеток и ранних предшественников гемопоэтических клеток (фактор роста ранних предшественников всех ростков миелопоэза). Его называют мультиростковым колониестимулирующим фактором.

Интерлейкин-4 (ИЛ-4) также продуцируется активированными Т-лимфоцитами (Th2-типа, TCR⁺/CD4⁺/CD8⁻). Ранее он именовался «фактор роста В-клеток», что определяет его свойство стимулировать дифференцировку В-лимфоцитов и синтез иммуноглобулинов, в частности, IgG1 и IgE (переключает синтез иммуноглобулинов на классы Е и G1. Способствует выживанию Th2-лимфоцита, стимулирует их дифференцировку, ингибирует активацию макрофагов, активирует дифференцировку тучных клеток.

Интерлейкин-5 (ИЛ-5) вырабатывается активированными Т-лимфоцитами (Th2-типа), способствует активации В-клеток, активирует синтез IgA (осуществляет это действие независимо от Т-клеток, за что получил название «Т-замещающий фактор»). ИЛ-5 полифункционален, действует также на эозинофильные и базофильные лейкоциты (содействует их росту).

Интерлейкин-6 (ИЛ-6) продуцируется Т-лимфоцитами (Th0- и Th2-типа), моноцитами, макрофагами и фибробластами. ИЛ-6 продуцируют макрофаги и лимфоидные дендритные клетки покровных тканей в очаге внедрения патогена. Активирует Т- и В-клетки, усиливает дифференциацию В-лимфоцитов, является фактором роста гибридом, гемопоэтическим фактором роста, стимулирует гепатоциты, способствует дифференцировке Т-клеток в цитотоксические, является.

Интерлейкин-7 (ИЛ-7) продуцируется клетками стромы костного мозга, тимуса, является ростовым фактором В-клеток; воздействует на

ранние предшественники В-клеток, а также на ранние и поздние предшественники Т-лимфоцитов [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993].

Интерлейкин-8 (ИЛ-8) продуцируется моноцитами, моноцитами, фибробластами эндотелиальными клетками, является индуктором воспалительной реакции — активирует хемотаксис (эндогенный хемоаттрактант) и активность гранулоцитов. Кроме стимуляции направленного движения различных типов лейкоцитов, усиливает генерацию активных форм кислорода.

Интерлейкин-9 (ИЛ-9) продуцируется Т-клетками, в частности Т-хелперами. Способствует дифференциации и пролиферации В- и Т-клеток. Сходное влияние оказывает также на красный росток костного мозга.

Интерлейкин-10 (ИЛ-10) продуцируется Т-лимфоцитами (CD8; Th2-клетками), В-лимфоцитами и макрофагами. Включен в так называемый down regulation высвобождения остальных цитокинов — регуляция синтеза цитокинов. Он подавляет образование ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ФНО. Подавляет активацию Th1-типа.

Интерлейкин-11 (ИЛ-11) - вырабатывается стромальными клетками костного мозга, фибробластами. Относится к регуляторам гемопоэза и имеет сходный эффект с ИЛ-6. Стимулирует гемопоэз мегакариоцитов и эритроцитов.

Интерлейкин-12 (ИЛ-12)- гетеродимер, источником являются активированные В-клетки, моноциты, макрофаги. Является ключевым цитокином для усиления клеточно-опосредованного ответа вызывает пролиферацию активированных Т-лимфоцитов и ЕКК, усиливает действие ИЛ-2, стимулирует Th1-лимфоциты и продукцию γ -интерферона, ингибирует синтез IgE. Активирует эффективную противoinфекционную защиту против вирусов, бактерий, грибов и простейших.

Интерлейкин-13 (ИЛ-13)- выделяется Т-лимфоцитами (Th2), индуцирует дифференцировку В-клеток, секрецию IgM, IgE, IgG4. Подавляет синтез активированными макрофагами ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО.

Интерлейкин-14 (ИЛ-14) - выделяется активированными Т-лимфоцитами, усиливает аутокринно пролиферацию В-лимфоцитов в В-лимфомах

Интерлейкин-15 (ИЛ-15)- выделяется макрофагами, активирует пролиферацию Т-лимфоцитов, Th1-клеток, дифференцировку их в киллеры, активирует ЕКК.

Интерлейкин-16 (ИЛ-16) - катионный гомотетрамер, состоит из 130 аминокислот, ММ 14КД, является лигандом, хемотаксическим и активирующим фактором для CD4⁺ - моноцитов, стимулирует их миграцию и экспрессию ИЛ 2 – рецепторов (CD25) на лимфоцитах. Выделяется под влиянием антигенов CD8⁺ CD4⁺ Т-клетками, а также эпителием бронхов и эозинофилами при действии гистамина.

М-7 продуцируется стромальными клетками, участвуют в пролиферации и дифференцировке В-лимфоцитов.

К цитокинам - факторам роста - относятся фактор роста фибробластов; фактор роста эпидермиса; фактор роста эндотелиальных клеток, трансформирующий фактор роста. Из всех цитокинов, в системной циркуляции можно выявить только ФНО, ИЛ-1, ИЛ-6, Г-КСФ (провоспалительные цитокины), причем при септических процессах и массивном воспалении (это исключение из правил). Остальные цитокины действуют локально.

Таблица 1.1. Основные типы клеток-продуцентов цитокинов и кинетика их синтеза

Клетки - продуценты	Индукторы цитокинов	Кинетика выработки	Продуцируемые цитокины
Стромальные клетки (фибробласты, эндотелиальные клетки)	Контактные взаимодействия, бактериальные продукты	В пределах часа – мРНК; через 3-4 часа - пик секреции цитокинов	ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ, IFN- β , TGF- β , ИЛ-6, 7, 8, ИЛ-11
Моноциты/макрофаги	Бактерии и их продукты, поли-электролиты, форболовые эфиры	В пределах часа – мРНК; через 6-14 часов – пик секреции цитокинов	ИЛ-1, TNF- α , ИЛ-10, 12,15; ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ, TGF- β , IFN- α , хемокины
Т-хелперы 1	Связывание антигена/мито-гена через ТКР -CD3/CD28 ИЛ-12	Через 5 –8 часов - мРНК; через 10-48 часов - пик секреции цитокинов	ИЛ-2, IFN- γ , TNF – α , β , ИЛ-3, ИЛ-8;ГМ-КСФ, MIF, хемокины, MAF
Т-хелперы 2	Связывание антигена/мито-гена; ИЛ-4, TGF- β	Через 5 –8 часов мРНК, через 24-48 часов - пик секреции цитокинов	ИЛ-3, 4, 5, 6,8, 10, ИЛ-13, ГМ-КСФ, хемокины

Примечание. Эта последовательность отражает процессы дифференцировки Т-хелперов. “Наивные” CD4⁺ Т-клетки в ответ на стимуляцию вырабатывают лишь ИЛ-2, затем, превращаясь в Th0, они начинают продуцировать в малом количестве уже целый ряд цитокинов. При дальнейшей (или повторной) стимуляции Тх0 дифференцируются в Th1 и Th2, которые характеризуются различным спектром цитокинов.

Ингибирующий фактор — один из наиболее изученных лимфокинов. Продуцируется лимфоцитами человека. Так в суспензии макрофагов, очищенной от лимфоцитов, МИФ (макрофагингибирующий фактор) не обнаруживается. Ингибирующее действие на миграцию макрофагов

оказывает надосадочная жидкость культуральной среды, в которой инкубированы лимфоциты со специфическим антигеном. Надосадочная жидкость, содержащая МИФ, способна также агрегировать макрофаги.

МИФ и фактор, вызывающий агрегацию макрофагов, по-видимому, не обладают антигенной специфичностью и синтезируются в момент действия антигена, т.к. образование их ингибируется веществами, подавляющими синтез протеинов. Биологическая роль МИФ состоит в том, что он способствует задержке макрофагов в тканях, содержащих антиген. 9 Антиген сам является важным фактором иммунорегуляции. От природы антигена зависит тип иммунного ответа. На полисахаридные антигены бактерий, как правило, развивается гуморальный иммунный ответ. На бактериальные белковые антигены – как клеточный, так и гуморальный ответы. На внутриклеточные инфекты (вирусы, внутриклеточные бактерии и простейшие) возникает клеточный иммунный ответ.

Так на микобактериальную инфекцию развивается клеточный иммунный ответ. Доза антигена, кратность и путь его поступления, играют решающую роль в возникновении иммунного ответа. Большие дозы антигена могут индуцировать толерантность. Так же как и поступление антигена перорально вызывает толерантность к данному антигену. Это позволило применить в специфическом лечении аллергических заболеваний пероральное введение аллергенов.

Антигенпрезентирующие клетки (АПК), процессируя и представляя антиген вместе с молекулами ГКГС класса II Т-хелпером, обеспечивают активацию Т-хелперов. В этом процессе важным и определяющим является взаимодействие мембранных молекул Т-хелпера и АПК (CD40 L– CD40; CD 28- CD80 и CD86 молекул адгезии). Поэтому АПК для CD4 клеток являются решающими активаторами («тем блюдечком с голубой каемочкой, с которого Т-хелперы берут эпитоп для выполнения своих или Th1, или Th2-типа»). Т-хелперы играют регулируемую роль в выборе гуморального или клеточного иммунного ответа (иммунное отклонение). Th1, продуцируя интерферон γ , подавляют развитие Th2-клеток. И, наоборот, Th2 лимфоциты, продуцируя ИЛ-4, ИЛ-10, подавляют Th1- клетки. Таким образом, в процессе иммунного ответа преобладает клеточный или гуморальный ответ.

Супрессия иммунного ответа наступает под действием множества факторов. В первую очередь супрессия обусловлена элиминацией антигена, исчезновением антигенной стимуляции и развитием апоптоза простимулированных лимфоцитов. Отсутствие антигена в результате его иммунной элиминации приводит к прекращению активации лимфоцитов через TcR и BcR.

Новые не иммунные лимфоциты не активируются, а в проактивированных лимфоцитах снижается экспрессия антиапоптозных генов, которые защищают лимфоциты от апоптоза в период иммунопоэза. На лимфоцитах усиливается экспрессия CD95, рецепторов для глюкокортикоидов и ФНО, что так же приводит к апоптозу. Кроме того в активированных лимфоцитах, не связавших своим антигенспецифическим

рецептором антиген, развивается феномен индуцированной активацией клеточной смерти (AICD – activation-induced cell death). Кроме указанного, цитокин TGF β (трансформирующий фактор роста β) является важным гуморальным фактором супрессии иммунного ответа, ингибитором пролиферации Т- и В-лимфоцитов.

Клетки продуцирующие этот цитокин подавляют иммунный ответ и могут быть отнесены к супрессорным клеткам. Генетический контроль иммунного ответа осуществляет особый генетический аппарат —главный комплекс гистосовместимости (ГКГС). В области ГКГС локализованы так называемые Ir (Immune response) гены, определяющие степень интенсивности иммунного ответа на тот или иной антиген.

ТФР β – трансформирующий фактор роста β . Подавляет пролиферацию Т- и В-лимфоцитов. Отменяя эффекты многих цитокинов, является супрессорным фактором.

ФНО α (TNF- α) - фактор некроза опухоли-альфа, кахексин, выделяется макрофагами, Т- и В-лимфоцитами (Th1- и Th2-типа; CD8⁺), нейтрофилами, стимулирует воспаление, активирует и повреждает клетки, вызывает лихорадку (пироген). Получил своё название из-за способности ингибировать рост некоторых опухолей. Является одним из основных провоспалительных цитокинов. Его большие концентрации обуславливают токсический шок. Кроме того, через свои рецепторы вызывает апоптоз. ФНО α активирует макрофаги, индуцирует продукцию ими NO-синтетазы.

TNF β – фактор некроза опухоли- β (лимфотоксин), синтезируемый Th1-лимфоцитами, макрофагами и лимфоидные дендритные клетки покровных тканей в очаге внедрения патогена. ФНО β был вначале обнаружен как компонент сыворотки животных, стимулированных бактериальным токсином, вызывающим некротические процессы в опухоли.

TNF α и TNF β относятся к негативным регуляторам гемопоэза активирует моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, повышая их миграционную и адгезивную активность. Введение или выброс больших количеств ФНО α и ИЛ-1 обуславливает картину септического шока с геморрагическими повреждениями, распадом тромбоцитов, освобождением медиаторов.

Действие ФНО α и ФНО β (TNF α и TNF β) на опухоль обусловлено их токсическими свойствами в отношении клеток опухоли (β -лимфотоксин), нарушениями липидного обмена, обуславливающими кахексию (α -лимфотоксин), активацией моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов, местным провоспалительным эффектом [Georgiev V.St., Albright J.E.,1993].

Получение рекомбинантных TNF α и TNF β открывает возможности прямого воздействия их на опухоль, в частности, при местном применении.

Колонистимулирующие факторы ГМ-КСФ - (GM-CSF) гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор, образуется Т- и В-лимфоцитами, макрофагами, другими лейкоцитами, стимулирует пролиферацию предшественников гранулоцитов, макрофагов и активирует их функции. Г-КСФ – (G-CSF) гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, продуцируют активированные макрофаги, эндотелиальные клетки,

фибробласты. Усиливает пролиферацию и дифференцировку костномозговых клеток-предшественников нейтрофилов. Может действовать дистантно из очага воспаления. Указанные КСФ нашли широкое применение с целью эффективной стимуляции развития лейкоцитов гранулоцитарного ряда.

Хемокины - низкомолекулярные цитокины, ответственные за хемотаксис клеток (привлекают в очаг воспаления лимфоциты и лейкоциты).

Интерфероны (ИФН) занимают особое место среди цитокинов. К первому типу ИФН относится α -ИФ и β -ИФ, индуцируемых вирусами а также двухспиральной РНК. Эти ИФ обладают противовирусными (в отношении клеток, пораженных вирусами) действием. α -ИФ продуцируется лейкоцитами, а β -ИФ - фибробластами. ИФ подавляют размножение вирусов в индуцированных ими клетках.

Ко второму типу ИФН относится γ -ИФН (иммунный ИФН), который продуцируется Т-лимфоцитами и лимфобластами. Стимулами к образованию γ -ИФН служат антигены и митогены. γ -ИФН обладает противовирусным и выраженным иммуномодулирующим свойством (подавляет пролиферацию клеток и рост опухолей, усиливает функцию макрофагов, ЕКК, способствует экспрессии на клетках антигенов главного комплекса гистосовместимости и Fc-рецепторов, влияет на образование антител и реализацию клеточного иммунного ответа. Все соматические клетки имеют рецепторы для ИФН.

Интерфероны (ИНФ) - это цитокины с противовирусной активностью. Интерфероны – группа низкомолекулярных биологически активных пептидов, белков, которых в настоящее время известно более 20. Выделено четыре вида интерферонов (α , β , γ , ω), различающихся происхождением, некоторыми химическими и биологическими свойствами. Они объединены в два типа: I тип – альфа-, бета- и омега - интерфероны, 2 тип – гамма-интерферон.

Интерферон- α (лейкоцитарный) продуцируется лимфоцитами, макрофагами, некоторыми эпителиальными клетками после индукции разными антигенами (индукторами интерферона). К ним относятся вирусы, в меньшей степени риккетсии, бактерии, белковые полимеры, синтетические анионы. В настоящее время описано 24 подтипа интерферона- α .

Интерферон- α блокирует рост вирусов и других внутриклеточных паразитов, ингибирует соединение вирусной РНК с рибосомами клетки, что затрудняет или вовсе исключает возможность репродукции вируса в клетке, а также тормозит пролиферацию нормальных клеток-фибробластов, гемопоэтических клеток (антипролиферативное, тумороцидное действие).

Интерферон- β (фибробластный) - вырабатывается фибробластами. Усиливает экспрессию HLA- антигенов на клетках, активирует естественные клетки-киллеры (ЕКК) и фагоциты. Доказано структурное родство альфа- и бета- интерферонов, а также их функциональная схожесть. Оба вида интерферонов индуцируются вирусами и взаимодействуют с одними и теми же клеточными рецепторами. Основной эффект α - и β - интерферонов – противовирусный и противоопухолевый.

Интерферон- ω (омега) - изучен слабо.

Интерферон - γ (иммунный) - в основном его продуцируют различные субклассы лимфоцитов (CD4 клетки - Т-хелперы (Th 1), CD8-клетки и ЕКК. Его секреция наблюдается только после стимуляции клеток антигенами или митогенами. Он усиливает противовирусное и антипролиферативное действие интерферонов- α и - β . Кроме того, он является важнейшим иммунорегулятором.

Интерферон- γ усиливает синтез HLA-антигенов клетками, что приводит к ускорению процессов распознавания и переработки антигенов, активирует естественные киллеры, Т-лимфоциты, макрофаги, адгезию лейкоцитов и моноцитов, фагоцитоз, снижают активность В-лимфоцитов и продукцию IgE, подавляет продукцию цитокинов Th-2 клеток.

Способностью вырабатывать интерферон в той или иной степени обладают все клетки организма. Наиболее сильными продуцентами интерферона являются иммунокомпетентные клетки. Система интерферона не имеет ни специализированных клеток, ни специализированных органов, так как каждая клетка может быть заражена вирусом и должна иметь систему распознавания и элиминации чужеродной генетической информации, т.е. вирусной нуклеиновой кислоты.

Эффект интерферонов неспецифичен. В настоящее время в клинической практике используется большое количество препаратов интерферона и индукторов интерферона, которые применяются как при вирусных инфекциях, так и в онкологической практике, с целью иммуностимуляции, а так же в связи с наличием у них антипролиферативного эффекта.

Следует отметить, что данные в отношении цитокинов находятся в процессе интенсивного изучения и уточнения. Процесс цитокиновой регуляции иммуногенеза далеко не так прост и однозначен. В настоящее время достаточно хорошо исследовано более 12 типов интерлейкинов, выполняющих различные иммунорегуляторные функции. Общее число известных интерлейкинов дошло до 23 [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Существуют способы изучения функции цитокинов, основанные на их способности активировать определенную иммунную реакцию. При этом цитокины получают методом молекулярного клонирования с применением технологии рекомбинантной ДНК (генная инженерия). Интерлейкины получают из супернатантов лимфоцитов, стимулированных ФГА или другими митогенами [Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Kimber I., 1996; Dawson M.M., Moore M., 1998].

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ДОИММУННЫХ ФАКТОРОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ОРГАНИЗМА И ИММУННОГО СТАТУСА

2.1. Интегральное состояние неспецифической резистентности организма

Интегральное состояние неспецифической резистентности организма (врожденный иммунитет) характеризуется устойчивостью организма к инфекции. Ее можно вызвать внутрибрюшинным или внутриплевральным введением крысам или мышам (только данные животные используются в экспериментальной иммунотоксикологии) суспензии суточной культуры *P. vulgaris*, *E. coli* или других условно-патогенных или патогенных микроорганизмов в различных дозах.

Антиинфекционную интегральную неспецифическую резистентность организма (НРО) чаще всего определяют по летальности крыс или мышей в течение 36 ч от экспериментальной инфекции по среднелетальной дозе (DL₅₀) *P. vulgaris* или *E. coli* и среднеэффективному времени жизни животных (Et₅₀) в опытной и контрольной группах, рассчитанных методом пробит-анализа [Беленький М.Л., 1961]. Введение микроорганизмов производят внутрибрюшинно или внутрилегочно одновременно с применением ФОС или через 6 - 48 ч после них трем группам животных в дозах, составляющих соответственно 1,5; 2,0; 2,5 млрд микробных тел (для *P. vulgaris* или *E. coli*). Могут быть использованы и другие микроорганизмы, при этом может осуществляться их введение в легкие интратрахеально или ингаляционно. Описанный метод является первичной скрининговой моделью для оценки влияния химических веществ на доиммунные механизмы резистентности организма [Забродский П. Ф., 1987, 1994; Mc Grath J., Wong S., 1987].

НРО определяется несколькими факторами защиты организма, к основным из которых относятся белки острой фазы (С-реактивный протеин, маннанысвязывающий лектин, фибриноген, сурфактанты SP-A, SP-D) бактерицидная активность сыворотки крови (БАСК), системы комплемента и пропердина, сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка - ТКБ (β-лизина), лизоцима, интерфероны и фагоцитоз. [Цыбиков Н. Н., 1989; Шмидт Р., Тевс Г., 1996; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

2.2. Интегральное состояние неспецифической и иммунологической резистентности организма

Интегральное состояние неспецифической и иммунологической резистентности организма (показатели врожденного и адаптивного иммунитета) определяют по показателям течения экспериментальной инфекции, вызванной внутрибрюшинным или

внутриперитонеальным введением мышам или крысам суспензии суточной культуры условно патогенных или патогенных микроорганизмов. Для *E. coli* эта доза составляет 4,0; 6,0; 9,0 млрд микробных тел через 4 сут после иммунизации данными микроорганизмами в дозе 10^6 микробных тел. В настоящее время в возникновении различных инфекционных осложнений играет именно условно-патогенная флора [Забродский П.Ф., 1998].

Антиинфекционную интегральную иммунологическую резистентность организма определяли по летальности крыс в течение 48 ч от экспериментальной инфекции по среднелетальной дозе микробных тел (DL_{50}) и среднеэффективному времени жизни животных (Et_{50}) в опытной и контрольной группах, рассчитанных методом пробит-анализа [Беленький М.Л., 1961]. Введение *E. coli* и *P. vulgaris* проводят через различное время (как правило, через 24 ч) после введения ТХВ. Аналогичные инфекционные защитные тесты предлагаются в качестве первичной скрининговой модели для оценки иммунотоксичности химических веществ [Забродский П. Ф., 1987, 1994; Mc Grath J., Wong S., 1987].

2.3. Бактерицидная активность сыворотки крови

Бактерицидная активность сыворотки крови является интегральным показателем естественной способности крови к самоочищению от микроорганизмов. Бактерицидное действие сыворотки крови распространяется как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии. БАСК зависит от многих неспецифических факторов защиты организма и является одним из параметров, используемых для изучения влияния химических соединений на организм. Данный показатель служит чувствительным тестом для выявления ранних изменений в организме под влиянием химических веществ [Бухарин О. В. и соавт., 1985]. Это доказано и более поздними исследованиями [Забродский П. Ф., 1998].

В основе существующих методов определения БАСК лежит оценка индекса ее бактерицидности, подсчет и изучение морфологии микробных клеток, а также изменение оптической плотности микробной взвеси до и после контакта с сывороткой [Ремезов А. И., Башмаков Г. А., 1976]. Данный показатель является чувствительным тестом для выявления ранних изменений в организме под влиянием токсических веществ [Бухарин О. В. и соавт., 1985]. Это доказано и более поздними исследованиями [Забродский П. Ф., 1998].

Существуют основания предполагать, что БАСК может определяться пептидными антибиотиками, синтезируемыми организмом животных и человека. Эти антибиотики, действующие на *E.coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pyogenes* и другие микроорганизмы, открыты и изучены в начале 90-х годов последнего столетия [Voman H.G., 1995]. Вероятно, ТХВ могут изменять их активность путем прямого или косвенного воздействия.

Бактерицидный эффект сыворотки крови определяют по степени нарастания или угнетения оптической плотности микробно-сывороточной

взвеси в опыте и контроле. В качестве микроорганизмов используется суточная культура *E. coli*.

В ускоренном фотонейфелометрическом методе определения БАСК по О. В. Бухарину и А. П. Луда (1972) бактерицидный эффект сыворотки крови определяют, используя в качестве микроорганизмов суточную культуру *E. coli*. В опытную пробирку с 2,5 мл стерильного бульона Кульбака добавляют 0,5 мл исследуемой нативной сыворотки и 0,1 мл суточной культуры кишечной палочки. В контрольной пробирке вместо сыворотки крови использовался изотонический раствор (0,85%) натрия хлорида (0,5 мл). Расчет БАСК проводили по формуле [Ремезов А.И., Башмаков, 1976].

Определение оптической плотности проводят на фотоэлектроколориметре и спектрофотометре. Следует отметить, что данный метод в экспериментальной иммунотоксикологии используется довольно редко в связи с нестабильностью результатов, обязательная строгая синхронизированность проведения манипуляций в опытных и контрольной пробах).

2.4. Сывороточная активность лизоцима

Содержание сывороточного лизоцима определяют методом О.В. Бухарина (1971), основанным на способности лизоцима растворять индикаторный микрококк (*Micrococcus lysodeicticus*), измеряя при этом оптическую плотность опытной и контрольной суспензии микроорганизмов. Взвесь суточной агаровой культуры микрококка на 1/15 М фосфатном буфере (рН 6,2) стандартизировали по левому барабану фотоэлектрокалориметра до оптической плотности 0,66. В опытную пробирку вносили 0,4 мл фосфатного буфера, 0,1 мл исследуемой сыворотки и 2 мл стандартной взвеси микрококка. Смесь выдерживали при 37°С 30 мин, после чего измеряли ее оптическую плотность на ФЭК по правому барабану в кювете №2 с зеленым светофильтром. Для количественной характеристики лизоцима в исследуемой сыворотке с использованием кристаллического лизоцима строили калибровочную кривую, исходя из активности фермента 2, 4, 6, 8, 10, 20, 40, 50 мкг в пробе. Во все пробирки с различным содержанием лизоцима вносили с интервалом 30 с по 2 мл стандартизированной суспензии микрококка. Смесь инкубировали при 37 °С 30 мин, и в каждой пробирке, начиная с первой, измеряли оптическую плотность. Каждое последующее измерение выполняли через 30 с после предыдущего. С помощью калибровочной кривой находили количества лизоцима в исследуемой сыворотке, выраженное в абсолютных единицах. Для удобства расчетов зависимость между оптической плотностью микробной взвеси в опыте и контроле, а также содержанием лизоцима в исследуемой сыворотке использовали таблицу [Ремезов П. И., Башмаков Г. А., 1976].

Определение активности лизоцима проводят в различные сроки после интоксикации химическими веществами.

2.5. Тромбоцитарный катионный белок сыворотки крови

Метод определения содержания тромбоцитарного катионного белка (ТБК) в сыворотке крови (активности β -лизина) основан на избирательной чувствительности к его бактерицидному действию индикаторной культуры - *B. subtilis*. ТБК определяют фотонейфелометрическим ускоренным методом по О.В. Бухарину, Б.А. Фролову и А.П. Луда (1972), учитывая изменение оптической плотности раствора сахарозы при росте в ней индикаторной культуры.

Определение ТКБ проводят в различные сроки после интоксикации ТХВ.

2.6. Комлементарная активность сыворотки крови

Определение активности комплемента проводят гемолитическим методом по Л.С.Резниковой (1967) путем титрования комплемента по 50% гемолизу. Гемолитическую систему готовили из 3% суспензии эритроцитов барана (ЭБ) с добавлением антител к ЭБ путем смешивания раствора ЭБ с сывороткой кролика, иммунизированного эритроцитами барана. Суспензию ЭБ смешивают с сывороткой в равном объеме. Сыворотку берут в разведении 1:500 от титра, вызывающего гемолиз ЭБ. Гемолитическую систему выдерживают при 37 °С 30 мин для сенсibilизации эритроцитов. Исследуемую нативную сыворотку разводят в 10 раз изотоническим 0,85% раствором натрия хлорида и разливают в 10 пробирок в количестве от 0,05 до 0,5 мл с разницей между объемами 0,05 мл. Сыворотку доводят 1,5 мл изотонического раствора NaCl и во все пробирки добавляют по 1,5 мл сенсibilизированной гемолитической системы. Пробирки инкубируют при 37 °С 45 мин, охлаждают в холодильнике 10 мин, центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 мин и колориметрируют в фотоэлектрокалориметре в кюветах (3 мм) с зеленым светофильтром против дистиллированной воды. Процент гемолиза вычисляют по формуле [Новикова Л.В. и соавт., 1981].

2.7. Определение фагоцитарной активности

Один из методов оценки фагоцитарной активности нейтрофилов основан на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия (НСТ) в нерасстворимый диформаза под влиянием супероксиданиона, образующегося в НАДФ-Н-оксидазной реакции. НСТ-тест, интегрально характеризует кислородзависимые антиинфекционные системы фагоцита. Применяется цитохимический вариант этого метода [Измайлова Ф.А., 1985; Park В.Н., 1971]. Учет результатов проводится путем подсчета в каждой мазке 100 нейтрофилов, среди которых определяется процент клеток, содержащих отложения диформаза (НСТ - позитивные нейтрофилы).

Кроме того, оценку фагоцитарно-метаболической активности

полиморфноядерных лейкоцитов проводят общепринятыми методами [Хаитов Р.М. и соавт., 1995; Сакаева Д.Д., Лазарева, 1998; Белокрылов Г.А., Попова О.Я., 2002].

2.8. Оценка функции стволовых кроветворных клеток

Долгое время в качестве стволовых кроветворных клеток (СКК) рассматривали клетки, дающие колонии в селезенке облученных мышей – КОЕс. Однако в последние годы такое предположение было экспериментально опровергнуто. Примитивные СКК (П-СКК) в культуре созревают до стадии КОЕс за 4-6 нед. Несмотря на то что ни КОЕс и ни одна из категорий клеток, способных к колониеобразованию в культуре, не относятся к классу П-СКК [Чертков И.Л. и соавт., 1990], тем не менее, согласно теории клональной саксессии (последовательная смена кроветворных клонов в результате последовательного созревания одной за другой СКК) число 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].

До последнего времени в литературе [Забродский П.Ф., 1998] описывают содержание КОЕ в селезенке после летального облучения мышей с экранированием $\frac{1}{2}$ голени, как отражение функции стволовых кроветворных клеток (хотя с учетом вышеизложенного такое изложение требует определенных пояснений). Это, на наш взгляд, допустимо, исходя из гносеологических причин, не позволяющим исследователям в прикладных областях токсикологии, физиологии и т.п. достаточно быстро вникнуть в суть сложных концепций (гипотез) гемопоэза.

Влияние ксенобиотиков на функцию СКК [в более строгой формулировке по И.Л.Черткову (1990) – на функцию КОЕс] проводят 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 или методом экзогенного клонирования. Возможна оценка числа КОЕс после тотального облучения мышей в дозе 6 Гр. Через 8 сут селезенку извлекают, фиксируют ее в растворе Боуэна и макроскопически подсчитывают 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. ТХВ вводят до облучения, практически одновременно с облучением или после него через 1-2 сут.

2.9. Определение лимфоидного индекса тимуса и селезенки

Лимфоидный индекс (ЛИ) тимуса и селезенки характеризует функциональное состояние данных органов системы иммунитета. В тимус из

костного мозга мигрируют протимоциты. Клетки, мигрирующие из костного мозга в тимус, называют также стволовыми кроветворными клетками, клетками предшественниками лимфопоэза, лимфоцитами-прекурсорами [Кемилева З., 1984; Галактионов В.Г., 1986; Ройт А., 1991; Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. Только один процент тимоцитов мигрирует в периферические лимфоидные органы и принимает участие в иммуногенезе, остальные Т-лимфоциты погибают в тимусе по механизму апоптоза, либо уходят из тимуса живыми и разрушаются в печени, селезенке и кишечнике [Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. Более 95% тимоцитов являются Т-лимфоцитами, остальные клетки относятся к лимфобластам, макрофагам, эпителиальным клеткам, тельцам Гассала, интердигитатным клеткам [Гольдберг Д.И., Гольдберг Е.Д., 1980; Петров Р.В., 1983; Ройт А. и соавт., 2000].

Протимоциты (претимоциты) заселяют кортикальную часть долек вилочковой железы, где пролиферируют, после чего переходят в медуллярную часть, из которой происходит их выход в лимфатические сосуды, путем экстравазации в посткапиллярные венулы или транскапсулярные артерии [Хаитов Р.М. и соавт., 2000]. Селезенка удаляет из кровотока утратившие функциональную активность эритроциты и лейкоциты, а также образует новые лимфоциты в ответ на попавшие из кровотока чужеродные антигены. Лимфоциты заселяют селезенку путем миграции из тимуса и костного мозга Т- и В-клеток [Петров Р.В. и соавт., 1981а; Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1981б; Ройт А., 1991].

Лимфоидный индекс тимуса и селезенки является косвенным показателем содержания ядросодержащих клеток в этом органе, в частности лимфоцитов, в определенной степени он 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; Сидельникова Н.М., 2004]. Кроме того, величина лимфоидного индекса тимуса и селезенки прямо коррелирует с антителопродукцией [Забродский П.Ф., 1998, 2002].

Исследование влияния острой интоксикации ядов общетоксического действия на лимфоидный индекс тимуса и селезенки белых крыс или мышей проводят через 1–8 сут после введения ксенобиотиков. В период от 1 до 2 сут при острых воздействиях ксенобиотиков и экстремальных физических факторов на животных, как правило, происходит максимальное снижение ЛИ тимуса и селезенки [Александров В.Н., 1983; Забродский П.Ф., 1998; 2002; Descotes J., 1986].

С целью оценки лимфоидного индекса тимуса и селезенки определяют их массу гравиметрическим методом. ЛИ вычисляют 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 1–7 сут после интоксикации ТХВ. Через 7 сут, даже при действии в больших дозах цитостатиков, данный показатель нормализуется [Гольдберг Е. Д. и соавт., 1972]. Данные параметры являются косвенными критериями оценки состояния иммунной системы и могут отражать ее

функциональное состояние в целом [Александров В. Н., 1983 Забродский П.Ф., 1998, 2005, 2010].

2.10. Оценка содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета

Содержание Т-клеток в тимусе крыс или мышей определяют общепринятым методом подсчета ядросодержащих клеток в органе, учитывая, что лимфоциты в вилочковой железе представлены Т-популяцией на 85-90% [Гольдберг Д. И., Гольдберг Е. Д., 1980; Петров Р. В., 1987; Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. Лимфоциты в селезенке, лимфатических узлах (для изучения берут паховые лимфоузлы) и костном мозге (исследуют клетки костного мозга бедренной кости) подсчитывают, исходя из их относительного содержания в мазках данного органа, окрашенных по Романовскому–Гимзе.

Для определения содержания в лимфоидных органах лимфоцитов клеточные суспензии из тимуса, селезенки, костного мозга и паховых лимфоузлов крыс или мышей готовят после действия токсикантов, как правило, через 1-6 сут. Содержание лейкоцитов и лимфоцитов в крови животных под влиянием ТХВ определяют через 1–6 сут общепринятыми методами [Гембицкий Е.В. и соавт., 1987]. В более поздние сроки исследование содержания клеток в органах под влиянием острого действия ядов нецелесообразно в связи с практически полным восстановлением их содержания в органах системы иммунитета к 5–6 сут [Забродский П.Ф., 1991].

2.11. Исследование индукции макрофагами гуморального иммунного ответа

Способность макрофагов к индукции гуморального иммунного ответа оценивают через 4-5 сут по числу АОК к ЭБ у линейных крыс-реципиентов (или мышей) после введения токсиканта сингенным животным-донорам. Макрофаги от животных-доноров переносят реципиентам через 1 сут после интоксикации. За 1,5 ч до переноса перитонеальных макрофагов в брюшную полость крысам или мышам вводят $2,5 \cdot 10^8$ ЭБ в 0,1 мл изотонического раствора хлорида натрия [Argyris B.F., 1967].

2.12. Изучение кооперации Т- и В- лимфоцитов

Кооперацию Т- и В- лимфоцитов исследуют *in vivo* и *in vitro*. Методы исследования кооперации Т- и В- лимфоцитов *in vivo* изложены в монографии [Петров Р. В. и соавт., 1981a].

Исследование взаимодействия Т- и В-клеток *in vitro* включает получение Т-клеток. Для этого используют метод фильтрования селезеночной суспензии линейных мышей через нейлоновую вату (“Нитрон”) [Ширшев С.В., 1998]. Для выделения В-лимфоцитов применяют реакцию комплементзависимого масс-цитоллиза. В качестве цитотоксической

сыворотки используют моноклональные антитела против антигенов Т-лимфоцитов мыши. Из суспензии спленоцитов макрофаги удаляют методом негативной селекции, используя их способность прилипать к стеклянной поверхности [Ширшев С.В., 1998]. Жизнеспособность клеток оценивают в тесте с трипановым синим (она должна составлять 90-98%). Инкубируемая по методу J. K. Thomas, T. Imamura [1986] культура содержит 10^6 и $5 \cdot 10^5$ В- и Т-клеток соответственно и 10^7 эритроцитов барана в 0,15 мл среды Хенкса. Антителообразующие клетки (АОК) подсчитывают 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 определяют также путем сравнения числа АОК после инкубации той или иной популяции лимфоцитов в течение 1–4 ч с различными концентрациями ТХВ (10^{-9} – 10^{-1} М).

2.13. Оценка гуморальных иммунных реакций

Для оценки гуморальных иммунных реакций в качестве антигенов применяли эритроциты барана (ЭБ) и брюшнотифозный Vi-антиген (Vi-Ag).

Использование данных антигенов позволяет рассмотреть влияние токсикантов на Т-зависимый (ЭБ) или Т-независимый (Vi-Ag) иммунный ответ в сравнительном аспекте, а также оценить роль Т-хелперов в реализации гуморального звена иммунного ответа [Утешев Б. С., 1984; Descotes J., 1986]. Данный подход широко используется для оценки действия химических соединений на систему иммунитета [Плецитый К. Д., 1985; Ройт А., 1991; Забродский П.Ф., 2000, 2006].

Изучение показателей Т-зависимого гуморального иммунного ответа проводят через 5, 8 и 13 суток (могут быть выбраны и другие сроки исследования) после острой интоксикации. Иммунизацию эритроцитами барана проводили путем их внутрибрюшинного введения в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия. Титры антител к ЭБ определяли в реакции гемолиза эритроцитов в присутствии комплемента. Все реакции проводились на стерильных пластиковых микропланшетах. Гуморальный иммунный ответ оценивают по отрицательному двоичному логарифму титра антител (ОДЛТА). Данный тест отражает способность органов системы иммунитета синтезировать IgM через 5 сут и IgG (преимущественно) через 8–14 сут [Ройт А., 1991; Casale G.P. et al., 1983]. Максимальный синтез IgG к ЭБ происходит через 14 сут после иммунизации.

Гуморальную иммунную реакцию к Т-зависимому и Т-независимому антигенам чаще всего оценивают через 4–5 суток после иммунизации по числу АОК в селезенке [Белокрылов Г. А. и соавт., 1980; Jerne N. K., Nordin A. A., 1963] после введения ФОС с внутрибрюшинной иммунизацией крыс ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия и Vi-Ag в дозе 8 мкг/кг (использованный тест отражает синтез IgM В-клетками селезенки). АОК, характеризующие продукцию IgG, определяют в селезенке

методом непрямого локального гемолиза в геле [Jerne N. K., Nordin A. A., 1963; Dresser D.W., Wortis H.H., 1965]. Данные литературы позволяют полагать, что данный метод характеризует преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, так как Th1-лимфоциты обеспечивают возможность образования в этот период антителогенеза, кроме IgM, также и IgG2a, составляющих не более 20% от всех подклассов IgG [Ройт А. и соавт., 2000].

Введение ФОС проводят практически одновременно с иммунизацией. Кроме того, при исследовании Т-зависимого антителообразования по числу АОК в селезенке ксенобиотики вводят через 1 и 3 сут после иммунизации. При этом одновременное введение токсикантов с ЭБ и через 1 сут после иммунизации позволяет оценить индуктивную фазу гуморального иммунного ответа, а через 3 сут – продуктивную [Забродский П.Ф. и соавт., 2005; Deskotes J., 1986].

2.14. Исследование функции Т-лимфоцитов

Исследование функции Т-лимфоцитов проводят по реакции торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ) периферической крови в присутствии конконавалина А (КонА) или фитогемагглютинаина (ФГА). Это один из очень простых, но достаточно информативных тестов. 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., Брок Й., 1986].

Для исследования РТМЛ кровь у крыс или мышей забирают из подъязычной вены через 1–6 сут после введения исследуемых ксенобиотиков. В капилляры для определения С-реактивного белка набирают с часового стекла смесь, состоящую из гепаринизированной крови (0,2 мл) исследуемых крыс или мышей (опыт и контроль) и раствора КонА (0,5 мл). Концентрация митогена в растворе должна составлять 10-100 мкг/мл. Капилляры запаивают с одного конца парафином и центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин, затем в вертикальном положении их инкубируют 24 ч в термостате при температуре 37 °С. Учет реакции проводят путем измерения длины зоны миграции основной массы лейкоцитов от границы эритроцитарного осадка в контроле и опыте [Гембицкий Е.В. и соавт., 1987]. Величина миграции лейкоцитов обратно пропорциональна активности Т-клеток.

2.15. Изучение формирования гиперчувствительности замедленного типа

Для оценки влияния ксенобиотиков на формирование реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у крыс или мышей используют модель данной реакции, в которой не применяется перенос

сингенных иммуноцитов, и адоптивные модели (связанные с переносом клеток; to adopt –принимать, усваивать, присваивать). ГЗТ оценивают после иммунизации внутривенным введением $2 \cdot 10^8$ эритроцитов барана (ЭБ) в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия одновременно с применением ксенобиотиков. Разрешающую (вызывающую реакцию) дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$ в 0,05 мл изотонического раствора хлорида натрия) вводят под апоневроз задней лапы крысы через 4 сут после иммунизации. Оценку реакции осуществляют через 24 ч (можно проводить оценку через 6 – 48 ч) по приросту массы стопы задней лапы крыс по сравнению с контрольной – контрлатеральной [Брюхин Г.В. и соавт., 1990]. Ксенобиотики вводят одновременно с иммунизацией или через 1–4 после нее. Данный тест отражает функцию Th1-лимфоцитов и способность их к продукции $\text{TGF}\beta$, ИЛ-3, γ -интерферона, ИЛ-12, β -фактора некроза опухоли - лимфотоксина и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) [Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Ройт А. и соавт., 2002].

Локальную адоптивную ГЗТ оценивают у линейных крыс-реципиентов (мышей) после введения им под апоневроз стопы смеси ЭБ ($5 \cdot 10^8$) и спленоцитов ($4 \cdot 10^8$) от сингенных интактных животных (отрицательный контроль), животных, иммунизированных 10^8 ЭБ (положительный контроль) и спленоцитов крыс или мышей, получавших ксенобиотик (опытная серия). Селезенку для получения клеток извлекают у доноров через 4 сут после иммунизации. Опытной группе за 1 сут до извлечения селезенки вводят ксенобиотик (опытная серия). Суспензию спленоцитов готовят на среде № 199.

При исследовании формирования ГЗТ у линейных крыс-реципиентов (мышей) после переноса им спленоцитов ($5 \cdot 10^8$) от иммунизированных 10^8 ЭБ сингенных доноров, реципиентов через 1 ч сенсibilизируют внутривенным введением 10^8 ЭБ. Через 4 сут под апоневроз стопы реципиентов вводят разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) с последующей оценкой реакции через 24 ч. Спленоциты получают через 5 сут после иммунизации доноров. Ксенобиотик вводят реципиентам через 30 мин после иммунизации. В данном эксперименте формирование ГЗТ отражало влияние ксенобиотика на вторичный иммунный ответ в модели адоптивной реакции, связанной с переносом иммунных спленоцитов животным-реципиентам

Исследование формирования ГЗТ у крыс при переносе супрессорных клеток проводят аналогично описанному опыту. Влияние ТХВ на формирование спленоцитов-супрессоров исследуют путем практически одновременного введения токсиканта и ЭБ в толерогенной дозе (вызывающей значительное снижение или полное отсутствие иммунной реакции на антиген) крысам-донорам [Фролов и соавт., 1985; Забродский П.Ф., Мышкина А.К., 1990; Германчук В.Г., 2000].

2.16. Исследование активности естественных клеток-киллеров

Оценку активности естественных клеток-киллеров проводят по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) спектрометрическим (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 получают, удаляя прилипающие клетки инкубацией в колонках с нейлоновой ватой. Эффекторные клетки взвешивают 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 ставят в пластиковых камерах «Linbro» (76-013-05) с круглым дном. Результаты реакции учитывают 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. Проводят 3 контроля: эффекторные клетки в питательной среде без ЭК; питательная среда; взвесь ЭК в питательной среде без эффекторов. В конце инкубации содержимое лунок осторожно ресуспендируют и камеры центрифугировали 5 мин при 100g. 0,2 мл надосадка переносят в другие свободные ряды микропластины, а к осадку приливают 0,2 мл 0,25% раствора додецилсульфата натрия (ДСН) для лизиса ЭК, оставшихся неразрушенными в ходе цитотоксической реакции.

Оптическую плотность осадков измеряют в специально изготовленных микрокуветах с длиной оптического пути 1 см и объемом 0,1 мл на спектрофотометре 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:

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

где E_k - оптическая плотность лизированного осадка ЭК контроль

ной 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* определяют спектрофотометрически описанным методом после инкубации клеток-эффекторов, получаемых из спленоцитов крыс, в течение 4 ч в среде 199 с содержанием токсикантов в концентрациях 1, 10, 100 и 1000 мМ. В ходе опыта обеспечивается соотношение эффектор-мишень 10:1 (или 25:1, 50:1).

Результаты реакции учитывают по спектрофотометрическому определению концентрации гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЭК.

Кроме того, существует радиометрический метод оценки активности ЕКК с использованием ^{51}Cr . Результат учитывают по высвобождению ^{51}Cr из меченых клеток определенных опухолей [Ройт А. и соавт., 2000]

2.17. Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности

В настоящее время доказано, что К-клетки, реализующие антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), – это ЕКК, использующие для усиления реакции антитела (IgG) [Ройт А., 1991; Хаитов Р. М. и соавт., 2002]) Антителозависимую клеточную цитотоксичность определяют спектрофотометрически по методу Ю. И. Зимина, В. Ф. Ляхова (1985), через 5 сут после иммунизации эритроцитами барана (или без иммунизации), через различные сроки после введения ксенобиотика. Животных иммунизируют ЭБ ($5 \cdot 10^8$ клеток в 0,5 мл изотонического раствора хлорида натрия внутрибрюшинно или внутривенно). АЗКЦ оценивают в различных органах системы иммунитета через 5 сут после иммунизации.

Существует и радиометрический метод оценки АЗКЦ с использованием ^{51}Cr . Результат учитывают по высвобождению ^{51}Cr из меченых клеток определенных опухолей [Ройт А. и соавт., 2000].

2.18. Оценка активности ацетилхолинэстеразы в Т-клетках

Для определения активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в Т-клетках тимуса и селезенки используют метод выделения популяции Т-лимфоцитов с максимальной активностью АХЭ из ядросодержащих клеток органов в градиенте плотности перколла (удельная плотность составляла 1,065). Клетки отмывают в 0,1 молярном фосфатном буфере (pH–8,0) и подсчитывают содержание лимфоцитов в суспензии. Выделенные таким образом клетки

составляют около 80% Т-лимфоцитов «низкой плотности», характеризуются высокой активностью АХЭ [Szelenyi J.G., et al., 1982]. Активность АХЭ определяют по методу [Ellman G.M., et al., 1961]. К 1,5 мл суспензии, содержащей $1 \cdot 10^8$ клеток в 1 мл 0,1 молярного фосфатного буфера (рН – 8,0), добавляли 20 мкл 0,075 моль ацетилхолина иодида и 50 мкл 0,01 моль дитио-бис-нитробензойной кислоты. После 20 мин инкубации при 25° С реакцию останавливают добавлением 100 мкл 1,5-дифтор-2,4-динитробензола и регистрируют увеличение оптической плотности спектрофотометрически (420 нм) [Szelenyi J.G., et al., 1982]. За единицу активности АХЭ (Ед) принимают мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл суспензии, содержащей 10^9 Т-лимфоцитов [Kutty K. M. et al., 1976].

Учитывая зависимость антителогенеза от перераспределения иммунокомпетентных клеток между лимфоидными органами [Maslinski W. K et al., 1987; Tiefenbach B., Wichner S., 1985], подсчитывают число ядродержащих клеток в тимусе и селезенке после их выделения из органов в среду № 199 путем подсчета в камере Горяева через 4 сут (могут быть, в зависимости от задачи исследования, выбраны и иные сроки) после иммунизации (через 1 и 2 сут после введения последней дозы АХ и холинотропных веществ соответственно).

Число Т- и В-лимфоцитов в тимусе и селезенке определяют по методике [Thomas I.K., Imamura T., 1986], а активность АХЭ – по описанному методу [Ellman G.M., et al., 1961, Szelenyi J.G., et al., 1982].

2.19. Определение показателей ПОЛ, концентрации кортикостерона и катехоламинов в крови

Переокисное окисление липидов (ПОЛ) оценивали по суммарной продукции радикалов методом люминолзависимой хемилюминесценции, активированной форболовым эфиром (0,156 МКм) [Takayama F. et al, 1998] по содержанию малонового диальдегида [Коробейникова Э.Н., 1989], активности каталазы и пероксидазы в крови спектрофотометрически [Валеева И.Х. и соавт., 2002] через различные сроки после применения токсикантов. При этом активность каталазы и пероксидазы являлась показателем функции антиоксидантной системы (АОС).

Для определения уровня кортикостерона в плазме крови крыс используется флюорометрический метод определения уровня неконъюгированных 11-оксикетостероидов [Moog P. de et al., 1962; 1976] через 1 – 24 ч после интоксикации ксенобиотиками.

Экстракция кортикостерона из анализируемых образцов плазмы крови проводится четыреххлористым углеродом. Для удаления пигментов плазмы и

нестероидных соединений экстракты промывают с помощью 0,1% раствора NaOH и дистиллированной воды. Затем верхний слой, включающий в себя кортикостерон, переносится, выпаривается и повторно экстрагируется 6 мл метилхлорида или хлороформа. Для образования флюоресцентных комплексов используется смесь концентрированной серной кислоты и этанола в соотношении 3:1. После развития флюоресценции растворы исследуют на флюориметре с использованием интерферентных фильтров: первичного с пропусканием волн длиной 470 нм и вторичного – 540 нм.

Содержание адреналина и норадреналина определяют в плазме крови животных по методу Э.Ш. Матлиной (1965). Этот метод является весьма трудоемким и устаревшим.

В настоящее время определение катехоламинов в тканях лабораторных животных проводят, используя радиометрический метод в сочетании тонкослойной хроматографии [Ткачева Г.А. и соавт., 1983; Russell B.C. et al., 2015].

В качестве иммуностимуляторов (иммуномодуляторов) в эксперименте использовали Т-активин (20 мкг/кг), имунофан (20 мкг/кг), полиоксидоний (150 мкг/кг) в эквитерапевтических дозах, то есть дозах, вызывающих рекомендуемый данными литературы и справочниками, одинаковый терапевтический эффект (высшая разовая доза). Препараты вводили внутримышечно однократно, ежедневно в течение 7 сут при хронической интоксикации ФОС в течение 30 сут, начиная с 24 сут, а при интоксикации в течение 60 сут – начиная с 54 сут; при острой интоксикации – через 30 мин после введения ФОС однократно, ежедневно, 4 сут. Дозы иммуномодуляторов для животных обоснованы данными литературы и расчетами (исходя из данных, приведенных в справочниках с описанием и рекомендациями назначения лекарственных средств для человека).

Функцию Th1- и Th2-лимфоцитов оценивали также по концентрации интерферона- γ (ИФН- γ) и ИЛ-4 соответственно в плазме крови крыс и мышей методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits MyBioSource) в соответствии с инструкциями изготовителя. Аналогично определяли концентрацию в плазме крови животных иммунорегуляторных цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4), провоспалительного цитокина (ИЛ-6) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-13).

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента, а также других общепринятых параметрических и непараметрических методов. Порог статистической значимости был установлен на уровне $p=0,05$

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

ГЛАВА 3. ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИЕ СОЕДИНЕНИЯ

3.1. Общая характеристика фосфорорганических соединений

В 1902 г. А.Е. Арбузов открыл новый путь получения эфиров алкилфосфиновых кислот, получивших название “перегруппировки Арбузова”. Это позволило в 1931 г. А.Е. Арбузову и Б.А. Арбузову впервые получить эфиры пирогосфористой, а также моно- и дитиопирогосфорных кислот и выделить в чистом виде этиловый эфир пирогосфорной кислоты. В 1932 г. Lange и Kruger синтезировали ряд алкиловых эфиров фторгосфорной кислоты, получивших название «эфиров Ланге». Было установлено, что эти соединения ядовиты. Начиная с 1950 г. синтез новых фосфорорганических соединений (ФОС) принял исключительно широкий размах [Голиков С.Н., 1968; Rosenberg Y.J., 2005; Kusa K. et al, 2006]. В настоящее время производство ФОС в мире составляет сотни тысяч тонн [Каган Ю.С., 1977; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]

ФОС составляют обширную группу веществ, широко используемых в сельском хозяйстве в качестве пестицидов (ФОП): инсектицидов – для уничтожения насекомых, акарицидов – клещей, нематоцидов – червей, зооцидов и рентицидов – грызунов, лимацидов – моллюсков, ларвицидов – личинок насекомых, овоцидов – яиц насекомых, фунгицидов – грибов, гербицидов – сорняков, дефолиантов (препаратов, вызывающих опадение листьев и облегчающих уборку некоторых культур), десикантов (препаратов, способствующих подсушиванию растений). В промышленности ФОС используются для синтеза различных веществ, обладающих избирательным действием в отношении определенных видов животных и другими целями. В быту ФОС применяются преимущественно в качестве инсектицидов. Боевые отравляющие вещества (БОВ) составляют специальную группу фосфорорганических отравляющих веществ (ФОВ), которые, включая средства доставки (применения), являются химическим оружием [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

По своему химическому строению большинство ФОС относятся к следующим группам: эфиры тиогосфорной кислоты (тиофос, метафос, метилнитрофос, меркаптофос, трихлорметафос-3), эфиры дитиогосфорной кислоты (карбофос, фосфамид), амиды пирогосфорной кислоты (октаметил), эфиры алкилгосфорных кислот (хлорофос, ДДВФ) [Голиков С.Н., 1968; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000].

В отечественной литературе ФОС по токсичности разделяют на 4 группы: сильнодействующие токсичные вещества – метафос, тиофос, меркаптофос, метилэтилтиофос (DL_{50} - 10- 50 мг/кг), высокотоксичные вещества – метилмеркаптофос, фосфамид, ДДВФ, базудин, антио, цидеал, фталофос, бензофосфат (DL_{50} - 50-200 мг/кг), соединения средней токсичности – хлорофос, метилнитрофос, карбофос, трихлорметафос-3, сайфос (DL_{50} - 200-1000 мг/кг), вещества малой токсичности – винилфосфат, бромосфос, абат, цианокс, валексон, демуфос (DL_{50} - более

1000 мг/кг) [Медведь Л.И. и соавт., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. В особую группу можно выделить ФОВ, являющиеся БОВ с ЛД₅₀ менее 10 мг/кг (зарин, зоман, VX) и яды, относящиеся к, так называемым, супертоксикантам (ЛД₅₀ – менее 5 мг/кг при внутрижелудочном введении) [Куценко С.А., 2004; Rosenberg Y.J., 2005].

ФОС представляют собой большую группу токсикантов, обладающих антихолинэстеразным эффектом и довольно подробно описанных в многочисленных учебниках и монографиях [Голиков С.Н., 1968; Медведь Л.И. и соавт., 1968; Каган Ю.С., 1977; Саватеев Н.В., 1978; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Маркова И.В. и соавт., 1998; Куценко С.А., 2004].

Основной механизм действия ФОС на системы и органы организма – нарушение каталитической функции ферментов холинэстераз (антихолинэстеразное действие). Инактивация ацетилхолинэстеразы приводит к накоплению ацетилхолина в центральной нервной системе (ЦНС), мозговом веществе надпочечников, ганглиях симпатической и парасимпатической нервной системы, а также в синаптической щели нервных окончаний парасимпатической нервной системы, подходящим к м-холинорецепторам внутренних органов. Кроме того, ацетилхолин выделяется из пресинаптической мембраны нервных окончаний симпатической нервной системы, иннервирующей потовые железы, и соматической нервной системы, иннервирующей скелетные мышцы. В результате действия ацетилхолина реализуется мускариноподобное, никотиноподобное и центральное действие ФОВ [Саватеев Н.В., 1978; Мошкин Е.А. и соавт., 1980; Лужников Е.А., 1982; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

К основным неантихолинэстеразным механизмам действия ФОВ относится их способность фосфорилировать некоторые белки, действовать на м- и н-холинорецепторы (курарепоподобное действие на скелетные мышцы), взаимодействовать с протеолитическими ферментами, оказывать влияние на адренергические структуры, обеспечивать так называемое «облегчающее» действие (способствует выходу ацетилхолина из нервных окончаний) [Прозоровский В.Б., Саватеев Н.В., 1976; Саватеев Н.В., 1978; Виноградов В.М. и соавт. 1985; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 1989, 2000; Sharp D., 2006].

Острые и хронические интоксикации ФОС, как правило, происходят при нарушении техники безопасности в процессе использования данных соединений по назначению, а также при употреблении их с суицидальной целью или в качестве суррогатов алкоголя. В связи с реализацией Федеральной целевой программы «Уничтожение запасов химического оружия в Российской Федерации», предусматривающей широкомасштабную утилизацию токсичных химикатов, существенная часть которых является

фосфорорганическими отравляющим соединениям, не исключена вероятность массовых отравлений при авариях и нарушениях техники безопасности. Возможно использование ФОС в качестве отравляющих веществ при осуществлении террористических актов [Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005] (например, использование в 1995 году зарина в метро Токио сектой «Аум Синрике» [Masuda N. et al., 1995]).

При острых отравлениях ФОС возникают поражения многочисленных органов и систем, что проявляется психоневрологическими симптомами, нарушением функции дыхания, сердечно-сосудистой системы, желудочно-кишечного тракта, печени, почек и других органов и систем [Голиков С.Н., 1968; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006].

Наиболее частыми осложнениями тяжелых отравлений ФОС являются пневмонии, поздние интоксикационные психозы и полиневриты [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Rosenberg Y.J., 2005; Sharp D., 2006].

Существуют основания полагать, что одной из причин постинтоксикационной пневмонии является нарушение регуляции системы иммунитета [Забродский П.Ф. и соавт., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Sharp D., 2006]. Возможны и другие инфекционные осложнения и заболевания после острого отравления ФОС, а также патологические нарушения, тесно связанные с изменением регуляции иммунного гомеостаза: мутагенное, канцерогенное, демиелинизирующий эффект и аллергические реакции [Каган Ю.С., 1977; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2000].

Механизм восстановления ферментативной активности АХЭ состоит в связывании реактивирующего агента с остатком ФОС и отрыве последнего от фермента. Отравленный энзим может очень быстро «стареть» и тогда не реактивируется. Например, полупериод «старения» составляет при ингибированииДФФ – 20 мин, зоманом – 5 мин и т. д. Поэтому применение реактиваторов должно осуществляться как можно раньше.

Восстановление каталитической активности холинэстеразы, угнетенной ФОВ, определяется как процесс реактивации ацетилхолинэстеразы. Фармакологические препараты, способные ускорить такой процесс реактивации, называются реактиваторами холинэстеразы и являются антидотами ФОВ. Кроме того, основным антидотом ФОВ является атропин. В Вооруженных Силах РФ для оказания первой медицинской помощи при отравлениях боевыми отравляющими веществами, относящимися к ФОВ, существуют специальные рецептуры, содержащие холиноблокаторы, реактиваторы холинэстеразы и ряд других соединений [Саватеев Н.В., 1978; Куценко С.А., 2004].

3.2. Основные токсикометрические характеристики ФОС и холиномиметиков

По данным различных авторов иммунотоксические параметры одних и тех же ФОС могут различаться, как правило, в 2-3 раза. Эта общая особенность для всех ТХВ, связанная с проведением экспериментов на животных в различное время года, обусловленная генотипическими различиями животных одного вида, особенностями их содержания, питания, климатической зоной, микроклиматом вивария и т.п. Чем выше токсичность химических соединений, тем меньше различия токсикометрических параметров, установленные в различных лабораториях.

Краткая токсикометрическая характеристика соединений (DL_{50}), применяющихся в качестве ФОИ, приведена в табл. 3.1 [Голиков С.Н., 1968; Забродский П.Ф., Линючев М.Н., 1993].

Таблица 3.1. Токсичность фосфорорганических инсектицидов

Препарат	Вид животного	Способ введения	DL_{50} мг/кг
Тиофос	Крысы	Внутрь	6-15
Меркаптофос	Крысы	Внутрь	2,5-12,0
Октаметил	Крысы	Внутрь	6-7
Метафос	Крысы	Внутрь	15-25
Метилмеркаптофос	Крысы	Внутрь	55-138
Фосфамид	Крысы	Внутрь	230
Метилнитрофос	Крысы	Внутрь	850
Трихлорметафос	Крысы	Внутрь	330
Хлорофос	Крысы	Внутрь	400-1000
Метилацетофос	Мыши	Внутрь	300-1020
Авенин	Мыши	Внутрь	4000
Метилпаратион	Мыши	Внутрибрюшинно	4-10
Гутион	Мыши	Внутрибрюшинно	6-11
Фолекс	Мыши	Внутрибрюшинно	80-160
Ко-пал	Мыши	Внутрибрюшинно	5-9
Паратион	Мыши	Внутрибрюшинно	1-5
Систакс	Мыши	Внутрибрюшинно	1-2
Делнав	Мыши	Внутрибрюшинно	14-21
Тритион	Мыши	Внутрибрюшинно	7-13
Дисистакс	Мыши	Внутрибрюшинно	1,5-2,5

Токсичность (DL_{50}) прямых холиномиметиков и обратимых и необратимых ингибиторов холинэстеразы по данным различных авторов приведена в табл. 3.2.

Таблица 3.2. Токсичность прямых холиномиметиков и обратимых и необратимых ингибиторов холинэстеразы

Препарат	Вид животного	Способ введения	DL ₅₀ , мг/кг
Аминостигмин	Крысы	Внутрибрюшинно	0,41
	Мыши	Внутрибрюшинно	0,16
	Кролики	Внутрь	3,6
Армин	Крысы	Внутривенно	0,2
	Крысы	Внутрь	1,0
	Мыши	Внутривенно	0,2-04
	Мыши	Подкожно	0,3-1,2
	Мыши	Внутрибрюшинно	0,7-1,0
Диизопропилфторфосфат	Мыши	Внутривенно	0,2-0,7
	Мыши	Внутрь	36-37
	Мыши	Подкожно	3,2-6,2
	Крысы	Внутривенно	0,3-0,5
Пиридостигмин	Мыши	Внутривенно	1,4-1,5
	Мыши	Внутрибрюшинно	5,5
	Мыши	Подкожно	2,7
	Мыши	Внутрь	32
Прозерин	Мыши	Внутривенно	0,16-0,40
	Мыши	Внутрибрюшинно	0,32-0,70
	Мыши	Подкожно	0,30-0,80
	Крысы	Внутривенно	0,25
	Крысы	Внутрибрюшинно	0,30
	Крысы	Подкожно	0,70
Физостигмин (эзерин)	Мыши	Внутривенно	0,39-0,55
	Мыши	Внутрибрюшинно	0,85-2,30
	Мыши	Подкожно	0,75-2,30
	Крысы	Подкожно	2,0-3,0
	Человек	Внутрибрюшинно	0,03
Лобелин	Крысы, мыши	Подкожно	80-100
	Крысы, мыши	Внутрибрюшинно	75
Никотин	Мыши	Внутримышечно	0,3
Пентамин	Мыши	Внутрь	2500
	Мыши	Подкожно	187
	Мыши	Внутривенно	60

В табл. 3.3 приведена токсичность (DL₅₀) ФОВ, относящихся к антихолинэстеразным токсичным химикатам.

Таблица 3.3. Токсичность боевых ФОВ (по данным различных авторов)

ТХ	Вид животного	Способ введения	ЛД ₅₀ , мг/кг
Зарин	Крысы	Внутривенно	0,04-0,06
	Крысы	Внутрь	0,06-0,60
	Мыши	Внутривенно	0,02-0,14
	Мыши	Подкожно	0,05-0,30
	Человек	Внутримышечно	0,03
Зоман	Крысы	Внутривенно	0,02-0,08
	Крысы	Внутрь	0,06-0,60
	Мыши	Внутривенно	0,03-0,09
	Мыши	Подкожно	0,04-0,16
	Мыши	Внутрь	0,04-0,06
	Человек	Подкожно	0,003
VX	Мыши, крысы	Подкожно	0,010-0,025
	Человек	Внутрь	0,07

3.3. Токсикологические свойства хлорофоса

Хлорофос (диптерекс, диплокс, трихлорфон, триэтилорфон, Байер Л-13/99,0,0-диметил-1-окси-2,2,2-три-хлорэтанфосфат) относится к эфирам алкилфосфорных кислот. Химически чистый хлорофос - белое кристаллическое вещество с запахом, напоминающим эфир. Молекулярный вес - 257,42 Да; точка плавления 78-83°. Температура кипения при 0,1 мм рт. ст. составляет 100° С, упругость паров - 0,00003 при 24° С. Летучесть - 0,11 мг/м³ при 20° С и 0,38 мг/м³ при 30° С. Растворяется в воде, бензоле, эфире, особенно хорошо - в хлороформе. Технический препарат - твердое вещество, напоминающее парафин, или темная густая жидкость с эфирным запахом. Температура плавления 68-70° [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983].

Хлорофос применяется главным образом в водных растворах. Широко используется в дезинфекционной практике для уничтожения мух, клопов, блох, тараканов. Для защиты растений хлорофос применяется как контактный и кишечный инсектицид. Особенно эффективен для уничтожения грызущих личинок и насекомых (гусениц, майских жуков, июньского хруща, монашенки). Благодаря своему системному действию хлорофос пригоден также для борьбы с вредителями, минирующими листья растений. В полеводстве хлорофос применяется главным образом против личинок свекловичной мухи. Эффективен против клопа-черепашки, хлебного жука, хлебной жужелицы, зерновой моли. Кроме того, он с успехом используется против рапсового пилильщика и гусениц мотылька, а также для уничтожения сенного червя и листоверток на виноградниках. В плодоводстве хлорофос применяется против яблоневого, грушевого, сливового и крыжовникового пилильщиков и яблоневой моли. Хлорофос пригоден также для уничтожения зимней пяденицы, кольчатого шел-

копряда, златогузки, непарного шелкопряда, вишневой фруктовой мухи, различных видов долгоносиков. Хлорофос обладает высокой инсектицидной эффективностью в отношении рисового фразника и хлопкового червя [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977].

В последнее время хлорофос стали применять в ветеринарии для борьбы с эндо- и эктопаразитами на овцах и коровах, а также против личинок овода. В ветеринарной практике он может быть использован и в качестве противоглистного средства. Токсическое действие хлорофоса сходно с действием других ФОС, но проявляется медленнее и менее интенсивно. В отличие от многих ФОС хлорофос оказывает местное действие на кожу (гиперемия, трещины, подкожные кровоизлияния). При интоксикации хлорофосом наряду с понижением активности холинэстеразы происходит изменение активности трансаминазы крови, состава фракций белка, а также нарушение антитоксической функции печени [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983].

Отравления хлорофосом возможны при контакте с большими количествами препарата: открывание бочек, набирание и взвешивание ядохимиката, приготовление рабочих растворов, заправка бака самолета раствором. Минимально действующие дозы хлорофоса для людей при однократном приеме внутрь не превышают 5-7 мг/кг. DL_{50} хлорофоса для неинбредных белых мышей и крыс составляет при различных путях введения от 400-1000 мг/кг. Самцы крыс более устойчивы к действию хлорофоса [Голиков С.Н., 1968; Забродский П.Ф., Линючев М.Н., 1993].

3.4. Токсикологические свойства диметилдихлорвинилфосфата

ДДВФ (диметилдихлорвинилфосфат, вапона, винилфосфат, дихлофос, перкола, нуван, геркол) является эфиром эфиры алкилфосфорной кислоты (О,О-диметил-О,2,2-дихлорвинилфосфат). ДДВФ является бесцветной, прозрачной жидкостью с неприятным запахом. Молекулярный вес составляет 220,99 Да; точка кипения – 120°C при давлении 3 мм рт. ст. и 74°C при - 3 мм рт. ст. Летучесть равна 145 мг/кг при 20° и 350 мг/кг – при 30°C. В воде растворимость ДДВФ составляет 10 г/л [Каган Ю.С., 1977]. Дихлофос быстро разрушается во внешней среде. При 20°C в воде гидролизует 50% ДДВФ в течение 61,5 сут, а при температуре 70°C – за 25 мин.

Используется для уничтожения малярийных комаров, эффективен против растительноядных клещей, щитовок, мух, минирующей моли, практически всех видов насекомых, дезинсекции транспортных самолетов и складов. В сельском хозяйстве используется в виде 50% эмульсии [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983].

Являясь высокотоксичным соединением, ДДВФ в экспериментальных исследованиях может использоваться для моделирования иммунотропных эффектов боевых ФОВ [Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Следует отметить, что ДДВФ используется в ВВС РФ для дезинсекции транспортных самолетов и складов [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983], а также для борьбы с педикулезом [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Острое отравление ДДВФ характеризуется типичной клинической картиной проявления интоксикации ФОС. В опытах на крысах показано, что DL_{50} для данного вида животных составляет при внутрижелудочном введении 25-60 мг/кг. При нанесении на кожу DL_{50} ДДВФ равно 107 мг/кг для самцов и 75 мг/кг для самок крыс. DL_{50} ДДВФ для белых крыс составляет 32-40 мг/кг при внутрибрюшинном введении [Голиков С.Н., 1968]. Среднелетальная доза ДДВФ для белых крыс при подкожном введении яда составляет $65,0 \pm 2,5$ мг/кг [Беликов В.Г., 2000]. По данным Забродского П.Ф. и Линючева М.Н. (1993) DL_{50} ДДВФ для мышей обоего пола при внутрибрюшинном и пероральном введении составляет $40,0 \pm 0,8$ и $126,0 \pm 5,7$ мг/кг соответственно. В организме хлорофос метаболизируется, образуя ДДВФ, поэтому признаки отравления этих ФОС очень похожи. В концентрации $8,2 \cdot 10^{-7}$ М ДДВФ ингибирует активность холинэстеразы эритроцитов крупного рогатого скота на 50% [Голиков С.Н., 1968].

Таким образом, DL_{50} ДДВФ для неинбредных белых мышей и крыс составляет при различных путях введения от 25 до 126 мг/кг. Самцы крыс более устойчивы к действию дихлофоса. Мыши обладают менее выраженной чувствительностью к ДДВФ, чем крысы.

3.5. Токсикологическая характеристика метафоса

Метафос (метилпаратион, метацид, нитрокс 80, фолидол, дальф, вофатокс, 0,0-диметил-0-4-нитрофенилтиофосфат) является белым кристаллическим веществом. Молекулярный вес – 263,21 Да; температура кипения - 158° ; температура плавления - $36-36,5^{\circ}\text{C}$; плотность - $1,351 \text{ г/см}^3$. Летучесть при 20°C - 14 мг/м^3 , при 30°C – $0,53 \text{ мг/м}^3$. Практически не растворим в воде, плохо растворим в керосине и других продуктах перегонки нефти. Хорошо растворяется в растительных маслах, углеводородах жирного и ароматического ряда, кетонах, сложных эфирах.

Технический метафос - желтая или коричневая жидкость с неприятным запахом. Выпускается в виде 2,5% дуста и 30% концентрата эмульсии. Применяется для борьбы с клопом-черепашкой на посевах злаковых культур, хлопковым долгоносиком, а также для уничтожения клещей, тлей, трипсов. Метафос - быстродействующий кишечный, контактный и ингаляционный инсектицид, но с более сильным начальным действием [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977].

Метафос вызывает в опытах на животных значительные изменения со стороны крови; уменьшение содержания гемоглобина, эритроцитов, ускорение РОЭ, нейтрофильный лейкоцитоз со значительным сдвигом лейкоцитарной формулы влево, повышенное содержание

метгемоглобина. Эти явления своим происхождением обязаны, по-видимому, наличию в структуре метафоса паранитрофенола. DL_{50} при введении в желудок белым крысам 15-25 мг/кг, белым мышам 30-50 мг/кг, кроликам 100-420 мг/кг. При нанесении на кожу крысам DL_{50} составляет 67 мг/кг, кроликам — 100-400 мг/кг. Абсолютно смертельная доза при ингаляционном отравлении крыс составляет 0,024 мг/л. Пороговая концентрация при вдыхании дуста метафоса в течение 4-х ч составляет 0,0036 мг/л. При ежедневном введении через рот 0,5 мг/кг в течение 6 месяцев погибает часть кошек. Метафос при ежедневном введении в течение 43 дней по 4 мг не вызывал у людей подавления активности холинэстеразы и каких-либо симптомов отравления. При ежедневном приеме 7-9 мг препарата активность холинэстеразы понизилась на 20% по сравнению с активностью фермента у лиц, не подвергшихся действию метафоса. Наибольшая ежедневная доза метафоса, переносимая человеком при приеме внутрь, составляет 0,1 мг/кг DL_{50} [Голиков С.Н., 1968; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Забродский П.Ф., Линючев М.Н., 1993].

3.5. Свойства карбофоса

Карбофос (малатион, малатон, препарат 4049) является эфиром дитиофосфорной кислоты (О,О-диметил-S-1,2 – дикарб-этоксиптилофосфат). Представляет собой маслянистую жидкость со своеобразным неприятным запахом. Молекулярный вес составляет 3330,35; температура кипения – 160-170°C при давлении 3,3 мм рт. ст. (120°C – при 0,2 мм рт. ст.), температура плавления – 2,8-3,7°C, плотность – 1,2076 (20%), летучесть – 2,26 мг/м³ при 20°C и 5,6 мг/м³ при 30°C. Практически не растворим в воде (145 мг/л), хорошо растворим во многих органических растворителях. Гидролизруется медленно. Гидролиз ускоряется в щелочной среде. Применяется для уничтожения сосущих и грызущих насекомых, эффективен против растительноядных клещей, щитовок, мух. Широкое применение он нашел в районах, опасных в отношении малярии, для истребления комаров [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977].

Хлорофос (диптерекс, диплокс, трихлорфон, триэтилорфон, Байер Л-13/99, О,О-диметил-1-окси-2,2,2-три-хлорэтанфосфат) относится к эфирам алкилфосфорных кислот. Химически чистый хлорофос – белое кристаллическое вещество с запахом, напоминающим эфир. Молекулярный вес – 257,42 Да; точка плавления 78-83°. Температура кипения при 0,1 мм рт. ст. составляет 100° С, упругость паров – 0,00003 при 24° С. Летучесть – 0,11 мг/м³ при 20° С и 0,38 мг/м³ при 30° С. Растворяется в воде, бензоле, эфире, особенно хорошо – в хлороформе. Технический препарат – твердое вещество, напоминающее парафин, или темная густая жидкость с эфирным запахом. Температура плавления 68-70° [Голиков С.Н., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983].

Отравление карбофосом характеризуется, в отличие от других ФОС (ДДВФ, тиофос), не возбуждением, а угнетением функции центральной нервной системы. В опытах на кошках установлено, что действие карбофоса наступает приблизительно через 1 ч после введения вещества [Голиков С.Н., 1968].

Концентрация карбофоса в крови при острых отравлениях людей составляет для порогового, критического и смертельного уровней соответственно 0,05-0,29; 0,33-1,10 и 1,20-5,00 мкг/мл. При этом активность холинэстеразы цельной крови в процентах от нормального показателя, принятого за 100%, составляет $57,08 \pm 3,8$; $21,48 \pm 1,55$ и $3,89 \pm 1,30$ соответственно [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Данным концентрациям холинэстеразы соответствуют более высокие концентрации хлорофоса и более низкие концентрации метафоса и трихлорметафоса –3 (ТХМ-3) для порогового уровня, более высокие концентрации хлорофоса, метафоса и ТХМ-3 для критического уровня, и более низкие концентрации метафоса и более высокие концентрации других сравниваемых ФОС. Это свидетельствует о том, что степень тяжести интоксикации при одинаковой инактивации холинэстеразы различных ФОС зависит от их концентрации в крови. Для карбофоса по сравнению с хлорофосом, метафосом и ТХМ-3 критическая концентрация яда в крови обеспечивается меньшим ее значением [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. При этом следует учитывать, что карбофос и хлорофос, ТХМ-3 относятся соответственно к ФОС малой и средней токсичности, а метафос – к сильнодействующим соединениям.

Среднелетальная концентрация карбофоса для различных видов животных, линий мышей и крыс весьма вариабельна. DL_{50} карбофоса при введении внутрь белым крысам составляет от 450 до 1400 мг/кг, а при нанесении на кожу кроликам – 4000-6150 мг/кг. Ежедневное скормливание кошкам карбофоса в дозе 1 мг/кг с пищей вызывает их гибель через 4,0-4,5 месяца (это свидетельствует о способности карбофоса к выраженной кумуляции в тканях организма). Концентрация карбофоса в воздухе, составляющая 0,0001 мг/л, не вызывает снижения активности холинэстеразы у людей. Сравнительная видовая токсичность карбофоса по данным различных авторов, обобщенная Schrader G., Kukenthal H. (1937) [цит. по Голикову С.Н., 1968], представлена в табл. 3.4.

По данным Забродского П.Ф. и Линючева М.Н. (1993) DL_{50} карбофоса для мышей обоего пола при внутрибрюшинном введении составляет $619,4 \pm 25,0$ мг/кг. По данным Rodgers K.E. et al. (1986б) DL_{50} очищенного карбофоса для мышей самок линии C57B1/6 составляет 1430 мг/кг, для мышей линии Swiss Webster – более 3000 мг/кг, а для крыс линии Spregue-Davley – более 12000 мг/кг, что свидетельствует о большей по сравнению с крысами чувствительности инбредных линий мышей к карбофосу по сравнению с крысами. Хроническая токсичность карбофоса, приведенная С.Н. Голиковым (1968) по данным отчета American Cyanamid Company (1960), для крыс, получавших ежедневно корм в течение 33 дней,

содержащий карбофос в дозе 90 и 470 мг/кг, ели нормально и у них не наблюдалось отравления, хотя и несколько снижалась активность холинэстеразы эритроцитов и плазмы. Кормление крыс в течение двух лет

Таблица 3.4. Сравнительная видовая токсичность карбофоса

Вид животного	Способ введения	ЛД ₅₀ , мг/кг
Мыши (самцы)	Внутрь	885
Крысы (самцы)	Внутрь	940
Крысы (самки)	Внутрь	1200
Крысы (самки)	Внутрибрюшинно	750
Морские свинки	Внутрь	570
Телята (трехнедельные)	Внутрь	80
Коровы	Внутрь	560
Куры	Внутрь	850
Овцы	Внутрь	100

пищей, содержащей указанные количества карбофоса, также не привело к вредным последствиям. Самки, получавшие ежедневно в течение 10 дней корм с добавлением к нему карбофоса из расчета 240 мг/кг, воспроизводили после спаривания с кормившимися таким же образом самцами меньше детенышей, чем нормально питавшиеся животные, причем среди молодняка в первый три недели после рождения наблюдалась повышенная смертность [Kalow M. P., Marton H.J., 1961; цит. по Голикову С.Н., 1968]. Наибольшие бессимптомно переносимые количества карбофоса при приеме внутрь составляют для крыс 5, а для людей 0,2 мг/кг в день [Голиков С.Н., 1968].

Таким образом, DL₅₀ карбофоса для неинбредных белых мышей и крыс составляет соответственно 619-885 мг/кг и 750-1200 мг/кг при различных путях введения. Самки крыс более устойчивы к действию карбофоса. Мыши обладают несколько более выраженной чувствительностью к карбофосу, чем крысы. Инбредные мыши более чувствительны к карбофосу, чем беспородные мыши и инбредные крысы. Очищенный паратион менее токсичен, чем неочищенный, который используется в сельском хозяйстве и быту [Rodgers K.E. et al., 1986b].

3.7. Токсикологическая характеристика фосфорорганических веществ, относящихся к боевым отравляющим веществам

Зарин является изопропиловым эфиром метилфторфосоновой кислоты. Зарин представляет собой бесцветную прозрачную жидкость, практически без запаха. Температура кипения 151,5⁰ С (при кипении частично разлагается). Температура плавления (затвердевания) -57⁰С, может применяться в зимних условиях. Молекулярная масса составляет 140,1, удельный вес (плотность) 1,0943 г/см³ (20⁰ С), плотность пара по воздуху 4,86. Давление насыщенного пара 1,48 мм рт. ст. (20⁰ С), максимальная концентрация пара $C_{\max}^{20}$ 11,3 мг/л, что позволяет создавать смертельные

концентрации зарина при экспозиции, не превышающей 1 мин. Зарин хорошо растворяется в жирах, липоидах, органических растворителях (дихлорэтан, бензин, бензол, спирт и др.) и в воде во всех соотношениях. Проникает через кожные покровы в капельно-жидком и парообразном состоянии [Саватеев Н.В., 1978; Бадюгин И.С. и соавт., 1992; Александров В.Н., Емельянов В.И., 1990; Куценко С.А., 2004].

Зоман – пинаколиновый эфир метилфторфосфоновой кислоты – прозрачная жидкость со слабым камфорным запахом. Кипит при температуре 190°C. Плотность паров по воздуху 6,33. Зоман хорошо растворим в органических растворителях и жирах. В воде растворим плохо (менее 1%). Легко впитывается в пористые материалы, резиновые изделия. Гидролиз с водой протекает медленно [Саватеев Н.В., 1978; Куценко С.А., 2004]. Зоман по своей токсичности превосходит зарин в 2-3 раза. Структура зомана идентична зарину [Куценко С.А., 2004].

Из токсичных химикатов, относящихся к V-газам, наиболее известны соединения – метилфосфорилхолин и метилэтоксифосфорилтиохолин. Эти вещества являются производными холина и тиохолина, ввиду чего они получили общее название фосфорилхолинов [Куценко С.А., 2004; Schans M. J. et al., 2004; Rosenberg Y.J., 2005].

ФОВ группы VX (вещество VX, российский VX) являются слаболетучими жидкостями или кристаллическими веществами без запаха, с температурой кипения 300°C. Летучесть при 20°C – 3-18 мг/м³ [Куценко С.А., 2004; Забродский П.Ф., 2007; Rosenberg Y.J., 2005].

Боевые ФОВ обладает высокой летучестью, тяжелее воды (плотность от 1,1 до 1,7), из них хорошо растворим в органических растворителях и плохо в воде – VX. Зарин хорошо растворим в воде [Куценко С.А., 2004; Забродский П.Ф., 2007; Schans M. J. et al., 2004].

Нами исследовались два основных представителя ФОВ из группы БОВ – вещество VX и зарин, иммунотоксические свойства которых, исходя из описанных характеристик, сходны с действием на органы и системы (в том числе, систему иммунитета) зомана.

ГЛАВА 4. Изменение показателей неспецифической резистентности организма (врожденного иммунитета) под влиянием ФОС. Холинергический противовоспалительный путь.

4.1. Неспецифическая резистентности организма (врожденный иммунитет). Система комплемента.

Неспецифическая резистентность организма (НРО) рассматриваются, как первый этап в реализации иммунного ответа [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Р.М. Хаитов и соавт. (2002) называет ее механизмами доиммунной биологической защитой от инфекций и рассматривает, как первый этап в реализации иммунного ответа. В англоязычной литературе термин «врожденный иммунитет» (innate immunity) соответствует используемому в русскоязычной литературе термину «доиммунные механизмы резистентности» [Хаитов Р.М. и соавт., 2002], или «неспецифическая резистентность организма - НРО» [Петров Р.В., 1987, 1991]. В связи с продолжающейся 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., 2002]. Новое определение понятия иммунного ответа характеризует его как «процесс взаимодействия антигена и организма, распознавания поврежденных патогеном клеток и тканей лимфоцитами с целью деструкции и выведения их из организма» [Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Иммунный гомеостаз, несмотря на критику этого термина в ряде статей, продолжает использоваться, на наш взгляд, вполне правомерно и обоснованно в отечественной литературе [Сиренко Е. В., 2000; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Ивашкин В.Т., 2009]. Он обеспечивается не только специфическими реакциями, включающими функцию Т- и В-систем иммунитета, но и комплексом неспецифических факторов резистентности к инфекциям: фагоцитарной активностью, системами комплемента и пропердина, системами интерферонов, лизоцима, тромбоцитарного катионного белка –ТКБ (β -лизина), белков острой фазы, эндогенных пептидов антибиотиков и др. [Descotes J., 1986, 2004]. Данные факторы одни авторы определяют, как пассивный иммунитет [Ройт А. и соавт., 2000], другие считают их доиммунными биологическими механизмами

резистентности к инфекциям [Петров Р.В., 1987; Забродский П.Ф., 2002; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Хаитов Р.М., 2006].

В 1972 году под руководством О.А. Богомольца установлено, что острая интоксикация отравляющими веществами, относящимися к ФОС, в дозе 1,0 ЛД₅₀ также приводит к снижению лизоцимной активности сыворотки крови.

Гуморальные и клеточные факторы НРО при хронической интоксикации ФОС в зависимости от дозы и времени воздействия изменяются неоднозначно (зарегистрировано как повышение, так и снижение фагоцитарная активность нейтрофилов). Длительное действие ФОС даже в небольших дозах (концентрациях) приводит к увеличению частоты заболеваний верхних дыхательных путей у лиц, контактирующих с ними. Изменение НРО под влиянием ФОИ описано в многочисленных работах [Золотникова Г.П., 1980; Перелыгин В.М. и соав., 1971; Жамсаранова С.Д. и соавт., 1988; Пирцхалава А.В., 1989; Чугунихина Н.В., Хасанова М.И., 1994; Hermanowicz A., Hermanowicz A., Kossman S., 1984; Kossman S., 1984].

Ряд компонентов комплемента, обладая эстеразной активностью, ингибируется фосфорорганическими соединениями [Becker E.Z. et al., 1967, 1971, 1976]. Установлено, что в системе "эритроциты барана-антитела кролика-комплемента морской свинки" в присутствии диизопропилфторфосфата пропорционально концентрации данного ФОС ингибируется гемолиз эритроцитов. Этот процесс связан со снижением активности основных компонентов комплемента [Mc Grath J., Wong S., 1987].

В настоящее время известно, что комплекс антиген-антитело способен индуцировать образование фермента С1-эстеразы, под воздействием которого возникает энзиматически активный комплекс С4,2, обозначаемый как С3-конвертаза [Кульберг А.Я., 1985]. Активация С1г и С1s компонентов С1 превращает их в эстеразу, в активном центре которой находится остаток серина. Доказано, что данный энзим ингибируется ФОС [Becker E.Z., 1956].

Ингибирование первого компонента комплемента эфирами фосфорной кислоты приводит к снижению индуцируемого антигеном выделения гистамина из тучных клеток легких морской свинки [Becker E.Z., Austen K.F., 1966]. Аналогичные результаты были получены при исследовании функции перитонеальных макрофагов. Изучено влияние фосфорорганических соединений на функцию ряда компонентов комплемента (С1, С2, С3, С4, С5) при классическом пути его активации. Ингибирование выделения гистамина фенол-, бензил-, 3-хлорпропил-, 5-хлорпентил- и 5-аминопентилфосфонатами на 50% происходит при их концентрациях от $2 \cdot 10^{-4}$ до $8 \cdot 10^{-4}$ М. Данная реакция зависит от количества атомов углерода в алкильном радикале ФОС [Becker E.Z., Austen K.F., 1966].

Существует различная видовая чувствительность первого комплемента к различным ФОС. Так, у бензилфосфоната максимальная

ингибирующая активность отмечается по отношению к С1 морской свинки, а у фенилфосфоната - к С1 кролика и крысы. ФОС оказывает ингибирующий эффект на комплемент только в процессе его активации комплексом "антиген-антитело" [Austen K. F., Becker E.L. , 1966]. Особенности структуры ФОС влияют на ингибирование не только первого компонента комплемента, но и на активность ацетилхолинэстеразы, трипсина и хемотрипсина [Becker E.Z., Koza E.P., 1978]. С ингибированием ФОС эстеразы системы комплемента связано снижение хемотаксиса полиморфноядерных лейкоцитов [Ward P.A., Berker E.L., 1967]. Угнетение комплементарной активности сыворотки крови фосфорорганическими соединениями установлено при их хроническом воздействии на животных [Шафеев М.Ш., 1978]. Нами показано, что острое действие ФОС на комплементарную активность сыворотки крови и, в частности, на основной компонент данной системы - С3, приводит к существенному снижению данных показателей [Забродский П.Ф. , Кажекин А.А., 1990].

Еще в прошлом веке описано непосредственное действие ФОС (диизопропилфторфосфата и других соединений) на мембрану лейкоцитов, в результате чего изменяется концентрация калия, натрия и кальция в клетках [Woodin A.M., Wieneke A.A., 1969; Taurog J.D., et al., 1979]. Это приводит к снижению хемотаксиса лейкоцитов [Woodin A.M., Wieneke A.A., 1969; Woodin A.M., Harris A., 1973], уменьшению секреции гистамина, серотонина, β -глюкоронидазы и лизоцима из лейкоцитов, причем определенную роль в данном процессе играет снижение активности эстераз данных клеток [Becker E.L., et al., 1967]. Существуют основания предполагать, что ацетилхолин при острой интоксикации ФОС легкой и средней степени тяжести способен оказывать противоположный эффект [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Dulis B.H. et al., 1979].

Таким образом, при остром и хроническом действии ФОС ингибируются основные компоненты системы комплемента вследствие инактивации эстераз этой системы.

4.2. Влияние ФОС на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов, клеточных иммунных реакций и концентрацию провоспалительных цитокинов в крови

При остром и хроническом воздействии фосфорорганические пестициды вызывают снижение фагоцитарной активности нейтрофилов [Золотникова Г.П., 1980; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Hermanowicz A., Kossmann S., 1984]. С уменьшением этого показателя под влиянием ФОС связывают повышенную частоту заболеваний верхних дыхательных путей у лиц, контактирующих с фосфорорганическими инсектицидами [Золотникова Г.П., 1980; Hermanowicz A., Kossmann S., 1984]. В начальном периоде хронической интоксикации (2-3 месяца) фагоцитарная активность нейтрофилов повышается, затем наступает ее существенное снижение [Перелыгин В.М. и соав., 1971]. Данные результаты нуждаются в уточнении,

так как в зависимости от токсодозы ФОС характер изменения фагоцитоза может быть различным. Вероятно, при хроническом действии ФОВ, относящихся к БОВ, могут быть выявлены особенности, не характерные для действия ФОИ. Острая интоксикация карбофосом приводит к снижению функции лейкоцитов [Пирцхалава А.В., 1989] и перитонеальных макрофагов [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1988]. Использование модели экспериментальной сальмонеллезной инфекции у мышей позволило выявить снижение НРО под действием фосфамида и альбуша при дозе в 10 раз меньшей по сравнению с общепринятыми показателями. Фосфамид и альбуш воздействовали на сопротивляемость организма к инфекции в одинаковой степени. Установлена также количественная зависимость между заболеваемостью населения кишечными инфекциями и интенсивностью применения агрохимикатов [Чугунихина Н.В., Хасанова М.И., 1994].

Диизопропилфторфосфат и другие ингибиторы холинэстеразы *in vitro* нарушают процесс фагоцитоза вследствие взаимодействия с α -хлорацетат-AS-эстеразой нейтрофилов, связанной с мембраной клетки, а также в результате нарушения функции комплемента в ходе фагоцитарной реакции [Musson R.A, Becker E.L. 90]. Угнетение фагоцитоза зависит от количества атомов углерода в алкильном радикале производных нитрофенилэтилфосфоната. Нарушение фагоцитарной активности нейтрофилов отмечается при концентрации различных фосфонатов от $3 \cdot 10^{-4}$ до $1 \cdot 10^{-3}$ М, меньшие дозы ФОС не влияют на фагоцитоз [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Рассматривая движение фагоцитов в патологический очаг (хемокинез) как одну из фаз реакции фагоцитирующей клетки на раздражитель, следует отметить ингибирование подвижности полиморфно-ядерных лейкоцитов под влиянием диизопропилфторфосфата. При концентрациях $1 \cdot 10^{-4}$ - $8 \cdot 10^{-3}$ М этого ФОС подвижность лейкоцитов уменьшалась в 3-4 раза. Возвращение клеток в среду, не содержащую антихолинэстеразных соединений, не восстанавливало подвижности лейкоцитов. Вероятно, данный эффект обусловлен ингибированием эстераз клеток [Woodin A.M., Harris A., 1973], в частности, α -нафтил-AS-бутиратэстеразы [MacManus J.P., Bounton A.L., Whitefield J.F. et al., 1975].

Существуют основания полагать, что увеличение фагоцитарной активности под влиянием острой интоксикации ФОС может быть связано с действием ацетилхолина на м-холинореактивные структуры макрофагов и нейтрофилов [Quliroz L., Oliveina L., 1975; . Masini E., Fantozzi R., 1985; Забродский П.Ф., 1992; 2012]. По-видимому, при остром отравлении возможна реализация механизмов, как снижающих, так и повышающих активность фагоцитоза.

При оценке влияния пестицидов в низких дозах на пролиферацию стимулированных митогеном лимфоцитов цыплят *in vitro* и выявлено нарушение фагоцитоза, индукция апоптоза, уплотнение хроматина в иммуногенных клетках. Данная методика предлагается в качестве

альтернативной для оценки иммунотоксичности пестицидов, в частности ФОС [Kote P. et al., 2006].

Как уже упоминалось, уменьшению летальности животных в ранней стадии сепсиса [Забродский П.Ф., 1987; 1995; 2010; 2011; 2012] может обусловлено снижением синтеза провоспалительных цитокинов при холинергической стимуляции, в частности, под влиянием ФОВ и других ингибиторов холинэстеразы.

После хронического действия ДДВФ [Забродский П.Ф., 2007] ФОС в меньшей дозе (0,01 DL₅₀) в течение 30 сут (табл. 4.1). показатели ФМАН существенно снижались по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

Таблица 4.1. Изменение фагоцитарно-метаболической активности ПЯЛ крыс под влиянием хронического воздействия ДДВФ (0,01 ДЛ₅₀) в течение 30 сут ($M \pm m$, $n=7-10$)

Серии опытов	Показатели	Срок наблюдения: 31сут
Контроль	ФП	28,1 $\pm$ 1,9
	ФЧ	1,9 $\pm$ 0,2
	НСТ сп	0,28 $\pm$ 0,02
	НСТ инд	0,59 $\pm$ 0,04
ДДВФ	ФП	16,5 $\pm$ 1,6*
	ФЧ	0,5 $\pm$ 0,1*
	НСТ сп	0,12 $\pm$ 0,02*
	НСТинд	0,22 $\pm$ 0,04*

Примечание: ФП, ФЧ – соответственно фагоцитарный показатель, фагоцитарное число; НСТ – НСТ-тест спонтанный и индуцированный – индекс активности ПЯЛ; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Данные, полученные в НСТ-тесте, свидетельствуют, что действие ДДВФ реализуется вследствие взаимодействия токсикантов с НАДФ·Н, НАДФ⁺. Действие ДДВФ, помимо антихолинэстеразного действия (в целом, антиэстеразного эффекта), может быть также связано с ингибированием ФАД⁺, ФАД·Н, восстановленным и окисленным убихиноном и цитохромом b₂₄₅ лейкоцитов или иными механизмами нарушения функционирования НАДФ·Н-оксидазного комплекса нейтрофилов. Кроме кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитоза, ФОС, вероятно, поражают и кислороднезависимые микробицидные системы фагоцитов [Гребенюк А.Н. и соавт., 1998].

В опытах на беспородных белых крысах обоего пола массой 180-240 г нами установлено [Забродский П.Ф. и соавт., 2013], что под влиянием хронической интоксикации ФОВ отмечалась существенная редукция фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов (ФМАН) (табл. 4.2). При проведении исследований ФМАН под влиянием ФОВ и никотина (фагоцитарный показатель - ФП, фагоцитарное число - ФЧ, индекс

активности нейтрофилов (ИАН) в спонтанном и индуцированном НСТ-тестах (НСТ сп., НСТ инд.) оценивали общепринятыми методами [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Кровь для исследований забирали из ретроорбитального венозного синуса.

В качестве ФОВ использовали российский VX и зарин, которые вводили подкожно в дозе, составляющей 0,01 DL₅₀, ежедневно в течение 30 сут (суммарная доза – 0,3 DL₅₀). DL₅₀ вещества VX и зарина при подкожном введении крысам составляли соответственно 0,018±0,002 и 0,21±0,02 мг/кг. Для определения роли н-холинорецепторов (nAChR) в реализации эффекта ФОВ на ФМАН и продукцию клетками ФМС провоспалительных цитокинов (ФНОα, ИЛ-1β и ИЛ-6) применяли никотин в суммарной дозе 0,3 DL₅₀ по 0,01 DL₅₀ ежедневно. DL₅₀ данного препарата составляла для крыс 35±4 мг/кг.

ФМАН под влиянием ФОВ и никотина (фагоцитарный показатель - ФП, фагоцитарное число - ФЧ, индекс активности нейтрофилов (ИАН) в спонтанном и индуцированном НСТ-тестах (НСТ сп., НСТ инд.) оценивали общепринятыми методами [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Кровь для исследований забирали из ретроорбитального венозного синуса.

Таблица 4.2. Изменение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов крыс под влиянием хронической интоксикации ФОС и никотином (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) (M+m, n=8-10)

Параметры	Контроль	VX	Зарин	Никотин
ФП, %	29,8±2,8	19,2±2,0*	21,1±1,9*	22,3±2,0*
ФЧ, у.е.	2,30±0,21	1,32±0,14*	1,49±0,16*	1,65±0,18*
НСТ сп., ИАН	0,28±0,02	0,14±0,02*	0,18±0,02*	0,21±0,02*
НСТ инд., ИАН	0,57±0,05	0,37±0,04*	0,39±0,04*	0,43±0,04*

Примечание. ИАН – индекс активности нейтрофилов; у.е. – условные единицы (среднее число микробных клеток, поглощенных одним нейтрофилом); * - различие с контролем достоверно p<0,05.

Через 30 сут после действия вещества VX фагоцитарный показатель, ФЧ, индекс активности нейтрофилов в спонтанном и индуцированном НСТ-тестах уменьшались соответственно в 1,55; 1,74; 2,00 и 1,54 раза (p<0,05), а после интоксикации зарином - в 1,41; 1,54; 1,56 и 1,47 раза (p<0,05) соответственно. Хроническое действие никотина снижало ФП, ФЧ, ИАН в НСТ сп. и НСТ инд. соответственно в 1,34; 1,39; 1,33 и 1,32 раза (p<0,05).

По степени редукции ФМАН эффекты ФОВ и никотина в эквивалентных дозах существенно не отличались (хотя, в целом, супрессирующее действие VX было выше, чем зарина). Так, средняя кратность снижения всех параметров при действии вещества VX и зарина составляла соответственно 1,68±0,06 и 1,49±0,03 (p<0,05). Эффект никотина был существенно (p<0,05)

меньше, чем у ФОВ (средняя кратность снижения всех параметров составляла $1,34 \pm 0,02$), что свидетельствует о том, что «никотиновый механизм» супрессии ФМАН является не единственным.

Известно, что возбуждение ацетилхолином mAChR нейтрофилов (острое действие) приводит к увеличению их фагоцитарно-метаболической активности [Забродский П.Ф., 1995; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Однако, как показали наши эксперименты, при хроническом действии ФОВ наблюдается обратный эффект, связанный с действием никотина на их $\alpha 7$ nAChR [Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V. A., 2007; Pavlov V.A., 2008].

Не исключено, что данный эффект существенно выше активирующего действия ацетилхолина на mAChR клеток ФМС.

Существуют основания полагать, что на снижение ФМАН может оказывать влияние при хроническом действии ФОВ активация гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы [Trabold B. et al. 2007]. Редукция ФМАН может быть связана с ингибированием ФОС эстераз цитозоля клеток ФМС (α -нафтилацетатэстеразы, α -нафтилбутиратэстеразы, α -нафтил-AS-D-ацетатэстеразы, α -нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы), а также с инициацией ФОВ перекисного окисления липидов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Редукция ФОВ ФМАН сопровождается снижением в крови концентрации провоспалительных цитокинов. Так, после хронической интоксикации веществом VX концентрация в крови крыс ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 уменьшалась соответственно в 1,64; 1,76 и 1,62 раза ($p < 0,05$), а после отравления зарин - в 1,47; 1,58 и 1,45 раза ($p < 0,05$) соответственно. По степени снижения исследованных параметров действие вещества VX и зарина в эквивалентных дозах практически не отличалось.

При воздействии никотина в эквивалентной дозе (0,01 DL₅₀ ежедневно, в течение 30 сут) концентрация в крови крыс ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 снижалась соответственно в 1,93; 2,17 и 1,85 раза ($p < 0,05$). Средняя кратность снижения провоспалительных цитокинов при действии ФОВ и никотина составила соответственно $1,59 \pm 0,05$ и $1,98 \pm 0,13$ ($p < 0,05$). Это позволяет полагать, что редукция содержания провоспалительных цитокинов в крови обусловлена, в основном, стимуляцией н-холинорецепторов клеток ФМС при интоксикации ФОВ (табл. 4.3).

Таблица 4.3. Влияние хронической интоксикации ФОС и никотина (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови крыс, пг/мл (M+m, n=7)

Серии опытов	ФНО α	ИЛ1 β	ИЛ-6
Контроль	87 $\pm$ 9	65 $\pm$ 8	115 $\pm$ 10
VX	53 $\pm$ 6*	37 $\pm$ 4*	71 $\pm$ 7*
Зарин	59 $\pm$ 7*	41 $\pm$ 5*	79 $\pm$ 8*
Никотин	45 $\pm$ 5*	30 $\pm$ 4*	62 $\pm$ 7*

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

Снижение продукции провоспалительных цитокинов клеток фагоцитарно-моноцитарной системы (ФМС) под влиянием хронического действия ФОВ происходит вследствие холинергической стимуляции, в частности, активации н-холинорецепторов ($\alpha 7$ nAChR) этих клеток и реализации под влиянием холинергического противовоспалительного пути (механизма) - «cholinergic anti-inflammatory pathway» [Забродский П.Ф., 1987, 2010, 2015; Kessler W. et al., 2006; Kessler W. et al., 2006; Tracey K.J., 2007; Oke S.L., Tracey K.J., 2008; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009].

Холинергический противовоспалительный путь (механизм) - «cholinergic anti-inflammatory pathway» [Забродский П.Ф., 1987, 2010, 2015; Kessler W. et al., 2006; Tracey K.J., 2007; Oke S.L., Tracey K.J., 2008] включает: м-холинорецепторы (mAChR) головного мозга, модулирующие иммунорегуляторную функцию блуждающего нерва; эфферентные волокна п. vagus; ацетилхолин; н-холинорецепторы (в частности, $\alpha 7$ nAChR) клеток ФМС. В клетках ФМС в реализации противовоспалительного эффекта участвуют киназы JAK2; фактор транскрипции STAT3; транскрипционный фактор NF- κ B. Под влиянием холинергической стимуляции «включение» данных биохимических механизмов клетки ингибирует продукцию ими α -фактора некроза опухоли (ФНО α), протеина B1 - HMGB1, макрофагально-воспалительный протеин-2 - MIP-2, интерлейкинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 [Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V. A., 2007; Pavlov V.A., 2008].

При поражении ядами, в частности, ФОВ ФМС играет очень важную роль в реализации, как воспалительных, так и противовоспалительных эффектов. Снижение фагцитарно-метаболической активности нейтрофилов (ФМАН) и синтеза провоспалительных цитокинов можно рассматривать, как весьма негативную реакцию при хроническом действии ФОВ. При этом возможны нарушения, связанные с деструкцией и удалением тканей, пораженных токсикантом, и сопряженными с их действием процессами [Laskin D. L. et al., 2011]. То есть реализация воспаления, как реакции, носящей защитно-приспособительный характер (а не только патологический) при хронической интоксикации ФОВ нарушается.

Таким образом, после хронической интоксикации ФОВ (российский VX, зарин) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL₅₀ (по 0,01 DL₅₀ ежедневно) снижается фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов. Снижение функции фагоцитарно-моноцитарной системы ФОВ обусловлено стимуляцией nAChR клеток ФМС, что проявляется уменьшением концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6.

Параллельно с оценкой фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов (ФМАН) при хронической интоксикации ФОВ нами определялось влияние отравления данными соединениями, не относящимся к ОВ (карбафосом и метафосом), на ФМАН, показатели клеточного иммунитета, а также продуцируемых клетками системы крови провоспалительных цитокинов ФНО α и ИЛ-1 β , ИЛ-6 [Забродский П.Ф. и соав., 2013]

Под влиянием хронической интоксикации ФОС отмечалась существенная редукция ФМАН (табл. 4.4). Через 30 сут после действия карбофоса ФП, ФЧ, индекс активности нейтрофилов в спонтанном и индуцированном НСТ-тестах уменьшались соответственно в 1,77; 1,49; 1,94 и 1,24 раза ($p<0,05$), а после интоксикации метафосом - в 1,48; 1,66; 1,55 и 1,33 раза ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 4.4. Изменение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов крыс и показателей клеточных иммунных реакций под влиянием хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) ($M\pm m$, $n=8-10$)

Параметры	Контроль	Карбофос	Метафос
Фагоцитарный показатель, %	33,4 $\pm$ 2,9	18,9 $\pm$ 2,3*	22,5 $\pm$ 1,9*
Фагоцитарное число, у.е.	2,54 $\pm$ 0,22	1,70 $\pm$ 0,15*	1,53 $\pm$ 0,17*
НСТ-тест спонтанный, ИАН	0,31 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,02*	0,20 $\pm$ 0,02*
НСТ-тест индуцированный, ИАН	0,52 $\pm$ 0,05	0,42 $\pm$ 0,04*	0,39 $\pm$ 0,04*
Активность ЕКК, %	34,1 $\pm$ 3,0	26,3 $\pm$ 2,3*	22,0 $\pm$ 2,5*
АЗКЦ, %	13,3 $\pm$ 1,4	9,2 $\pm$ 1,0*	10,1 $\pm$ 1,1*

Примечание: иан – индекс активности нейтрофилов; у.е. – условные единицы (среднее число микробных клеток, поглощенных одним нейтрофилом); * - различие с контролем достоверно $p<0,05$.

Активность ЕКК и АЗКЦ под влиянием карбофоса снижались соответственно в 1,30 и 1,46 раза ($p<0,05$), а после отравления метафосом - в 1,55 и 1,32 раза ($p<0,05$). По степени редукции ФМАН, естественной цитотоксичности и АЗКЦ эффекты ФОС в эквивалентных дозах существенно не отличались.

Действие ФОС на ФМАН, вероятно, реализуется вследствие взаимодействия токсикантов и их метаболитов с НАДФ·Н и НАДФ⁺. Действие ФОС может быть также связано с ингибированием ядами и продуктами их биотрансформации ФАД⁺, ФАД·Н, восстановленного и окисленного убихинона, цитохрома b₂₄₅ лейкоцитов или иными механизмами нарушения функционирования НАДФ·Н-оксидазного комплекса нейтрофилов. Кроме кислородзависимых антиинфекционных систем фагоцитоза ФОС, поражают и кислороднезависимые микробицидные системы фагоцитов (нейтрофилов) [Гребенюк А.Н. и соавт., 1998].

Не исключено, что редукция ФМАН может быть связана с ингибированием ФОС эстераз цитозоля клеток ФМС (α -нафтилацетатэстеразы, α -нафтилбутиратэстеразы, α -нафтил-AS-D-ацетатэстеразы, α -нафтил-AS-D-хлорацетатэстеразы) [Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П.Ф., 1998, 2007]], а также с инициацией ФОС перекисного окисления липидов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Супрессия активности ЕКК и АЗКЦ, вероятно, обусловлена инактивацией ФОС ацетилхолинэстеразы естественных клеток-киллеров и К-клеток [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Иммуносупрессивный эффект ФОС сопровождался снижением в крови концентрации провоспалительных цитокинов (табл. 4.5). Так, после хронической интоксикации карбофосом в крови крыс ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 уменьшалась соответственно в 1,45; 1,91 и 1,55 раза ($p<0,05$), а после отравления метафосом - в 1,67; 1,63 и 1,40 раза ($p<0,05$) соответственно.

Таблица 4.5.. Влияние хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови крыс, пг/мл (M $\pm$ m, n=7)

Серии опытов	ФНО α	ИЛ1 β	ИЛ-6
Контроль	87 $\pm$ 9	65 $\pm$ 8	115 $\pm$ 10
Карбофос	60 $\pm$ 7*	34 $\pm$ 4*	74 $\pm$ 9*
Метафос	52 $\pm$ 6*	40 $\pm$ 5*	82 $\pm$ 8*

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

Как уже упоминалось, уменьшение продукции провоспалительных цитокинов нейтрофилами, моноцитами, макрофагами (и, в меньшей степени, другими клетками иммунной системы происходит вследствие реализации под влиянием холинергической стимуляции холинергического противовоспалительного пути (механизма) - «cholinergic anti-inflammatory pathway» (активация ацетилхолином $\alpha 7nAChR$ клеток ФМС, приводящее к редукции синтеза провоспалительных цитокинов) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Oke S.L., Tracey K.J. , 2008; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009]. Вероятно, снижение продукции этих цитокинов при интоксикации ФОС происходит не только в результате механизмов, связанных с «cholinergic anti-inflammatory pathway». Возбуждение ацетилхолином mAChR нейтрофилов приводит к увеличению их фагоцитарно-метаболической активности [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Однако, как показали наши эксперименты, при хроническом действии ФОС наблюдался обратный эффект, вероятно, обусловленный действием ацетилхолина на $\alpha 7nAChR$ нейтрофилов [Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V. A., 2007]. Не исключено, что данный эффект существенно выше активирующего действия ацетилхолина на mAChR клеток ФМС.

Существуют основания полагать, что при интоксикации ФОС состояние ФМАН определяют многочисленные эффекты, ряд которых разнонаправлены (например, активация mAChR и $\alpha 7nAChR$ нейтрофилов) [П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Интересно отметить, что снижение синтеза провоспалительных цитокинов при холинергической стимуляции, в частности, под влиянием ФОС, может приводить к снижению летальности животных в ранней стадии сепсиса [Забродский П.Ф., 1987, 2007, 2010].

При поражении ядами, в частности, ФОС фагоцитарно-моноцитарная система играет очень важную роль в проявлении, как воспалительных, так и противовоспалительных эффектов. Снижение ФМАН и синтеза провоспалительных цитокинов можно рассматривать, как негативную реакцию при хроническом действии ФОС. При этом возможны нарушения, связанные с деструкцией и удалением тканей, пораженных токсикантом, и сопряженными с их действием процессами [Laskin D. L. et al., 2010]. То есть реализация воспаления, как реакции, носящей защитно-приспособительный характер (а не только патологический), при хронической интоксикации ФОС нарушается.

Таким образом, при хронической интоксикации ФОС (карбофос, метафос) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL₅₀, уменьшается фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов, активность естественных клеток-киллеров и антителозависимая клеточная цитотоксичность, снижается функция фагоцитарно-моноцитарной системы, что проявляется уменьшением концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6.

4.3. Влияние ФОС на показатели летальности мышей при экспериментальной инфекции

В экспериментах на мышах массой 18-25 г установлено [Забродского П.Ф. и Молоткова А.О., 2000] (табл. 4.6), что после острого отравления малатионом (карбофосом) (табл.1) происходит уменьшение летальности мышей от экспериментального перитонита, вызванного *E.coli* (контроль - 35,0 $\pm$ 10,7) в 1,57 раза ($p>0,05$), что свидетельствует об увеличении антиинфекционной НРО. Под влиянием малатиона происходило увеличение ДЛ₅₀ *E. coli* ($p>0,05$) и статистически значимое ($p<0,05$) повышение Et₅₀.

Таблица 4.6. Влияние малатиона (0,75 ДЛ₅₀) на показатели летальности мышей, ДЛ₅₀ *E. coli* и Et₅₀ (M $\pm$ m)

Показатель	Контроль	Малатион
Летальность, %	35,0 $\pm$ 10,7 (20)	21,4 $\pm$ 10,8 (14)
ДЛ ₅₀ <i>E. coli</i> , 10 ⁹ микр. тел	2,16 $\pm$ 0,20 (20)	2,92 $\pm$ 0,17* (14)
Et ₅₀ , ч	18,5 $\pm$ 1,9 (20)	25,1 $\pm$ 1,3* (14)

Примечание: в скобках - число животных; * $p<0,05$ по сравнению с контролем.

Уменьшение летальности мышей от пневмонии через 1 сут после острой интоксикации карбофосом может быть связано с подавлением продукции провоспалительных цитокинов вследствие реализации «холинергического противовоспалительного пути (механизма)» («cholinergic anti-inflammatory pathway») [Забродский П.Ф. и соавт., 1987, 2007, 2010, 2011 2015; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009], активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, в результате чего реализуется противовоспалительный и другие протективные эффекты кортикостероидов; возрастанием бактерицидной активности сыворотки крови, сывороточной активности лизоцима и тромбоцитарно-катионного белка (β -лизина); стимуляцией ацетилхолином м-холинореактивных структур нейтрофилов, которая увеличивает их фагоцитарно-метаболическая активность [Забродский П.Ф., 1998, 2007; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979].

Повышение под влиянием холинергической стимуляции (ацетилхолина) функции естественных клеток-киллеров [Wietrowt R.W. et al., 1978; Grabczewska E. et al., 1990], возможно, являющихся одним из основных факторов, определяющих антиинфекционную неспецифическую резистентность организма под влиянием острого действия ФОС [Забродский П.Ф., 1986, 1987, 1993, 2007].

Под влиянием необратимого ингибитора эстеразы армина [Забродский П.Ф., 1995], относящегося к ФОС и предназначенного для лечения глаукомы, происходит прямо связанное с дозой холинергических веществ уменьшение летальности мышей от экспериментальной инфекции в диапазоне доз этого препарата от 0,2 до 0,75 ДЛ₅₀. Данная зависимость наиболее отчетливо проявляется при регистрации летальных исходов до 18 ч (табл. 4.7).

С увеличением дозы армина до 1,0 ДЛ₅₀ степень снижения летальности уменьшается, однако при регистрации эффектов до 36 ч остается выше контрольного уровня. Следует отметить, что после 36 ч гибель мышей от экспериментальной инфекции практически отсутствовала. Обращает на себя внимание интересный феномен: в дозах от 0,2 до 0,75 ДЛ₅₀ на фоне повышения выживаемости животных в целом увеличивается летальность животных от инфекции в интервале 18-36 ч. При использовании в качестве холиномиметического средства ацетилхолина установлено, что через 18 ч летальность животных в контрольной и опытной группах составляла соответственно $66,6 \pm 6,9$ и $38,5 \pm 7,8\%$ ($p < 0,01$), а через 36 ч исследованный параметр в этих группах составлял $91,5 \pm 4,0\%$ (контроль) и $74,5 \pm 7,0\%$ (опыт, $p < 0,05$). Видно, что снижение гибели животных от инфекции под влиянием холинергической стимуляции наиболее выражено в интервале 18-36 ч. Такая же закономерность установлена и при использовании м-холиномиметика ацеклидина и н-холиномиметика никотина. Так, летальность через 18 ч в контроле и опыте

составляла при действии ацеклидина соответственно $66,7 \pm 11,1$ и $12,5 \pm 7,5\%$, а через 36 ч – $95,0 \pm 5,1$ и $37,4 \pm 15,6\%$.

Таблица 4.7. Влияние армина на летальность мышей от экспериментальной инфекции (*E. coli*) через 18 и 36 ч

Доза, DL ₅₀	Летальность, %			
	18 ч		36 ч	
	контроль	Опыт	Контроль	Опыт
0,03	70,4±9,0 (27)	66,7±9,8 (24)	77,8±8,1 (27)	83,3±7,8 (24)
0,20	19,4±6,6 (36)	5,5±3,8* (36)	47,2±8,3 (36)	33,3±7,9 (36)
0,35	35,0±7,8 (37)	5,0±3,4* (40)	54,0±8,2 (37)	25,0±6,8* (40)
0,75	43,5±12,6 (23)	8,8±4,9* (34)	91,3±5,9 (23)	32,3±8,0* (34)
1,0	36,0±9,8 (25)	28,6±8,7 (28)	56,0±10,1 (25)	28,6±8,7* (28)

Примечание: в скобках - число животных; * - различия с контролем достоверны - $p < 0,05$.

При изучении влияния необратимого ингибитора холинэстеразы армина на неспецифические факторы резистентности организма установлено, что БАСК, содержание лизоцима в сыворотке крови, фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов с увеличением дозы армина от 0,05 до 0,75 возрастают, а при 1,0 DL₅₀ данного препарата - снижаются. При этом лизоцимная активность сыворотки крови, несмотря на существенное уменьшение, превышает контрольный уровень. При сопоставлении характера исследованных зависимостей выявлена сходная закономерность в изменении летальности и факторов неспецифической резистентности организма под влиянием холинергической стимуляции. При действии ацетилхолина (20 мг/кг) и армина (1,0 DL₅₀) естественная цитотоксичность составляла соответственно 38 ± 4 (n=10) и $14 \pm 2\%$ (n=9) (контроль - $29 \pm 3\%$, n=10, $p < 0,05$). Вероятно, именно повышением под влиянием активации холинергической системы БАСК, лизоцимной активности крови и фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов, функции естественных лимфоцитов-киллеров обусловлено выраженное снижение летальности животных от экспериментальной инфекции, особенно в интервале до 18 ч. Можно считать, что увеличение БАСК, лизоцима и фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов под влиянием армина происходит вследствие стимуляции м-холинореактивных структур. При этом возможно прямое действие холинотропных средств на м-холинорецепторы нейтрофилов, в результате чего выход бактерицидных ферментов из клеток и повышение фагоцитоза реализуются вследствие

увеличения внутриклеточного содержания цГМФ [Quliroz L., Oliveina L., 1975]. Такой же механизм обуславливает повышение под влиянием ацетилхолина активности естественных киллеров [Grabczewska E., Lascowska-Bozek H., 1990; Хаитов Р.М. и соавт., 2000], являющихся одним из факторов, определяющих антиинфекционную неспецифическую резистентность организма. Снижение неспецифических факторов резистентности организма при увеличении дозы армина до 1,0 ЛД₅₀, видимо, связано с инактивацией эстераз нейтрофилов [Хейхоу Ф.Г.Дж, Кваглино Д., 1983] и лимфоцитов [Ferluga J. et al., 1972]. Однако, при этом повышающий антиинфекционную неспецифическую резистентность организма эффект ацетилхолина при интоксикации ФОС превышает супрессирующее действие, связанное с ингибированием эстераз клеток крови. В настоящее доказано, что снижение летальности животных после отравления ФОС обусловлено активацией $\alpha 7$ н-холинорецептора ($\alpha 7$ nAChR) ацетилхолином, продуцирующим нервными окончаниями n.vagus [Kessler W. et al., 2006; Pavlov V.A. , 2008], приводит к подавлению продукции провоспалительных цитокинов реализацией «холинергического противовоспалительного пути (механизма)» («cholinergic anti-inflammatory pathway») [Забродский П.Ф. и соавт., 2011; Anderson J., 2005; Kessler W. et al., 2006; Oke S.L., Tracey K.J., 2008; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009].

После острого отравления боевыми отравляющими веществами, относящимся к ФОВ, зарином и российского VX происходит уменьшение летальности крыс от экспериментальной пневмонии, вызванной *Proteus vulgaris* соответственно на 20,5 и 26,4% ($p < 0,05$), уменьшение DL₅₀ *Proteus vulgaris* и среднеэффективного времени жизни животных - Et₅₀, что свидетельствует о снижении антиинфекционной НРО (доиммунных факторов защиты от инфекций) [Забродский П.Ф. и соавт., 2003] (табл. 4.8)

Таблица 4.8. Влияние острого отравления ФОС (0,5 LD₅₀) на летальность от экспериментальной пневмонии (*Proteus vulgaris*), DL₅₀ *Proteus vulgaris* и Et₅₀ (M $\pm$ m)

ФОВ	Летальность, %	DL ₅₀ <i>Proteus vulgaris</i> , 10 ⁹ микробных тел	Et ₅₀ , ч
Контроль	54,2 $\pm$ 6,5 (59)	3,1 $\pm$ 0,2 (59)	18,7 $\pm$ 1,2 (59)
Зарин	33,3 $\pm$ 10,2* (21)	3,9 $\pm$ 0,3* (21)	23,5 $\pm$ 2,5 (21)
VX	27,8 $\pm$ 10,5* (18)	4,2 $\pm$ 0,3* (18)	24,2 $\pm$ 2,3* (18)

Примечание: в скобках - число животных в серии; * $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Уменьшение летальности от экспериментальной инфекции в течение 36 ч после острого отравления ФОС в дозе 0,5 DL₅₀ (парадоксальный феномен) может быть связано с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, в результате чего реализуется

противовоспалительный и другие протективные эффекты кортикостероидов (КС); возрастанием бактерицидной активности сыворотки крови, сывороточной активности лизоцима и тромбоцитарно-катионного белка (β -лизина) [Забродский П.Ф., 1995; 1998]; стимуляцией ацетилхолином м-холинореактивных структур нейтрофилов, моноцитов и макрофагов, которая увеличивает их фагоцитарно-метаболическую активность [Забродский П.Ф., 1992; 1995]. Уменьшение летальности животных в ранней стадии сепсиса под влиянием ФОВ и других ингибиторов холинэстеразы обусловлено снижением синтеза провоспалительных цитокинов вследствие холинергической стимуляции. [Забродский П.Ф., 1987; 1995; 2010].

Исследования, выполненные на беспородных мышах самцах линии СВА массой 18-20 г и крысах самцах Вистар массой 160-200 г, показали [Забродский П.Ф. и соавт., 1993], что хлорофос, который вводился подкожно в дозе 0,8-1,0 ЛД₅₀, существенно изменяет показатели НРО. Так, острая интоксикация, вызванная хлорофосом, приводит к существенному увеличению показателей НРО. Уменьшается летальность мышей при экспериментальном перитоните, увеличивается среднелетальная доза кишечной палочки, среднеэффективное время жизни животных. Устойчивость животных к перитониту максимально выражена через 1 и 4 суток после интоксикации хлорофосом.

Активность лизоцима, тромбоцитарного катионного белка, лизина, комплемента, показатели фагоцитарной способности нейтрофилов достигают наибольших значений через 1 сутки после отравления и уменьшается на 7 сутки, существенно не отличаясь от контрольных уровней. Значительное повышение устойчивости мышей к экспериментальному перитониту через 1 сут после интоксикации хлорофосом можно объяснить возрастанием показателей НРО, механизмами повышения резистентности, связанными с возбуждением холинергических структур, с активацией симпатико-адреналовой системы, обеспечивающей кратковременную адаптацию.

Аналогичный эффект через 4 суток, вероятно, - результат реализации механизмов, связанных с действием глюкокортикоидов вследствие возбуждения гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы [Меерсон Ф.З. и соавт., 1982. Tiefenbach V. et al., 1983]. Двухфазное повышение устойчивости животных к экспериментальному перитониту не соответствует сдвигам других показателей НРО, для которых характерен один пик увеличения через 1 сутки после интоксикации. Вероятно, увеличение устойчивости животных к перитониту реализуется не только путем повышения активности лизоцима, тромбоцитарного катионного белка, комплемента, фагоцитарной способности нейтрофилов, но и другими адаптационными реакциями [Меерсон Ф.З. и соавт., 1982]. В дальнейшем было показана роль н-холинорецепторов в увеличении НРО после интоксикации ФОС [Забродский П.Ф. и соавт., 2011].

Обратимые ингибиторы холинэстеразы влияют на НРО и систему иммунитета в целом также, как и необратимые ингибиторы. Нами [Забродский П.Ф., 1996] изучалось влияние аминостигмина на

неспецифическую антиинфекционную резистентность организма и некоторые звенья иммуногенеза, определяющие антителообразование. Опыты проводили на неинбредных и инбредных мышах СВА массой 18-20 г. Аминостигмин вводили подкожно в дозах 0,01 и 0,05 мг/кг. Было установлено, что под влиянием аминостигмина происходит существенное увеличение антиинфекционной неспецифической резистентности организма, что выражается в прямо связанных с дозой вещества снижением летальности животных от экспериментальной инфекции, увеличением среднелетальной дозы кишечной палочки и среднеэффективного времени жизни животных. Адреналэктомия приводила к отмене стимулирующего влияния аминостигмина на антиинфекционную резистентность организма. Аминостигмин пропорционально применявшейся дозе приводил к увеличению числа КОЕс, что связано с активацией миграции СКК из костного мозга в селезенку.

Данные литературы и результаты проведенных собственных исследований позволяют считать, что нарушение неспецифической резистентности организма под влиянием ФОС обусловлены подавлением синтеза провоспалительных цитокинов реализацией «холинергического противовоспалительного пути (механизма)» («cholinergic anti-inflammatory pathway») [Забродский П.Ф. и соавт., 2011; Anderson J., 2005; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009], нарушением функции центральной нервной системы и нейрогуморальных механизмов [Корнева Е.А., 1988; Забродский П.Ф., Тимофеев Д.А., 1997], увеличением в плазме крови гормонов гипофиза, глюкокортикоидов и биогенных аминов [Дорошевич А.Л., 1971; Кузьминская У.А. и соавт., 1980; Szot R.J., Murphy S.D., 1970; Забродский П.Ф., 1993, 1998, 2002], действием ацетилхолина на холинорецепторы нейтрофилов [Dulis B.H., Gordon M.A., 1979; Забродский П.Ф., 1992], изменением в клетках крови содержания циклических нуклеотидов [Маянский Д.Н., 1986; Henson P.M., Oades Z.G., 1976], ингибированием эстераз нейтрофилов и моноцитов [Хейхоу Ф.Г.Дж, Кваглино Д., 1983; Забродский П.Ф., 1993], лимфоцитов (ЕКК) [Ferluga J. et al, 1972], системы комплемента [Becker E.Z. et al, 1956, 1964, 1966, 1967, 1971, 1976; Забродский П.Ф. и соавт., 1990].

4.4. Роль ацетилхолина в реализации «холинергического противовоспалительного пути (механизма)» при острой интоксикации ФОС

В 1987 году [Забродский П.Ф., 1987] и в последующих работах [Забродский П.Ф., 1995; 2000], нами было показано, что холинергическая стимуляция фосфорорганическими соединениями (ФОС) существенно снижает летальность белых мышей от сепсиса, вызванного внутрибрюшинным или внутрилегочным введением *E. coli*, а в 1995 году была доказана целесообразность использования холиномиметиков (в том числе, ацетилхолина - АХ) для экстренной активации неспецифической

антимикробной резистентности организма при различных инфекционных процессах [Забродский П.Ф., 1995; 2007]. В многочисленных публикациях [Oke S.L., Tracey K.J., 2008; Pavlov V.A., 2008; Giebeleh I.A. et al., 2009; Hauber H.P., Zabel P., 2009; Liu C., et al., 2009] исследована роль активации холинергической системы в увеличении выживаемости животных при сепсисе, вызванном различными инфекционными процессами, и ее связь с продукцией провоспалительных цитокинов [Kessler W. et al., 2006; Song D.J. et al., 2009; Vos A.F., et al., 2009].

По данным литературы в настоящее время смертность от сепсиса составляет более 1/3 от всех смертельных исходов, связанных с болезнями и их осложнениями причем этот показатель продолжает увеличиваться [Забродский П.Ф., 2014].

Снижение летальности мышей после холинергической стимуляции [Забродский П.Ф., 1987; 1995; 2010] в настоящее время объясняют реализацией «холинергического противовоспалительного пути (механизма)» («cholinergic anti-inflammatory pathway») [Anderson J., 2005; Kessler W. et al., 2006; Oke S.L., Tracey K.J., 2008; Rosas-Ballina M., Tracey K.J., 2009]. Общеизвестно, что возбуждение $\alpha 7$ н-холинорецептора ($\alpha 7$ nAChR) АХ, продуцирующим нервными окончаниями n.vagus [Забродский П.Ф., 1987, 1995, 2010, 2016; Kessler W. et al., 2006; Pavlov V.A., 2008], приводит к подавлению продукции провоспалительных цитокинов моноцитарно-макрофагальной системой (ММС), которую называют также фагоцитарно-моноцитарной системой (ФМС), вызывающей снижение летальности животных при сепсисе и различных инфекционных процессах [Kessler W. et al., 2006; Anderson J., 2005; Hauber H.P., Zabel P., 2009; Song D.J. et al., 2009; Vos A.F., et al., 2009]. Доказано, что активация $\alpha 7$ nAChR играет важную роль в выживании, апоптозе, пролиферации и дифференцировке стволовых [Shen J.X. et al., 2013].

В настоящее время существует необходимость в доказательстве того, что «парадоксальное» снижение летальности животных в ранней фазе сепсиса (инфекционного процесса) после острого отравления фосфорорганическими соединениями - ФОС [Забродский П.Ф., 1987; 1995; 2007; 2010] обусловлено снижением продукции моноцитарно-макрофагальной системы - ММС (моноцитами, макрофагами, нейтрофилами) [Oke S.L., Tracey K.J., 2008; Hauber H.P., Zabel P., 2009] и лимфоидными дендритными клетками [Ройт А. и соавт., 2000] провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли- α (ФНО α), ИЛ-1 β и ИЛ-6 [Kessler W. et al., 2006; Song D.J. et al., 2009; Vos A.F., et al., 2009].

В опытах на неинбредных белых мышах обоего пола массой 18-22 г применяли ФОС (зарин, диметилдихлорвинилфосфат - ДДВФ) и ацетилхолина (АХ) хлорид (подкожно однократно в дозах 0,5 DL₅₀) Через 6 ч у мышей вызывали сепсис внутриперитонеальным введением $2 \cdot 10^9$ суточной культуры микробных тел *E. coli* [Забродский П.Ф., 1987; Song D.J. et al., 2009].

Нами установлено (табл. 4.9), что применение зарина, ДДВФ и АХ через 10 ч после внутриперитонеального введения *E. coli* АХ приводили к снижению ($p<0,05$) исследованного показателя в на 28-36%, а через 25 ч –на 24-32% ($p<0,05$).

Таблица 4.9. Влияние холинергических средств (ФОС и ацетилхолина) на летальность мышей после моделирования сепсиса ($M\pm m$, $n = 25$)

Серии опытов	Срок исследования летальности после введения <i>E. coli</i> , ч	
	10	25
Контроль (сепсис)	56,0 $\pm$ 9,9	84,0 $\pm$ 7,3
Зарин+сепсис	28,0 $\pm$ 9,0*	56,0 $\pm$ 9,9*
ДДВФ+сепсис	24,0 $\pm$ 8,5*	52,0 $\pm$ 10,0*
АХ +сепсис	20,0 $\pm$ 8,0*	60,0 $\pm$ 9,8*

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

При изучении концентрации цитокинов в плазме крови мышей (табл. 2) установлено увеличение содержания ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6 через 10 ч при сепсисе по сравнению с контролем соответственно в 4,9; 13,8 и 19,3 раза ($p<0,05$).

Содержание ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6 в крови мышей после отравления заринном с последующим моделированием сепсиса через 10 ч уменьшалось по сравнению с параметрами при экспериментальной инфекции без применения ФОС соответственно в 2,6; 3,0 и 2,9 раза ($p<0,05$).

Таблица 2. Влияние холинергических средств (ФОС и ацетилхолина) на изменение концентрации провоспалительных цитокинов в плазме крови мышей при сепсисе, пг/мл ($M\pm m$)

Серии опытов	ФНО α		ИЛ1 β		ИЛ-6	
	10	25	10	25	10	25
Контроль	34 $\pm$ 5 (6)	37 $\pm$ 4 (6)	25 $\pm$ 3 (6)	20 $\pm$ 3 (6)	30 $\pm$ 4 (6)	35 $\pm$ 4 (6)
Сепсис	167 $\pm$ 18* (6)	65 $\pm$ 21° (4)	346 $\pm$ 38*° (6)	135 $\pm$ 45*° (4)	578 $\pm$ 60*° (6)	375 $\pm$ 73*° (4)
Зарин+сепсис	65 $\pm$ 7** (6)	45 $\pm$ 6° (6)	117 $\pm$ 14**° (6)	39 $\pm$ 5**° (6)	198 $\pm$ 20**° (6)	118 $\pm$ 13**° (6)
ДДВФ+сепсис	82 $\pm$ 9** (6)	54 $\pm$ 5*° (6)	147 $\pm$ 16**° (6)	51 $\pm$ 7**° (6)	180 $\pm$ 22**° (6)	98 $\pm$ 20**° (6)
АХ+сепсис	73 $\pm$ 8** (6)	48 $\pm$ 5° (6)	138 $\pm$ 15**° (6)	44 $\pm$ 6**° (6)	221 $\pm$ 22**° (6)	133 $\pm$ 16**° (6)

Примечание: 10 и 25 – срок после моделирования сепсиса, ч; в скобках – число животных в опыте; * - $p<0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p<0,05$ по сравнению с контролем и показателем при сепсисе; ° - $p<0,05$ по сравнению с показателем через 10 ч.

Содержание в крови ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6 после интоксикации ДДВФ с последующим моделированием инфекционного процесса по сравнению показателями при сепсисе без применения ДДВФ через 10 ч уменьшалось соответственно в 1,5; 2,4 и 2,6 раза ($p < 0,05$).

Аналогичные изменения концентрации в крови провоспалительных цитокинов вызывало применение АХ. Так, содержание ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6 в плазме крови животных через 10 ч снижалось соответственно в 2,3; 2,5 и 2,6 раза ($p < 0,05$) по сравнению с концентрацией цитокинов при сепсисе без использования АХ. При этом их значения достоверно ($p < 0,05$) превышали контрольные показатели.

Через 25 ч содержание в крови цитокинов ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6 существенно снижалось ($p < 0,05$) по сравнению с концентрацией, зарегистрированной через 10 ч. Содержание цитокинов в крови через 25 ч оставалось выше контрольных значений ($p < 0,05$), за исключением уровня ФНО α при воздействии зарина и АХ, который был увеличен незначимо ($p > 0,05$) – соответственно в 1,2 и 1,3 раза.

Полученные результаты позволяют полагать, что АХ при острой интоксикации ФОС, воздействуя на $\alpha 7nAChR$ моноцитов, макрофагов и нейтрофилов [Забродский П.Ф., 1987, 1995, 2010, 2015; Kessler W. et al., 2006; Hauber H.P., Zabel P., 2009] (возможно, и естественных клеток-киллеров [Забродский П.Ф., 1995]), реализует «холинергический противовоспалительный механизм» [Забродский П.Ф., 1987; 1995; 2007; Vos A.F., et al., 2009], снижая в крови и органах ММС, включая селезенку, печень и желудочно-кишечный тракт, содержание провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6, вызывающих различные патологические реакции, приводящие к летальному исходу при сепсисе (и других инфекционных патологических состояниях) [Oke S.L., Tracey K.J., 2008; Pavlov V.A., 2008].

Уменьшение в крови ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 характеризует редукцию их синтеза макрофагами, моноцитами, естественными клетками-киллерами (эти клетки продуцируют ФНО α [Anderson J., 2005]) и лимфоидными дендритными клетками вследствие воздействия АХ после острого отравления ФОС на их холинергические рецепторы. Продукция ИЛ-6 Th2-лимфоцитами (и клетками Th0-типа) в ответ на введение белковых антигенов (*E. coli*) начинается в период формирования иммунного ответа только через 5-7 сут после попадания в организм антигена [Ройт А. и соавт., 2000].

Установленное нами в предыдущих экспериментах «парадоксальное» снижение летальности животных через 1-2 сут после острой интоксикации ФОС (зарин, VX, инсектицидами), обратимыми и необратимыми ингибиторами холинэстеразы, применяемыми в медицине [Забродский П.Ф., 1987; 1995; 2007], обусловлено не только воздействием АХ (в частности, на $\alpha 7nAChR$ макрофагов, моноцитов и нейтрофилов [Забродский П.Ф., 2010, 2015; 1987; Oke S.L., Tracey K.J., 2008]), но и активацией гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы с последующим увеличением в крови кортикостероидов [Забродский П.Ф. и соавт., 2000; 2007].

Таким образом, ФОС (зарин, ДДВФ) в эквивалентных дозах (0,5 DL₅₀) при их введении за 6 ч до моделирования сепсиса вызывают существенное снижение летальности мышей от экспериментального инфекционного процесса. ФОС обуславливают редукцию концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 при моделировании сепсиса. Выявленные эффекты ФОС связаны с воздействием ацетилхолина (воздействие на $\alpha 7$ nAChR макрофагов, моноцитов и нейтрофилов [Забродский П.Ф. 2010,2015; Oke S.L., Tracey K.J., 2008]).

4.5. Роль м- и н-холинорецепторов в реализации холинергического противовоспалительного механизма в ранней фазе сепсиса

Представляет интерес роль м- и н-холинорецепторов в реализации холинергического противовоспалительного механизма в ранней фазе сепсиса в связи с тем обстоятельством, что на данные рецепторы при интоксикации ФОС будут воздействовать ацетилхолин.

Оценялось влияние активации mAChR и nAChR соответственно ацеклидином (АК) и никотином (НТ) на летальность на беспородных белых мышей от сепсиса, вызванного экспериментальным перитонитом, содержание в плазме крови провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и МІР-2 и фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов [Забродский П.Ф. и соавт, 2012].

Никотин и АК через 10 ч после введения *E. coli* приводили к снижению ($p<0,05$) исследованной летальности по сравнению с контрольной группой 1 (сепсис) соответственно в 2,33 и 1,75 раза (на 33,3 и 25,0%) ($p<0,05$), а через 25 ч – в 1,68 и 1,28 раза (на 36,1 и 19,5%) ($p<0,05$) соответственно. Это свидетельствует о том, что активация как nAChR, так mAChR существенно увеличивает выживаемость животных в ранней фазе сепсиса (табл. 4.10). При этом эффект НК несущественно превышает действие АК.

Таблица 4.10. Влияние никотина и ацеклидина на летальность мышей после моделирования сепсиса ($M\pm m$, $n = 36$)

Серии опытов	Срок исследования летальности после введения <i>E. coli</i> , ч	
	10	25
Сепсис (контрольная группа 1)	58,3 $\pm$ 8,2	88,9 $\pm$ 5,2
Никотин + сепсис (группа 2)	25,0 $\pm$ 7,2*	52,8 $\pm$ 8,3*
Ацеклидин + сепсис (группа 3)	33,3 $\pm$ 7,8*	69,4 $\pm$ 7,7*

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

Содержание цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 и МІР-2 в плазме крови мышей через 10 ч при сепсисе по сравнению со 2-й контрольной группой мышей

(интактные животные) повышалась соответственно в 13,29 и 17,53 и 6,07 раза ($p<0,05$) (табл. 4.11). Концентрации ИЛ-1 β , ИЛ-6 и МІР-2 в крови мышей после применения НТ с последующим введением *E. coli* через 10 ч (после моделирования сепсиса) уменьшались по сравнению с показателями при сепсисе (контрольная группа 1) соответственно в 2,49; 1,87 и 2,02 раза ($p<0,05$). При этом содержание ПВЦ достоверно ($p<0,05$) превышали контрольные показатели.

Таблица 4.11. Влияние никотина и ацеклидина на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови мышей при сепсисе через 10 и 25 ч, пг/мл ($M\pm m$)

Серии опытов	ИЛ1 β		ИЛ-6		МІР-2	
	10	25	10	25	10	25
Контрольная группа 2	21 $\pm$ 3 (7)	26 $\pm$ 4 (7)	30 $\pm$ 5 (7)	35 $\pm$ 6 (7)	15 $\pm$ 3 (7)	18 $\pm$ 3 (7)
Сепсис (контрольная группа 1)	279 $\pm$ 32 ^a (7)	94 $\pm$ 17 ^{ac} (4)	526 $\pm$ 57 ^a (7)	332 $\pm$ 60 ^{ac} (4)	91 $\pm$ 10 ^a (7)	68 $\pm$ 12 ^{ac} (4)
Никотин + сепсис (группа 2)	112 $\pm$ 15 ^{ab} (7)	51 $\pm$ 6 ^{abc} (7)	282 $\pm$ 30 ^{ab} (7)	157 $\pm$ 17 ^{abc} (7)	45 $\pm$ 6 ^{ab} (7)	31 $\pm$ 4 ^{abc} (7)
Ацеклидин + сепсис (группа 3)	185 $\pm$ 17 ^{abd} (7)	48 $\pm$ 6 ^{abc} (7)	370 $\pm$ 38 ^{ab} (7)	178 $\pm$ 18 ^{abc} (7)	67 $\pm$ 6 ^{acd} (7)	46 $\pm$ 5 ^{acd} (7)

Примечание. 10 и 25 – срок после моделирования сепсиса, ч; в скобках – число животных в опыте; ^a - $p<0,05$ по сравнению с контролем; ^b - $p<0,05$ по сравнению с соответствующим параметром при сепсисе (контрольной группы 1); ^c - $p<0,05$ по сравнению с показателем через 10 ч; ^d - $p<0,05$ по сравнению с показателем при воздействии никотина.

Применение АК за 6 ч до моделирования сепсиса приводило через 10 ч после введения *E. coli* мышам к снижению концентрации в плазме крови ИЛ1 β , ИЛ-6 и МІР-2 по сравнению показателями при сепсисе без применения ХМ (контрольной группой 1) соответственно в 1,51; 1,42 ($p<0,05$) и 1,34 раза ($p>0,05$).

Аналогичные, но менее выраженные изменения содержания в крови ПВЦ выявлены при сепсисе без предшествующего применения ХМ (контрольная группа 1) через 25 ч после моделирования сепсиса. Содержание в крови цитокинов ИЛ1 β , ИЛ-6 и МІР-2 через 25 ч после моделирования сепсиса во всех сериях опытов существенно снижалось ($p<0,05$) по сравнению с концентрацией, зарегистрированной через 10 ч после введения *E. coli*.

Параметры при экспериментальном перитоните с использованием НТ при оценке содержания в крови ПРЦ через 10 и 25 ч были снижены по сравнению с показателями, полученными в экспериментах с применением АК, причем - существенно ($p<0,05$) при оценке ИЛ1 β и МІР-2. При этом содержание ПВЦ статистически значимо ($p<0,05$) превышало контрольные уровни (контрольная группа 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что не только стимуляция nAChR, но и воздействие на mAChR (вероятно, дорсального вегетативного ядра n. vagus продолговатого мозга) приводит к снижению летальности животных от сепсиса вследствие снижения в крови ПРЦ. Возможно, что снижение летальности обусловлено также активацией mAChR нейтрофилов и других клеток ММС.

Действительно, при воздействии НТ и АК на ФМАН установлено (табл. 4.12), что АК увеличивает ФП, ФЧ, ИАН в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте ($p < 0,05$).

Таблица 4.12. Изменение фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов в крови мышей и концентрации сывороточного лизоцима после воздействия никотина и ацеклидина (0,5 DL₅₀) через 25 ч (M+m, n = 14)

Параметры	Контрольная группа 2	Никотин	Ацеклидин
ФП, %	26,1±2,2	34,2±3,4	49,0±4,0 ^a
ФЧ	1,75±0,18	1,97±0,24	2,94±0,31 ^a
НСТ сп, иан	0,28±0,03	0,34±0,04	0,51±0,05 ^a
НСТ инд, иан	0,50±0,06	0,65±0,08	0,82±0,09 ^a
Лизоцим, мг/л	6,5±0,6	8,0±0,7	9,9±0,8 ^a

Примечание. ФП, ФЧ – соответственно фагоцитарный показатель, фагоцитарное число; НСТ сп, НСТ инд – НСТ-тест соответственно спонтанный и индуцированный, иан – индекс активности нейтрофилов; ^a - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Никотин несущественно ($p > 0,05$) повышал все исследованные показатели, вероятно, вследствие активации nAChR симпатических ганглиев и мозгового вещества надпочечников и последующего действия норадреналина и адреналина на β -адренорецепторы клеток ММС [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007] на фоне супрессирующего эффекта НТ. Это предположение дают основание сделать результаты работы [Razani-Boroujerdi S. et al., 2008], в которой доказано, что активация nAChR и mAChR клеток ММС и лимфоцитов приводит к противоположным эффектам (возбуждение nAChR снижает функцию лейкоцитов, макрофагов и моноцитов). При воздействии АК существенно возрастали ФП, ФЧ, ИАН в спонтанном и индуцированном НСТ-тесте в 1,88; 1,51; 1,82 и 1,64 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (контрольной группой 2). Кроме того, активация mAChR АК приводила к увеличению концентрации сывороточного лизоцима у мышей в 1,52 раза ($p < 0,05$).

Выявленные изменения содержания ПВЦ в крови у мышей свидетельствуют о том, холинергический противовоспалительный механизм («cholinergic anti-inflammatory pathway») [Забродский П.Ф., 1987, 1995a, 2010; Oke S.L., Tracey K.J., 2008], приводящий к снижению летальности животных от сепсиса, реализуется не только вследствие активации $\alpha 7$ nAChR моноцитов, макрофагов и нейтрофилов [Hauber H.P., Zabel P., 2009], но и в

результате воздействия АЦХ на mAChR дорсального вегетативного ядра п. vagus продолговатого мозга. Кроме того, на увеличение выживаемости животных при сепсисе может влиять возбуждение mAChR клеток MMC печени, желудочно-кишечного тракта, селезенки, приводящее к увеличению ФМАН.

Таким образом, воздействие на м- и н-холинергических рецепторы соответственно никотина и ацеклидина (в эквивалентных дозах 0,5 DL₅₀, однократно) за 6 ч до моделирования сепсиса вызывают существенное снижение летальности мышей от экспериментального инфекционного процесса вследствие уменьшения в крови концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, МІР-2. Реализация холинергического противовоспалительного механизма (возбуждение периферических $\alpha 7$ nAChR и центральных mAChR) модулируется активацией mAChR клеток MMC.

4.6. Влияние обратимого ингибирования холинэстеразы и никотина на летальность мышей и содержание в крови провоспалительных цитокинов в ранней фазе сепсиса

При исследовании летальности белых мышей после моделирования сепсиса с применением и без применения холинергических препаратов установлено (табл. 4.13), что прозерин и никотин через 10 ч после внутривентрального введения *E. coli* приводили к снижению ($p < 0,05$) исследованного показателя по сравнению с контрольной группой 1 (сепсис) соответственно на 30,0 и 36,7%, а через 25 ч – на 23,3 и 30,0% ($p < 0,05$ соответственно).

Таблица 4.13. Влияние прозерина и никотина на летальность мышей после моделирования сепсиса ($M \pm m$, $n = 30$)

Серии опытов	Срок исследования летальности после введения <i>E. coli</i> , ч	
	10	25
Сепсис (контрольная группа 1)	66,7 $\pm$ 8,6	83,3 $\pm$ 6,9
Прозерин + сепсис (группа 2)	36,7 $\pm$ 8,8*	60,0 $\pm$ 8,9*
Никотин + сепсис (группа 3)	30,0 $\pm$ 8,4*	53,3 $\pm$ 9,1*

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

Полученные результаты позволяют полагать, что уменьшение летальности мышей при моделировании сепсиса после применения обратимого ингибитора холинэстеразы прозерина и н-холиномиметика никотина обусловлено активацией АХ и никотином рецептора $\alpha 7$ nAChR клеток MMC [Giebeleh I.A. et al., 2009].

Концентрация провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6 в плазме крови мышей при сепсисе (контрольная группа 1) значительно увеличивается ($p<0,05$) по сравнению со 2-й контрольной группой мышей (интактные животные) через 10 ч при сепсисе соответственно в 4,9; 14,0 и 21,7 раза (табл. 4.14)

Концентрация в крови мышей ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6 после применения прозерина (группа 2) с последующим моделированием сепсиса через 10 ч уменьшалось по сравнению с показателями при сепсисе без использования данного холиномиметика (контрольная группа 1) соответственно в 1,6; 2,1 и 2,4 раза ($p<0,05$). При этом содержание провоспалительных цитокинов достоверно ($p<0,05$) превышало показатели контрольной группы 2 (интактные животные).

Введение никотина до моделирования сепсиса (группа 3) приводило через 10 ч после внутрибрюшинного введения *E. coli* мышам к снижению концентрации в плазме крови ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6 по сравнению с показателями при сепсисе без применения холинергических препаратов (контрольная группа 1) соответственно в 1,8; 2,4 и 2,7 раза ($p<0,05$). В целом никотин вызывал более выраженную редукцию исследованных показателей, хотя параметры при сепсисе с использованием прозерина (группа 2) и никотина (группа 3) практически не отличались. При этом содержание цитокинов достоверно ($p<0,05$) превышало контрольные уровни.

Таблица 4.14. Влияние прозерина и никотина на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови мышей при сепсисе через 10 и 25 ч, пг/мл ($M \pm m$)

Серии опытов	ФНО α		ИЛ1 β		ИЛ-6	
	10	25	10	25	10	25
Контрольная группа 2 (интактные животные)	39 $\pm$ 6 (7)	42 $\pm$ 4 (7)	29 $\pm$ 3 (7)	24 $\pm$ 3 (7)	35 $\pm$ 4 (7)	30 $\pm$ 4 (7)
Сепсис (контрольная группа 1)	190 $\pm$ 20 ^a (10)	63 $\pm$ 16 ^{ac} (5)	405 $\pm$ 42 ^a (10)	117 $\pm$ 27 ^{ac} (5)	760 $\pm$ 80 ^a (10)	332 $\pm$ 83 ^{ac} (5)
Прозерин + сепсис (группа 2)	119 $\pm$ 12 ^{ab} (9)	49 $\pm$ 5 ^c (9)	191 $\pm$ 20 ^{ab} (9)	56 $\pm$ 6 ^{abc} (9)	313 $\pm$ 34 ^{ab} (9)	150 $\pm$ 17 ^{abc} (9)
Никотин + сепсис (группа 3)	105 $\pm$ 11 ^a _b (10)	45 $\pm$ 5 ^c (9)	167 $\pm$ 17 ^{ab} (10)	51 $\pm$ 6 ^{abc} (9)	282 $\pm$ 30 ^{ab} (10)	167 $\pm$ 18 ^{abc} (9)

Примечание. 10 и 25 – срок после моделирования сепсиса, ч; в скобках – число животных в опыте; ^a - $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой 2; ^b - $p<0,05$ по сравнению с соответствующим параметром при сепсисе (контрольной группы 1); ^c - $p<0,05$ по сравнению с показателем через 10 ч.

Менее выраженное по сравнению с показателями контрольной группы 2 (интактные животные), уменьшение концентрации цитокинов зарегистрировано при сепсисе без применения холиномиметиков (контрольная группа 1) через 25 ч после внутрибрюшинного введения мышам *E. coli*.

Содержание в крови ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6 через 25 ч после моделирования сепсиса во всех сериях опытов (контрольная группа 1, группы 2 и 3) существенно снижалось ($p < 0,05$) по сравнению с концентрациями цитокинов через 10 ч после введения *E. coli*. Содержание провоспалительных цитокинов в крови через 25 ч оставалось выше значений контрольной группы 2 ($p < 0,05$), за исключением уровня ФНО α , который практически не отличался от контрольного показателя (контрольной группы 2). При воздействии прозерина (группа 2) и никотина (группа 3) с последующим моделированием сепсиса концентрация ФНО α была ниже по сравнению с показателями при сепсисе (контрольная группа 1) соответственно в 1,3 и 1,4 раза ($p > 0,05$). Концентрации в крови цитокинов при сепсисе с применением прозерина и никотина практически не отличались.

Установленные изменения содержания провоспалительных цитокинов в плазме крови мышей свидетельствуют о том, что при использовании прозерина АХ, воздействуя на $\alpha 7nAChR$ моноцитов, макрофагов и нейтрофилов [Hauber H.P., Zabel P., 2009] (возможно, и естественных клеток-киллеров [Забродский П.Ф., 1995а], приводит к реализации «холинергического противовоспалительного механизма» [Забродский П.Ф., 1987, 1995а, 1995b, 1996, 2007, 2010, 2015; Vos A.F. de et al., 2009], снижая в крови и органах, имеющих ММС (печень, желудочно-кишечный тракт, селезенка), содержание провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ1 β и ИЛ-6. Эти цитокины вызывают различные патологические реакции, приводящие к летальному исходу при сепсисе (и других инфекционных патологических состояниях) [Pavlov V.A., 2008]. При введении никотина данный холиномиметик активирует $\alpha 7nAChR$ клеток ММС и вызывает (несущественно) более выраженный эффект, чем прозерин, в эквивалентной дозе.

Снижение летальности животных через 1-2 сут после воздействия обратимых и необратимых ингибиторов холинэстеразы (в том числе, фосфорорганических соединений), АХ и м-холиномиметика ацеклидина [Забродский П.Ф., 1987, 1995а, 1995b, 1996], обусловлено не только взаимодействием АХ с $\alpha 7nAChR$ макрофагов, моноцитов и нейтрофилов [Oke S.L., Tracey K.J., 2008], но и с активацией гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы с последующим увеличением в крови кортикостероидов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Кроме того, увеличение антимикробной неспецифической резистентности организма может быть связано с активацией АХ и м-холиномиметиками м-холинорецепторов клеток ММС, приводящей к увеличению фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов, а также к повышению

бактерицидной активности сыворотки крови, продукции клетками крови лизоцима и тромбоцитарного катионного белка [Забродский П.Ф., 1995а, 1996].

Следует отметить, что проведенные исследования в ранней фазе сепсиса характеризуют влияние холинергических препаратов при моделировании сепсиса не на реакции гуморального и клеточного иммунитета, а на антиинфекционную неспецифическую резистентность организма [Забродский П.Ф., 1987, 1995а, 1995b, 1996]. Синтез ИЛ-6 Th2-лимфоцитами (и клетками Th0-типа) в ответ на введение *E. coli* начинается в период формирования иммунного ответа только через 5-7 сут после попадания в организм данного антигена [Ройт А. и соавт., 2000].

Таким образом, обратимый ингибитор холинэстеразы прозерин и н-холиномиметик никотин (эквивалентная доза 0,2 DL₅₀, однократно) при их введении за 2 ч до моделирования сепсиса вызывают существенное снижение летальности мышей от экспериментального инфекционного процесса вследствие уменьшения в крови концентрации провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6.

Для окончательного подтверждения роли активации $\alpha 7nAChR$ в уменьшении летальности животных после отравления ФОС при последующем моделировании сепсиса представляет интерес результат сравнения действия анабазина (активатора $\alpha 7nAChR$ моноцитов, макрофагов, нейтрофилов) [Забродский П.Ф., и соавт., 2014, Pavlov V.A., 2008; Н.Р. Hauber, P. Zabel, 2009] с воздействием ФОС для подтверждения роли возбуждения $\alpha 7nAChR$ ацетилхолином клеток ФМС (ММС) при интоксикации антихолинэстразным ядом в реализации именно этого фактора в снижение летальности животных при моделировании экспериментальной инфекции.

4.7. Значение $\alpha 7n$ -ацетилхолинорецепторов ($\alpha 7nAChR$) в реализации «холинергического противовоспалительного пути (механизма)» при острой интоксикации ФОС

Активация рецепторов $\alpha 7nAChR$ анабазином в дозах 1,0 и 5,0 мг/кг за 2 ч до моделирования сепсиса через 4 ч после введения взвеси *E. coli* приводила к снижению летальности мышей по сравнению с контрольной группой 2 (сепсис) соответственно в 1,88 ($p > 0,05$) и 3,01 ($p < 0,05$) раза, а через 24 ч – в 1,28 и 1,85 раза ($p < 0,05$) соответственно. [Забродский П.Ф. и соавт., 2014]. В дозе, составляющей 0,1 мг/кг, анабазин не оказывал существенного влияния на летальность животных при моделировании сепсиса (табл. 4.15).

Таблица 4.15. Влияние анабазина в различных дозах за 2 ч до моделирования сепсиса) на летальность мышей (%), $M \pm m$)

№ группы	Доза анабазина	n	Срок исследования летальности после введения <i>E. coli</i> , %	
			4 ч	24 ч
2	сепсис (контроль)	40	25,0±6,8	90,0±4,7
3	сепсис + 0,1 мг/кг	25	22,0±9,0	84,0±7,3
4	сепсис + 1,0 мг/кг	30	13,3±6,2	70,0±8,4*
5	сепсис + 5,0 мг/кг	35	8,3±4,6**	48,6±8,3**

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем (группа 2); ** - $p < 0,05$ по сравнению с контролем и группой 3.

Полученные данные свидетельствует о том, что активация $\alpha 7nAChR$ анабазином в дозах 1,0 и 5,0 мг/кг существенно ($p < 0,05$) дозозависимо увеличивает выживаемость животных в ранней фазе сепсиса.

При сепсисе (контрольная группа 2) в крови существенно увеличивалось содержание ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 по сравнению с группой 1 (интактные животные), особенно выраженное через 4 ч после внутрибрюшинного введения взвеси *E. coli* (соответственно в 20,2 и 27,5 и 61,1 раза ($p < 0,05$)) (табл. 4.16).

Таблица 4.16. Влияние анабазина в различных дозах (подкожное введение за 2 ч до моделирования сепсиса) на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови мышей (пг/мл, $M \pm m$)

№ групп	Анабазин Доза	ФНО α		ИЛ1 β		ИЛ-6	
		4ч	24ч	4ч	24ч	4ч	24ч
1	Контроль интактная	23±3 (7)	25±4 (7)	14±3 (7)	18±4 (7)	26±5 (7)	20±4 (7)
2	Сепсис контроль	465±48 ^a (7)	36±9 ^c (4)	385±39 ^a (7)	85±23 ^{ac} (4)	1590±180 ^a (6)	143±37 ^{ac} (4)
3	0,1 мг/кг + сепсис	410±42 ^a (7)	32±3 ^c (7)	390±40 ^a (7)	70±8 ^{ac} (7)	1340±125 ^a (6)	150±16 ^{ac} (7)
4	1,0 мг/кг + сепсис	270±29 ^{abd} (7)	31±4 ^c (7)	245±26 ^{abd} (7)	59±6 ^{ac} (7)	898±90 ^{abd} (6)	85±9 ^{abcd} (7)
5	5,0 мг/кг + сепсис	146±16 ^{abde} (7)	20±4 ^c (7)	174±18 ^{abde} (7)	51±6 ^{ac} (7)	205±25 ^{abde} (6)	59±6 ^{abcde} (7)

Примечание. 4ч и 24ч – время после моделирования сепсиса; в скобках – число животных; ^a - $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой 1; ^b - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим параметром при сепсисе (контрольная группа 2); ^c - $p < 0,05$ по сравнению с показателем через 4 ч; ^d - $p < 0,05$ по сравнению с параметром при воздействии анабазина (0,1 мг/кг); ^e - $p < 0,05$ по сравнению с показателем при назначении анабазина (1,0 мг/кг);

Активация $\alpha 7nAChR$ анабазином в дозе 0,1 мг/кг не влияла на летальность животных при экспериментальном сепсисе (контрольная группа 2). Анабазин в дозе 1,0 мг/кг за 2 ч до моделирования сепсиса приводил через 4 ч после введения *E. coli* мышам (группа 4) к снижению концентрации в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 по сравнению показателями при сепсисе (контрольная группа 2) без применения препарата соответственно в 1,72; 1,57 и 1,77 раза ($p < 0,05$), а в дозе 5,0 мг/кг (группа 5) – в 3,18; 2,21 и 7,76 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Через 24 ч после моделирования сепсиса концентрация ФНО- α в крови мышей по сравнению с показателями контрольной группы 1 существенно не изменялась. При этом отмечались менее выраженные, но статистически значимые изменения ($p < 0,05$) содержания ИЛ-1 β и ИЛ-6, чем через 4 ч после введения *E. coli*, в группах 2, 3, 4, 5. При введении анабазина в дозе 0,1 мг/кг концентрации ПВЦ в крови через 24 ч по сравнению с показателями в группе 2 (сепсис без применения активатора $\alpha 7nAChR$) существенно не отличались ($p > 0,05$). Анабазин в дозе 1,0 мг/кг существенно снижал ($p < 0,05$) содержание в крови ИЛ-6 по сравнению параметрами контрольной группы 2 (сепсис) и группы 3 (доза анабазина - 0,1 мг/кг). Активатор $\alpha 7nAChR$ в дозе 5,0 мг/кг через 24 ч после введения *E. coli* статистически значимо ($p < 0,05$) снижал концентрацию ИЛ-6 по сравнению с показателями групп 2, 3, 4.

Полученные данные свидетельствует о том, что активация $\alpha 7nAChR$ анабазином в дозах 1,0 и 5,0 мг/кг существенно ($p < 0,05$) дозозависимо снижает концентрацию ПВЦ в крови мышей в ранней фазе сепсиса. Анабазин в дозе, составляющей 0,1 мг/кг, не оказывал существенного влияния на летальность животных и концентрацию ПВЦ в крови при моделировании сепсиса.

Уменьшение концентраций в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 при назначении анабазина в дозах 1,0 и 5,0 мг/кг связано с его активацией $\alpha 7nAChR$ моноцитов, макрофагов, нейтрофилов (а также лимфоидных дендритных клеток) [Забродский П.Ф., и соавт., 2014, Pavlov V.A., 2008; Н.Р. Hauber, P. Zabel, 2009].

Таким образом, анабазин в дозах 1,0 и 5,0 мг/кг за 2 ч до моделирования сепсиса (внутрибрюшинное введение взвеси микробных тел *E. coli*) вызывают существенное дозозависимое снижение летальности мышей через 24 ч в среднем на 24,5% ($p < 0,05$), вызывают дозозависимое уменьшения в крови концентрации провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, а в дозе 0,1 мг/кг не оказывал существенного влияния на летальность мышей и содержание в плазме крови провоспалительных цитокинов.

При острой интоксикации ДДВФ (0,5 DL_{50}), сопровождающейся активацией как $mAChR$, так и $nAChR$, в том числе, и $\alpha 7nAChR$ (применение ФОС за 2 ч до моделирования сепсиса) после введения взвеси *E. coli* через 4 ч происходило снижение летальности мышей по сравнению с

контрольной группой 2 (сепсис) на 11,7%, в 1,88 раза ($p<0,05$), а через 24 ч – на 26,7%, в 1,42 раза ($p<0,05$).

Активация $\alpha 7nAChR$ анабазином [Welch K.D., 1913] в эквилетальной дозе ($0,5 DL_{50}$) при таком же сроке применения препарата до моделирования сепсиса после введения *E. coli* через 4 ч приводила к уменьшению летальности мышей по сравнению с контрольной группой 2 (сепсис) на 16,7%, в 3,01 раза ($p<0,05$), а через 24 ч – на 41,4%, в 1,85 раза ($p<0,05$) (табл. 4.17).

Таблица 4.17. Влияние ФОС и активатора $\alpha 7nAChR$ анабазина (применение за 2 ч до введения взвеси *E. coli*) на летальность мышей после моделирования сепсиса ($M \pm m$)

Серии опытов	Срок исследования летальности после введения <i>E. coli</i> , ч	
	4	24
Сепсис (контрольная группа 2, n = 40)	25,0 $\pm$ 6,8	90,0 $\pm$ 4,7
ДДВФ + сепсис (группа 3, n = 30)	13,3 $\pm$ 6,2*	63,3 $\pm$ 8,8*
Анабазин + сепсис (группа 5, n = 35)	8,3 $\pm$ 4,6*	48,6 $\pm$ 8,3*

Примечание. * - $p<0,05$ по сравнению с контролем (группа 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что острая интоксикация ФОС и активация $\alpha 7nAChR$ анабазином в эквилетальной дозе ($0,5 DL_{50}$) существенно увеличивают выживаемость животных в ранней фазе сепсиса. При этом эффект активации $\alpha 7nAChR$ анабазином более выражен, чем действие ФОС, однако отличия показателей (летальности) статистически не значимы ($p>0,05$).

При сепсисе (контрольная группа 2) в крови существенно увеличивалось содержание ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 по сравнению с группой 1 (интактные животные), особенно выраженное через 4 ч после внутрибрюшинного введения взвеси *E. coli* (соответственно в 20,22 и 27,50 и 61,15 раза ($p<0,05$)) (табл. 4.18).

Острое отравление ДДВФ за 2 ч до моделирования сепсиса приводило через 4 ч после введения *E. coli* мышам (группа 3) к снижению концентрации в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 по сравнению показателями при сепсисе (контрольная группа 2) без применения ФОС соответственно в 2,51; 1,77 и 5,88 раза ($p<0,05$).

Активация $\alpha 7nAChR$ анабазином в дозе $0,5 DL_{50}$ за 2 ч до введения *E. coli* мышам (группа 4) вызывала редукцию содержания в крови животных ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 после моделирования сепсиса через 4 ч по сравнению параметрами контрольной группы 2 (сепсис) соответственно в 3,18; 2,21 и 7,76 раза ($p<0,05$).

После моделирования сепсиса через 24 ч концентрация ФНО- α в крови мышей (группы 2, 3, 4) по сравнению с показателями контрольной группы 1 существенно не изменялась. В этот же период содержание ИЛ-1 β и ИЛ-6

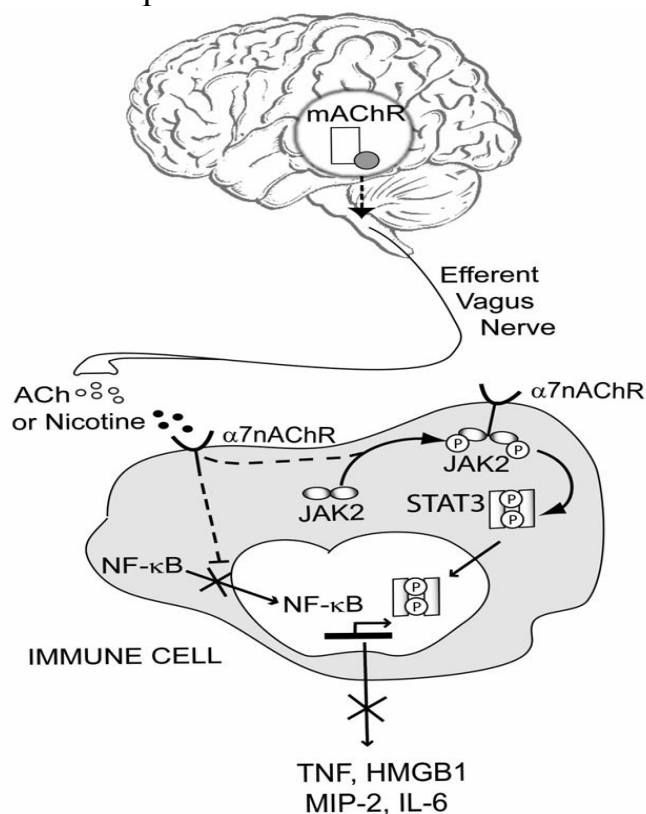
при сепсисе (контрольная группа 2) увеличивалось по сравнению с показателями контрольной группы 1 соответственно в 4,72 и 7,19 раза ($p<0,05$).

Таблица 4.18. Влияние ФНО α и активатора $\alpha 7nAChR$ анабазина (применение за 2 ч до введения взвеси *E. coli*) на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови мышей после моделирования сепсиса, пг/мл (M $\pm$ m)

Серии опытов	ФНО α		ИЛ1 β		ИЛ-6	
	4	24	4	24	4	24
Контрольная группа 1	23 $\pm$ 3 (7)	25 $\pm$ 4 (7)	14 $\pm$ 3 (7)	18 $\pm$ 4 (7)	26 $\pm$ 5 (7)	20 $\pm$ 4 (7)
Сепсис (контрольная группа 2)	465 $\pm$ 48 ^a (7)	36 $\pm$ 9 ^c (4)	385 $\pm$ 39 ^a (7)	85 $\pm$ 23 ^{ac} (4)	1590 $\pm$ 180 ^a (6)	143 $\pm$ 37 ^{ac} (4)
ДДВФ + сепсис (группа 3)	185 $\pm$ 21 ^{ab} (6)	31 $\pm$ 4 ^c (6)	218 $\pm$ 23 ^{ab} (6)	45 $\pm$ 5 ^{ac} (7)	270 $\pm$ 30 ^{ab} (7)	60 $\pm$ 7 ^{abc} (7)
Анабазин + сепсис (группа 4)	146 $\pm$ 16 ^{ab} (7)	20 $\pm$ 4 ^c (7)	174 $\pm$ 18 ^{ab} (7)	51 $\pm$ 6 ^{ac} (7)	205 $\pm$ 25 ^{ab} (7)	59 $\pm$ 6 ^{abc} (7)

Примечание. 4 и 24 – время после моделирования сепсиса, ч; в скобках – число животных; ^a - $p<0,05$ по сравнению с контрольной группой 1; ^b - $p<0,05$ по сравнению с соответствующим параметром при сепсисе (контрольная группа 2); ^c - $p<0,05$ по сравнению с показателем через 4 ч.

Холинергический противовоспалительный путь (механизм)» («cholinergic anti-inflammatory pathway») [Забродский П.Ф. и соавт., 1987; 1995, 2007, 2010, 2015; Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V.A., 2007] представлен на рис. 4.1.



Эфферентные холинергические сигналы п. vagus снижают продукцию TNF (ФНО) и других провоспалительных цитокинов через $\alpha 7$ nAChR-опосредованных механизмы. Экспериментальные данные показывают, что активация иммунных и других клеток крови (в данном случае, имеются в виду макрофаги, моноциты, нейтрофилы, В-клетки) ацетилхолином, возбуждающим рецепторы $\alpha 7$ nAChR, может предотвратить NF- κ B ядерную транслокацию. $\alpha 7$ nAChR-опосредованная активация JAK2 / STAT3 пути была продемонстрирована в ответ на никотин [Kessler W. et al., 2006; Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V.A., 2007; Hauber H.P., Zabel P., 2009]. Эти сигнальные пути играют центральную роль в передаче холинергических противовоспалительных сигналов и активация ацетилхолином $\alpha 7$ nAChR приводит к ингибированию активации иммунной клетки и подавлению TNF, HMGB1, продукции макрофагального воспалительного белка-2 (MIP-2) и IL-6. В мозгу мускариновые рецепторы (M1) к ацетилхолину (mAChR) способны возбуждать или снижать активацию «cholinergic anti-inflammatory pathway», модулируя иммунорегуляторные и противовоспалительные процессы (см. раздел 4.5) [Забродский П.Ф. и соавт, 2012].

Как уже упоминалось, активация н- и м-холинорецепторов (nAChR, mAChR) соответственно никотином и ацеклидином (эквивалентная доза 0,5 DL₅₀, однократно) за 6 ч до моделирования сепсиса вызывают существенное снижение летальности мышей от экспериментального инфекционного процесса вследствие уменьшения в крови концентрации провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β , ИЛ-6, MIP-2. Активация mAChR (введение ацеклидина) приводит к повышению фагоцитарно-метаболической активности моноцитов, макрофагов, нейтрофилов. Реализация холинергического противовоспалительного механизма (возбуждение периферических $\alpha 7$ nAChR и центральных mAChR) модулируется активацией mAChR клеток макрофагально-моноцитарной системы (ФМС). Холинергический противовоспалительный путь обеспечивается не только снижением провоспалительных цитокинов (антивоспалительный эффект), но и реализацией воспалительного механизма, активируя mAChR клеток ФМС и увеличивая функцию фагоцитов (см. раздел 4.5) [Забродский П.Ф. и соавт, 2012].

Таким образом, холинергический противовоспалительный путь (механизм) - «cholinergic anti-inflammatory pathway» [Забродский П.Ф., 1987, 2010, 2015; Kessler W. et al., 2006; Tracey K.J., 2007; Oke S.L., Tracey K.J., 2008] включает: м-холинорецепторы (mAChR) головного мозга, модулирующие иммунорегуляторную функцию блуждающего нерва; эфферентные волокна п. vagus; ацетилхолин; н-холинорецепторы (в частности, $\alpha 7$ nAChR) клеток ФМС. В клетках ФМС в реализации антивоспалительного эффекта участвуют киназы JAK2; фактор транскрипции STAT3; транскрипционный фактор NF- κ B. Под влиянием холинергической стимуляции «включение» данных биохимических механизмов клетки ингибирует продукцию ими α -фактора некроза опухоли (ФНО α), протеина B1 - HMGB1, макрофагально-воспалительный протеин-2

- MIP-2, интерлейкинов ИЛ-1 β , ИЛ-6 [Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V. A., 2007; Pavlov V.A., 2008]. Проведенные нами эксперименты позволили включить в этот процесс активацию фагоцитоза вследствие возбуждения mAChR ФМС.

При остром отравлении ДДВФ и применении анабазина за 2 ч до моделирования сепсиса через 24 ч после введения *E. coli* мышам концентрация ИЛ-1 β в крови была меньше данного показателя в контрольной группе 2 (сепсис) соответственно в 1,67 ($p>0,05$) и 1,89 раза ($p>0,05$), а содержание ИЛ-6 - соответственно в 2,38 ($p<0,05$) и 2,42 раза ($p<0,05$).

Полученные данные свидетельствует о том, что снижение летальности мышей при сепсисе после острого отравления ФОС (ДДВФ) обусловлено активацией $\alpha 7$ nAChR клеток и уменьшением продукции ими ПВЦ. Данные литературы свидетельствуют о том, активируются $\alpha 7$ nAChR моноцитов, макрофагов, нейтрофилов, а также лимфоидных дендритных клеток [Забродский П.Ф., 1987, 1995, 2010, 2015; Pavlov V.A., 2008; Hoeger S. et al., 2014].

Активация $\alpha 7$ nAChR ингибиторами ацетилхолинэстеразы и другими н-холиномиметиками клеток не только ФМС, но и других систем и органов, может рассматриваться как перспективный способ одного из направлений лечения септических состояний, а также других патологических состояний (заболеваний) [Забродский П.Ф., 1995; Hoeger S. et al., 2014; Newham P., et al., 2014].

Таким образом, острая интоксикация ФОС, также как и активация $\alpha 7$ nAChR анабазином в эквилетальной дозе (0,5 DL₅₀; применение препаратов за 2 ч до моделирования сепсиса) после внутрибрюшинного введения взвеси микробных тел *E. coli* через 4 и 24 ч существенно увеличивают выживаемость мышей в ранней фазе сепсиса, а также уменьшают в крови концентрации провоспалительных цитокинов. Следовательно, снижение летальности мышей и редукция провоспалительных цитокинов при сепсисе при остром отравлении ФОС (ДДВФ) обусловлено активацией $\alpha 7$ nAChR.

4.8. Влияние активации $\alpha 7$ n- ацетилхолинорецепторов ($\alpha 7$ nAChR) и антител к фактору некроза опухоли- α на летальность мышей и концентрацию провоспалительных цитокинов в крови в ранней фазе сепсиса

Как уже упоминалось, выявленный нами в 1987 году феномен [Забродский П.Ф., 1987] обеспечивается реализацией холинергического противовоспалительного пути (механизма) - «cholinergic anti-inflammatory pathway» [Забродский П.Ф. и соавт, 2012; Tracey K.J., 2007], который включает: активацию м-холинорецепторов (mAChR) головного мозга, модулирующих иммунорегуляторную функцию блуждающего нерва; возбуждение эфферентных волокон n. vagus; действие ацетилхолина на $\alpha 7$ n-ацетилхолинорецепторы ($\alpha 7$ nAChR) клеток макрофагально-моноцитарной

системы (ММС). В клетках ММС возникновение противовоспалительного эффекта обеспечивается киназой JAK2; фактором транскрипции STAT3; транскрипционным фактором NF-κB. Под влиянием холинергической стимуляции реализация данных биохимических механизмов клетки ингибирует продукцию клетками ММС ФНО-α, протеина В1 - HMGB1, макрофагально-воспалительного протеина-2 - MIP-2, интерлейкинов - ИЛ-1β, ИЛ-6 [6]. Активация ацетилхолином α7nAChR макрофагов, моноцитов и нейтрофилов приводит к снижению летальности от сепсиса [Забродский П.Ф., 1987, 1995; Pavlov V.A., 2008] вследствие уменьшения продукции этими клетками провоспалительных цитокинов (ПВЦ) [Oke S.L., Tracey K.J., 2008]. Доказано, что такой же эффект способен вызвать м-холиномиметик ацеклидин, действующий на mAChR ядра n. vagus продолговатого мозга [Забродский П.Ф. и соавт, 2012].

В настоящее время представляют интерес исследования, направленные на изучение возможности снижения летальности при сепсисе путем применения активаторов α7nAChR [Забродский П.Ф. и соавт, 2012; Rohanka M., 2012], а также антител к цитокину ФНО-α [Newham P. et al., 2014].

Целью исследования являлась оценка влияния активации α7nAChR и антител к ФНО-α, а также их комбинированного эффекта на летальность мышей в ранней фазе сепсиса, вызванного экспериментальным перитонитом, и содержание провоспалительных цитокинов ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6 в крови.

Применение анабазина, МАФНО, а также их комбинации за 2 ч до введения *E. coli* приводило к снижению ($p < 0,05$) летальности через 4 ч по сравнению с контрольной группой 2 (сепсис) соответственно в 2,50; 1,88 ($p > 0,05$) и 3,79 раза ($p < 0,05$) (на 15,0; 11,7 и 18,4%), а через 24 ч – в 1,29; 1,59 и 2,46 раза (на 20,0; 33,4 и 53,4%) ($p < 0,05$) соответственно (табл. 4.19).

Таблица 4.19. Влияние анабазина (0,5 DL₅₀), моноклональных антител к ФНО-α (МАФНО; 1 мг/кг) и их комбинированного действия на летальность мышей после моделирования сепсиса (M±m)

Серии опытов	Срок исследования летальности после введения <i>E. coli</i> , ч	
	4	24
Сепсис (контрольная группа 2, n = 40)	25,0±6,8	90,0±4,7
Анабазин + сепсис (группа 3, n = 30)	10,0±4,8	70,0±8,4*
МАФНО + сепсис (группа 4, n = 30)	13,3±6,2	56,6±9,2*
Анабазин + МАФНО + сепсис (группа 5, n = 30)	6,6±4,5*	36,6±8,7**

Примечание. * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем (группа 2); ** - $p < 0,05$ по сравнению с контролем и группами 3 и 4.

Это свидетельствует о том, что активация α7nAChR и связывание (нейтрализация) МАФНО ФНО-α, существенно увеличивают выживаемость

животных в ранней фазе сепсиса. При этом эффект анабазина существенно не отличается от действия МАФНО. Комбинированное действие активатора $\alpha 7nAChR$ анабазина и МАФНО вызывало больший эффект, чем изолированное воздействие данных препаратов ($p < 0,05$) (аддитивное действие).

При сепсисе (контрольная группа 2) в крови существенно увеличивалось содержание ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 по сравнению с группой 1 (интактные животные), особенно выраженное через 4 ч после внутрибрюшинного введения взвеси *E. coli* (соответственно в 20,22 и 27,50 и 61,15 раза ($p < 0,05$)). Активация $\alpha 7nAChR$ анабазином за 2 ч до моделирования сепсиса приводило через 4 ч после введения *E. coli* мышам (группа 3) к снижению концентрации в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в по сравнению показателями при сепсисе (контрольная группа 2) без применения препаратов соответственно в 3,18; 2,21 и 7,76 раза ($p < 0,05$). При этом содержание ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в крови достоверно ($p < 0,05$) превышало показатели контрольной группы 1 (табл. 4.20).

Таблица 4.20. Влияние анабазина (0,5 DL₅₀), моноклональных антител к ФНО- α (МАФНО; 1 мг/кг) и их комбинированного действия на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови мышей после моделирования сепсиса, пг/мл ($M \pm m$)

Серии опытов	ФНО α		ИЛ1 β		ИЛ-6	
	4	24	4	24	4	24
Контрольная группа 1	23 $\pm$ 3 (7)	25 $\pm$ 4 (7)	14 $\pm$ 3 (7)	18 $\pm$ 4 (7)	26 $\pm$ 5 (7)	20 $\pm$ 4 (7)
Сепсис (контрольная группа 2)	465 $\pm$ 48 ^a (7)	36 $\pm$ 9 ^c (4)	385 $\pm$ 39 ^a (7)	85 $\pm$ 23 ^{ac} (4)	1590 $\pm$ 180 ^a (6)	143 $\pm$ 37 ^{ac} (4)
Анабазин + сепсис (группа 3)	146 $\pm$ 16 ^{ab} (7)	20 $\pm$ 4 ^c (7)	174 $\pm$ 18 ^{ab} (7)	51 $\pm$ 6 ^{ac} (7)	205 $\pm$ 25 ^{ab} (6)	59 $\pm$ 6 ^{abc} (7)
МАФНО + сепсис (группа 4)	310 $\pm$ 30 ^{abd} (6)	29 $\pm$ 5 ^c (7)	120 $\pm$ 13 ^{ab} ^d (7)	35 $\pm$ 4 ^{abcd} (7)	143 $\pm$ 16 ^{abd} (7)	40 $\pm$ 5 ^{abcd} (7)
Анабазин + МАФНО + сепсис (группа 5)	100 $\pm$ 12 ^{abde} (7)	17 $\pm$ 4 ^c (7)	84 $\pm$ 9 ^{abde} (7)	20 $\pm$ 3 ^{abcde} (7)	87 $\pm$ 9 ^{abde} (7)	32 $\pm$ 4 ^{abcd} (7)

Примечание. 4 и 24 – время после моделирования сепсиса, ч; в скобках – число животных; ^a - $p < 0,05$ по сравнению с контролем (группа 1); ^b - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим параметром при сепсисе (контрольной группы 2); ^c - $p < 0,05$ по сравнению с показателем через 4 ч; ^d - - $p < 0,05$ по сравнению с показателем при воздействии анабазина; ^e - $p < 0,05$ по сравнению с показателем при назначении МАФНО.

Содержание ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в крови мышей через 4 ч после моделирования сепсиса при применении МАФНО за 2 ч до введения взвеси *E. coli* (группа 4) уменьшалось по сравнению с параметрами при сепсисе (контрольная группа 2) соответственно в 1,50; 3,21 и 11,12 раза ($p < 0,05$).

Концентрация ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в крови мышей через 4 ч после внутрибрюшинного введения взвеси *E. coli* при активации $\alpha 7nAChR$ анабазином и введения мышам МАФНО (комбинированное действие препаратов) за 2 ч до моделирования сепсиса (группа 5) уменьшались по сравнению с показателями контрольной группы 2 соответственно в 4,65; 4,58 и 18,16 раза ($p < 0,05$). Содержание ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в крови статистически значимо ($p < 0,05$) превышало показатели контрольной группы 1.

Через 24 ч после моделирования сепсиса концентрация ФНО- α в крови мышей по сравнению с показателями контрольной группы 1 существенно не изменялась. При этом отмечались менее выраженные, но статистически значимые изменения ($p < 0,05$) содержания ИЛ-1 β и ИЛ-6, чем через 4 ч после введения *E. coli*, в группах 2, 3, 4, 5.

Концентрация ФНО- α при экспериментальном перитоните с использованием комбинации анабазина и МАФНО снижалась максимально по сравнению изолированным эффектом препаратов, причем по сравнению с воздействием МАФНО эффекты анабазина и его комбинации с МАФНО были более выражены (соответственно в 2,12 и 3,10 раза, $p < 0,05$). При этом эффект анабазина (уменьшение ФНО- α) превышал действие МАФНО ($p < 0,05$).

Полученные данные свидетельствуют, что содержание в крови ИЛ-1 β и ИЛ-6 при сепсисе и активации $\alpha 7nAChR$ анабазином через 4 и 24 ч (группа 3) снижалось в меньшей степени ($p < 0,05$), чем при использовании МАФНО (группа 4), а комбинированное действие анабазина и МАФНО (группа 5) вызывало уменьшение ПВЦ в крови большее, чем при их изолированном применении ($p < 0,05$). Это позволяет заключить, что реализуется аддитивный эффект препаратов.

Редукция концентраций в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 при назначении анабазина связано с его активацией $\alpha 7nAChR$ моноцитов, макрофагов, нейтрофилов (а также лимфоидных дендритных клеток) [Pavlov V.A., 2008; Welch K.D. et al., 2015]. Снижение содержания ИЛ-1 β и ИЛ-6 в крови при применении МАФНО, вызывающего нейтрализацию ФНО- α , обусловлено уменьшением их продукции, которая стимулируется данным цитокином (ФНО α) [Bradley J.R., 2008].

Таким образом, применение антител к ФНО- α и активация $\alpha 7nAChR$ анабазином за 2 ч до моделирования сепсиса вызывают существенное снижение летальности мышей от экспериментального сепсиса (внутрибрюшинное введение взвеси микробных тел *E. coli*) вследствие уменьшения в крови концентрации провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6. Комбинированное использование анабазина и МАФНО и приводило к их аддитивному эффекту.

4.9. Сывороточная активность лизоцима при хроническом действии ФОС

Исследование показателя лизоцимной активности сыворотки крови для оценки неблагоприятного действия химических факторов на организм свидетельствуют о высокой чувствительности данного теста [Бухарин О. В. и соавт., 1985; Агапов В.И. и соавт., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Как правило, химические соединения вызывают снижение лизоцимной активности сыворотки крови [Агапов В.И. и соавт., 2004; Василенко О.А., 2004; Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Однако свидетельством отрицательного воздействия ксенобиотиков на организм может являться также и кратковременное повышение содержания лизоцима в крови [Барштейн Ю. А. В. и соавт., 1991].

После хронического действия VX в дозе 0,01 ЛД₅₀ в течение 30 сут через 30 сут (табл. 4.21) происходило уменьшение сывороточной активности лизоцима в 1,89 раза ($p < 0,05$).

Таблица 4.21. Влияние иммуностимуляторов на активность лизоцима сыворотки крови крыс после хронической интоксикации веществом VX (суммарная доза 0,3 ДЛ₅₀, 30 сут) , мг/л ($M \pm m$, $n=8-10$)

Серии опытов	Активность лизоцима, мг/л
Контроль	8,5±1,2
VX	4,2±1,1*

Примечание: *- различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Супрессия активности лизоцима под влиянием ФОС, вероятно, связана с ингибированием эстераз клеток крови, а также вследствие эффекта токсиканта, инактивирующего многочисленные биохимические реакции, связанные с участием различных эстераз [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Снижение синтеза лизоцима может происходить также вследствие воздействия ФОВ на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

Таким образом, после хронического действия ФОВ в дозе 0,01 ЛД₅₀ в течение 30 сут происходит снижение активности лизоцима сыворотки крови.

4.10. Сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка при хронической интоксикации ФОС

Начиная от беспозвоночных и заканчивая млекопитающими и человеком, важным фактором неспецифической защиты организма представителей царства *Animalia*, являются катионные антимикробные

пептиды. Эти соединения представляют собой обширную группу неферментных белков с молекулярной массой от 2 до 10 кДа, за счет электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной поверхностью микробной клетки способных оказывать на нее прямое бактерицидное действие. В частности, подобные свойства демонстрирует тромбоцитарный катионный белок (ТКБ), освобождающийся из гранул тромбоцитов в процессе свертывания крови и ответственный за обеспечение стерильности образующегося сгустка [Каримов И.Ф. и соавт., 2009]

Исследование влияние хронического действия ФОВ (вещества VX) на содержание ТКБ сыворотки крови показало (табл. 4.22), что через 30 сут отмечается снижение показателя в 1,53 раза ($p < 0,05$).

Таблица 4.22. Влияние иммуностимуляторов на активность тромбоцитарного катионного белка сыворотки крови крыс после хронической интоксикации VX (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут), % (M±m, n=8-10)

Серии опытов	Активность ТКБ, %
Контроль	69,2±7,0
VX	45,1±3,5*

Примечание: *- различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Редукция сывороточной активности ТКБ может быть связано с действием ФОВ на его синтез и выделение тромбоцитами [Бухарин О.В., 1974, 1985; Забродский П.Ф., 1998; 2002; Сидельникова Н.М., 2004]. Механизм супрессии активности ТКБ (β -лизина), видимо, обусловлен нарушением функции тромбоцитов в результате взаимодействия с эстеразами тромбоцитов ФОВ, ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [Ротенберг Ю.С., 1980; 1982; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф., 2002], инициацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2004а, 2004б; Василенко О.А., 2004]. Нарушение продукции ТКБ, вероятно, наряду с действием ФОВ на клеточном уровне может быть обусловлено изменением активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) [Бухарин О.В. и соавт., 1974, 1998; Забродский П.Ф., 2002].

Таким образом, после хронического действия ФОС в дозе 0,01 DL₅₀ в течение 30 сут происходит снижение активности ТКБ сыворотки крови.

ГЛАВА 5. ХАРАКТЕРИСТИКА ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ. ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА Т-АКТИВИНА, ИМУНОФАНА И ПОЛИОКСИДОНИЯ

Анализ обширной литературы, посвященной лекарственным средствам, обладающим выраженными иммуотропными эффектами, позволяет считать, что иммуномодуляторами являются вещества, способные вызывать иммунодепрессию и иммуностимуляцию, а также оказывать активирующее или супрессирующее действие на систему иммунитета в зависимости от ее функционального состояния. К иммуностимуляторам (в литературе часто термин «иммуномодулятор» используют, как синоним определения «иммуностимулятор», если речь не идет об иммуносупрессантах) обычно относят соединения, способные увеличивать нормальный или пониженный гуморальный и клеточный иммунный ответ [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 1995а, 1995б, 2005; Коготкова О.И. и соавт., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Хаитов Р.М., 2006; Hokland M. et al., 1999; Bondar N.F. et al., 2004; Singh N., Perfect J.R., 2007].

По основным функциональным признакам иммуностимуляторы подразделяются на препараты, стимулирующие преимущественно НРО (продигиозан, метилурацил, пентоксил, нуклеинат натрия), клеточный иммунитет (тималин, Т-активин, тимоптин, тимоген, молграмостин, леакадин) [Забродский П.Ф., 2002; Романцов М.Г. и соавт., 2008; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993; Khaitov R.M., 1993; Kimball E. S., 1993; Janik G., Kopp W.C., 1993], В-систему иммунитета (миелопид, спленин), а также оказывающее влияние практически на все звенья иммунного ответа и НРО (имунофан, полиоксидоний) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Hokland M. et al., 1999; Bondar N.F. et al., 2004].

Данная классификация не является общепринятой. К современным препаратам, восстанавливающим функционирование фагоцитов, ЕКК и дефекты гуморального иммунитета относят ликолипид и полиоксидоний, восстанавливающим гуморальный иммунитет – миелопид, а функционирование Т-клеточного звена – Т-активин (тактивин), тимоген, имунофан, бестим и т.д. [Нестерова И.В., 2005].

По происхождению иммуностимуляторы подразделяются на продукты жизнедеятельности микроорганизмов, растений и животных (полисахариды, фосфолипиды мембран, гликопептиды, модифицированные токсины, ДНК и РНК микроорганизмов, вакцины и др.) [Лазарева Д.Н., Алехин Е.К., 1985; Хаитов Р.М. и соавт., 1995б; 1995в, 2000; 2002; Чекнёв С.Б., Бабаева Е.Е., 2004; Медуницын Н.В., 2005; Хабибуллаев Б.Б., 2005; Khaitov R.M., 1993], пептидные эндогенные стимуляторы иммунитета (препараты тимуса, селезенки, костного мозга, интерлейкины, интерфероны и др.) [Нестерова И.В., 2005; Петров Р.В. и соавт., 2005; Georgiev V.St. et al., 1993; Stevens G., 1993], синтетические стимуляторы иммунитета

(левамизол, леакадин, тимоген) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Hokland M. et al., 1999; Bondar N.F. et al., 2004; Singh N., Perfect J.R., 2007], стимуляторы метаболических процессов - экстраиммунная терапия (анаболические гормоны, рибоксил, плазмол, витамины, бемитил, пирацетам, оротат калия, и др.) [Зарубина И.В., Миронова О.П., 2001; Забродский П.Ф., 2002; Хаитов Р.М. и соавт., 1995б; 1995в, 2002; Хаитов Р.М., 2006].

Описаны иммунопротективные эффекты мелатонина при действии пестицидов на крыс Вистар, которые заключались в восстановлении клеточного иммунного ответа, за исключением реакции ГЗТ, вследствие нормализации цитокинового профиля, измененного широко используемым пестицидом пропоксуром [Suke S.G., 2008].

В настоящее время средства коррекции нарушений системы иммунитета включает несколько сотен соединений, однако широко используются лишь несколько десятков из них. Необходимо учитывать, что практически все иммуностимуляторы имеют те или иные нежелательные побочные эффекты. Однако при применении Т-активина, имунофана и полиоксидония они не выявлены [Хаитов Р.М. и соавт., 1995в, 2002; Нестерова И.В., 2005; Хаитов Р.М., 2006; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Изучение иммуностимулирующих характеристик различных препаратов [Беликов В.Г., 2001; Мальцева Г.М., 2002; Нечаев В.И. и соавт., 2003; Василенко О.А., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Нестерова И.В., 2005; Забродский П.Ф., 1998, 2002; Елизарова Н.Л. и соавт., 2005; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Hokland M. et al., 1999; Bondar N.F. et al., 2004; Singh N., Perfect J.R., 2007; Frasc S.C. et al., 2007] показывает, что наиболее эффективным при нарушении Т-звена иммунитета и снижении активности ЕКК вследствие действия ФОС могут являться Т-активин, при поражении Т- и В-звена иммунитета – имунофан, а при комбинированной супрессии показателей НРО, Т- и В-системы иммунитета – имунофан и полиоксидоний.

В литературе практически отсутствуют сведения, имеющие отношения к сравнительной характеристике действия некоторых иммуностимуляторов на иммунный гомеостаз. Однако анализ иммуностимулирующих эффектов иммуномодуляторов [Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 1989, 1997, 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003; Елизарова Н.Л. и соавт., 2005; Dyakonova V.A. et al., 2004], позволяет считать наиболее приемлемыми препаратами для коррекции постинтоксикационных нарушений, вызванных отравлениями ФОВ, Т-активин, имунофан и полиоксидоний.

Т-активин является иммуномодулирующим препаратом полипептидной природы, полученным из вилочковой железы крупного рогатого скота. При иммунодефицитных состояниях он восстанавливает измененные функциональные показатели Т-системы иммунитета, стимулирует продукцию лимфокинов, в том числе интерферонов, нормализует другие показатели клеточного иммунитета. Применяют Т-активин у взрослых в комплексной терапии инфекционных, гнойных, септических процессов и

других заболеваний, сопровождающихся иммунодефицитным состоянием с преимущественным поражением Т-системы иммунитета [Ковальская Н.И. и соавт., 1984; Арион В.Я. 1981; Арион В.Я. и соавт., 1984, 1987, 1991; Базарный В.В., Ястребов А.П., 1993; Нечаев В.И. и савт., 2003]. Препарат противопоказан при атопической форме бронхиальной астмы и беременности [Машковский М.Д., 2010]. Показана эффективность Т-активина при отравлениях хлорорганическими соединениями [Вахидова Г.А. и соавт., 1990].

Имеются сведения, что Т-активин обладает более высокой эффективностью в связи с его способностью активировать выработку γ -интерферона Т-лимфоцитами [Вахидова Г.А. и соавт., 1990; Борисова А.М. и соавт., 1991; Ханафиева И.В. и соавт., 1992; Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993; Машковский М.Д., 2010]. Препарат оказывает существенное иммуномодулирующее влияние на функцию макрофагов и различные иммунные реакции в очень широком диапазоне доз от 0,001 до 5 мкг/кг [Большаков и соавт., 1991; Кириличева Г.Б. и соавт., 1990]. В литературе описаны свойства Т-активина увеличивать пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность Т-клеток [Шляхов Э.Н., Гылка В.В., 1989; Арион В.Я. и соавт., 1987; Стасий Е.Д. и соавт., 1990; Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф., 1991]. Т-активин способен также стабилизировать В-звено иммунитета [Имантаева Г.М., 2005].

Сравнительно недавно стало известно, что Т-независимый иммунный ответ на антигены 2-го класса, к которым относятся полисахариды бактериальных стенок и, в частности, Vi-Ag, обеспечивается взаимодействием В-лимфоцитов с тимуснезависимыми Т-лимфоцитами (Т $\gamma\delta$) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000]. Поэтому вполне логично предположить, что Т-активин способен стимулировать и Т-независимый гуморальный иммунный ответ, активируя Т $\gamma\delta$. Кроме того, Т-активин, повышая функцию макрофагов [Таранов В.А., Короткова М.И., 1989], приводит к увеличению ими продукции ИЛ-1, который может активировать Т-независимое антителообразование [Gillbert R.V., Hoffmann M.K., 1985] при остром отравлении ФОВ.

Исследованиями последних лет показано, что имунофан (аргинил-альфа-аспартил-лизил-валин-тирозил-аргинин) – гексапептид с молекулярной массой 836 Да. Препарат относится к синтетическим иммуностимуляторам, обладает иммунорегулирующим, детоксикационным, гепатопротективным действием и вызывает инактивацию свободнорадикальных процессов ПОЛ [Покровский В.И. и соавт., 1997; Лебедев В.В. и соавт., 1999а, 1999б, 2000]. Фармакологическое действие пептидного иммунооксидредуктанта основано на достижении коррекции иммунной и окислительно-антиокислительной систем организма. Действие препарата начинает развиваться в течение 2-3 часов (быстрая фаза) и продолжается до 4 мес (средняя и медленная фазы).

В течение быстрой фазы (продолжительность до 2-3 суток) прежде всего, проявляется детоксикационный эффект – усиливается

антиоксидантная защита организма путем стимуляции продукции церулоплазмينا, лактоферрина, активности каталазы. Препарат нормализует перекисное окисление липидов, ингибирует распад фосфолипидов клеточной мембраны и синтез арахидоновой кислоты с последующим снижением уровня холестерина крови и продукции медиаторов воспаления. При токсическом и инфекционном поражении печени имунофан предотвращает цитолиз, снижает активность трансаминаз и уровень билирубина в сыворотке крови [Константинов Б.А. и соавт., 2000; Лебедев В.В. и соавт., 2000; Караулов А.В., 2000а, 2000б].

В течение средней фазы (начинается через 2-3 суток, продолжительность – до 7-10 суток) происходит усиление реакций фагоцитоза и гибели внутриклеточных бактерий и вирусов. В течение медленной фазы (начинает развиваться на 7-10 сут, продолжительность до 4 месяцев) проявляется иммунорегуляторное действие препарата – восстановление нарушенных показателей клеточного и гуморального иммунитета. В этот период наблюдается восстановление иммунорегуляторного индекса, отмечается увеличение продукции иммуноглобулинов [Лебедев В.В. и соавт., 2000; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003].

Влияние препарата на продукцию специфических противовирусных и антибактериальных антител эквивалентно действию некоторых лечебных вакцин. В отличие от последних препарат не оказывает существенного влияния на продукцию реактивных антител класса IgE и не усиливает реакцию гиперчувствительности немедленного типа [Лебедев В.В., Покровский В.И., 1999а; 1999б].

В связи с установленным нами поражением различных элементов системы иммунитета, нарушением его разнообразных реакций, популяций лимфоцитов под влиянием токсикантов имунофан, возможно, может являться препаратом выбора при остром отравлении ФОС. Имунофан в отличие от тимогена и Т-активина способен оказывать не только иммуностимулирующее влияние на все звенья системы иммунитета, но и обеспечивать детоксицирующий, гепатопротективный и антиоксидантный эффекты [Покровский В.И. и соавт., 1997; Лебедев В.В., Покровский В.И., 1999а; 1999б]. Антиоксидантное действие имунофана предотвращает повреждение ДНК лимфоцитов и гранулоцитов, вызванное химическими факторами окружающей среды (токсикантами) [Караулов А.В. и соавт., 2005].

Полиоксидоний (азоксимера бромид) - это физиологически активное соединение с молекулярной массой 80 кДа, обладающее выраженной иммуномодулирующей активностью. Обладает иммуностимулирующим и дезинтоксикационным действием. Входит в реестр «Жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств». Используется в составе противогриппозной вакцины «Гриппол». По своей химической структуре он является сополимером N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-

карбоксит)-1,4-этиленпиперазиния бромида [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005]. Он является иммуномодулятором последнего поколения, обладает иммуностимулирующими, детоксикационными, антиоксидантными и мембраностабилизирующими эффектами. При совместном введении полиоксидония и CuSO_4 происходит 100%-ная защита животных от действия ядовитого сульфата меди при 100%-ной гибели их в контроле [Пинегин Б.В., и соавт., 2004; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005] и свойствами гепатопротектора [Ратькин А.В. и соавт., 2005]. Полиоксидоний оказывает активирующее действие на НРО, фагоцитоз, гуморальный и клеточный иммунитет, действует на все звенья иммунного ответа, а также обладает способностью активировать ЕКК. Повышает функцию ЕКК полиоксидоний только в том случае, если она была исходно понижена. На нормальные уровни цитотоксичности лимфоцитов он влияния не оказывает [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Пинегин Б.В. и соавт., 2004; Dyakonova V.A. et al., 2004].

Одним из главных биологических свойств полиоксидоний является его способность стимулировать антиинфекционную резистентность организма. Предварительное его введение за 48, 72 и 96 ч может существенно повысить устойчивость животных к заражению несколькими летальными дозами патогенного микроорганизма *S. typhimurium*, вероятно, в связи с его способностью существенно повышать функциональную активность клеток фагоцитарной системы. Полиоксидоний в 1,5-2 раза усиливает способность фагоцитов периферической крови нормальных доноров убивать *S. aureus* и это усиление носит дозозависимый характер. Препарат обладает способностью активировать кислородонезависимые механизмы бактерицидности лейкоцитов. Полиоксидоний подавляет образование внеклеточных, но стимулирует образование внутриклеточных активных форм кислорода, от которых, как отмечалось, зависит гибель бактерии в клетке. Ингибция образования внеклеточных активных форм кислорода лейкоцитами можно рассматривать как положительный эффект этого иммуномодулятора, так как их избыточное образование лежит в основе повреждающего действия активированных нейтрофилов на различные ткани и органы. Полиоксидоний в определенных дозах обладает способностью стимулировать как спонтанный, так и индуцированный синтез цитокинов, продуцируемых в основном клетками моноцитарно-макрофагальной системы и нейтрофилами: IL-1 β , IL-6, TNF α [Пинегин Б.В., и соавт., 2004], которые являются основными активаторами функциональной активности фагоцитарных клеток [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Пинегин Б.В., и соавт., 2004; Dyakonova V.A. et al., 2004]. При этом он ведет себя как истинный иммуномодулирующий препарат, то есть усиливает образование ФНО только у лиц с исходно пониженным или средним уровнем синтеза цитокина и не оказывает влияния или даже несколько понижает продукцию у лиц с исходно повышенным его синтезом. Вероятно, способность полиоксидония индуцировать образование и провоспалительных (ИЛ-1 и факторы некроза опухоли - ФНО), и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-6) лежит в

основе его иммуномодулирующего эффекта. В условиях *in vivo* полиоксидоний обладает выраженной способностью стимулировать гуморальный иммунный ответ. При введении совместно с низкими дозами антигена препарат усиливает антителообразование в 5-10 раз по сравнению с животными, получавшими только один антиген. Важно отметить, что такое усиление можно наблюдать у старых мышей, у которых иммунный ответ по сравнению с молодыми животными существенно снижен [Пинегин Б.В., и соавт., 2004; Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

Таким образом, оценка эффективности Т-активина, имунофана и полиоксидония после отравлений ФОС позволит рассмотреть возможность применения данных препаратов для восстановления показателей НРО (врожденного иммунитета, доиммунных факторов резистентности организма), клеточного и гуморального иммунного ответа, содержания цитокинов в крови для профилактики инфекционных осложнений и заболеваний. Т-активин, имунофан, полиоксидоний могут являться препаратами выбора при нарушении иммунного гомеостаза вследствие интоксикации ФОС.

ГЛАВА 6 . ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

6.1. Влияние иммуномодуляторов на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови при хронической интоксикации фосфорорганическими веществами

При разработке способов профилактики и лечения постинтоксикационных иммунодефицитных состояний, сопровождающихся различными инфекционными осложнениями и заболеваниями, важно знать характер модуляции иммунных реакций специфическими средствами терапии острых отравлений ФОС.

В экспериментах на белых крысах оценивали действие различных иммуномодуляторов на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови. Нами установлено (табл. 6.1; табл. 6.2), что, при хронической интоксикации ФОВ (веществом VX) Т-активин, имунофан, полиоксидоний восстанавливали при назначении на 24 сут показатели ФМАН и содержание цитокинов в крови. При этом наибольшей активностью обладал полиоксидоний, а Т-активин восстанавливал содержание в крови ФНО α и ИЛ1 β только частично (при этом между их концентрациями при действии иммуномодуляторов и показателями в контроле существенных различий не отмечалось).

Таблица 6.1. Влияние иммуномодуляторов на фагоцитарно-метаболическую активности нейтрофилов крыс под влиянием хронической интоксикации веществом VX (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) (M $\pm$ m, n=8-10)

Серия опытов	ФП, %	ФЧ, у.е.	НСТ сп.	НСТ инд.
Контроль	29,8 $\pm$ 2,8	2,30 $\pm$ 0,21	0,28 $\pm$ 0,02	0,57 $\pm$ 0,05
VX	19,2 $\pm$ 2,0*	1,32 $\pm$ 0,14*	0,14 $\pm$ 0,02*	0,37 $\pm$ 0,04*
VX + Т-активин	24,0 $\pm$ 2,0	1,71 $\pm$ 0,19	0,23 $\pm$ 0,03	0,44 $\pm$ 0,04
VX + имунофан	26,2 $\pm$ 2,5	1,93 $\pm$ 0,20	0,25 $\pm$ 0,03	0,50 $\pm$ 0,04
VX + полиоксидоний	28,5 $\pm$ 2,7	2,23 $\pm$ 0,21	0,26 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,05

Примечание: иан – индекс активности нейтрофилов; ФП, ФЧ – фагоцитарные показатель и число соответственно; НСТ сп. - НСТ-тест спонтанный; НСТ инд. - НСТ-тест индуцированный; у.е. – условные единицы (среднее число микробных клеток, поглощенных одним нейтрофилом); * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Так, Т-активин, имунофан, полиоксидоний повышали ФП по сравнению с показателем при интоксикации VX соответственно в 1,25; 1,36 и 1,48 раза ($p < 0,05$), спонтанный НСТ-тест - в 1,64; 1,79 и 1,86 раза ($p < 0,05$), а концентрацию ИЛ-6 - в 1,27; 1,44 и 1,58 раза ($p < 0,05$).

Следует отметить, что существенных отличий между стимулирующими эффектами различных иммуномодуляторов выявлено не было. Учитывая, что супрессирующие эффекты зарина и VX практически не отличаются, а действие последнего даже превышает влияние зарина на исследованные показатели, следует ожидать, что полученные данные справедливы и в отношении иммуностимулирующих эффектов препаратов при хроническом отравлении заринном.

Таблица 6.2. Влияние иммуномодуляторов на хронической интоксикации российским VX на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови крыс, пг/мл ($M \pm m$, n=7)

Серии опытов	ФНО α	ИЛ1 β	ИЛ-6
Контроль	87 $\pm$ 9	65 $\pm$ 8	115 $\pm$ 10
VX	53 $\pm$ 6*	37 $\pm$ 4*	71 $\pm$ 7*
VX + Т-активин	65 $\pm$ 8	45 $\pm$ 6	90 $\pm$ 8*
VX + имунофан	73 $\pm$ 9	64 $\pm$ 7	102 $\pm$ 9
VX +полиоксидоний	80 $\pm$ 9	70 $\pm$ 7	112 $\pm$ 11

* - различие с контролем достоверно $p < 0,05$.

Эффект Т-активина, по-видимому, обусловлен его способностью повышать активность В-звена иммунитета [Имантаева Г.М., 2005], активировать макрофаги [Большаков и соавт., 1991], представляющие антиген Т-клеткам, выработку ИФН- γ и ИЛ-2 Th1-лимфоцитами [Ханафиева И.В. и соавт., 1992; Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993; Ройт А. и соавт., 2000], который стимулирует синтез IgM плазмоцитами, увеличивать пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность Т-клеток [Стасий Е.Д. и соавт., 1990; Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф., 1991].

Имуностимулирующее действие имунофана при хронической интоксикации этанолом обусловлено его иммунорегулирующим, детоксикационным, инактивацией свободнорадикальных процессов ПОЛ [Лебедев В.В. и соавт., 1999, 2000]. При этом достигается коррекция иммунной и окислительно-антиокислительной систем организма.

Эффект полиоксидония обусловлен его иммуностимулирующим действием в отношении Т-, В-лимфоцитов, плазматических клеток и других клеток иммунной системы, а также его антиоксидантными, детоксикационными и мембраностабилизирующими свойствами [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

Таким образом, применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови, а имунофан и полиоксидоний - практически полностью.

6.2. Фармакологическая коррекция сывороточной активности лизоцима при воздействии ФОВ

Исследование показателя лизоцимной активности сыворотки крови для оценки неблагоприятного действия химических факторов на организм свидетельствуют о высокой чувствительности данного теста [Бухарин О. В. и соавт., 1985; Агапов В.И. и соавт., 2004; Сидельникова Н.М., 2004; Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Как правило, химические соединения вызывают снижение лизоцимной активности сыворотки крови [Агапов В.И. и соавт., 2004; Василенко О.А., 2004; Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Однако свидетельством отрицательного воздействия ксенобиотиков на организм может являться также и кратковременное повышение содержания лизоцима в крови [Барштейн Ю. А. В. и соавт., 1991].

После хронического действия VX в дозе 0,01 ЛД₅₀ в течение 30 сут через 30 сут (рис. 6.3) происходило уменьшение сывороточной активности лизоцима в 1,89 раза ($p < 0,05$).

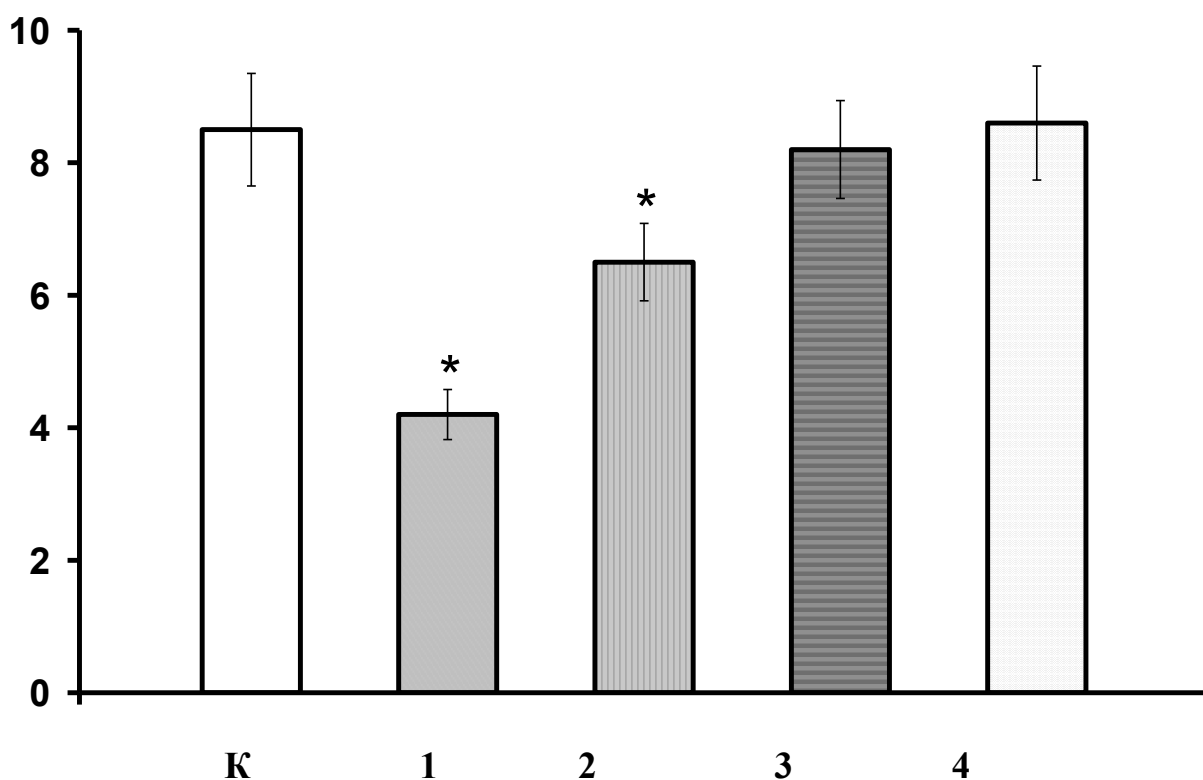


Рис. 6.3. Влияние иммуномодуляторов на активность лизоцима сыворотки крови крыс после хронической интоксикации веществом VX (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут), мг/л ($M \pm m$, $n=8-10$)

По оси абсцисс: К-контроль, 1 – VX, 2 – VX + Т-активин, 3 – VX + имунофан, 4 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: активность лизоцима, мг/л; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Супрессия активности лизоцима под влиянием ФОВ, вероятно, связана с ингибированием эстераз клеток крови, а также вследствие эффекта токсиканта, инактивирующего многочисленные биохимические реакции,

связанные с участием различных эстераз [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Снижение синтеза лизоцима может происходить также вследствие воздействия ФОВ на ДНК, что приводит к нарушению нуклеинового обмена [Голиков С.Н. и соавт., 1986].

При хронической интоксикации ФОВ (вещество VX) имунофан, полиоксидоний восстанавливали активность лизоцима сыворотки крови при назначении на 23 сут и применении в течение 7 сут (рис. 3.1). Существенных отличий между стимулирующими эффектами этих иммуномодуляторов выявлено не было. Т-активин увеличивал активность лизоцима незначительно ($p>0,05$).

Таким образом, после хронического действия ФОВ в дозе 0,01 ЛД₅₀ в течение 30 сут происходит снижение активности лизоцима сыворотки крови. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало активность лизоцима сыворотки крови крыс, сниженную под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний полностью восстанавливали показатель.

6.3. Коррекция сывороточной активности тромбоцитарного катионного белка при хронической интоксикации ФОВ.

Начиная от беспозвоночных и заканчивая млекопитающими и человеком, важным фактором неспецифической защиты организма представителей царства *Animalia*, являются катионные антимикробные пептиды. Эти соединения представляют собой обширную группу неферментных белков с молекулярной массой от 2 до 10 кДа, за счет электростатического взаимодействия с отрицательно заряженной поверхностью микробной клетки способных оказывать на нее прямое бактерицидное действие. В частности, подобные свойства демонстрирует тромбоцитарный катионный белок (ТКБ), освобождающийся из гранул тромбоцитов в процессе свертывания крови и ответственный за обеспечение стерильности образующегося сгустка [Каримов И.Ф. и соавт., 2009]

Исследование влияния хронического действия ФОВ (вещества VX) на содержание ТКБ сыворотки крови показало (рис. 6.4), что через 30 сут отмечается снижение показателя в 1,53 раза ($p<0,05$).

Редукция сывороточной активности ТКБ может быть связана с действием ФОВ на его синтез и выделение тромбоцитами [Бухарин О.В., 1974, 1985; Забродский П.Ф., 1998; 2002; Сидельникова Н.М., 2004].

Механизм супрессии активности ТКБ (β -лизина), видимо, обусловлен нарушением функции тромбоцитов в результате взаимодействия с эстеразами тромбоцитов ФОВ, ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [Ротенберг Ю.С., 1980; 1982; Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф., 2002], инициацией перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Голиков С.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2004а, 2004б; Василенко О.А., 2004]. Нарушение

продукции ТКБ, вероятно, наряду с действием ФОВ на клеточном уровне может быть обусловлено изменением активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) [Бухарин О.В. и соавт., 1974, 1998; Забродский П.Ф., 2002].

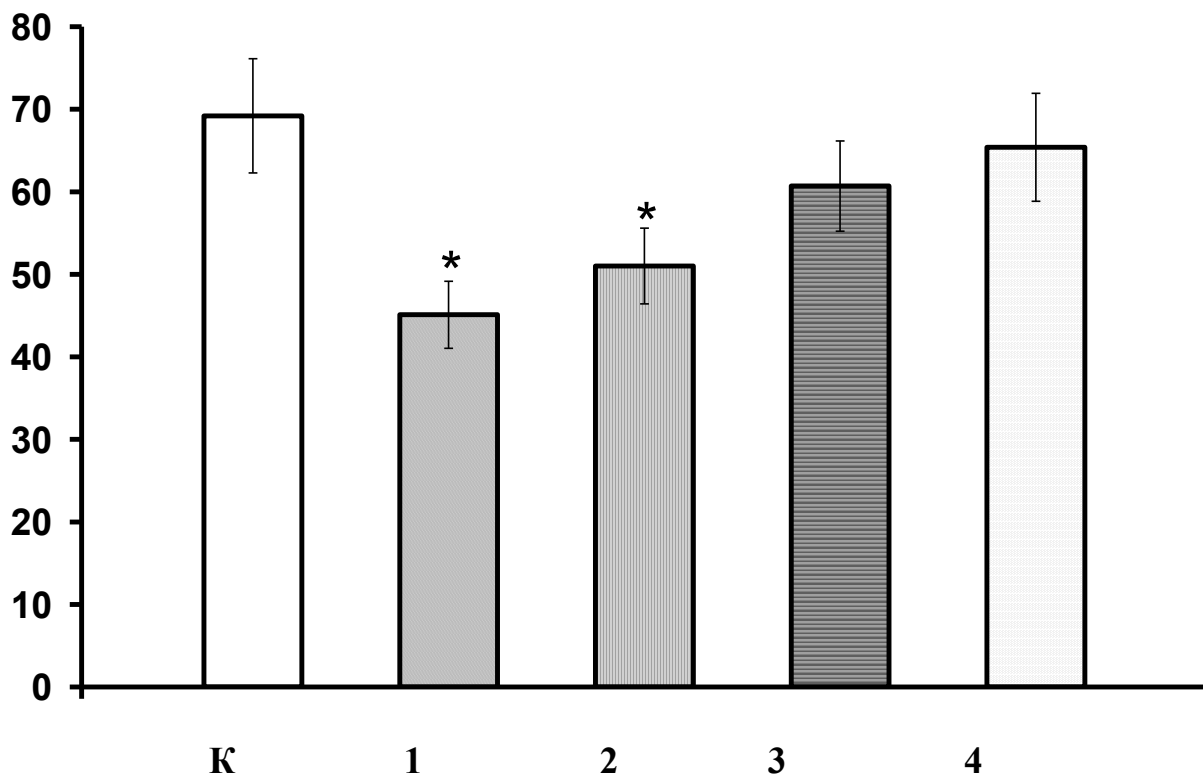


Рис. 6.4. Влияние иммуностимуляторов на активность тромбоцитарного катионного белка сыворотки крови крыс после хронической интоксикации VX (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут), % (M $\pm$ m, n=8-10)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – VX + Т-активин, 3 – VX + имунофан, 4 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: активность тромбоцитарного катионного белка, %, * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

При хронической интоксикации веществом VX Т-активин не восстанавливал активность ТКБ. Использование имунофана и полиоксидония увеличивало содержание ТКБ в сыворотке крови при назначении на 24 сут до контрольного значения (рис. 3.2). Существенных отличий между стимулирующими эффектами этих иммуномодуляторов не выявлено.

Таким образом, после хронического действия ФОВ в дозе 0,01 ЛД₅₀ в течение 30 сут происходит снижение активности ТКБ сыворотки крови. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ не восстанавливало сывороточную активность ТКБ, сниженную под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний увеличивали показатель до контрольного значения.

Резюме

Полученные нами результаты исследований показали, что после хронической интоксикации ФОС (российский VX, зарин) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL₅₀ (по 0,01 DL₅₀ ежедневно) снижается фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов. При хроническом отравлении ФОС уменьшается функция моноцитарно-фагоцитарной системы вследствие стимуляции nAChR ацетилхолином, что проявляется уменьшением концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6.

Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и содержание провоспалительных цитокинов в крови, а имунофан и полиоксидоний - практически полностью.

После хронического действия ФОВ в дозе 0,01 ЛД₅₀ в течение 30 сут происходит снижение активности лизоцима сыворотки крови. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ частично восстанавливало активность лизоцима сыворотки крови крыс под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний восстанавливал показатель полностью.

Хроническое действие ФОВ в дозе 0,01 ЛД₅₀ в течение 30 сут вызывает снижение активности ТБК сыворотки крови. Применение Т-активина при хронической интоксикации ФОВ не восстанавливало сывороточную активность ТБК, сниженную под влиянием хронической интоксикации, а имунофан и полиоксидоний увеличивали показатель до контрольного значения.

ГЛАВА 7. ВЛИЯНИЕ ФОС НА АДАПТИВНЫЙ ИММУНИТЕТ

7.1. Изменение содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета под влиянием ФОС

Интенсивные исследования влияния фосфорорганических соединений на гуморальный иммунный ответ началось в 60-е годы, в период получения Ф.Бернетом и П.Медаваром Нобелевской премии (в 1960 году) за исследования по искусственной индукции иммунологической толерантности и открытия R. Porter (1962) схемы строения иммуноглобулинов [Забродский П.Ф., 1998; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Descotes J., 1986]. Внимание исследователей в основном было сосредоточено на эффектах, обусловленных хроническим воздействием ФОП [Феерман И.С. и соавт., 1964; Штенберг А.И., Джунусова Р.М., 1968; Фридман Г.И., 1970].

Рядом исследователей было показано, что ФОС вызывают снижение антителообразования. При последующем изучении функции В-звена иммунитета после хронического воздействия метилмеркаптофоса, хлорофоса, циклофоса и других ФОС эти результаты были существенно дополнены и подтверждены с помощью различных методов исследования гуморальной иммунной реакции [Николаев А.И. и др., 1972; Диноева С.К., 1974; Забродский П. Ф. , 1986; Жминько П.Г., 1986; Присяжнюк Т.Н. и соавт., 1986; Desi I., Varga L., 1983]. Так, было установлено, что при ежедневном поступлении хлорофоса (5-100 мг/кг) в организм крыс с водой через 1 месяц увеличивалось количество лимфоцитов в периферической крови, затем содержание этих клеток в тимусе и селезенке уменьшалось пропорционально суточной дозе яда [Иванов В.В., 1986]. У лиц, контактирующих с ФОП, изменялись корреляционные связи внутри пула лимфоцитов и нейтрофилов, зависимость между содержанием В-лимфоцитов и общим количеством лимфоцитов [Федоров С.М. и соавт., 1988]. Незначительное снижение синтеза антител (титра антител) под влиянием метилпаратиона сопровождалось существенным уменьшением лимфоидного индекса селезенки. При введении роннела (фенхлорфоса) перорально в дозе 0,5 ppm (ежедневно в течение 3-8 недель) отмечали снижение лимфоидного индекса тимуса на 49%. Уменьшение данного показателя регистрировали при введении фенхлорфоса перорально в дозе 1 ppm в течение 3-8 недель на 39% [Rodica G., Srefania M., 1973]. В наших исследованиях было установлено (рис. 4.1), что при действии российского VX через 2 сут происходит прямо связанное с дозой снижение лимфоидного индекса (ЛИ) тимуса и селезенки, статистически значимое при дозах токсиканта, составляющих 0,25; 0,50 и 0,75 DL₅₀ ($p < 0,05$). ЛИ тимуса и селезенки при дозе 0,75 DL₅₀ уменьшался соответственно в 1,57 и 1,35 раза.

Под влиянием острой интоксикации VX в дозе 0,75 DL₅₀ (рис. 7.1) наибольшие изменения ЛИ тимуса и селезенки отмечались через 1 сут, значимое снижение показателей ($p < 0,05$) было зарегистрировано в период до 3 сут. Через 6 сут ЛИ исследуемых органов восстанавливался до контрольного уровня.

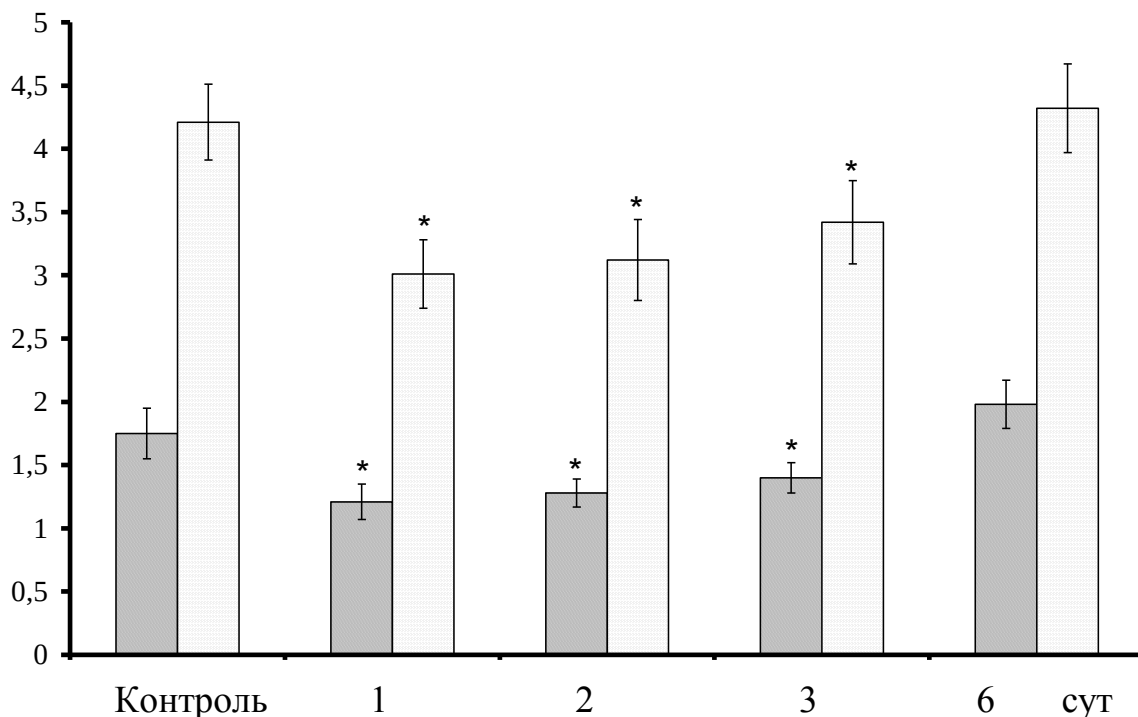


Рис. 7.1. Изменение лимфоидного индекса (усл. ед.) тимуса и селезенки крыс после острого отравления VX (0,75 DL₅₀ (M±m, n=5-7):

▨ - лимфоидный индекс тимуса; □ - лимфоидный индекс селезенки;

* – различие с контролем достоверно – $p < 0,05$.

Выявленные изменения имеют неспецифический и специфический компоненты. Аналогичные сдвиги были обнаружены при тяжелой механической травме [Александров В.Н., 1983] и связаны с действием кортикостерона, снижающего ЛИ тимуса, и катехоламинов, вызывающих уменьшение массы селезенки вследствие выхода из нее лимфоцитов в циркулирующую кровь [Горизонтов П.Д., 1981a]. Специфический компонент исследованной реакции обусловлен действием ацетилхолина на м-холинорецепторы тимоцитов, что приводит к их выходу из тимуса [Maslinski W. et al., 1987].

Проведенное нами экспериментальное исследование числа Т-лимфоцитов в тимусе показало (рис. 7.2), что в прямой зависимости от дозы антихолинэстеразного ТХ происходит снижение количества клеток в органе. Статистически достоверное снижение показателя ($p < 0,05$) происходило при дозах 0,50 и 0,75 DL₅₀ VX.

Существуют основания полагать, что уменьшение числа лимфоцитов в селезенке обусловлено снижением в органе количества В-лимфоцитов [Забродский П.Ф. и соавт., 2001].

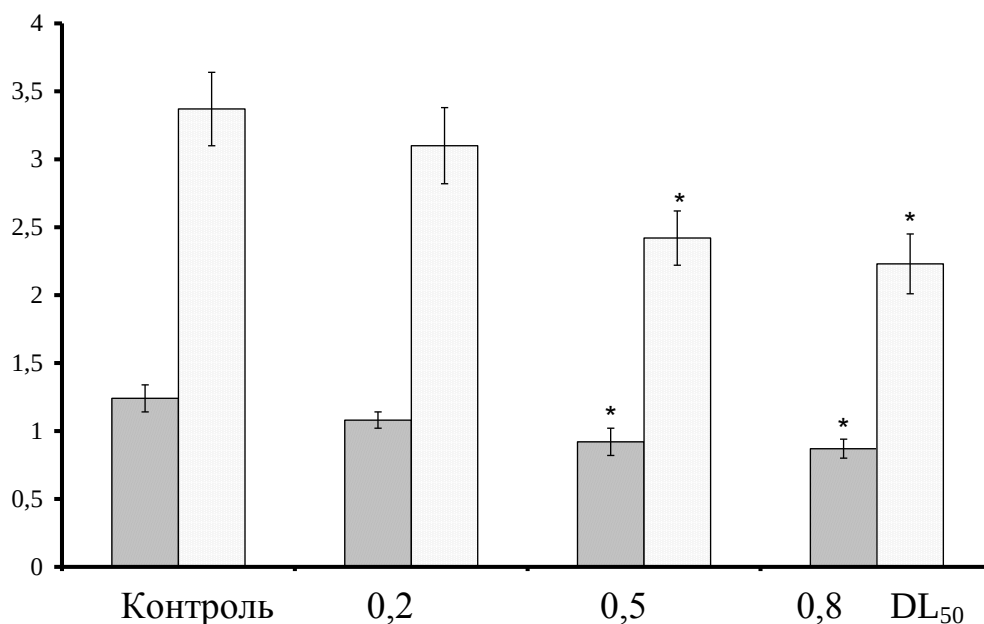


Рис. 7.2. Влияние острого отравления VX (0,75 DL₅₀) на содержание лимфоцитов в тимусе и селезенке крыс через 2 сут (M±m, n=5-7):

■ - число Т-лимфоцитов в тимусе (10^8); □ - число лимфоцитов в селезенке (10^8);

* – различие с контролем достоверно – $p<0,05$.

Нами показано, что под влиянием острой интоксикации VX в дозе 0,75 ЛД₅₀ (рис. 7.3) максимальное снижение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке отмечалось через 1 сут, значимое снижение показателей ($p<0,05$) было зарегистрировано в период до 3 сут. Через 6 сут количество клеток в исследуемых органах восстанавливалось до контрольного значения.

Под влиянием острой интоксикации VX происходит дозозависимое существенное уменьшение лимфоидного индекса тимуса и селезенки в течение 3 сут с последующим восстановлением этих показателей к 6 суткам.

Аналогичные изменения выявлены при оценке содержания Т-лимфоцитов в тимусе и лимфоцитов в селезенке.

Патогенез уменьшения числа лимфоцитов в селезенке связан как с неспецифическим, так и специфическим компонентами [Горизонтов П.Д., 1981a, 1981b; Александров В.Н., 1983; Maslinski W. et al., 1987] и происходит при отравлении ФОС за счет популяции В-клеток [Забродский П.Ф. и соавт., 2001].

Вероятно, увеличение лимфоцитов в селезенке при минимальной дозе VX обусловлено миграцией Т-лимфоцитов из тимуса в селезенку [Забродский П.Ф., Мышкина А.К., 1989]. При отравлении VX происходит миграция лимфоцитов из селезенки в результате активации α -адренорецепторов этого органа адреналином и норадреналином (концентрация данных гормонов в крови увеличивается вследствие действия ацетилхолина – антихолинэстеразный эффект ФОС - на н-холинорецепторы

мозгового слоя надпочечников [Горизонтов П.Д., 1981а, Забродский П.Ф. и соавт., 2000].

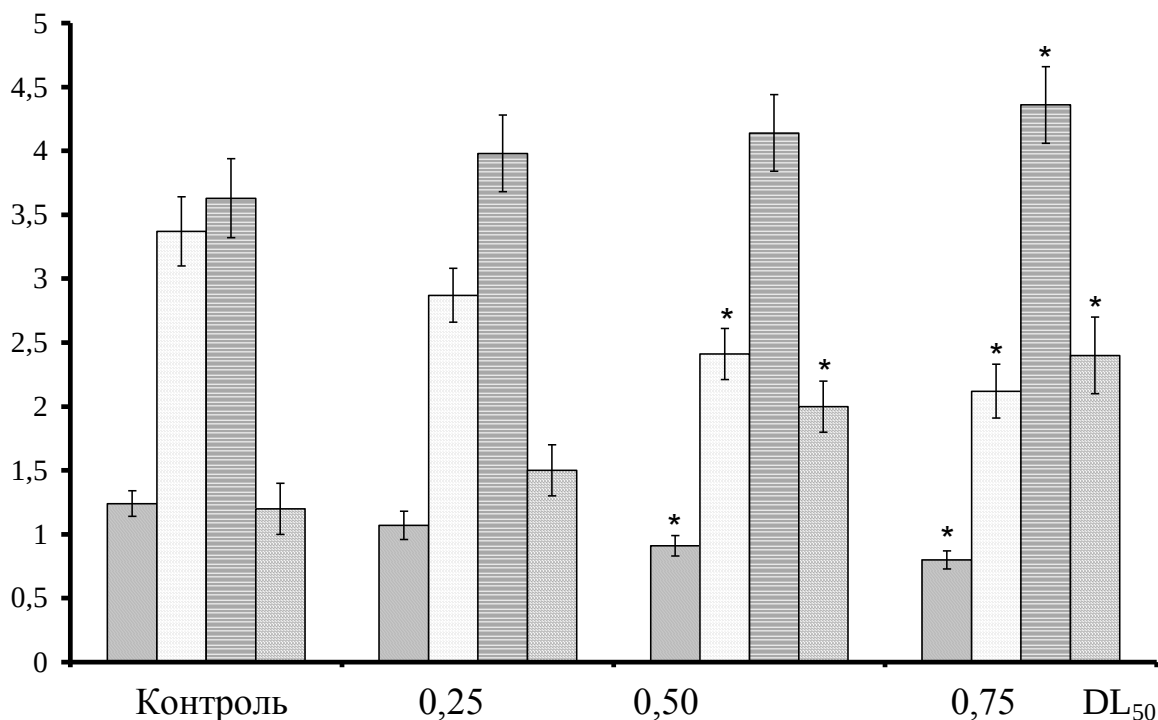


Рис. 7.3. Влияние острого отравления VX на число лимфоцитов в органах системы иммунитета у крыс через 1 сут ($M \pm m$):

▨ - число лимфоцитов в тимусе (10^8); □ - число лимфоцитов в селезенке (10^8);
 ▤ - число лимфоцитов в костном мозге (10^7); ▦ - число лимфоцитов в лимфоузлах (10^7);
 * – различие с контролем достоверно – $p < 0,05$.

Под влиянием VX в дозах 0,25; 0,50 и 0,75 DL_{50} происходит дозозависимое уменьшение содержания лимфоцитов в тимусе через 1 сут после интоксикации ($p < 0,05$) раза. Аналогично изменяется содержание лимфоцитов в селезенке. В костном мозге число лимфоцитов через 1 сут незначительно увеличивается. В лимфоузлах VX вызывал дозозависимое повышение содержания лимфоцитов, статистически значимое ($p < 0,05$) при дозах, составляющих 0,50 и 0,75 DL_{50} (рис. 7.3).

В крови через 6 ч и 1 и 3 сут при дозе зарина 0,75 DL_{50} происходило повышение содержания лейкоцитов с 11,7 до 14,2-15,1 $10^9/л$ ($p < 0,05$), а через 4 сут – снижение до контрольного уровня. Через 6 сут статистически значимого отличия содержания лейкоцитов в крови от контрольного уровня не отмечалось.

Относительное содержание лимфоцитов повышалось в течение 3 сут после отравления до 10% ($p < 0,05$). К 4 сут значимые отличия показателя по сравнению с контролем отсутствовали. Абсолютное содержание лимфоцитов в крови увеличивалось до $3,4 \cdot 10^9/л$ в течение 3 сут ($p < 0,05$) и восстанавливалось до контрольного значения через 4 сут.

7.2. Изменение миграции колониеобразующих единиц в селезенку

Примитивные стволовые кроветворные клетки (П-СКК) в культуре созревают до стадии колониеобразующей единицы селезенки (КОЕс) за 4-6 нед. Несмотря на то, что ни КОЕс и ни одна из категорий клеток способных к колониеобразованию в культуре не относятся к классу П-СКК [Чертков И.Л. и соавт., 1990], тем не менее, согласно теории клональной саксессии (последовательная смена кроветворных клонов в результате последовательного созревания одной за другой СКК) число КОЕс, мигрировавших из костного мозга (КМ) в селезенку, в определенной степени отражает функциональное состояние клона кроветворных клеток и, следовательно, функцию СКК, продуцирующих этот клон.

В литературе описывают содержание КОЕ в селезенке после летального облучения мышей с экранированием определенного участка голени или бедра, как отражение функции стволовых кроветворных клеток [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1972; Петров Р.В. и соавт., 1981; Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., 1993; 1998; 2000; Забродский П.Ф., Киричук В.Ф. и соавт., 1997; Беликов В.Г., 2001; Сидельникова Н.М., 2004]. Описан также и упрощенный метод оценки содержания КОЕс в селезенке после сублетального тотального облучения в дозе 6 Гр [Петров Р. В. и соавт., 1970]. Метод эндогенного клонирования 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]. Чертков И.Л. и соавт. (1990) считают, что при остром воздействии токсикантов при определении КОЕс следует говорить не о влиянии ядов на СКК, а о действии их именно на КОЕс. Существуют основания полагать, что содержание КОЕс отражает митостатическое действие ядов при изучении лимфопоэтической функции костного мозга, обеспечивающей иммунопоэз [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1981; Забродский П.Ф., 2002].

Использованный нами метод исследования влияния ФОС на КОЕс является одним из наиболее часто применяемых в прикладных областях иммунологии [Корнева Е.А., 1990; Забродский П.Ф., и соавт., 1997; Забродский П.Ф., 2002].

В результате проведенных нами исследований установлено (табл. 7.1), что острая интоксикация карбофосом в дозах 0,05; 0,2 и 0,5 DL₅₀ вызывает дозозависимое увеличение числа КОЕс соответственно в 1,12; 1,32 ($p > 0,05$) и 1,96 ($p < 0,05$). В дозе 0,8 DL₅₀ миграция КОЕс из КМ по сравнению с дозой карбофоса, составляющей 0,5 DL₅₀, снижалась в 1,38 раза, оставаясь выше контрольного уровня в 1,42 раза ($p > 0,05$).

Повышение содержания КОЕ в селезенке после острой интоксикации карбофосом обусловлено, возможно, активацией ацетилхолином их м-холинорецепторов. о чем косвенно свидетельствуют данные литературы [Дешевой Ю. Б., 1983; Забродский П. Ф., 1993; Беликов В.Г., 2001; Kutty K. M., 1976; Maslinski W. et al., 1983]. Данный эффект, наиболее выраженный

при дозе карбофоса 0,5 DL₅₀ вероятно, превышает возможное антихолинэстеразное влияние ФОС на КОЕ и снижающее их миграцию действие кортикостероидов [Забродский П. Ф., 1993].

Таблица 7.1. Влияние острого отравления карбофосом на число колониеобразующих единиц в селезенке мышей через 8 сут после интоксикации (M±m)

Доза, DL ₅₀	КОЕс
Контроль	7,8±2,3
0,05	8,7±2,1
0,2	10,3±2,6
0,5	15,3±2,5*
0,8	11,1±3,2

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 10 мышей; * - различие с контролем достоверно - p<0,05.

Таким образом, под влиянием острой интоксикации ФОС в дозах 0,05; 0,2 и 0,5 DL₅₀ происходит дозозависимое увеличение числа КОЕс. В дозе 0,8 DL₅₀ миграция КОЕс в селезенку снижается.

7.3. Перераспределение лимфоцитов между органами системы иммунитета и циркулирующей кровью

Под влиянием карбофоса в дозах 0,5 и 0,8 DL₅₀ происходит дозозависимое уменьшение содержания лимфоцитов в тимусе через 1 сут после интоксикации соответственно в 1,33 и 1,44 (p<0,05) раза (табл. 7.2.).

Таблица 7.2. Влияние острого отравления ФОС на число лимфоцитов в органах системы иммунитета у крыс через 1 сут (M±m, n=6-10)

Доза, DL ₅₀	Органы системы иммунитета			
	Тимус±, 10 ⁹	Селезенка, 10 ⁸	Костный мозг, 10 ⁶	Лимфоузлы, 10 ⁸
Контроль	1,25±0,12	3,38±0,29	36,45±3,12	0,11±0,02
0,2	1,17±0,10	3,01±0,22	38,98±3,10	0,14±0,02
0,5	0,94±0,09*	2,57±0,21*	39,49±3,05	0,19±0,02*
0,8	0,87±0,08*	2,23±0,23*	40,56±3,19	0,23±0,03*

Примечание: в каждой серии использовалось от 6 до 10 крыс; * - различие с контролем достоверно - p<0,05.

При дозе 0,2 DL₅₀ ФОС отмечалась тенденция к повышению показателя. Аналогично изменяется содержание лимфоцитов в селезенке. В костном мозге число лимфоцитов через 1 сут незначительно увеличивается.

В лимфоузлах ФОС вызывал дозозависимое повышение содержания лимфоцитов, статистически значимое ($p<0,05$) при дозах, составляющих 0,5 и 0,8 DL_{50} .

В крови через 6 ч и 1 и 3 сут при дозе карбофоса 0,8 DL_{50} происходило повышение содержания лейкоцитов ($p<0,05$), через 4 сут – снижение. Через 6 сут статистически значимого отличия содержания лейкоцитов в крови от контрольного уровня не отмечалось (табл. 7.3). Относительное содержание лимфоцитов повышалось до 3 сут ($p<0,05$). К 4 сут значимые отличия показателя по сравнению с контролем отсутствовали. Абсолютное содержание лимфоцитов в крови увеличивалось до 3 сут ($p<0,05$) и восстанавливалось до контрольного значения через 4 сут.

Таким образом, под влиянием острой интоксикации карбофосом через 1 сут уменьшается содержание лимфоцитов в тимусе и селезенке и увеличивается в крови, костном мозге и лимфатических узлах вследствие изменения механизмов регуляции миграции иммуноцитов.

Данные литературы свидетельствуют, что при ежедневном поступлении хлорофоса (5-100 мг/кг) в организм крыс с водой через 1 месяц увеличивалось количество лимфоцитов в периферической крови, затем содержание этих клеток в тимусе и селезенке уменьшалось пропорционально суточной дозе яда [Иванов В.В., 1986].

Активация м-холинорецепторов ацетилхолином [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979], концентрация которого после действия ФОС в синапсах и циркулирующей крови повышается, оказывает существенное влияние на процессы, связанные с перераспределением лимфоцитов в органах иммунной системы.

Таблица 7.3. Влияние острого отравления карбофосом (0,8 DL_{50}) на число лейкоцитов и относительное и абсолютное содержание лимфоцитов в циркулирующей крови у крыс, $10^9/л$ ($M\pm m$; $n=10-13$)

Время после отравления, сут	Лейкоциты		Лимфоциты			
			Относительное содержание, %		Абсолютное содержание, $10^9/л$	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
6 ч	11,7±0,2	13,9±0,4*	63,5±1,5	68,9±1,7*	7,4±0,2	9,6±0,3*
1		14,5±1,5*		69,4±1,6*		10,1±0,4*
3		14,7±0,3		70,8±1,3*		10,4±0,5*
4		11,0±1,2		67,7±2,2		7,5±0,9
6		14,1±1,5		58,8±2,8		8,3±0,7

Примечание: * - различие с контролем достоверно - $p<0,05$.

При рассмотрении перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета и циркулирующей кровью под влиянием ФОС следует учитывать, что дифференцировка и созревание Т-лимфоцитов регулируется имеющимися на эпителиальных клетках тимуса никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами [Tomimasa K. et al., 1989], а также (как уже указывалось) наличием м- и н-холинорецепторов на лимфоцитах [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Masini et al., 1985; Rossi A. et al., 1989].

Кроме того, полученные нами результаты исследований, а также существующие в настоящее время данные литературы позволяют высказать предположение, что возможные механизмы, определяющие перераспределение лимфоцитов между органами иммунной системы после интоксикации ФОС связаны с действием ацетилхолина на н-холинорецепторы надпочечников и симпатических ганглиев, активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), что приводит к увеличению концентрации в крови адреналина и норадреналина [Дорошевич А.Л., 1971; Денисенко П.П., 1980] и кортикостероидов [Гурин В.Н., 1970; Горизонтов П. Д., 1981а, 1981б; Забродский П.Ф., 2007].

Таким образом, выход Т-лимфоцитов из тимуса при интоксикации ФОС связан со стимуляцией м-холинорецепторов тимоцитов [Maslinski W., et al., 1983, 1987] и эффектом кортикостероидов [Горизонтов П. Д., 1981б]. Лимфоциты мигрируют из селезенки вследствие действия преимущественно норадреналина на α -адренореактивные этого органа (вероятно, и на рецепторы лимфоцитов) [Горизонтов П. Д., 1981б]. Увеличение лимфоцитов в костном мозге обусловлено активацией β -адренорецепторов данного органа [Горизонтов П. Д., 1981б].

Полученные нами результаты исследований, а также существующие в настоящее время данные литературы позволяют высказать предположение, что возможные механизмы, определяющие перераспределение лимфоцитов между органами иммунной системы после интоксикации ФОС связаны с действием ацетилхолина на н-холинорецепторы надпочечников и симпатических ганглиев, активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС), что приводит к увеличению концентрации в крови адреналина и норадреналина [Дорошевич А.Л., 1971; Денисенко П.П., 1980; Забродский П.Ф., и соавт., 2005] и кортикостероидов [Гурин В.Н., 1970; Горизонтов П. Д., 1981а, 1981б; Забродский П.Ф. и соавт., 2005].

Выход Т-лимфоцитов из тимуса при интоксикации ФОС связан со стимуляцией м-холинорецепторов тимоцитов [Maslinski W., et al., 1983, 1987] и эффектом кортикостероидов [Горизонтов П. Д., 1981б]. Лимфоциты мигрируют из селезенки вследствие действия преимущественно норадреналина на α -адренореактивные этого органа (вероятно, и на рецепторы лимфоцитов) [Горизонтов П. Д., 1981б]. Увеличение лимфоцитов в костном мозге обусловлено активацией β -адренорецепторов данного органа [Горизонтов П. Д., 1981б].

ФОС, вызывая увеличение концентрации ацетилхолина в лимфоидных органах, способны повышать подвижность В-лимфоцитов [Адо А.Д. и соавт., 1983]. При действии ДДВФ происходило прямо связанное с ней уменьшение Т-клеток в тимусе. Таким же образом действовали стрессорный фактор, гидрокортизон и ацетилхолин [Забродский П.Ф., 1993].

Инволюция тимуса при действии ФОС связана преимущественно с выходом тимоцитов из органа под влиянием кортикостероидов (неспецифический механизм) [Pruett S., 2008] и активацией м-холинорецепторов тимоцитов ацетилхолином - специфический эффект [Maslinski W. et al., 1989], и в меньшей степени - с цитотоксическим действием гормонов коры надпочечников [Heideman M., Bentgson A., 1985; Bide R.W. et al., 2005; Sharp D., 2006].

При изучении нами влияния острой интоксикации хлорофосом на показатели отдельных звеньев иммуногенеза установлено увеличение миграции стволовых клеток, В-лимфоцитов из костного мозга, Т-лимфоцитов из тимуса, уменьшение лимфоидных индексов тимуса и селезенки, числа ядродержащих клеток в них, угнетение антителообразования. Максимальное уменьшение масс тимуса и селезенки, числа клеток в них отмечалось через 1, 3 суток после интоксикации. Через 7 суток значения данных показателей не отличались от контрольных. Увеличение миграции клеток отражает активацию отдельных звеньев индуктивной фазы иммуногенеза, а угнетение антителообразования является проявлением иммуносупрессивного эффекта.

У рабочих хроническое воздействие фосфорорганических инсектицидов приводит к ингибированию Т-клеточного эффекта на митогенную стимуляцию фитогемагглютинином и уменьшение содержания Е-РОК в крови [Золотникова Г.П., 1980; Кащенко Л.А., и соавт., 1981].

В многомерных исследованиях в различных странах (Нидерландах, Италии, Финляндии и Болгарии), в которых участвовало 248 рабочих, подвергавшихся действию различных пестицидов (в том числе, и ФОС) выявлены зависимости между профессиональной экспозицией к пестицидам и астматическими признаками (неприятные ощущения за грудиной, приступы астмы, хрипы и др.) Экспозицию оценивали по наличию в моче (концентрации) метаболитов пестицидов [Boers D. et al., 2008].

Лимфопролиферативные заболевания у людей, подвергшихся воздействию ФОС встречаются значительно чаще, вероятно, вследствие ингибирования эстераз моноцитов, Т-лимфоцитов и естественных киллеров [Newcombe D.S., 1991].

Существуют основания считать, что воздействие ФОС может приводить к повреждению структуры ДНК лимфоцитов [Москалева Е.Ю. и соавт., 1993; Sunil K. K.V., 1993].

Исследования на беспозвоночных, рыбах и млекопитающих, что иммунотоксичность ФОС прямо связана с ингибированием гидролитических

ферментов серина (альфа-амино-бета-оксипропионовой кислоты) или эстераз в различных элементах иммунной системы, с прооксидантными эффектами в органах иммунной системы, а также модуляцией сигналов, управляющих иммунными функциями. Косвенные эффекты включают влияние нервной системы и нарушения метаболизма в иммунных органах [Galloway T., Handy R., 2003].

При оценке влияния пестицидов в низких дозах на пролиферацию стимулированных митогеном лимфоцитов цыплят *in vitro* и выявлено нарушение фагоцитоза, индукция апоптоза, уплотнение хроматина в иммуногенных клетках. Данная методика предлагается в качестве альтернативной для оценки иммунотоксичности пестицидов, в частности ФОС [Kote P. et al., 2006].

Представляют интерес данные в отношении иммунотоксичности пропанила, которые во многом схожи с действием ФОС. Пропанил в моделях *in vivo* и *in vitro* моделях. воздействует на иммунную систему на органном, клеточном и молекулярном уровнях, вызывая атрофию тимуса, спленомегалию, уменьшение развития Т-клеток в тимусе и В-клеток в костном мозге, редукцию активности естественных клеток-киллеров и макрофагов, а также продукцию ими воспалительных цитокинов. Пропанил также воздействует на дыхательный взрыв макрофагов, ингибируя образование реактивного кислорода и оксида азота. Молекулярные механизмы, ответственные за данные эффекты, вероятно, связаны с альтерацией фактора (NF)-κB в ядре клетки, снижением транскрипции и внутриклеточной активности Ca^{++} . Действие пропанила нарушает множество функций зрелых Т- и В- лимфоцитов, снижая синтез цитокинов Т-клетками и иммунные реакции (адаптивный иммунитет). Степень супрессии гуморального иммунного ответа на модельные антигены и неповрежденные бактерии изменяется в зависимости от экспозиции токсиканта. Авторы отмечают, что влияние на доиммунные механизмы защиты организма и систему иммунитета (неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции и вакцинации) под влиянием пропанила только начинают изучаться [Salazar K.D. et al., 2008].

7.4. Действие ФОС на гуморальные и клеточные иммунные реакции

Интенсивные исследования влияния фосфорорганических соединений на гуморальный иммунный ответ началось в 60-е годы, в период получения Ф.Бернетом и П.Медаваром Нобелевской премии (в 1960 году) за исследования по искусственной индукции иммунологической толерантности и открытия Р. Porter (1962) схемы строения иммуноглобулинов [Забродский П.Ф., 1998; Хаитов Р.М. и соавт., 2000; Descotes J., 1986]. Внимание исследователей в основном было сосредоточено на эффектах, обусловленных хроническим воздействием

ФОП [Феерман И.С. и соавт., 1964; Штенберг А.И., Джунусова Р.М., 1968; Фридман Г.И., 1970].

Действие ФОС на клеточные иммунные реакции началось на несколько лет позже изучения действия антихолинэстеразных ядов на антителообразование и в дальнейшем происходило, как правило, с одновременной оценкой гуморальных иммунных реакций. В этот период исследования с использованием довольно простых моделей и методик (рассматривая их с современных позиций) были сосредоточены в основном на эффектах, обусловленных хроническим воздействием фосфорорганических инсектицидов. Было установлено, что фосфорорганические вещества вызывают снижение продукции синтеза антител (иммуноглобулинов). При последующем изучении гуморального иммунного ответа после хронического воздействия метилмеркаптофоса, хлорофоса, циклофоса и других ФОС эти результаты были в целом подтверждены с помощью различных методов исследования гуморальной иммунной реакции [Николаев А.И. и др., 1972; Диноева С.К., 1974; Жминько П.Г., 1986, 1989; Присяжнюк Т.Н. и соавт., 1986; Забродский П.Ф. и соавт., 2005, 2007; Desi I., Varga L., 1983].

Данные литературы свидетельствуют, что при остром действии на животных паратион в дозе 22,3 мг/кг (1,0 DL₅₀) при интоксикации через 2 суток после иммунизации эритроцитами барана (продуктивная фаза иммунного ответа) приводил к снижению антителообразующих клеток в селезенке мышей в 3,4 раза.

На индуктивную фазу иммунного ответа при введении ФОС одновременно с иммунизацией паратион существенного влияния не оказывал [Wietrowt R.W. et al., 1978]. Аналогичные результаты получены при острой интоксикации паратионом, малатионом, дихлофосом, метамидофосом и другими фосфорорганическими пестицидами [Rodgers K.E. et al., 1986a; Thomas I.K., Imamura T. 1986].

Паратион в дозе 16 мг/кг, вызывающей выраженную холинергическую стимуляцию и гибель 20% мышей, на 65% снижал число клеток в селезенке, синтезирующих Ig M. При применении его через 2 суток после иммунизации (оценка иммунного ответа проводилась на 4-е сутки после иммунизации) доза 4 мг/кг, не вызывающая симптомов интоксикации, не подавляла иммунную реакцию [Casale G.P. et al., 1984].

Показано значительное угнетение антителообразования фозалоном [Алимова М. Т. и соавт., 1991]. Снижение гуморальной иммунной реакции под влиянием ФОС сопровождалась снижением лимфоидных индексов тимуса и селезенки, уменьшением активности холинэстеразы в плазме крови и мозге, увеличением концентрации кортизола и глюкозы в крови, активности трансаминазы в печени [Tiefenbach B., Lange P., 1980; Casale G.P. et al., 1983; Tiefenbach B., Wichner S., 1985].

Установлена обратная корреляция между активностью холинэстеразы в плазме крови и мозге и угнетением антителообразования [Tiefenbach B. et al., 1983]. Восстановление содержания лимфоцитов в тимусе и селезенке

при интоксикации диметоатом происходило через 72 часа. Атропин в дозе 75 мг/кг не оказывал защитного действия на синтез антител [Tiefenbach B., Lange P., 1980].

Снижение синтеза антител в описанных экспериментах отмечалось не только при дозах, вызывающих выраженную холинергическую стимуляцию [Casale G.P. et al., 1983; 1984], но и при воздействии относительно небольшой дозы ФОС (метомидофоса), составляющей 0,1 ЛД₅₀. При дальнейшем уменьшении дозы метомидофоса до 0,05 DL₅₀ проявлялось стимулирующее влияние ФОС на гуморальный иммунный ответ [Tiefenbach B., Wichner S., 1985].

Действие ФОС на синтез и IgG зависит от соотношения сроков интоксикации и иммунизации. Продукция IgM снижается при введении ФОС через 2 суток после антигенной стимуляции. При этом через 8 суток отмечается тенденция к увеличению синтеза IgG. Однако, если вызвать интоксикацию через 6 суток после иммунизации, то количество клеток в селезенке, синтезирующих антитела этого класса, снижается в 2 раза [Casale G.P. et al., 1983; 1984].

Предполагают, что супрессия иммунного ответа связана с увеличением содержания в крови под влиянием ФОС кортикостероидов, так как применение преднизолона в дозе 100 мг/кг вызывает аналогичный эффект, а адреналэктомия иммунотоксическое действие антихолинэстеразных ядов устраняет [Tiefenbach B. et al., 1983; Tiefenbach B., Wichner S., 1985]. В экспериментах на крысах Вистар было установлено, что введение внутрь форматиона в дозе 1/100 DL₅₀ (3,5 мг/кг) в течение 2 мес. вызывает повышение кортикостерона в крови, коррелирующее со снижением гуморального иммунитета [Хусинов А.А. и соавт., 1991]. В опытах *in vitro* показано, что индуцированная антииммуноглобулинами подвижность В-лимфоцитов, существенно подавляется под влиянием диизопропилфторфосфата [Becker E.L., Unanue E.R., 1976].

Эти эксперименты не позволяют признать роль глюкокортикоидов в супрессии функции В-клеток под влиянием ФОС основной.

При хроническом воздействии в ежедневных дозах от 0,025 до 0,100 DL₅₀ ДДВФ снижал функцию В-звена иммунитета у кроликов на брюшнотифозную вакцину [Desi I. et al., 1970]. Аналогичный эффект оказывал паратион, который в дозе 0,1 ЛД₅₀ при ежедневном пероральном поступлении в течение 8 суток уменьшал содержание антителообразующих клеток в селезенке у мышей на 35% [Wietrowt R.W. et al., 1978]. Отмечали угнетение гуморальной иммунной реакции при пятикратном введении мышам карбофоса в дозах от 0,05 до 0,01 DL₅₀ [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1990].

Дихлофос при хроническом действии в ежедневных дозах, составляющих 1/40, 1/20, 1/10 DL₅₀, приводил к снижению гуморальной иммунной реакции у кроликов на брюшнотифозную вакцину [Desi I. et al., 1970]. Такое же действие оказывал паратион, который в дозе 2,2 мг/кг (0,1 DL₅₀) при ежедневном пероральном поступлении в течение 8

суток уменьшал содержание антителообразующих клеток в селезенке у мышей на 35% [Wietrowt R.W. et al., 1978]. Наблюдался угнетение В-клеточного звена иммунитета в дозах 1/20, 1/50, 1/100 DL_{50} при пятикратном введении мышам карбофоса [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1990].

Не отмечено изменения концентрации иммуноглобулинов в крови рабочих, связанных с использованием ФОС [Desi I. et al., 1986]. Установлено казалось бы парадоксальное явление: хлорофос при хроническом отравлении течение 100 дней (0,05 DL_{50}) приводил к увеличению антителопродукции к брюшнотифозному О- и Vi-антигену [Шафеев М.Ш., 1976]. Аналогичный феномен был установлен при действии ФОС в отношении IgM и IgG. При этом в сыворотке крови снижалось только содержание IgA [Kossman S. et al., 1985]. Доза метомидофоса, составляющая 0,05 DL_{50} , оказывала активирующее влияние на гуморальную иммунную реакцию [Tiefenbach B., Wichner S., 1985]. Следует отметить, что при хронической интоксикации ФОС метилпиримифосом в течение 28 сут в дозе 120 мг/кг/сутки отмечалось увеличение в целом продукции интерлейкинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 с изменением соотношения между ними, увеличением функции Th2-клеток и реализации хронического воспаления [Kim H.S., 2007].

ФОС в некоторых случаях могут не влиять на антителообразование. Например, при действии лептофоса при концентрациях в пище от 10 до 500 ppm, отмечалось уменьшение активности холинэстеразы сыворотки крови в 1,5-8,8 раз через 12 недель, но при этом не было отмечено существенного влияния этого ФОС на количество антителообразующих клеток селезенки при первичном и вторичном гуморальном иммунном ответе [Koller L.D. et al., 1976]. Не отмечено изменения концентрации иммуноглобулинов в крови рабочих, связанных с использованием ФОС [Desi I. et al., 1986]. Аналогичные данные получены Fernandez-Cabezudo M.J. et al. [2008].

Установлено казалось бы парадоксальное явление: хлорофос при хроническом отравлении течение 100 дней (0,05 DL_{50}) приводил к увеличению антителопродукции к брюшнотифозному О- и Vi-антигену [Шафеев М.Ш., 1976]. Аналогичный феномен был установлен при действии ФОС в отношении IgM и IgG. При этом в сыворотке крови снижалось только содержание IgA [Kossman S. et al., 1985]. Доза метомидофоса, составляющая 0,05 DL_{50} , оказывала активирующее влияние на гуморальную иммунную реакцию [Tiefenbach B., Wichner S., 1985].

Следует отметить, что при хронической интоксикации ФОС метилпиримифосом в течение 28 сут в дозе 120 мг/кг/сутки отмечалось увеличение в целом продукции интерлейкинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 с изменением соотношения между ними, увеличением функции Th2-клеток и реализации хронического воспаления [Kim H.S., 2007].

В экспериментах показано [Забодский П.Ф. и соавт., 2007], что число антителообразующих клеток (АОК) в селезенке к ЭБ у крыс Вистар (при введении яда одновременно с ЭБ) через 5 сут после острой интоксикации карбофосом в дозе 0,05 DL_{50} (табл. 7.4) увеличивалось в 1,36 раза

($p < 0,05$), что свидетельствует о супрессии синтеза на синтез IgM В-клетками (плазмоцитами).

Таблица 7.4. Влияние острого отравления карбофосом на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана, синтезирующим IgM, в селезенке крыс Вистар через 5 сут, 10^3 ($M \pm m$, $n=8$)

Доза, DL ₅₀	Время интоксикации по отношению к иммунизации, сут		
	0	1	3
Контроль	33,5 $\pm$ 3,2		
0,05	45,6 $\pm$ 3,1*	46,7 $\pm$ 3,2*	35,9 $\pm$ 3,3
0,2	27,8 $\pm$ 3,4	25,1 $\pm$ 2,6	20,1 $\pm$ 2,2*
0,5	23,1 $\pm$ 2,2*	20,0 $\pm$ 2,1*	16,0 $\pm$ 2,5*
0,8	20,2 $\pm$ 2,9*	17,1 $\pm$ 2,7*	14,1 $\pm$ 2,8*

Примечание: * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Дозы ФОС, составляющие 0,5 и 0,8 ЛД₅₀, вызывали противоположные сдвиги, снижая АОК соответственно в 1,57 и 1,66 раза ($p < 0,05$). В интервале доз 0,2-0,8 DL₅₀ супрессия показателя была прямо связана с дозой карбофоса. Аналогичные изменения числа АОК к ЭБ были обнаружены при введении карбофоса через 1 и 3 сут после иммунизации.

Доза карбофоса, составляющая 0,05 DL₅₀, при его введении через 3 сут после иммунизации не влияла на содержание АОК в селезенке. В продуктивную фазу гуморальной иммунной реакции (введение карбофоса в дозах 0,2; 0,5 и 0,8 DL₅₀ через 3 сут после ЭБ), по сравнению с индуктивной (введение ФОС одновременно с ЭБ или через 1 сут) снижение антителопродукции было более выражено. Так, в продуктивную фазу антителогенеза число АОК в селезенке при дозах ФОС, составляющих 0,2; 0,5 и 0,8 DL₅₀, снижалось соответственно в 1,67; 2,09 и 2,37 раза ($p < 0,05$). Таким образом, под влиянием острой интоксикации карбофосом (0,2; 0,5 и 0,8 DL₅₀) происходит дозозависимое снижение тимусзависимого антителообразования, оцениваемого по числу АОК к ЭБ в селезенке, преимущественно в продуктивную фазу антителогенеза. При дозе карбофоса 0,05 DL₅₀ антителопродукция увеличивается при действии ФОС в индуктивную фазу иммуногенеза. Это свидетельствует о возможной стимуляции малыми дозами ФОС при его остром воздействии Th1-лимфоцитов [Pfeifer C. et al., 1991] и снижении их функции сублетальными дозами. Известно, что Th1-лимфоциты участвуют в синтезе Ig M, G₂ (и формировании ГЗТ), а Th2-лимфоциты способствуют синтезу Ig G₁, A, E [Pfeifer C. et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993].

При острой интоксикации ФОС в индуктивной фазе иммуногенеза установлено (табл. 7.5), что под влиянием карбофоса через 8 сут при дозе 0,05 DL₅₀ происходит увеличение синтеза IgG, оцениваемого по числу АОК, синтезирующих иммуноглобулины данного класса в 1,42 раза. Дозы

карбофоса, составляющие 0,5 и 0,8 ЛД₅₀, снижали исследованный показатель ($p < 0,05$).

Таблица 7.5. Влияние острого и подострого отравления карбофосом на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана, синтезирующим IgG, в селезенке крыс Вистар через 8 сут ($M \pm m$, $n=8$)

Доза, DL ₅₀	АОК, $\times 10^3$
Контроль	18,1 $\pm$ 2,1
0,05	25,8 $\pm$ 2,3*
0,2	15,2 $\pm$ 2,5
0,5	10,5 $\pm$ 1,9*
0,8	9,7 $\pm$ 1,8*

Примечание: * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Увеличение синтеза IgG при действии минимальной дозы карбофоса вследствие активации его продукции плазмócитами селезенки, вероятно, связано с действием ацетилхолина [Абрамов В.В. и соавт., 1986; Адо А.Д. и соавт., 1983; Забродский П.Ф., 2001, 2007]. Вероятно, малые дозы ФОС не только активируют вследствие действия ацетилхолина на Т-хелперы типа 1 (Th1), увеличение синтеза IgM, но и за счет активации Th2-лимфоцитов, повышают продукцию IgG [Pfeifer C. Et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993]. Полученные данные свидетельствуют о том, что сублетальные дозы карбофоса (0,2-0,8 DL₅₀) при однократном воздействии в индуктивной фазе иммуногенеза существенно снижают функцию Th2-лимфоцитов.

При оценке содержания АОК к Vi-Ag в селезенке у крыс Вистар после острой интоксикации карбофосом через 5 суток было установлено (табл. 7.6), что карбофос при дозе, составляющей 0,05 DL₅₀, увеличивает данный показатель в 1,41 раза ($p < 0,05$). Дозы ФОС, составляющие 0,2; 0,5 и 0,8 DL₅₀, вызывали противоположные сдвиги, вызывая снижение АОК к Vi-Ag соответственно в 1,11, 1,33 ($p > 0,05$) и 1,40 раза ($p < 0,05$).

Таблица 7.6. Влияние острого отравления карбофосом на число антителообразующих клеток к Vi-Ag, синтезирующим Ig M, в селезенке белых крыс через 5 сут ($M \pm m$, $n=8-10$)

Доза, DL ₅₀	АОК, $\times 10^3$
Контроль	27,2 $\pm$ 3,0
0,05	38,4 $\pm$ 3,3*
0,2	24,5 $\pm$ 2,2
0,5	19,0 $\pm$ 2,5*
0,8	17,5 $\pm$ 2,1*

Примечание: * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Таким образом, острая интоксикация карбофосом в дозе 0,05 DL₅₀ вызывала увеличение синтеза IgM АОК селезенки к тимуснезависимому антигену, а в сублетальной дозе (0,8 DL₅₀) существенно снижала его.

Преимущественное нарушение Т-зависимой антителопродукции под влиянием карбофоса обусловлено, наряду с другими механизмами, действием ФОС одновременно на макрофаги, В-лимфоциты и Т-клетки (в использованной нами экспериментальной модели на субпопуляцию Th1), участвующие в реализации данной иммунной реакции, в то время как тимуснезависимый иммунный ответ обеспечивается в основном функцией В-клеток, активируемых антигеном в присутствии ИЛ-1, секретируемом макрофагами [Gillbert K. M. et al., 1985]. Вполне естественно, что иммунотоксическое действие на три элемента, взаимодействующих в процессе антителообразования, проявляется значительно большим его угнетением, чем при поражении одного или двух элементов, если нет оснований предполагать реализации селективного иммунотропного эффекта. При наличии этого эффекта в отношении Т-клеток, а ФОС таким действием обладают, ингибируя эстеразы Т-хелперов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. , 1983; Забродский П.Ф., 1993; Fergula J. et al., 1972], их поражение будет еще более выраженным.

Известно, что многие иммуносупрессивные эффекты малатиона усиливаются при хранении этого ФОС в условиях повышенной температуры [Devens B.H. et al., 1985; Thomas I.K., Imamura T., 1986b]. Острая интоксикация малатионом в дозе 0,5 DL₅₀ через 5 суток приводила к увеличению антителообразующих клеток в селезенке после иммунизации эритроцитами барана [Rodgers K.E. et al., 1986b]. Отмечалось увеличение пролиферации лимфоцитов в ответ на их стимуляцию липополисахаридом и конканавалином А. При этом количество лимфоцитов в тимусе и селезенке не изменялось. Отсутствие супрессии гуморального иммунного ответа, вероятно, можно объяснить тем обстоятельством, что при применении малатиона в дозе 0,5 DL₅₀ не отмечалось признаков интоксикации и изменения холинэстеразной активности плазмы. Повышение активности В-системы иммунитета может быть связано с повышением продукции иммуностимулирующих интерлейкинов. Патогенез данного эффекта пока не выяснен. В то же время, установлено снижение функции лейкоцитов и макрофагов под влиянием острой интоксикации карбофосом [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1988; Пирцхалава А.В., 1989]. Неочищенный малатион в опытах *in vitro* тормозил иммунный ответ на тимусзависимый и тимуснезависимый антигены, подавлял способность макрофагов представлять антиген [Thomas I.K., Imamura T., 1986a, 1986b].

Следует отметить, иммуностимулирующий (или иммуносупрессирующий) эффект ацетилхолина при острой интоксикации ФОС, вероятно, зависит от его концентрации в крови, лимфоидных органах и в области холинорецепторов иммунокомпетентных клеток, а также от изучаемого параметра системы иммунитета [Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Возможно, существует не известная

до сих пор функция ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, регулирующая их активность не только путем гидролиза избытка ацетилхолина [Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006].

Получены результаты, демонстрирующие влияние пола и возраста и пренатального супрессирующего воздействия токсиканта на иммунную систему взрослых мышей [Rowe A.M., 2008].

Сенсибилизация антигеном морских свинок увеличивает уязвимость к индуцированной О,О-диэтил-О-паранитрофенилтиофосфатом (паратионом) повышенной реактивности дыхательных путей и изменениям одного из механизмов, связанного с реализацией астматического синдрома (зависимого от ИЛ-5). Поскольку сенсибилизация к аллергенам характерна из 50 % общей совокупности популяции и 80 % астматиков (включая детей), эти результаты свидетельствуют о высоком риске возникновения астмы при действии ФОС [Proskolil B.J. et al., 2008].

Малатион *in vitro* (лимфоциты мышей) при концентрациях 75 мкг/мл и выше существенно снижает образование зрелых форм цитотоксических Т-лимфоцитов под влиянием клеток аллогенной опухоли Р815. Аналогичный эффект при меньших дозах вызывали этилпаратион, метилпаратион, фенитротрион и фентиол. подавляют генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов в дозе 5 -10 мкг/мл [Rodgers K.E. et al., 1986]. Преинкубация ФОС с постмитохондриальным супернатантом печени крыс, приводящая к их биотрансформации, значительно ослабляет этот эффект. Карбофуран существенно не влиял на активность цитотоксических Т-клеток, а карбанил подавлял ее в дозе 50-100 мкг/мл.

Длительное введение малатиона (0,1 DL₅₀) в течение двух недель вызывало у мышей уменьшение количества Т-клеток в тимусе. Острая интоксикация малатионом (0,5 ЛД₅₀) вызывала увеличение пролиферации Т-лимфоцитов при их стимуляции конканавалином А [Devens B.H. et al., 1985]. Отмечается супрессия выработки Т-ростковых факторов у мышей под влиянием ФОС [Арипова Т. У. и соавт., 1991].

Существуют данные, позволяющие предполагать, что в реализации механизма ФОС, ингибирующего цитотоксичность Т-лимфоцитов, существенное значение имеет связанная с эстеразной активностью проницаемость мембраны клетки-эффектора для ионов кальция и магния. В свою очередь электролитный обмен этой клетки сопряжен с внутриклеточным содержанием циклических нуклеотидов. Показано, что диизопропилфторфосфат уменьшает антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) при концентрациях от 0,5 до 4 мМ на 5-80% вследствие нарушения электролитного обмена клетки и изменения соотношения цАМФ/цГМФ и других механизмов [Trinchievi G., M. de Marchi, 1976; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

При изучении иммунотоксических свойств нескольких наиболее часто используемых в сельском хозяйстве пестицидов, в том числе и фосфорорганического инсектицида - метилпаратиона, отмечалось

существенное уменьшение реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на туберкулин у кроликов после получения ими пестицидов в различных дозах в течение 10 и 24 суток. Супрессия реакции ГЗТ прямо зависела от дозы и времени интоксикации. Например, метилпаратион в дозах от 0,04 до 1,50 мг/кг, получаемых ежедневно, через 24 дня уменьшал реакцию на повторные введения туберкулина от 1,2 до 2,8 раз. На 10-е сутки после ежедневного получения пестицидов дозозависимый эффект для метилпаратиона и большинства исследованных пестицидов отсутствовал [Street J.C., Sharma R.P., 1975]. Курение и потребление алкоголя потенцируют вызываемые метилпаратионом повреждения лимфоцитов [Sunil K. K.B, 1993].

Реакцию ГЗТ в дозе 1/100 DL₅₀ (13,5 мг/кг) при пероральном поступлении в течение двух месяцев у крыс Вистар снижал форматион, причем это было связано с увеличением содержания в крови кортикостерона [Хусинов А.А. и соавт., 1991]. Связь синтеза антител с концентрацией в циркулирующей крови этого глюкокортикоида после интоксикации ДДВФ в последующем была подтверждена [Забродский П.Ф., 1993].

При изучении влияния острого отравления заринном и VX на гуморальные и клеточные иммунные реакции крыс нами установлено, что данные ФОВ существенно снижают исследованные показатели системы иммунитета (табл. 7.8).

Так, под влиянием острого отравления ФОВ происходила супрессия антителообразования, причем отмечалась более выраженное снижение Т-зависимого гуморального иммунного ответа (на ЭБ) по сравнению с Т-независимой гуморальной иммунной реакцией (на Vi-Ag). Острое воздействие ФОВ в дозе, составляющей 0,5 DL₅₀, вызывало уменьшение функции ЕКК, снижало АЗКЦ и реакцию ГЗТ. В целом, величина редукции исследованных показателей системы иммунитета при действии VX превышала эффект зарина при действии данных ФОВ в эквивалентных дозах.

Таблица 7.8. Влияние острого отравления антихолинэстеразных ТХ (0,5 DL₅₀) на гуморальные и клеточные иммунные реакции крыс (M±m, n=9-11)

ФОВ	АОК к ЭБ, 10 ³	АОК к Vi-Ag, 10 ³	ЕЦ, %	АЗКЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	39,4±3,5	28,3±2,4	31,3±3,5	15,1±1,9	30,0 ± 2,7
Зарин	25,1±2,3*	22,5±1,9	14,0±2,2*	9,5±1,3*	19,7±1,8*
VX	21,2±2,5*	21,8±2,3	12,1±2,0*	8,3±1,4*	20,2±2,0*

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

Снижение преимущественно Т-зависимого антителообразования, редукция активности ЕКК и АЗКЦ обусловлены при отравлении ФОС иммуносупрессивным действием и реализацией механизмов апоптоза

иммуноцитов под влиянием КС [Забродский П. Ф., 1998, 2000; Ficek W., 1997] иммунотоксическим эффектом, вызванным инактивацией эстераз Т-лимфоцитов и, возможно, ЕКК и К-клеток [Забродский П. Ф., 1978; Хусинов А.А. и соавт., 1991; Newcombe D.S., 1991]. Супрессия Т-независимой антителопродукции может быть связана с действием кортикостероидов и на В-клетки [Забродский П. Ф., 1998].

Данные литературы свидетельствуют о том, что в некоторых случаях ФОВ могут не вызывать снижения антителообразования. Так, при действии лептофоса при концентрациях в пище от 10 до 500 ppm, отмечалось уменьшение активности холинэстеразы сыворотки крови в 1,5-8,8 раза через 12 недель, но при этом не было отмечено существенного влияния этого ФОВ на количество антителообразующих клеток селезенки при первичном и вторичном гуморальном иммунном ответе [Koller L.D. et al., 1976]. Не обнаружены сдвиги при исследовании содержания иммуноглобулинов у рабочих, обрабатывающих теплицы фосфорорганическими соединениями [Desi I. et al., 1986]. Хлорофос при хронической интоксикации в течение 100 дней в ежедневной дозе 1/20 DL₅₀ приводил даже к увеличению титра антител к брюшнотифозному О- и Vi-антигену [Шафеев М.Ш., 1976]. Такие же изменения под влиянием ФОС отмечались в отношении IgM и IgG. При этом в сыворотке крови уменьшалось только содержание IgA [Kossmann S. et al., 1985]. Доза метомидофоса, составляющая 0,05 DL₅₀, оказывала активирующее влияние на гуморальную иммунную реакцию [Tiefenbach B., Wichner S., 1985].

Нами проводились исследования (табл. 7.9) по оценке хронического действия ФОС в течение 30 и 60 сут на иммунные реакции, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов, а также на содержание в крови цитокинов (γ-интерферона - ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10) [Забродский П.Ф. и соавт., 2013].

Таблица 7.9. Влияние хронической интоксикации ФОВ (суммарные дозы 0,3 и 0,6 DL₅₀ соответственно через 30 и 60 сут) на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов у белых крыс (M±m, n = 9-12)

Серии опытов	Функция Th1-лимфоцитов				Функция Th2-лимфоцитов	
	АОК к ЭБ (IgM), 10 ³		ГЗТ, %		АОК к ЭБ (IgG), 10 ³	
	1	2	1	2	1	2
Контроль	45,3±4,0	42,0±4,1	39,1±3,6	37,5±3,5	55,0±5,3	57,2±5,5
Карбофос	26,1±2,3*	20,1±2,4*	24,0±2,2*	27,3±2,5*	39,0±3,2*	30,9±3,4*
Метафос	23,0±3,0*	19,8±3,1*	22,0±2,7*	25,6±2,2*	40,1±3,5*	35,0±3,5*

Примечание: 1 – 30 сут; 2 – 60 сут; * -p<0,05 по сравнению с контролем.

После отравления карбофосом и метафосом через 30 сут отмечалась также существенная редукция активности Th1-лимфоцитов, оцениваемая по

реакции ГЗТ, соответственно в 1,63 и 1,78 раза ($p < 0,05$). На 14 сут после иммунизации ЭБ отмечалась супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, после интоксикации карбофосом и метафосом, соответственно в 1,41 и 1,37 раза ($p < 0,05$).

Параметры, характеризующие клеточную и гуморальную иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии ФОВ в течение 30 сут в среднем снижались соответственно в 1,70 и 1,37 раза. Это свидетельствует о том, что под влиянием антихолинэстеразных ядов в большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов.

После хронического воздействия карбофоса и метафоса в течение 60 сут (табл. 7.9) отмечалась редукция гуморальной иммунной реакции к Т-зависимому антигену (функция Th1-лимфоцитов). Продукция IgM, через 4 сут после иммунизации по сравнению с контрольным уровнем снижалась соответственно в 2,09 и 2,12 раза ($p < 0,05$).

После интоксикации веществом карбофосом и метафосом через 60 сут отмечалась также существенная редукция активности Th1-лимфоцитов, оцениваемая по реакции ГЗТ, соответственно в 1,37 и 1,46 раза ($p < 0,05$). На 14 сут после иммунизации ЭБ отмечалась супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, после интоксикации карбофосом и метафосом, соответственно в 1,60 и 1,85 раза ($p < 0,05$).

Параметры, характеризующие функцию Th1- и Th2-лимфоцитов при действии ФОС в течение 60 сут в среднем снижались соответственно в 1,78 и 1,73 раза. Это свидетельствует о том, что под влиянием антихолинэстеразных ядов в течение 60 сут функция Th1- и Th2-лимфоцитов поражается в равной степени.

Следует отметить, что при оценке влияния ФОС на функцию Th1- и Th2-клеток, мы не принимали во внимание действие токсикантов на В-клетки (плазмоциты) при оценке числа АОК к ЭБ на 5 и 14 сут после иммунизации, так как это практически не повлияло бы на полученные нами данные о сравнительной активности двух типов Th-лимфоцитов.

Полученные данные в отношении большей редукции активности Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-лимфоцитами при интоксикации ФОС через 30 и 60 сут, подтверждается оценкой концентрации цитокинов в крови крыс (табл. 7.10). После хронической интоксикации карбофосом и метафосом (30 сут) выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ на 5 сут после иммунизации ЭБ в 1,89 и 1,81 раза ($p < 0,05$), а ИЛ-4 на 14 сут после иммунизации ЭБ - в 1,51 и 1,35 раза ($p < 0,05$) соответственно. Это свидетельствуют о том, что по сравнению с ИЛ-4 концентрация ИФН- γ в крови под влиянием ФОС при интоксикации в течение 30 сут снижается в большей степени.

Таблица 7.10. Влияние хронической интоксикации ФОС (суммарные дозы 0,3 и 0,6 DL₅₀ соответственно через 30 и 60 сут) на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл (M±m, n=8)

Серии опытов		ИФН-γ	ИЛ-4	ИФНγ/ИЛ-4
Контроль (30 сут)	1	1005±78	89±8	11,6±1,0
Контроль (60 сут)	2	1023±75	91±9	11,2±0,9
Карбофос	1	531±69*	59±5*	9,0±0,8
	2	512±65*	49±6*	10,4±1,1
Метафос	1	554±60*	66±5*	8,4±0,8*
	2	509±55*	44±5*	11,5±1,1

Примечание. 1 – 30 сут; 2 – 60 сут; * - $p<0,05$ по сравнению с контролем.

После хронической интоксикации карбофосом и метафосом через 60 сут установлено уменьшение концентрации ИФН-γ на 5 сут после иммунизации ЭБ в 2,00 и 2,01 раза ($p<0,05$), а ИЛ-4 на 14 сут после иммунизации ЭБ - в 1,86 и 2,07 раза ($p<0,05$) соответственно. Это свидетельствует о том, что концентрации ИФН-γ и ИЛ-4 в крови под влиянием ФОС снижаются в равной степени.

Уменьшение соотношения ИФН-γ/ИЛ-4 при действии ФОС в течение 30 сут подтверждает большее снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Так, установлено, что при действии карбофоса и метафоса соотношение ИФН-γ/ИЛ-4 было существенно ниже контрольного уровня равного в среднем $11,4\pm0,8$ и составляло в среднем $8,7\pm0,6$ ($p<0,05$). Приблизительно равное соотношения ИФН-γ/ИЛ-4 в контроле и при действии ФОС через 60 сут подтверждает одинаковое снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа и функции Th2-клеток [Ройт А., и соавт, 2000; Сухих Г.Т. и соавт. 2005].

Снижение функции преимущественно Th1-лимфоцитов при действии ФОС в течение 30 сут обусловлено способностью этих соединений активировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, увеличивая в крови концентрацию кортикостерона [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. При этом известно, что данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [Ройт А., и соавт, 2000]. Через 60 сут после интоксикации ФОС концентрация кортикостерона существенно снижалась по сравнению с контролем (стадия истощения в реализации общего адаптационного синдрома и снижение способности ФОС активировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Так, через 30 и 60 сут концентрация гормона в плазме крови после действия карбофоса составляла соответственно $39,1\pm3,7$ ($p<0,05$) и $11,5\pm1,6$ нг/мл ($p<0,05$; контроль – $17,8\pm1,8$ нг/мл; $n=7$).

Полученные данные позволяют полагать, что относительное уменьшение активности Th1-лимфоцитов по сравнению с функцией Th2-

клеток после отравления ФОС через 30 сут может приводить к увеличению вероятности вирусных инфекций (по сравнению с микробными) [Ройт А., и соавт, 2000]. При одинаковом снижении двух основных типов Th-лимфоцитов (действие ФОС в течение 60 сут) равновероятно развитие, как микробной (основная защитная роль выполняется Th2-лимфоцитами и связанными с ними клетками и иммуноглобулинами), так и вирусной инфекции (основная защитная роль наряду с другими Т-клетками и естественными клетками киллерами принадлежит Th1-лимфоцитам) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007,4].

При исследовании концентрации в плазме крови крыс цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10 (табл. 7.11) установлено уменьшение их содержания через 30 сут после хронического действия карбофоса соответственно в 1,39; 1,44 и 1,38 раза ($p<0,05$), а при действии метафоса – в 1,43; 1,47 и 1,37 раза ($p<0,05$).

Через 60 сут после хронического действия карбофоса концентрация в крови крыс цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 снижалась соответственно в 1,70 и 1,53 раза ($p<0,05$), а при действии метафоса – в 1,46 и 1,67 раза ($p<0,05$). Содержание в крови ИЛ-10 практически не снижалась.

Таблица 7.11. Влияние хронической интоксикации ФОС (суммарные дозы 0,3 и 0,6 DL₅₀ соответственно через 30 и 60 сут) на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ($M\pm m$, $n=7$)

Цитокины	Контроль (30 сут)	Контроль (60 сут)	Карбофос		Метафос	
			1	2	1	2
ИЛ-2	1352±105	1198±107	972±73*	705±80*	945±90*	820±90*
ИЛ-6	115±10	92±8	80±8*	60±5*	78±7*	55±6*
ИЛ-10	990±83	987±85	719±65*	851±86	721±69*	903±78

Примечание. 1 – 30 сут; 2 – 60 сут; * - $p<0,05$ по сравнению с контролем.

Уменьшение в плазме крови под влиянием ФОС ИЛ-2 (провоспалительного цитокина) свидетельствует о супрессии его продукции Т-лимфоцитами (как CD4⁺, относящимися к лимфоцитам Th0- и Th1-типа), так и некоторыми CD8⁺, редукции пролиферации Т- и В-клеток (синтеза J-цепи молекулы иммуноглобулина), снижении активности естественных клеток-киллеров. Уменьшение в крови ИЛ-6 (провоспалительного цитокина) характеризует редукцию его синтеза макрофагами и лимфоидными дендритными клетками вследствие их поражения ФОС [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Концентрация ИЛ-10 (антивоспалительного цитокина), продуцируемого Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками и снижающего секрецию ИФН-γ Th1-лимфоцитами [Kim H.S., 2007] уменьшалась при интоксикации ФОС в течение 30 сут. Снижение синтеза ИЛ-10 в меньшей степени, чем ИФН-γ, подтверждает установленный нами больший поражающий эффект ФОС в отношении Th1-

лимфоцитов. Относительно небольшая редукция ИЛ-10 через 30 сут и отсутствие ее через 60 сут, вероятно, связано со значительным снижением ФОС синтеза ИФН- γ . При этом не реализуется эффект ИЛ-10, продуцируемого Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками, который способен усилить супрессию функции Th1-лимфоцитов и синтез ими ИФН- γ в еще большей степени [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Таким образом, хроническое действие ФОС (30 сут, суммарная доза 0,3 DL₅₀) в большей степени снижает иммунные реакции и ИФН- γ , связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток действием ИЛ-4. Интоксикация ФОС (30 сут) уменьшает концентрацию в крови ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10. Действие ФОС в течение 60 сут (суммарная доза 0,6 DL₅₀) в равной степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов; вызывает редукцию концентрации в крови ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-2, ИЛ-6 и не влияет на содержание в крови ИЛ-10.

Неоднозначность изменений гуморальной иммунной реакции под влиянием хронической интоксикации ФОС у людей и животных может быть связана с особенностями иммунотоксичности этих соединений [Lee T.P. et al., 1979; Audre F. et al. 1983], исследованиями, проводящимися в различное время суток, когда концентрация в крови кортикостероидов существенно различалась [Иванова С.С., 1998; Dhabhar F. S. et al., 1996], и другими причинами [Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006] в частности, повышением внутриклеточного содержания цГМФ под влиянием ацетилхолина [Денисенко П.П., 1980; Абрамов В.В. и соавт., 1986; Калинкович А.Г., и соавт., 1988; Garoroy M.R. et al., 1975; MacManus J.P. et al, 1975]. Не исключены также ошибки в формировании контрольных групп, оценке эффектов различных доз яда, а также погрешности при определении этих доз, использованием различных видов животных, проведением иммунизации в различные сроки по отношению к интоксикации.

Можно предположить, что в малых дозах ФОВ, так же как и фармакологические средства, обладающие холиномиметическим действием, способны оказывать стимулирующее влияние на функцию В-лимфоцитов (плазмоцитов) и Т-хелперов в результате повышения внутриклеточного содержания цГМФ под влиянием ацетилхолина [Денисенко П.П., 1980; Абрамов В.В. и соавт., 1986; MacManus J.P. et al, 1975]. Основными конечными внутриклеточными регуляторами функции иммунных клеток, через которые реализуется действие нейромедиаторов и пептидных гормонов, являются цГМФ и цАМФ [Garoroy M.R. et al., 1975]. Они опосредуют также выделение и действие лимфокинов и других внутрисистемных факторов регуляции иммунного ответа. Показано, что обработка *in vitro* в течение 60 мин В-клеток крови доноров малыми дозами ФОС, увеличивающими внутриклеточное содержание цГМФ,

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., и соавт., 1988].

У лиц, подвергшихся воздействию ФОС, значительно чаще встречаются лимфопролиферативные заболевания. ФОС тормозят активность эстераз в моноцитах, цитотоксических Т-лимфоцитах, интактных и активированных лимфокинами естественных киллерах. Эти эффекты ФОС ослабляют иммунологический контроль и эффекторные функции, опосредуемые данными видами клеток. Развитие лимфомы часто связано с присутствием вируса Эпштейна-Барра и человеческого герпесвируса-6, иммунитет к которым опосредуется моноцитами, Т-лимфоцитами и естественными киллерами. Высказывается предположение, что торможение активности эстераз иммунокомпетентных клеток, вызываемое ФОС, ослабляет процесс эстеразозависимой детоксикации, в результате чего активируется процесс лимфомогенеза. Кроме того, ингибирование эстераз подавляет иммунитет к таким патогенам, способствующим развитию лимфом, как герпесвирусы [Newcombe D.S., 1991].

Ингибирование ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах нами установлено и при интоксикации веществом VX в дозе 0.75 DL₅₀ [Забродский П.Ф. и соавт., 2003].

Определялось влияние ДДВФ на ацетилхолинэстеразу лимфоцитов тимуса и селезенки крыс Вистар, а также роли этого эффекта и ацетилхолина в дозе 5 мг/кг (ежедневно двукратно в течение 3-х сут) в изменении антителообразования. VX вводили подкожно в дозе 0,5 DL₅₀ [Забродский П.Ф. и соавт., 2001].

Установлено (табл. 7.12), что выделенные Т-лимфоциты тимуса и селезенки, относящиеся к основной популяции Т-клеток «низкой плотности» с максимальным содержанием ацетилхолинэстеразы (АХЭ) [Szelenyi J.G., et al, 1982.], обладают практически одинаковой антихолинэстеразной активностью.

Введение ацетилхолина (АХ) приводило к увеличению активности АХЭ в Т-клетках, вероятно, вследствие реализации механизмов, направленных на поддержание иммунного гомеостаза путем увеличения гидролиза АХ на мембране Т-лимфоцита. При этом ограничивается действие данного медиатора на м- и н-холинорецепторы, наличие которых на Т-лимфоцитах доказано [Maslinski W., K. et al., 1987; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979]. В результате обеспечивается оптимальное соотношение цАМФ/цГМФ в ИКК, необходимое для их пролиферации и дифференцировки [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979]. VX существенно снижал активность АХЭ в Т-клетках, уменьшая число АОК к ЭБ в селезенке, а действие АХ вызывало противоположные эффекты.

Таблица 7.12. Влияние ДДВФ (0,5 DL₅₀) и ацетилхолина на активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах, выделенных из ядросодержащих клеток тимуса и селезенки у крыс Вистар, (мЕД/10⁹) и число АОК к ЭБ в селезенке через 4 сут после иммунизации (M±m, n =8-10)

Серии опытов	Тимус	Селезенка	АОК к ЭБ, 10 ³
Контроль	87,2±8,5	110,2±11,0	28,2±3,0
Ацетилхолин	115,9±11,0*	140,3±10,5*	38,2±3,1*
ДДВФ	13,2 ± 2,2*	8,2±2,1*	19,4±2,3*

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

Таким образом, при интоксикации ДДВФ в сублетальной дозе 0,5 DL₅₀ реализуются два специфических противоположных эффекта: ингибирование ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, приводящее к супрессии тимусзависимого антителообразования (данный эффект преобладает), и действие ацетилхолина, стимулирующее антителопродукцию. Увеличение в интактных Т-лимфоцитах при действии АХ активности АХЭ позволяет предположить, что роль АХЭ на мембране Т-клетки заключается в изменении степени активации холинергических рецепторов лимфоцитов ацетилхолином, что является одним из механизмов регуляции гуморального иммунного ответа.

Можно полагать, что при дозах ФОВ, превышающих 0,5 ЛД₅₀, возможна суммация иммуносупрессирующего эффекта ацетилхолина и антихолинэстеразного эффекта токсиканта.

Экспериментальные исследования, проведенные на разных видах животных, выявили противотканевые аутоантитела при воздействии ФОС (метилмеркаптофоса, фосфамида, базудина, бутифоса, афоса). Аналогичные данные получены при исследовании крови у людей, профессионально контактирующих с базудином и бутифосом [Жминько П.Г., 1991]. Антитела с антигеном могут образовывать в организме нерастворимые иммунные комплексы антиген-антитело. Такие иммунные комплексы фиксируются в органах и тканях организма. Нерастворимые иммунные комплексы могут взаимодействовать практически со всеми клетками крови, компонентом, рецепторами многих клеток, что является причиной повреждения мембран и развития аутоиммунных заболеваний [Ройт А. и соавт., 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 2002, 2005].

Отражающая функцию Th1-клеток реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), при пероральном поступлении в течение двух месяцев у крыс Вистар снижал форматион в дозе 0,01 DL₅₀ (13,5 мг/кг). Авторы связывали это только (не совсем обоснованно, на наш взгляд) с увеличением содержания в крови кортикостерона [Хусинов А.А. и соавт., 1991]. Действительно, одним из факторов редукции иммунных реакций может являться концентрация в циркулирующей крови кортикостероидов после интоксикации ФОС [Забродский П.Ф., 1993].

Зарегистрировано существенное уменьшение реакции ГЗТ на туберкулин у кроликов после получения ими ФОС в различных дозах в течение 10 и 24 суток. Редукция формирования ГЗТ прямо зависело от дозы и времени интоксикации. Так, метилпаратион в дозах от 0,04 до 1,50 мг/кг, получаемых ежедневно, через 24 дня уменьшал реакцию на повторные введения туберкулина от 1,2 до 2,8 раз. На 10-е сутки после ежедневного получения пестицидов дозозависимый эффект для метилпаратиона и большинства исследованных пестицидов отсутствовал [Street J.C., Sharma R.P., 1975].

В экспериментах на животных установлено [Забродский П.Ф., Мышкина А.К., 1989], что при применении ФОС (армина) за 1 ч до введения разрешающей дозы антигена существенно уменьшалось формирование ГЗТ. Снижение иммуногенности спленоцитов в опытах по изучению формирования ГЗТ при различных моделях может быть связано с ингибированием ФОС эстераз иммунокомпетентных клеток [Ferluga J. et al., 1972]. Показано, что под влиянием холинергической стимуляции равновероятны два процесса: относительное увеличение в селезенке количества либо Т-эффекторов и Т-хелперов, либо клеток-супрессоров. На эти процессы существенное влияние оказывает стимуляция м-холинорецепторов ацетилхолином [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979], концентрация которого после действия ФОС в синапсах и циркулирующей крови повышается. Результаты проведенных опытов позволили авторам заключить, что ФОС (армин) в дозе 0,7 DL₅₀ изменял формирование реакции ГЗТ, характер проявления которой на разных моделях в основном связан с особенностями миграции Т-лимфоцитов из селезенки. При рассмотрении иммуотропных эффектов ФОС следует учитывать, что дифференцировка и созревание Т-лимфоцитов регулируются имеющимися на эпителиальных клетках тимуса никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами [Tomimasa K. et al., 1989], а также (как уже указывалось) наличием м- и н-холинорецепторов на лимфоцитах [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Masini et al., 1985; Rossi A. et al., 1989].

При хроническом воздействии фосфорорганических инсектицидов на рабочих отмечалось ингибирование Т-клеточного эффекта на митогенную стимуляцию фитогемагглютинином и уменьшение содержания Е-РОК в крови [Золотникова Г.П., 1978; Кащенко Л.А., и соавт. 1981].

Под влиянием хлорофоса существенно снижалась реакция трансплантат против хозяина и фагоцитарное число [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1990]. Данные экспериментальных исследований свидетельствуют, что угнетение клеточного иммунитета при интоксикации ФОС сопровождается изменением иммунной структуры лимфатических фолликулов селезенки, в частности, уменьшением тимусзависимых зон в этом органе с атрофией коры тимуса [Street J.C., Sharma R.P., 1975].

Нами установлено, что число антителообразующих клеток к ЭБ, синтезирующим IgM, в селезенке крыс при хроническом действии ДДВФ (0,01 DL₅₀ в течение 30 сут) снижалось в 1,58 раза ($p < 0,05$). При

хроническом действии ДДВФ отмечалось уменьшение АЗКЦ спленоцитов и тимоцитов соответственно в 2,08, 2,20 раза ($p < 0,05$) и супрессия функции ЕКК в 1,91 раза ($p < 0,05$). При хроническом действии ДДВФ отмечалось приблизительно такое же изменение показателей, как и при остром действии ФОС в дозе 0,50-0,75 DL_{50} [Забродский П.Ф., Кадушкин А.М., 2007].

Представляет интерес сопоставление иммунотоксичности антихолинэстеразных препаратов, относящихся к ФОС, и производными карбаминовой кислоты. Отмечено различное действие дитиокарбаматов на ряд иммунологических параметров *in vitro* и на выживаемость *in vitro* лимфоцитов самок мышей. Эффект зависел от дозы, отмечалось различное влияние на массу тимуса и селезенки, активность естественных клеток-киллеров (ЕКК). Диэтилдитиокарбамат и этилен-бис-дитиокарбамат в отличие от метилдитиокарбамата при введении в желудок в дозах 200, 225 и 300 мг/кг в сутки в течение 7 дней не влияли на киллерную активность клеток селезенки [Padget E.L. et al., 1992]. Обработка карбаматов постмитохондриальным супернатантом не оказывала влияния на их цитотоксичность [Rodgers K.E. et al., 1986в]. Полученные данные свидетельствуют о том, что антихолинэстеразный эффект в реализации иммунотоксичности ФОС не является решающим.

В опытах на мышах установлено, что малатион *in vitro* при концентрациях 75 мкг/мл и выше существенно снижает образование зрелых форм цитотоксических Т-лимфоцитов под влиянием клеток аллогенной опухоли Р815. Аналогичный эффект при меньших дозах вызывали этилпаратион, метилпаратион, фенитротрион и фентиол, подавляя генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов в дозе 5-10 мкг/мл [Rodgers K.E. et al., 1985а]. Преинкубация ФОС с постмитохондриальным супернатантом печени крыс, приводящая к их биотрансформации, значительно ослабляет этот эффект. Карбофуран существенно не влияет на активность цитотоксических Т-клеток, а карбанил подавляет ее в дозе 50-100 мкг/мл. Длительное введение малатиона (0,1 DL_{50}) в течение двух недель вызывало у мышей уменьшение количества Т-клеток в тимусе. Острая интоксикация данным пестицидом (0,5 DL_{50}) вызывала увеличение пролиферации Т-лимфоцитов при их стимуляции конканавалином А [Devens B.H. et al., 1985]. Отмечается супрессия выработки Т-ростковых факторов у мышей под влиянием ФОС [Арипова Т. У. и соавт., 1991].

В середине 80-х годов прошлого столетия появляется большое количество работ, посвященных исследованию токсичных эффектов фосфорорганического инсектицида малатиона и O,O,S-триметилтиофосфата, который появляется при хранении этого ФОП в условиях повышенной температуры [Devens B.H. et al., 1985; Rodgers K.E. et al., 1985а, 1985б, 1985в, 1986а, 1986б, 1986в; Thomas I.K., Imamura T., 1986; Rodgers K.E. et al., 1987].

Установлено, что многие иммуносупрессивные эффекты малатиона связаны с действием O,O,S-триметилтиофосфата, обладающего крайне

слабой антихолинэстеразной активностью. Острая интоксикация малатионом в дозе 0,5 DL₅₀ через 5 сут приводила к увеличению антителообразующих клеток в селезенке после иммунизации эритроцитами барана (ЭБ) [Rodgers K.E. et al., 1985a]. Отмечалось увеличение пролиферации лимфоцитов в ответ на их стимуляцию липополисахаридом и конканавалином А. При этом количество лимфоцитов в тимусе и селезенке не изменялось. Отсутствие супрессии гуморального иммунного ответа, вероятно, можно объяснить тем обстоятельством, что при применении малатиона в дозе 0,5 DL₅₀ не отмечалось признаков интоксикации и изменения холинэстеразной активности плазмы. Повышение активности В-системы иммунитета может быть связано с повышением продукции ИЛ-1 и ИЛ-2. Механизм этого эффекта не ясен. В то же время установлено снижение функции лейкоцитов и макрофагов под влиянием острой интоксикации карбофосом [Жамсаранова С.Д. и соавт., 1988; Пирцхалава А.В., 1989]. Неочищенный малатион в опытах *in vitro* тормозил иммунный ответ на тимусзависимый и тимуснезависимый антигены, подавлял способность макрофагов представлять антиген [Thomas I.K., Imamura T., 1986a, 1986b, 1986в].

Предполагают, что в реализации механизма ФОС, ингибирующего цитотоксичность Т-лимфоцитов, существенное значение имеет связанная с эстеразной активностью проницаемость мембраны клетки-эффектора для ионов кальция и магния. В свою очередь, электролитный обмен этой клетки сопряжен с внутриклеточным содержанием циклических нуклеотидов. Показано, что диизопропилфторфосфат уменьшает АЗКЦ при концентрациях от 0,5 до 4 мМ на 5-80% вследствие нарушения электролитного обмена клетки и изменения соотношения цАМФ/цГМФ и других механизмов [Trinchievi G., M. de Marchi, 1976; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

Повышение под влиянием холинергической стимуляции (ацетилхолина) функции естественных клеток-киллеров [Wietrowt R.W. et al., 1978; Grabczewska E. et al., 1990], возможно, является одним из основных факторов, определяющих антиинфекционную неспецифическую резистентность организма под влиянием острого действия ФОС [Забродский П.Ф., 1986, 1987, 1993].

Данные литературы свидетельствуют о том, что ФОВ поражают ЕКК (и цитотоксические Т-лимфоциты) реализацией следующих механизмов: нарушения экзоцитоза гранул, ингибируя активность гранзимов; уменьшения внутриклеточного уровня перфорины, гранзима А и гранулизина, опосредованного индукцией дегрануляции ЕКК и ингибированием транскрипции мРНК, участвующей в синтезе перфорины, гранзима А и гранулизина; снижения активации ЕКК вследствие нарушения их взаимодействия с лигандами FasL/Fas, инициирующими процесс цитотоксического эффекта ЕКК; индукции апоптоза иммунных клеток [Li Q., Kawada T., 2006].

Действие ФОВ может извратить механизм действия ЕКК на

ксеногенные клетки. При этом ЕКК будут поражать собственные клетки организма. Известно, что одна из систем распознавания, которая является характерной для ЕКК, зависит от киллер-активирующих и киллер-ингибирующих рецепторов этих клеток. Хотя все ядерные клетки в норме экспрессируют молекулы ГКГС класса I на своей поверхности, они могут иногда терять эту способность. Эта потеря может происходить в результате действия ФОВ. Поэтому клетки, которые испытывают недостаток на поверхности молекул ГКГС класса I, в определенной степени «ненормальны». Этот недостаток молекул ГКГС I класса приводит к тому, что у ЕКК теряется «запрещающий сигнал» для киллер-ингибирующего рецептора, и ЕКК, вероятно, способны уничтожать клетки организма, в которых в результате действия ФОВ снизилось содержание молекул (МНС) ГКГС класса I [Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

При изучении влияния карбофоса на активность ЕКК селезенки крыс Вистар *in vitro* нами установлено (табл. 7.13), что при концентрациях ФОС, составляющих 10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М, происходит прямо связанное с концентрацией уменьшение активности ЕКК соответственно на 22,5 ($p>0,05$); 37,1 ($p<0,05$) и 66,2% ($p<0,05$).

Таблица 7.13. Влияние карбофоса на активность ЕКК (%) у крыс Вистар *in vitro* ($M \pm m$, $n=8-11$)

Серии опытов	Концентрация карбофоса, М		
	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}
Контроль	$27,5 \pm 3,4$		
ФОС	$21,3 \pm 2,8$	$17,3 \pm 2,5^*$	$9,3 \pm 2,0^*$

Примечание: в каждой серии использовали клетки от 5-7 крыс. Спленоциты в течение 1 ч инкубировали с карбофосом, * - $p<0,05$ по сравнению с контролем.

Выявленная супрессия активности ЕКК *in vitro* позволяет считать, что данный эффект связан преимущественно с ингибированием эстераз, которые содержатся в ЕКК [Забродский П.Ф., 2007; Ройт А., 1991].

Таким образом, карбофос *in vitro* в прямой зависимости от концентрации (10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М) снижал активность ЕКК

Сравнение показателей редукции активности ЕКК в условиях *in vivo* и *in vitro* под влиянием ФОС (карбофоса) позволяет полагать, что данный эффект, вероятно, связан преимущественно с ингибированием их эстераз, которые, содержатся в ЕКК [Ройт А. соавт. 2000; Забродский П.Ф. и соавт., 2007]. Однако нельзя исключить снижающего активность ЕКК действия кортикостероидов и катехоламинов [Madden K. S., Livnat S., 1991; Claman H.N., 1993], концентрация которых в циркулирующей крови при острой интоксикации ФОС возрастает [Забродский П.Ф., 1993, 2000; Szot R.J., Murphy S.D., 1970; Tiefenbach B. et al., 1980, 1983, 1985].

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), отражающая функцию Th1-клеток при пероральном поступлении в течение двух месяцев у крыс Вистар снижал форматион в дозе 0,01 DL₅₀ (13,5 мг/кг). Авторы связывали это только с увеличением содержания в крови кортикостерона (не совсем обоснованно, на наш взгляд) [Хусинов А.А. и соавт., 1991]. Действительно одним из факторов редукции иммунных реакций может являться высокая концентрация в циркулирующей крови кортикостероидов после интоксикации ФОС [Забродский П.Ф., 1993].

Зарегистрировано существенное уменьшение реакции ГЗТ на туберкулин у кроликов после получения ими ФОС в различных дозах в течение 10 и 24 суток. Редукция формирования ГЗТ прямо зависело от дозы и времени интоксикации. Так, метилпаратион в дозах от 0,04 до 1,50 мг/кг, получаемых ежедневно, через 24 дня уменьшал реакцию на повторные введения туберкулина от 1,2 до 2,8 раз. На 10-е сутки после ежедневного получения пестицидов дозозависимый эффект для метилпаратиона и большинства исследованных пестицидов отсутствовал [Street J.C., Sharma R.P., 1975].

В механизме действия ФОС на Т-систему иммунитета может иметь значение взаимодействия данных соединений с н-холинорецепторами Т-лимфоцитов. Косвенно это предположение подтверждает влияние холинергических агонистов на дифференцировку и созревание Т-лимфоцитов через имеющиеся на эпителиальных клетках тимуса никотиновые ацетилхолиновые рецепторы [Tomimasa K. et al., 1989].

Характер эффекта ацетилхолина (иммуностимулирующий или иммуносупрессирующий) а при острой интоксикации ФОС, вероятно, зависит от его концентрации в крови, лимфоидных органах и в области холинорецепторов иммунокомпетентных клеток, а также от изучаемого параметра системы иммунитета [Забродский П.Ф., 2002; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Возможно, существует не известная до сих пор функция ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, регулирующая их активность не только путем гидролиза избытка ацетилхолина [Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006].

Иммунотоксическое действие ФОС в сублетальных дозах, по-видимому, может определяться эффектом гормонов надпочечников [Забродский П.Ф., 1993; 2000; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], ингибированием эстераз Т-хелперов, моноцитов, нейтрофилов, системы комплемента [Becker E.Z. et al., 1966], действием высоких концентраций ацетилхолина на м-холинорецепторы иммуноцитов [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979]. Реализация описанных механизмов может приводить к редукции Т- и В- звена иммунитета [Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

В 2006 году Q. Li и T. Kawada сделано открытие механизмов ФОС, ингибирующих цитотоксичность клеток-киллеров. Автор отмечают ингибирующее влияние ФОС на естественные клетки-киллеры,

цитокинактивированные киллеры, цитотоксические Т-лимфоциты уменьшение CD5 клеток, и увеличение CD26 клеток и аутоантител. ФОС нарушает два главных механизма цитотоксичности, обеспечивающих уничтожение опухолевых клеток и клеток, пораженных вирусом: ингибирует прямую продукцию цитолитических гранул, которые содержат формирующий поры белок перфорин, несколько сериновых протеаз, называемых гранзимами, и гранулизин, осуществляющий экзоцитоз гранзимов. Кроме того, ФОС нарушает второй механизм, связанный с Fas-лигандом (так называемый (Fas-L)/Fas механизм), при реализации которого FasL (CD95 L), находящийся на поверхности клетки-киллера, связывается с поверхностью клетки-мишени «смертельным» рецептором Fas (CD95), индуцируя апоптоз клетки-мишени. ФОС ингибирует клетки-киллеры тремя механизмами: повреждая экзоцитоз гранул ЕКК, индуцированных цитокином (ИЛ-2) клеток-киллеров и цитотоксических Т-лимфоцитов, ингибируя активность гранзимов, а также уменьшая внутриклеточный уровень порфирина, гранзима А и гранулизина, которые индуцируют дегрануляцию ЕКК и транскрипцию матричных РНК перфорина, гранзима А и гранулизина; повреждая механизм FasL/Fas апоптоза клеток-мишеней клетками-киллерами (этот механизм выявлен на мышах, лишенных механизма экзоцитоза гранул); стимулируя апоптоз иммунных клеток [Li Q., Kawada T., 2006; Li Q., 2007].

Механизмы нарушения гомеостаза иммунной системы у людей при интоксикациях ФОС до сих пор практически не изучены, что обусловлено определенными методическими трудностями и отсутствием у клиницистов единого подхода к получению и анализу лабораторных данных. Ряд публикаций свидетельствуют о том, что у больных через 1 сутки после отравления ФОС снижается содержание иммуноглобулинов в крови, а через 7-10 сут отмечается увеличение IgG и IgA. При этом содержание IgM не изменяется [Ананченко В.Г. и соавт. 1987]. Приведенные данные противоречат большинству проведенных экспериментальных исследований [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Casale G.P. et al., 1984; Tiefenbach B., Wichner S., 1985]. Показано, что после острой интоксикации ФОС у больных до 10 сут сохраняется редукция основных показателей иммунного статуса [Смирновым В.С. и соавт., 2000].

У лиц, работающих с ФОС, изменялись корреляционные связи внутри пула лимфоцитов и нейтрофилов, зависимость между содержанием В-лимфоцитов и общим количеством лимфоцитов [Федоров С.М. и соавт., 1988]. Незначительное уменьшение антителопродукции под влиянием метилпаратиона сопровождалось существенной редукцией лимфоидного индекса селезенки. При хронической пероральной интоксикации роннелом (фенхлорфосом) отмечали снижение лимфоидного индекса тимуса в зависимости от дозы и экспозиции в 1,4-2,0 раза [Rodica G., Srefania M., 1973].

У рабочих хроническое воздействие фосфорорганических инсектицидов приводит к ингибированию Т-клеточного эффекта на

митогенную стимуляцию фитогемагглютинином и уменьшение содержания Е-РОК в крови [Золотникова Г.П., 1980; Кащенко Л.А., и соавт., 1981].

В многомерных исследованиях в различных странах (Нидерландах, Италии, Финляндии и Болгарии), в которых участвовало 248 рабочих, подвергавшихся действию различных пестицидов (в том числе, и ФОС) выявлены зависимости между профессиональной экспозицией к пестицидам и астматическими признаками (неприятные ощущения за грудиной, приступы астмы, хрипы и др.) Экспозицию оценивали по наличию в моче (концентрации) метаболитов пестицидов [Boers D. et al., 2008].

Лимфопролиферативные заболевания у людей, подвергшихся воздействию ФОС встречаются значительно чаще, вероятно, вследствие ингибирования эстераз моноцитов, Т-лимфоцитов и естественных киллеров [Newcombe D.S., 1991].

Существуют основания считать, что воздействие ФОС может приводить к повреждению структуры ДНК лимфоцитов [Москалева Е.Ю. и соавт., 1993; Sunil K. K.B, 1993].

Получены результаты, демонстрирующие влияние пола и возраста и пренатального супрессирующего воздействия атразина (хлорорганического инсектицида) на иммунную систему взрослых мышей [Rowe A.M., 2008].

Сенсибилизация антигеном морских свинок увеличивает уязвимость к индуцированной О,О-диэтил-О-паранитрофенилтиофосфатом (паратиином) повышенной реактивности дыхательных путей и изменениям одного из механизмов, связанного с реализацией астматического синдрома (зависимого от ИЛ-5). Поскольку сенсибилизация к аллергенам характерна из 50 % общей совокупности популяции и 80 % астматиков (включая детей), эти результаты свидетельствуют о высоком риске возникновения астмы при действии ФОС [Proskolil B.J. et al., 2008].

При оценке влияние пестицидов в низких дозах на пролиферацию стимулированных митогеном лимфоцитов цыплят *in vitro* и выявлено нарушение фагоцитоза, индукция апоптоза, уплотнение хроматина в иммуногенных клетках. Данная методика предлагается в качестве альтернативной для оценки иммунотоксичности пестицидов, в частности ФОС [Kote P. et al., 2008].

Представляют интерес данные в отношении иммунотоксичности пропанила, которые во многом схожи с действием ФОС. Пропанил в моделях *in vivo* и *in vitro* моделях. воздействует на иммунную систему на органном, клеточном и молекулярном уровнях, вызывая атрофию тимуса, спленомегалию, уменьшение развития Т-клеток в тимусе и В-клеток в костном мозге, редукцию активности ЕКК и макрофагов, а также продукцию ими воспалительных цитокинов. Пропанил также воздействует на дыхательный взрыв макрофагов, ингибируя образование реактивного кислорода и оксида азота. Молекулярные механизмы, ответственные за данные эффекты, вероятно, связаны с альтерацией фактора (NF)-κВ в ядре клетки, снижением транскрипции и внутриклеточной активности Ca^{++} . Действие пропанила нарушает множество функций зрелых Т- и В-

лимфоцитов, снижая синтез цитокинов Т-клетками и иммунные реакции (адаптивный иммунитет). Степень супрессии гуморального иммунного ответа на модельные антигены и неповрежденные бактерии изменяется в зависимости от экспозиции токсиканта. Авторы отмечают, что влияние на доиммунные механизмы защиты организма и систему иммунитета (неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции и вакцинации) под влиянием пропанила только начинают изучаться [Salazar K.D. et al., 2008].

Исследования на беспозвоночных, рыбах и млекопитающих показали, что иммунотоксичность ФОС прямо связана с ингибированием гидролитических ферментов серина (альфа-амино-бета-оксипропионовой кислоты) или эстераз в различных элементах иммунной системы, с прооксидантными эффектами в органах иммунной системы, а также модуляцией сигналов, управляющих иммунными функциями. Косвенные эффекты включают влияние нервной системы и нарушения метаболизма в иммунных органах [Galloway T., Handy R., 2003].

Анализ данных литературы и наши собственные исследования по иммунотоксическому действию ФОС позволяют полагать, что механизмы их иммунотоксических эффектов в сублетальных дозах определяются эффектом гормонов надпочечников, ингибированием эстераз Т-хелперов, моноцитов, нейтрофилов, системы комплемента [Becker E.Z. et al., 1957, 1964, 1966, 1967, 1971], действием высоких концентраций ацетилхолина на м-холинорецепторы иммуноцитов. В результате реализации данных механизмов может происходить снижение гуморального иммунного ответа и супрессия клеточных иммунных реакций.

7.5 Роль холинергической и цитокиновой регуляции функции т-лимфоцитов в формировании активации и редукции иммунных реакций при отравлениях разными дозами фосфорорганических соединений

Нами проводилась оценка возможности как усиления под влиянием ФОС гуморального и клеточного иммунного ответа, так и его супрессии в зависимости, с одной стороны, от соотношения активации м-холинореактивных структур Т-клеток и связанной с ними продукцией цитокинов, и степени инактивации ацетилхолинэстеразы Th1- и Th2-лимфоцитов, с другой стороны [Забродский П.Ф. и соавт. 2009].

Под влиянием ацетилхолина (АХ) (табл. 7.14) происходило увеличение гуморального иммунного ответа на 5 сут к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов, а также формирования ГЗТ по сравнению с контрольным уровнем соответственно в 1,37 и 1,30 раза ($p < 0,05$), а на 8 сут после иммунизации отмечалось возрастание продукции IgG (по числу АОК в селезенке) в 3,37 раза ($p < 0,05$), свидетельствующее о повышении активности Th2-лимфоцитов. Аналогичные данные получены при введении ацеклидина.

Таблица 7.14. Влияние холинергических веществ на функцию Th1- и Th2-лимфоцитов у крыс (M±m, n = 9-11)

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

Примечание. ГЗТ - гиперчувствительность замедленного типа. Здесь и табл. 2 и 3:- 1, 2, 3 – дозы соответственно 0,1; 0,05 и 0,5 DL₅₀; * -p<0,05 по сравнению с контролем.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что холиномиметики в дозе 0,1 DL₅₀ (эта доза приблизительно соответствует терапевтической разовой дозе для человека) повышают функцию Th1- и Th2- лимфоцитов у крыс.

При воздействии ДДВФ в минимальной дозе (0,05 DL₅₀) отмечалось существенное активация функции как Th1-, так и Th2-лимфоцитов. Так, Т-зависимое антителообразование, реакция ГЗТ и число АОК к ЭБ, свидетельствующее об интенсивности продукции IgG, увеличивались соответственно в 1,30; 1,27 и 1,32 раза (p<0,05).

ДДВФ в максимальной из применявшихся доз (0,5 DL₅₀) вызывал редукцию активности исследованных субпопуляций Т-клеток. Так, ФОС вызывало редукцию в селезенке крыс числа АОК к ЭБ, свидетельствующих о продукции IgM в 4,23 раза (p<0,05), супрессию реакции ГЗТ и синтеза IgG (оцениваемого по числу АОК на ЭБ) соответственно в 1,92 и 1,40 раза (p<0,05).

Таким образом, необратимые ингибиторы холинэстеразы, в частности, ФОС способны, как повышать активность Th1- и Th2- лимфоцитов у крыс в дозе 0,05 DL₅₀, вследствие действия АХ, так и снижать функцию этих субпопуляций Т-клеток в результате ингибирования АХЭ на их клеточной мембране [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007] в дозах превышающих 0,05 DL₅₀ и близких к 0,5 DL₅₀.

Исследование концентрации цитокинов в плазме крови крыс (табл. 7.15) показало, что на 5 и 8 сут после иммунизации и последующего воздействия ацетилхолина выявлено увеличение содержания ИФН-γ соответственно в 1,53 и 1,51 раза (p<0,05), а ИЛ-4 - в 1,25 и 1,29 раза (p<0,05) соответственно. Аналогичные изменения были установлены при введении м-холиномиметика ацеклидина. Введение ДДВФ в дозе 0,05 DL₅₀ приводило на 5 и 8 сут после иммунизации к возрастанию ИФН-γ в 1,28 и 1,29 раза (p<0,05), а ИЛ-4 - в 1,10 и 1,16 раза (p>0,05) соответственно.

Таблица 7.15. Влияние холинергических веществ на концентрацию цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ($M \pm m$, $n = 7$)

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

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

Увеличение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 характеризует повышение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток, а уменьшение данного соотношения свидетельствует о большей супрессии активности лимфоцитов Th2-лимфоцитов по сравнению с Th1-клетками [Ройт. А. и соавт, 2000; Сухих Г.Т, 2005]. Нами установлено, что соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 при введении ацетилхолина, ацеклидина, ДДВФ в минимальной дозе составляло через 5 сут соответственно 8,3; 8,5 и 7,9, а через 8 сут – 8,0; 8,7 и 7,7 (контроль – 6,8). Максимальная доза ДДВФ приводила к снижению соотношению ИФН- γ /ИЛ-4 через 5 и 8 сут соответственно в 5,5 и 5,1 раза. Это свидетельствует о том, что холиномиметики и ДДВФ в дозе 0,05 DL₅₀ повышают активность Th1-клеток в большей степени, чем Th2-лимфоцитов, а ДДВФ в дозе 0,5 DL₅₀ приводит к относительному снижению функции Th1-клеток. Повышение активности Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами под влиянием ацетилхолина и ацеклидина, позволяет предполагать наличие большего числа м-холинорецепторов на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа.

Установлено (табл. 7.16), что Т-лимфоциты, выделенные из селезенки, после воздействия ацетилхолина и ацеклидина, вызывало статистически значимое увеличение активности АХЭ в Т-лимфоцитах соответственно в 1,35 и 1,30 раза ($p < 0,05$). Воздействие ДДВФ в минимальной дозе практически не снижало содержание АХЭ в Т-клетках, а действие ФОС в дозе 0,5 DL₅₀ вызывало достоверное снижение активности АХЭ в Т-лимфоцитах в 2,79 раза ($p < 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют, что активность АХЭ в Т-клетках при действии ацетилхолина и ацеклидина, была прямо связана с показателями иммунных реакций, а при интоксикации ДДВФ дозе 0,5 DL₅₀ эта связь носила обратный характер.

Таблица 7.16. Влияние холинергических веществ на активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах спленоцитов крыс на 5 сут после иммунизации ($M \pm m$, $n = 9-13$)

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

Введение ацетилхолина и ацеклидина, вызывало увеличение активности АХЭ в Т-клетках, вероятно, вследствие реализации механизмов, направленных на поддержание иммунного гомеостаза путем увеличения гидролиза ацетилхолина на мембране Т-лимфоцитов. При этом достигалось снижение данного медиатора на м- и н-холинорецепторы, наличие которых на Т-клетках доказано [Забродский П.Ф. и соавт, 2008].

Супрессирующий эффект ФОС в относительно больших дозах в отношении преимущественно Th1-лимфоцитов обусловлен существенным увеличением в крови концентрации кортикостерона [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], к которому в большей степени чувствительны лимфоциты Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [Ройт А. и соавт, 2000].

Следует отметить, что ацетилхолин и ацеклидин в больших дозах (0,5 DL_{50}) значительно снижают иммунные реакции и продукцию цитокинов вследствие активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, приводящей к увеличению в крови кортикостерона, а также в результате чрезмерной стимуляции холинергических рецепторов лимфоцитов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Так, при введении ацетилхолина и ацеклидина (0,5 DL_{50}) ежедневно, однократно через 1 сут после иммунизации ЭБ в течение 2 сут содержание АОК к ЭБ в селезенке на 5 сут после иммунизации составляло соответственно 22,1 $\pm$ 2,3 и 19 $\pm$ 2,0 ($\cdot 10^3$) [контроль – 43,4 $\pm$ 4,5% ($\cdot 10^3$), $p < 0,05$], реакция ГЗТ – 25,2 $\pm$ 2,6 и 21,0 $\pm$ 2,2% (контроль – 40,1 $\pm$ 4,2%, $p < 0,05$), а концентрация в крови ИФН- γ на 5 сут – 557 $\pm$ 56 и 509 $\pm$ 54 пг/мл соответственно (контроль – 856 $\pm$ 71 пг/мл, $p < 0,05$).

Таким образом, применение ацетилхолина и ацеклидина (0,1 DL_{50} , в течение 3 сут) и фосфорорганического соединения ДДВФ в дозе 0,05 DL_{50} (однократно) повышают функцию Th1- и Th2- лимфоцитов и продукцию ими цитокинов. ДДВФ в дозе 0,5 DL_{50} (однократно) вызывал обратный эффект. Ацетилхолин и ацеклидин увеличивали активность АХЭ в Т-лимфоцитах, ДДВФ в дозе 0,05 DL_{50} не влиял на нее, а в дозе 0,5 DL_{50} вызывало ее снижение. При интоксикации ФОС в зависимости от дозы могут реализоваться два основных противоположных эффекта: активация

иммунных реакций вследствие действия ацетилхолина на м-холинорецепторы Т-клеток и редукция иммунного ответа в результате ингибирования АХЭ клеточной мембраны Т-лимфоцитов (как правило, активирующее действие ФОС на ИКК реализуется при дозах токсиканта в несколько раз меньших, чем среднелетальные).

7.6. Роль симпатико-адреналовой системы в супрессии иммунных реакций при отравлении ФОС

При определении роли адреналина и норадреналина в реализации основных иммунных реакций при острой интоксикации VX установлено (табл. 7.17), что под влиянием VX в прямой зависимости от дозы происходит супрессия исследованных показателей иммунного гомеостаза (ЕЦ, АОК к ЭБ, АОК к Vi-Ag, АЗКЦ и реакции ГЗТ), а также дозозависимое повышение в плазме крови адреналина и норадреналина.

Напрашивается вывод о редукции данных показателей под влиянием адреналина и норадреналина. Однако это предположение опровергается результатами, полученными в опытах с введением крысам адреналина и норадреналина одновременно с иммунизацией (табл. 7.17). Эти результаты свидетельствуют о том, что адреналин и норадреналин в дозе, составляющей 0,25 мг/кг, существенно повышали исследованные иммунные реакции, за исключением ЕЦ, а в дозе - 2,50 мг/кг вызывали редукцию всех исследованных иммунных реакций.

Таблица 7.17. Влияние VX на основные иммунные реакции и концентрацию адреналина и норадреналина в плазме крови крыс Вистар (M+m, n =6-8)

Параметры	VX, DL ₅₀		
	К	0,2	0,8
ЕЦ, %	28,5±3,2	15,0±3,0*	12,2±2,1*
АОК к ЭБ, 10 ³	33,2±3,5	21,4±2,2*	16,1±2,0*
АОК к Vi-Ag, 10 ³	24,5±3,1	14,1±2,0*	12,4±1,9*
АЗКЦ, %	8,4±1,8	5,3±1,3	4,0±0,9*
Реакция ГЗТ, %	30,4±2,7	24,1±2,0*	17,1±1,3*
Адреналин, мкг/л	5,8±1,1	11,5±1,5*	18,2±2,0*
Норадреналин, мкг/л	2,0±0,7	4,2±1,1*	8,1±1,5*

Примечание: * p<0,05 по сравнению с контролем (К).

Нами установлено (табл. 7.18), что под влиянием адреналина в минимальной дозе активация иммунных реакций более выражена, чем при действии норадреналина, что обусловлено преимущественной стимуляцией адреналином β-адренорецепторов иммуноцитов [Виноградов В.М., 1985]. Доза адреналина, составляющая 0,25 мг/кг, вызывала менее выраженную

стимуляцию Т-зависимого антителообразования по сравнению с тимуснезависимым (соответственно в 1,72 и 2,45 раза).

Следует отметить, что под влиянием адреналина и норадреналина доза, равная 0,25 мг/кг, создает концентрацию в плазме крови, превышающую содержание данных катехоламинов после острой интоксикации ДДВФ (0,8 DL₅₀), соответственно (приблизительно) в 10 и 20 раз (с учетом биотрансформации, взаимодействия с рецепторами и выведения эти значения могут быть несколько меньшими). Усиление дифференцировки незрелых лимфоидных клеток [Ройт А. и соавт., 2000], в частности В-лимфоцитов, под влиянием активации их β -адренорецепторов объясняет выявленное нами и описанное в литературе увеличение антителопродукции к преимущественно к Т-независимому антигену при введении адреналина и норадреналина в малых дозах [Gilbert K.M., Hoffmann M.K., 1985].

Таблица 7.18. Влияние адреналина и норадреналина на основные иммунные реакции в плазме крови крыс Вистар (М+m, n =7-9)

Параметры	Контроль	Катехоламины, мг/кг			
		Адреналин		Норадреналин	
		0,25	2,50	0,25	2,50
ЕЦ, %	29,8+4,3	21,1+2,9	15,2+2,2*	23,5+2,5	13,3+2,3*
АОК к ЭБ, 10 ³	31,2+3,7	53,7+4,6*	20,0+2,1*	43,3+3,1*	21,1+2,2*
АОК к Vi-Ag, 10 ³	22,4+3,1	54,9+3,3*	11,0+1,5*	35,8+2,9*	9,7+1,0*
АЗКЦ, %	8,5+1,9	15,1+1,4*	4,7+0,9*	13,7+1,1*	4,0+0,8*
ГЗТ, %	29,5+2,8	37,4+3,1*	20,5+2,1*	34,5+2,5	18,5+1,7*

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

Стимулирующее действие катехоламинов опосредуется через α - и β -адренорецепторы иммуноцитов путем синтеза цАМФ, приводящего к продукции соответствующих интерлейкинов, осуществляющих регуляцию иммунных реакций [Madden K. S., Livnat S., 1991]. Известно, что цАМФ стимулирует дифференцировку незрелых лимфоидных клеток [Coffey R.G., Hadden J.W., 1985], в частности В-лимфоцитов [Holte H., Torjesen P., 1988]. Предполагают, что активация β -адренорецепторов иммунокомпетентных клеток в первые 12 ч (индуктивная фаза иммунного ответа) после антигенного стимула увеличивает антителообразование. Увеличение под влиянием адреналина лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺ в селезенке мышей через 90 мин после его введения [Techima H. et al., 1991], видимо обуславливает активацию индуктивной фазы иммуногенеза, сопровождающуюся увеличением числа АОК, реакции ГЗТ и АЗКЦ. Существуют основания полагать, что увеличение А и НА в крови при острой интоксикации ФОС

сопровождается их уменьшением в мозгу и надпочечниках вследствие действия ацетилхолина [Brzezinski J., 1972]. Угнетение иммунных реакций при высоких дозах катехоламинов [Денисенко П.П., 1980] объясняется тем обстоятельством, что эти дозы являются пусковым фактором В-клеточной активации, но одновременно подавляют Т-клеточную хелперную активность [Gilbert K.M., Hoffmann M.K., 1985]. Редукция через 1 сут ЕЦ под влиянием катехоламинов (0,25-2,50 мг/кг) обусловлена увеличением соотношения цАМФ/цГМФ [Garoroy M.R., Strom T.B., 1975]. Доказано, при адреналэктомии функция ЕКК повышается [Madden K. S., Livnat S., 1991]. Не исключено, что введение катехоламинов в продуктивную фазу иммунного ответа может приводить к сдвигам исследованных иммунных реакций, существенно отличающихся от описанных [Madden K. S., Livnat S., 1991].

Таким образом, при острой интоксикации токсичным химикатом VX иммуносупрессивные эффекты (за исключением редукции ЕЦ) не связаны с увеличением концентрацией в плазме крови адреналина и норадреналина. Экзогенное введение адреналина и норадреналина в низкой дозе (0,25 мг/кг) вызывает увеличение основных иммунных реакций, а в высокой (2,50 мг/кг) – их уменьшение.

7.7. Специфические и неспецифические механизмы редукции иммунных реакций при интоксикации ФОС

В реализации действия ФОВ существенное значение имеют неспецифические (связанные со стресс-реакцией) и специфические механизмы [Алимова М. Т. и соавт., 1991; Гущин Н.В. и соавт. 1991, Хусинов А.А. и соавт., 1991; Забродский П.Ф., 1993; 2005]. В настоящее время недостаточно четко определено значение неспецифических и специфических механизмов в развитии нарушений иммунного статуса при действии ФОС.

В связи с этим нами исследовано значение неспецифических и специфических механизмов в формировании основных иммунных реакций при действии зарина в опытах на мышах-самцах линии СВА массой 18–22 г. В качестве ФОС применяли зарин (подкожное введение) в дозах 0,25; 0,5 и 1,0 DL₅₀. Исследованные иммунные реакции при действии зарина сравнивали с эффектами иммобилизационного стресса (6 ч) гидрокортизона и ацетилхолина, вводившихся подкожно в дозах соответственно 100 и 5 мг/кг.

Проведенные исследования (табл. 7.19, 7.20) показали, что под влиянием зарина в прямой зависимости от дозы происходит усиление миграции КОЕс из костного мозга (КМ) в селезенку.

Аналогичное действие характерно и для ацетилхолина, а стрессорное воздействие и гидрокортизон вызывают обратный эффект. Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение выхода КОЕс из костного мозга связано с действием ацетилхолина, причем этот специфический эффект при необратимом ингибировании ацетилхолинэстеразы ФОС преобладает

над торможением миграции КОЕс, вызываемым повышением концентрации в крови кортикостерона (неспецифический механизм).

Таблица 7.19. Влияние зарина на основные иммунные реакции, концентрацию кортикостерона в крови и активность α -нафтилбутиратэстеразы в спленоцитах, ($M \pm m$, $n = 7-9$)

Параметр	Контроль	DL ₅₀		
		0,25	0,5	1,0
Число КОЕ в селезенке	8,1 $\pm$ 1,45	12,2 $\pm$ 2,2	14,7 $\pm$ 2,5*	15,6 $\pm$ 1,6*
Содержание Т- клеток в тимусе, 10 ⁶	87 $\pm$ 8	72 $\pm$ 8	51 $\pm$ 5*	45 $\pm$ 5*
Реакция ГЗТ, %	35,1 $\pm$ 1,7	28,1 $\pm$ 1,3*	25,0 $\pm$ 1,4*	17,1 $\pm$ 1,5*
ЕЦ, %	30,3 $\pm$ 3,1	24,4 $\pm$ 3,4	18,7 $\pm$ 2,2*	15,4 $\pm$ 2,0*
АЗКЦ, %	10,1 $\pm$ 1,2	7,2 $\pm$ 0,7*	4,9 $\pm$ 1,0*	4,1 $\pm$ 0,5*
АОК к ЭБ, 10 ³	33,1 $\pm$ 3,1	22,4 $\pm$ 2,4*	17,2 $\pm$ 2,0*	15,0 $\pm$ 1,4
АОК к Vi-Ag, 10 ³	27,6 $\pm$ 2,3	20,0 $\pm$ 2,2	18,5 $\pm$ 1,7*	16,3 $\pm$ 1,8*
Кортикостерон, нг/мл	18,2 $\pm$ 1,9	49,7 $\pm$ 4,1*	68,5 $\pm$ 6,1*	125,8 $\pm$ 9,6*
Активность α -нафтил-бутиратэстеразы спленоцитов (% положительно окрашенных клеток)	46,1 $\pm$ 4,2	31,6 $\pm$ 3,2	25,5 $\pm$ 3,0*	18,0 $\pm$ 2,1

Примечание: * - различия с контролем достоверны - $p < 0,05$.

Таблица 7.20. Влияние иммобилизационного стресса, гидрокортизона (ГК) и ацетилхолина на основные иммунные реакции, концентрацию кортикостерона в крови и активность α -нафтилбутиратэстеразы в спленоцитах ($M \pm m$, $n = 7-9$)

Параметр	Контроль	Стресс	ГК, 100 мг/кг	АХ, 5мг/кг
Число КОЕ в селезенке	9,2 $\pm$ 1,5	5,1 $\pm$ 1,0*	5,7 $\pm$ 1,1*	14,2 $\pm$ 1,7*
Содержание Т- клеток в тимусе, 10 ⁶	82 $\pm$ 7	52 $\pm$ 5*	55 $\pm$ 6*	60 $\pm$ 6*
Реакция ГЗТ, %	40,5 $\pm$ 1,9	28,7 $\pm$ 1,4*	31,4 $\pm$ 1,5*	44,6 $\pm$ 1,6
ЕЦ, %	32,4 $\pm$ 4	21 $\pm$ 4*	17 $\pm$ 5*	27 $\pm$ 6
АЗКЦ, %	9,3 $\pm$ 1,3	7,9 $\pm$ 1,2	8,8 $\pm$ 1,6	12,5 $\pm$ 1,4
АОК к ЭБ, 10 ³	31,2 $\pm$ 3,0	17,2 $\pm$ 2,9*	20,3 $\pm$ 3,1*	43,3 $\pm$ 4,2
АОК к Vi-Ag, 10 ³	28,3 $\pm$ 2,5	18,1 $\pm$ 2,8*	17,5 $\pm$ 3,2*	41,2 $\pm$ 3,9*
Кортикостерон, нг/мл	35,1 $\pm$ 3,6	112,5 $\pm$ 10,2*	-	41,4 $\pm$ 5,5
Активность α -нафтил-бутиратэстеразы спленоцитов (% положительно окрашенных клеток)	42,1 $\pm$ 4,0	37,2 $\pm$ 3,8	46,4 $\pm$ 5,1	35,3 $\pm$ 4,0

Примечание: * - различия с контролем достоверны - $p < 0,05$.

Торможение миграции КОЕс из КМ при стимуляции коры надпочечников известно [Петров Р.В. и соавт., 1981]. Вероятно, механизм индукции ацетилхолином миграции СКК аналогичен описанному при изучении подвижности В-лимфоцитов данным медиатором [Адо А.Д. и соавт., 1983].

При увеличении вводимой дозы зарина происходило прямо связанное с ней уменьшение Т-клеток в тимусе. Таким же образом действовали стрессорный фактор, гидрокортизон и ацетилхолин. Вероятно, снижение Т-клеток в тимусе при действии ФОВ связано преимущественно с выходом тимоцитов из органа под влиянием кортикостероидов (неспецифический механизм) и активацией м-холинорецепторов тимоцитов ацетилхолином - специфический эффект [Maslinski W. et al., 1987], и в меньшей степени - с цитотоксическим действием гормонов коры надпочечников [Heideman M., Bentgson A., 1985].

Предполагают, что супрессия иммунного ответа связана с увеличением содержания в крови под влиянием ФОС кортикостероидов, так как применение преднизолона в дозе 100 мг/кг вызывает аналогичный эффект, а адреналэктомия иммунотоксическое действие антихолинэстеразных ядов устраняет [Tiefenbach B. et al., 1983; Tiefenbach B., Wichner S., 1985]. В экспериментах на крысах Вистар было установлено, что введение внутрь форматиона в дозе 1/100 DL₅₀ (3,5 мг/кг) в течение 2 мес. вызывает повышение кортикостерона в крови, коррелирующее со снижением гуморального иммунитета [Хусинов А.А. и соавт., 1991]. В опытах *in vitro* показано, что индуцированная антииммуноглобулинами подвижность В-лимфоцитов, существенно подавляется под влиянием диизопропилфторфосфата [Becker E.L., Unanue E.R., 1976].

Эти эксперименты не позволяют признать роль глюкокортикоидов в супрессии функции В-клеток под влиянием ФОС основной.

В экспериментах на крысах Вистар установлено, что при остром отравлении VX (0,5 DL₅₀) реализуются два специфических противоположных эффекта: ингибирование ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, приводящее к супрессии тимусзависимого антителообразования (данный эффект преобладает), и действие ацетилхолина (действие данного медиатора моделировалось введением его в дозе 5 мг/кг двукратно ежедневно в течение 3 сут через 1 сут после иммунизации), вызывающее стимуляцию антителопродукции. В интактных Т-клетках ацетилхолин увеличивает активность ацетилхолинэстеразы. Следует отметить, эффект ацетилхолина зависит от его концентрации в крови, лимфоидных органах и в области холинорецепторов иммунокомпетентных клеток, а также от изучаемого параметра системы иммунитета [Забродский П.Ф. и соавт., 2001]. Результаты проведенных экспериментов дают основание полагать, что, возможно, существует не известная до сих пор функция ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, регулирующая их активность не только путем гидролиза избытка ацетилхолина.

Инттоксикация заринном и другие исследованные факторы, за исключением ацетилхолина, существенно снижали реакцию ГЗТ. Как показывает анализ изменения содержания кортикостерона в плазме крови под влиянием зарина и стрессорного воздействия, это обусловлено ингибированием исследованной реакции кортикостероидами (неспецифический механизм) и, вероятно, инактивацией эстераз моноцитов и Т-клеток, определяющих формирование ГЗТ (специфический эффект).

При исследовании естественной цитотоксичности (ЕЦ) установлено ее снижение, прямо связанное с дозой ФОВ. Аналогичные эффекты оказывают стрессорное воздействие и гидрокортизон (неспецифический механизм). Подавление активности ЕКК при стрессе и оценка роли при этом ИЛ-2 и интерферона исследовались Г.Т. Сухих и Ф.З. Меерсоном (1985). Необходимо отметить, что данные этой работы позволяют предположить возможность восстановления активности ЕКК как при различных видах стресса, так и при интоксикации ФОВ применением ИЛ-2 или интерферона вследствие наличия общих механизмов, приводящих к формированию иммунодефицитного состояния. Взаимосвязь угнетения ЕЦ с ингибированием α -нафтилбутиратэстеразы в спленоцитах свидетельствует и о наличии специфического механизма снижения ЕЦ при интоксикации ФОВ.

АЗКЦ существенно уменьшалась при действии зарина. Супрессия активности показателя была прямо связана с дозой ФОВ, концентрацией в плазме крови кортикостерона и находилась в обратной зависимости от активности эстеразы спленоцитов (специфический эффект). Влияние стресса и гидрокортизона на АЗКЦ не выявлено. Ацетилхолин несущественно увеличивал данный показатель. Анализ вышеизложенного свидетельствует о снижении АЗКЦ вследствие инактивации эстераз К-клеток.

Число АОК в селезенке находилось в обратной зависимости от дозы зарина, концентрации кортикостерона в плазме крови (неспецифический эффект) и было прямо связано с активностью эстеразы в спленоцитах (специфический эффект). Ацетилхолин увеличивал гуморальную иммунную реакцию, вероятно, вследствие механизмов, описанных в работах [Адо А.Д. и соавт., 1983; Maslinski W. et al., 1987]. Обращает на себя внимание большее снижение под влиянием ФОВ Т-зависимого антителообразования (к ЭБ) по сравнению с Т-независимым (к Vi-Ag). Это, видимо, связано с инактивацией эстераз Т-клеток, локализованных преимущественно в этих лимфоцитах [Хейхоу Ф.Г.Дж, Кваглино Д., 1983]. Не выявлено различий в изменении гуморального иммунного ответа к Т-зависимому и Т-независимому антигенам под влиянием стресса и гидрокортизона.

Установлено [Забродский П.Ф., 1993], что под влиянием ДДВФ в прямой зависимости от дозы происходит усиление миграции стволовых кроветворных клеток (СКК) из костного мозга (КМ) в селезенку. Аналогичное действие характерно и для ацетилхолина, а стрессорное воздействие и гидрокортизон вызывают обратный эффект. Полученные

результаты свидетельствуют о том, что увеличение выхода СКК из КМ связано с действием ацетилхолина, причем этот специфический эффект при необратимом ингибировании ацетилхолинэстеразы ДДВФ преобладает над торможением миграции СКК, вызываемым повышением концентрации в крови кортикостерона (неспецифический механизм). Торможение миграции СКК из КМ при стимуляции коры надпочечников известно [Петров Р.В., Хаитов Р.М., 1981]. Вероятно, механизм индукции ацетилхолином миграции СКК аналогичен описанному при изучении подвижности В-лимфоцитов данным медиатором [Адо А.Д. и соавт., 1983]. При увеличении вводимой дозы ДДВФ происходило прямо связанное с ней уменьшение Т-клеток в тимусе. Таким же образом действовали стрессорный фактор, гидрокортизон и ацетилхолин.

Вероятно, инволюция тимуса при действии ФОС связана преимущественно с выходом тимоцитов из органа под влиянием кортикостероидов (неспецифический механизм) и активацией м-холинорецепторов тимоцитов ацетилхолином – специфический эффект [Maslinski W. et al., 1983], и в меньшей степени – с цитотоксическим действием гормонов коры надпочечников [Heideman M., Bentgson A., 1985]. Не выявлено различий в изменении гуморального иммунного ответа к Т-зависимому и Т-независимому антигенам под влиянием стресса и гидрокортизона. Значимость неспецифических и специфических эффектов в формировании иммунодефицитного состояния после интоксикации ФОС различна в зависимости от исследуемой иммунной реакции [Забродский П.Ф., 1993].

Снижение Т-клеток в тимусе при действии ФОС 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 [Забродский П.Ф., 1993].

Определялась относительная доля иммуносупрессорного эффекта кортикостерона (КС) [Забродский П.Ф. и соавт., 2000] в снижение иммунных реакций при остром отравлении фосфорорганическим инсектицидом метафосом (табл. 7.21).

Таблица 7.21. Влияние метафоса (0,8 DL₅₀) на гуморальные и клеточные иммунные реакции крыс (М+м, n =7-9)

Показатель	Контроль	Метафос
АОК к ЭБ, 10 ³	36,6±4,2	14,1±2,0*
АОК к Vi-Ag, 10 ³	27,3±3,4	17,1±2,4*
Реакция ГЗТ, %	25,1±2,3	17,2±1,3*
ЕЦ, %	28,2±4,1	12,5±2,3*
АЗКЦ, %	12,3±1,6	4,4±0,9*

Примечание: * - достоверность различий с контролем p<0,05.

В опытах на беспородных крысах самцах, массой 180-250 г (метафос вводили в растворе оливкового масла внутривенно в дозе 0,8 DL₅₀ в объеме 0,5 мл), установлено, что под влиянием ФОС происходит супрессия исследованных показателей гуморального и клеточного иммунитета.

При этом острая интоксикация метафосом вызывает более выраженное снижение иммунных реакций и ЕЦ. Оба исследованных ФОС в большей степени снижают тимусзависимый гуморальный иммунный ответ, что свидетельствует о редукции синтеза IgM и активности регулирующих этот синтез Th1-лимфоцитов.

При определении концентрации КС в плазме крови крыс при остром отравлении метафосом установлено (табл. 4.22) существенное увеличение его концентрации через 2, 12 и 24 ч под влиянием метафоса по сравнению с контролем, изменения которого в исследованный период отражали суточные изменения КС в плазме крови, связанные с изменением активности крыс в разное время суток [Dhabhar F. S et al., 1995].

Таблица 7.22. Концентрация кортикостерона в плазме крови крыс при его подкожном введении и остром отравлении малатионом, нг/мл ($M \pm m$, n =5-7)

Вещества		Время исследования после введения, ч		
		2	12	24
Контроль	1	25,1±3,6	191,3±14,8	31,3±2,8
Метафос	2	120,5±10,4	270,0±18,4	48,5±5,2
КС				
2мг/кг х 3	3	137,6±11,8	241,2±15,6	40,2±4,5
4мг/кг х 3	4	275,7±19,3	459,2±20,1	38,5±3,0
Уровень достоверности – p<0,05		1-2, 1-3, 1-4 2-4	1-2, 1-3, 1-4 2-4	1-2

Примечание: КС вводили трехкратно с интервалом 5 ч.

При этом максимальное увеличение концентрации КС (в 4,8 раз) отмечалось через 2 ч. Введение КС вызывало увеличение концентрации этого гормона в крови прямо пропорционально его дозе через 2 и 12 ч. При сравнении содержания КС в плазме крови крыс при остром отравлении метафосом при его экзогенном поступлении в различных дозах установлено, что увеличение концентрации КС под влиянием метафоса приблизительно соответствует трехкратному введению этого гормона в дозе 2 мг/кг.

Введение КС в этой дозе трехкратно с интервалом 5 ч (табл. 7.23) вызывает снижение тимусзависимого антителообразования. Кроме того, под влиянием КС в исследованной дозе значительно снижалась активность ЕКК (p<0,05) и незначительно - функция К-клеток (p>0,05).

Таблица 7.23. Влияние кортикостерона (2 мг/кг трехкратно с интервалом 5 ч) на показатели системы иммунитета (M+m, n =5-7)

Показатели	Контроль	Кортикостерон
АОК к ЭБ, 10^3	31,3 $\pm$ 3,7	20,3 $\pm$ 2,4*
АОК к Vi-Ag, 10^3	25,5 $\pm$ 3,8	27,3 $\pm$ 2,2
Реакция ГЗТ, %	28,5 $\pm$ 2,7	24,8 $\pm$ 2,5
ЕЦ, %	32,3 $\pm$ 4,5	20,8 $\pm$ 2,9*
АЗКЦ, %	10,1 $\pm$ 1,5	7,2 $\pm$ 1,7

Примечание: * - достоверность различий с контролем $p < 0,05$.

На Т-независимое антителообразование и реакцию ГЗТ исследованная доза КС в индуктивной фазе иммунного ответа влияния практически не оказывала.

Проведенные эксперименты позволяют рассчитать вклад КС в % в реализацию супрессии функции ЕКК и тимусзависимого гуморального иммунного ответа (синтеза IgM) при остром отравлении ФОВ по формуле:

$$\text{Вклад КС} = (1 - \text{ПИО}_{\text{КС}}/\text{ПИО}_{\text{К}}) \cdot 100,$$

где $\text{ПИО}_{\text{К}}$, $\text{ПИО}_{\text{КС}}$ - показатели иммунного ответа соответственно в контроле и при действии кортикостерона.

Для оценки вклада иммунотоксических эффектов ФОВ, не связанных с действием КС, в реализацию супрессии иммунных реакции, можно использовать следующую формулу:

$$\text{Вклад ФОС} = [(1 - \text{ПИО}_{\text{М}}/\text{ПИО}_{\text{К}}) - (1 - \text{ПИО}_{\text{КС}}/\text{ПИО}_{\text{К}})] \cdot 100, \text{ где}$$

$\text{ПИО}_{\text{К}}$, $\text{ПИО}_{\text{М}}$ - показатели иммунного ответа соответственно в контроле и при действии метафоса.

Расчеты показывают, что при остром отравлении метафосом вклад КС в реализацию супрессии функции ЕКК и тимусзависимого гуморального иммунного ответа (синтеза IgM) составляет соответственно 35,6 и 35,1%. Иммунотоксические эффекты метафоса, не связанные с действием КС, обеспечивают снижение функции ЕКК и тимусзависимого гуморального иммунного ответа соответственно на 20,0 и 26,4%.

Полученные результаты свидетельствуют о снижении гуморальных и клеточных иммунных реакций под влиянием острого отравления метафосом, при этом повышение концентрации в плазме крови кортикостерона под влиянием метафоса определяет вклад КС в реализацию супрессии функции ЕКК и тимусзависимого гуморального иммунного ответа (синтеза IgM), составляющий соответственно 35,6 и 35,1%.

Таким образом, изменение иммунного статуса при действии ФОВ связано как с неспецифическим стрессорным влиянием кортикостероидов на отдельные иммунные реакции, так и со специфическими механизмами, к

которым следует отнести ингибирование эстераз иммунокомпетентных клеток и действие ацетилхолина. Значимость неспецифических и специфических эффектов в формировании иммунодефицитного состояния после интоксикации ФОВ различна в зависимости от исследуемой иммунной реакции. Наличие ряда общих механизмов возникновения иммуносупрессии при стрессе и интоксикации ФОВ предполагает возможность использования сходных способов фармакологической коррекции нарушений иммунного гомеостаза, вызываемых этими факторами.

Результаты наших исследований подтверждают возможность реализации эффектов ФОС, связанных с неспецифическими (стресс-реакция) и специфическими механизмами.

Роль исследованных иммунных реакций при острой интоксикации ФОС 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 зарина 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.

Полученные нами данные в отношении иммунотоксичности различных доз ФОС (и антихолинэстеразных токсичных химикатов) в условиях эксперимента на животных позволяют заключить, что ФОС вызывает прямо связанную с дозой супрессию основных гуморальных и клеточных иммунных реакций. Наиболее чувствительными к действию ФОС в порядке уменьшения степени поражения являются: естественные клетки-киллеры, К-клетки, тимусзависимый гуморальный иммунный ответ в продуктивной фазе антителогенеза. Основными механизмами нарушения регуляции иммуногенеза и функции Т- и В-звена иммунитета ФОС, приводящими к постинтоксикационному иммунодефицитному состоянию, являются: изменение перераспределения иммуноцитов между органами системы иммунитета; нарушение кооперации Т- и В-лимфоцитов; ингибирование ацетилхолинэстеразы Т-клеток тимуса и селезенки, а также α -нафтил-АС-ацетатэстеразы и α -нафтил-бутиратэстеразы Т-лимфоцитов; действие на холинорецепторы иммунокомпетентных клеток высоких концентраций ацетилхолина; иммуносупрессивный эффект кортикостероидов.

7.8. Роль альфа7- никотиновых ацетилхолиновых рецепторов в-клеток в реализации иммунотоксического эффекта фосфорорганических соединений

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что интоксикация ДДВФ (группа 2), а также введение селективного агониста $\alpha 7nAChR$ GTS-21 (группа 5) вызывали снижение гуморального иммунного

ответа к Т-независимому антигену (АОК к Vi-Ag) на 5 сут после иммунизации соответственно в 2,04 и 1,74 раза ($p<0,05$), а на 8 сут после иммунизации соответственно в 1,82 и 1,76 раза ($p<0,05$) по сравнению с контролем (табл. 7.24).

Таблица 7.24. Влияние ДДВФ, хлоризондамина, их комбинации, GTS-21 на функцию В-клеток (АОК к Vi-Ag, 10^3) на 5 и 8 сут после иммунизации Vi-Ag у крыс ($M\pm m$, $n = 8-10$)

Группа	Срок исследования, сут		
		5	8
Контроль	1	33,2 $\pm$ 3,8	43,4 $\pm$ 4,5
ДДВФ	2	16,3 $\pm$ 2,0	23,9 $\pm$ 2,6
Хлоризондамин	3	36,2 $\pm$ 3,2	42,5 $\pm$ 4,8
ДДВФ + хлоризондамин	4	27,0 $\pm$ 2,8	37,0 $\pm$ 4,2
GTS-21	5	19,1 $\pm$ 2,3	24,7 $\pm$ 2,7
Уровень достоверности - $p<0,05$		1-2; 1-5; 2-3; 2-4; 3-4; 3-5	1-2; 1-5; 2-3; 2-4; 3-5

Примечание. 1,2,3,4,5 - группы.

Антагонист nAChR ХД (группа 3), а также комбинированное действие ДДВФ и ХД (группа 4) не оказывали влияния на Т-независимое антителообразование по сравнению с контрольной группой (группа 1). Антагонист nAChR при комбинированном применении с ДДВФ (группа 4) уменьшал ($p<0,05$) супрессию антителопродукции после иммунизации по сравнению с показателями при интоксикации ДДВФ (группа 2), увеличивая число АОК к Vi-Ag по сравнению с соответствующими параметрами (группа 2) соответственно в 1,66 и 1,55 раза.

Подострая интоксикация ДДВФ (группа 1), действие селективного агониста $\alpha 7$ nAChR GTS-21 (группа 5) приводили к уменьшению концентрации в крови ИЛ-10 и ИЛ-12 на 5 сут после иммунизации Vi-Ag соответственно в 1,55 и 1,64 раза ($p<0,05$). Введение антагониста nAChR ХД (группа 3), а также комбинированное применение ДДВФ и ХД (группа 4) не оказывали существенного влияния на содержание в крови крыс ИЛ-10 и ИЛ-12 по сравнению с контролем (табл. 7.25).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что под влиянием ДДВФ существенно снижается функция В-клеток, причем этот эффект не связан с ингибированием АХЭ данных иммуноцитов, так как В-лимфоциты являются эстеразонегативными клетками [Забродский П.Ф. и соавт., 2012]. Следует отметить, инактивацией АХЭ Т-клеток и ЕКК обусловлены основные иммунотоксические эффекты ФОС [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Антагонист nAChR ХД восстанавливает способность В-клеток

продуцировать IgM при интоксикации ФОС в результате блокирования их nAChR.

Таблица 7.25. Влияние ДДВФ, хлоризондамина, их комбинации, GTS-21 на содержание цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-12 в крови крыс на 5 сут после иммунизации Vi-Ag, пг/мл ($M \pm m$, $n=6$)

Группа		ИЛ-10	ИЛ-12
Контроль	1	310±34	172±20
ДДВФ	2	200±26	105±17
Хлоризондамин	3	296±32	169±21
ДДВФ + хлоризондамин	4	265±30	156±27
GTS-21	5	193±24	110±16
Уровень достоверности - $p < 0,05$		1-2; 1-5; 2-3; 3-5	1-2; 1-5; 2-3; 3-5

Примечание. 1,2,3,4,5 - группы.

При этом практически исключается действие молекулы ДДВФ (или ацетилхолина - АХ, концентрация которого в крови и лимфоидных органах увеличивается вследствие ингибирования ФОС АХЭ) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007] на nAChR В-лимфоцитов. Селективный агонист $\alpha 7$ nAChR GTS-21 оказывает практически такое же воздействие на активность В-лимфоцитов (Т-независимое антителообразование), как и ДДВФ, что является доказательством непосредственного воздействия ФОС (ДДВФ) и/или АХ на $\alpha 7$ nAChR В-клеток, приводящего к супрессии гуморального иммунного ответа.

Известно, что холинергическая стимуляция вызывает активацию АХ $\alpha 7$ nAChR макрофагов, моноцитов и нейтрофилов, что приводит к снижению продукции этими клетками провоспалительных цитокинов [Забродский П.Ф. и соавт., 2012]. Редукция функции В-лимфоцитов под влиянием ДДВФ, а также роль в данном эффекте активации $\alpha 7$ nAChR вследствие воздействия на В-клетки ФОС и/или АХ доказывается также снижением концентрации в крови ИЛ-10 и ИЛ-12, которые синтезируются при введении Т-независимого Vi-Ag преимущественно В-клетками (кроме этих лимфоцитов ИЛ-10 и ИЛ-12 синтезируют также соответственно Th2-клетки и макрофаги) [Holan et al., 2014. Lasek W. et al., 2014].

Таким образом, ФОС и/или ацетилхолин способны воздействовать на $\alpha 7$ nAChR В-клеток и вызывать снижение их функции, сопровождающиеся супрессией антителообразования и уменьшением концентрации в крови ИЛ-10 и ИЛ-12.

7.9. Нарушение иммунного статуса у людей после отравления ФОИ

В результате проведенных нами исследований [Забродский П.Ф. и соавт., 1994] было установлено, что острая интоксикация ФОИ средней и тяжелой степени приводит через 7-9 суток к существенному снижению абсолютного количества Т-лимфоцитов в крови, высокоаффинных Т-лимфоцитов, относительного содержания Т-хелперов ($CD4^+$). Относительное содержание $CD8^+$ (выполняющих, вероятно, супрессорную функцию Тh3-лимфоцитов) возрастало. Показатели естественной и антителозависимой клеточной цитотоксичности уменьшались соответственно в 1,4 и 1,9 раз. Незначительно снижалась функциональная активность Т-лимфоцитов в реакции бласттрансформации с фитогемагглютинином (ФГА) под влиянием острой интоксикации ФОИ. Отмечалась супрессия синтеза IgG и незначительное повышение IgA. Статистически значимых различий в содержании В-лимфоцитов в циркулирующей крови у отравленных по сравнению со здоровыми лицами того же возраста не отмечалось.

Снижение содержания в крови после острой интоксикации ФОИ может быть связано с лизисом кортизолчувствительной популяции этих клеток в результате значительного увеличения концентрации глюкокортикоидов в плазме крови. Относительное увеличение в крови $CD8$, вероятно, обусловлено преимущественной миграцией Т-хелперов ($CD4$) в костный мозг. Не исключено, что проявление Т-клеток с рецепторами супрессоров индуцируется высоким содержанием катехоламинов [Ройт А., 1991], концентрация которых в крови после отравления ФОИ существенно увеличивается [Кузьминская У.А. и соавт., 1980]. Уменьшение естественной и антителозависимой клеточной цитотоксичности может быть обусловлено ингибированием эстераз ЕКК, а также непосредственным действием ФОИ на Н-холинорецепторы этих клеток [Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979]. Снижение синтеза иммуноглобулинов под влиянием антихолинэстеразных ядов связано с нарушением процессов переработки и представления антигенной информации макрофагами Т-хелперам, кооперации Т- и В-лимфоцитов, снижением активности Т-хелперов и относительным увеличением содержания $CD8$, способных выполнять супрессорную функцию, нарушением функции В-лимфоцитов [Забродский П.Ф., 1986]. В реализации данных нарушений существенное значение имеют как неспецифические механизмы, связанные с активацией гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, действием на лимфоидные органы глюкокортикоидов, нарушением процессов миграции иммунокомпетентных клеток, так и специфические, реализующиеся вследствие значительного увеличения в синапсах лимфоидных органов ацетилхолина, ингибирования фосфорорганическими соединениями эстераз лимфоцитов [Cazale G.P. et al., 1983]. Повышение IgA после интоксикации ФОИ, вероятно, связано с развитием патогенной флоры в легочной ткани [Сильвестров В.П., Эйнер

Э.А., 1983], стимулирующей синтез данных антител плазматическими клетками слизистых оболочек бронхов.

Нами было проведено исследование основных показателей клеточного иммунитета у людей, получивших отравление различными ФОС тяжелой степени тяжести [Забродский П.Ф. и соавт, 1991]. Установлено (табл. 7.26), что острая интоксикация ФОС тяжелой степени поражения вызывала снижение числа Т-лимфоцитов, «высокоаффинных» Т-лимфоцитов в крови, реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) с ФГА, характеризующую функцию Т-лимфоцитов, и АЗКЦ через 5 сут.

Таблица 7.26. Влияние острой интоксикации тяжелой степени ФОС через 5 сут на основные показатели Т-системы иммунитета у людей (M±m)

Серии опытов	Т-клетки, 10 ⁹ /л	Высоко- аффинные Т- клетки, 10 ⁹ /л	РБТЛ с ФГА, %	ЕЦ, %	АЗКЦ, %
Контроль (25)	1,22±0,12	0,72±0,11	21,5±2,8	35,6±3,7	12,5±1,8
ФОС (11)	0,62±0,15*	0,34±0,11*	14,2±3,5	22,2±4,5*	6,8±2,3*

Примечание: в скобках – число наблюдений; * - различие с контролем достоверно p<0,05

Так, ФОС снижали содержание Т-клеток в крови соответственно в 1,97 раза (p<0,05), высокоаффинных Т-лимфоцитов – в 2,12 раза (p<0,05), РБТЛ с ФГА – в 1,51 (p>0,05), функцию ЕКК, оцениваемую по ЕЦ – в 1,60 раза (p<0,05) и АЗКЦ – соответственно в 1,84 раза (p<0,05).

Реакция иммунной системы на острое отравление ФОС характеризуется как проявление вторичного постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Таким образом, острая интоксикация ФОС приводит к иммунодефицитному состоянию у лиц, получивших острые отравления, связанному преимущественно с нарушением Т-системы иммунитета, снижением естественной и антителозависимой цитотоксичности.

Проведенные на разных видах животных экспериментальные исследования выявили противотканевые аутоантитела при воздействии ФОС (метилмеркаптофоса, фосфамида, базудина, бутифоса, афоса). Аналогичные данные получены при исследовании крови у людей, профессионально контактирующих с базудином и бутифосом [Жминько П.Г., 1991]. Антитела с антигеном могут образовывать в организме нерастворимые иммунные комплексы антиген-антитело. Такие иммунные комплексы фиксируются в органах и тканях организма. Нерастворимые иммунные комплексы могут взаимодействовать практически со всеми клетками крови, комплементом, рецепторами многих клеток, что является

причиной повреждения мембран и развития аутоиммунных заболеваний [Ройт А. и соавт, 2000; Забродский П.Ф. 2002, 2005a].

Резюме

Таким образом, под влиянием острой интоксикации ФОС отмечается дозозависимое существенное уменьшение лимфоидного индекса тимуса и селезенки, а также содержания в них лимфоцитов. Острое отравление ФОС эквивалентных дозах (0,2; 0,5 и 0,8 ЛД₅₀) оказывает более выраженное дозозависимое повреждающее действие на Т-клетки (преимущественно на Th1-лимфоциты) по сравнению с В-лимфоцитами в гуморальных иммунных реакциях. Действие ФОС более выражено в продуктивной фазе иммуногенеза, вызывает дозозависимое снижение функции Т-клеток, антителозависимой клеточной цитотоксичности, реакции гиперчувствительности замедленного типа в моделях, характеризующих как первичный, так и вторичный клеточный. ФОС вызывает дозозависимое снижение активности естественных клеток киллеров (ЕКК). ФОС *in vitro* в прямой зависимости от концентрации (10^{-6} , 10^{-5} и 10^{-4} М) приводит к редукции функции ЕКК. Основными механизмами нарушения физиологической регуляции иммуногенеза и функции Т- и В-звена иммунитета фосфорорганическими соединениями, приводящими к постинтоксикационному иммунодефицитному состоянию, являются: изменение перераспределения иммунных клеток между органами системы иммунитета; нарушение кооперации Т- и В-лимфоцитов, приводящее к снижению антителообразования вследствие преимущественного поражения Т-лимфоцитов (Th1 и Th2); ингибирование ФОС ацетилхолинэстеразы Т-клеток тимуса и селезенки, а также α -нафтил-AS-ацетатэстеразы и α -нафтил-бутиратэстеразы спленоцитов (преимущественно Т-клеток); действие на холинорецепторы иммунокомпетентных клеток высоких концентраций ацетилхолина; иммуносупрессивный эффект кортикостероидов.

При острой интоксикации ФОС, ацетилхолин, воздействуя на н-холинорецепторы (тип – $\alpha 7nAChR$) моноцитов, макрофагов и нейтрофилов и центральные м-холинорецепторы ($mAChR$) реализует холинергический противовоспалительный эффект, уменьшая в крови содержание провоспалительных цитокинов фактора некроза опухоли- α (ФНО), ИЛ-1 β и ИЛ-6, продуцируемых клетками макрофагально-моноцитарной системы, что приводит к снижению летальности мышей ранней фазе сепсиса («cholinergic anti-inflammatory pathway»). Острая, подострая и субхроническая (30 сут) интоксикация ФОС снижает преимущественно функцию Th1-лимфоцитов (по сравнению с Th2-клетками), активность естественных клеток-киллеров, антителозависимую клеточную цитотоксичность, Т-зависимую гуморальную иммунную реакцию, вследствие ингибирования ацетилхолинэстеразы, а также фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов (активация $\alpha 7nAChR$); уменьшает содержание в крови провоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов (γ -интерферона – ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-2) и

антивоспалительного цитокина ИЛ-10. Воздействие ацетилхолина на mAChR (в том числе, и при интоксикации ФОС) повышает активность Th1- и Th2-лимфоцитов (Th1-клеток – в большей степени) и продукцию ими соответственно ИФН- γ и ИЛ-4 (Забродский П.Ф. и соавт., 1987, 1995, 1996, 2007, 2008, 2010, 2012, 2013, 2014, 2015). Применение антител к ФНО- α и активация $\alpha 7$ nAChR анабазином за 2 ч до моделирования сепсиса вызывают существенное снижение летальности мышей от экспериментального сепсиса (внутрибрюшинное введение взвеси микробных тел *E. coli*) вследствие уменьшения в крови концентрации провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6. Комбинированное использование анабазина и МАФНО и приводило к их аддитивному эффекту.

ФОС и/или ацетилхолин способны воздействовать на $\alpha 7$ nAChR В-клеток и вызывать снижение их функции, сопровождающиеся супрессией антителообразования и уменьшением концентрации в крови ИЛ-10 и ИЛ-12.

ГЛАВА 8. ВЛИЯНИЕ КОМБИНИРОВАННОГО ОСТРОГО ДЕЙСТВИЯ ФОС И ИХ АНТИДОТОВ НА ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА

8.1. Фагоцитарно-метаболическая активность нейтрофилов после острой интоксикации ФОС в комбинации с антидотами

Исследование фагоцитарно-метаболической активности нейтрофилов (ФМАН) после острого действия ФОС и их комбинированного эффекта с антидотами показало (рис. 8.1), что на 5 сут отмечается снижение индекса активности нейтрофилов в спонтанном НСТ-тесте после действия метафоса, хлорофоса и ДДВФ соответственно в 2,07; 1,72 и 1,48 раза ($p < 0,05$). Учитывая наибольшее снижение показателя под влиянием метафоса, именно данное соединение применялось в последующем в комбинации с антидотами.

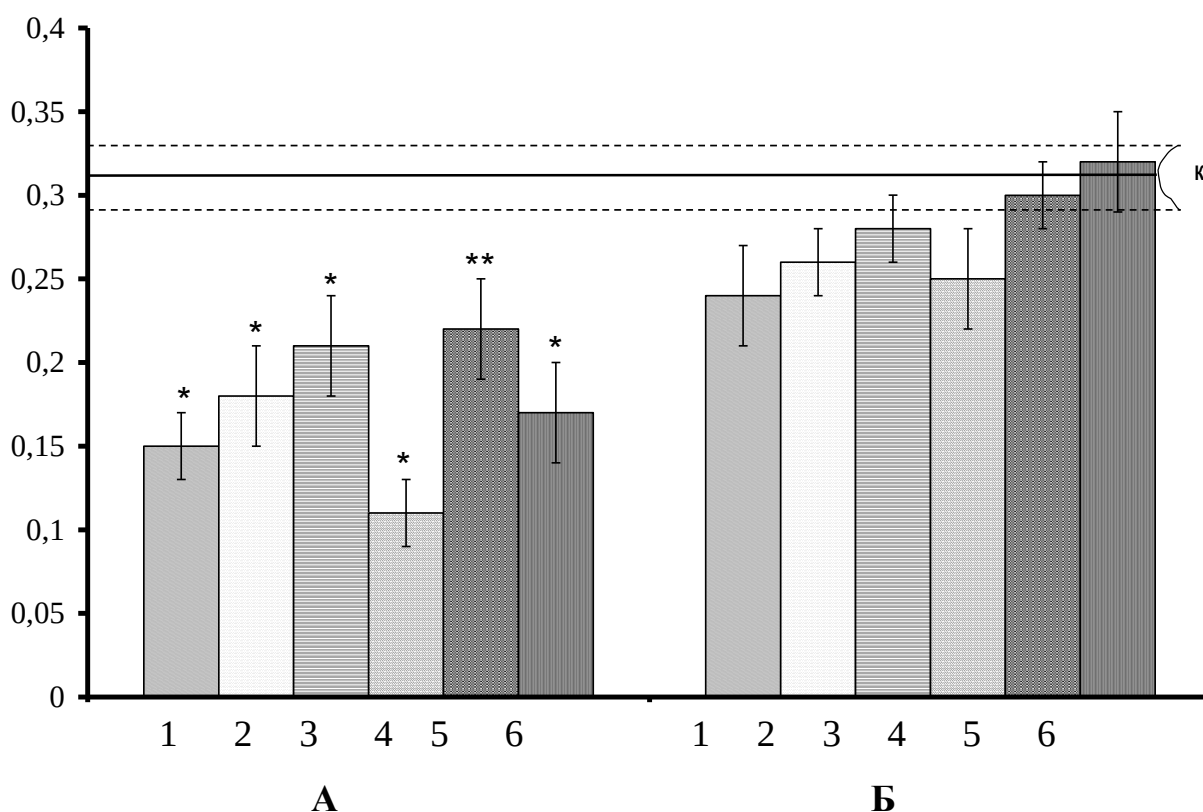


Рис. 8.1. Влияние острого отравления ФОС ($0,75 \text{ DL}_{50}$) в комбинации с их антидотами на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов крыс (индекс активности нейтрофилов) ($M \pm m$)

По оси абсцисс: А, Б – срок наблюдения соответственно 5 и 10 сут; 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: индекс активности нейтрофилов, К – контроль; в каждой серии использовалось 13-15 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

При действии метафоса в комбинации с атропином сульфатом, карбоксимом и двумя антидотами в сочетании установлено уменьшение ФМАН соответственно в 2,82; 1,41 и 1,82 раза ($p < 0,05$). Под влиянием карбоксима происходило статистически значимое увеличение активности ФМАН по сравнению с показателем при интоксикации метафосом ($p < 0,05$). При этом показатель оставался ниже контрольного уровня. Атропин несущественно усиливал редукцию ФМАН, вызванную ФОС.

На 10 сут после действия ФОС, а также метафоса в комбинации с атропином зарегистрирована несущественная супрессия ФМАН, которая находилась в пределах от 9,7 до 22,6% ($p > 0,05$), что свидетельствует о частичном восстановлении исследованного параметра. После отравления метафосом в комбинации с карбоксимом, а также с атропином в сочетании с карбоксимом показатели практически не отличались от контрольного значения.

По степени снижения ФМАН ФОС в порядке уменьшения эффекта располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Необходимо отметить, что, несмотря на отсутствие достоверности различий показателей, можно предполагать, что наибольшее снижение показателя (также как и активности лизоцима и ТКБ) на 10 сут характерно после отравления хлорофосом и метафосом, наименьшее – после отравления ДДВФ.

Наименее выраженная супрессия показателя по длительности эффекта и его интенсивности у метафоса и хлорофоса по сравнению с ДДВФ обусловлено действием метаболитов метафоса и хлорофоса (соответственно метаоксона и диметилдихлорвинилфосфата).

С целью изучения ФМАН в полном объеме (кислородзависимые системы) нами оценивались в динамике фагоцитарный показатель (число поглощенных микробных тел по отношению к общему числу клеток) и фагоцитарное число (среднее число поглощенных микроорганизмов фагоцитом), а также индуцированная зимозаном активность нейтрофилов в НСТ-тесте при интоксикации метафосом, наиболее токсичным из применявшихся ФОС.

Установлено (табл. 8.1), что под влиянием метафоса существенно снижался фагоцитарный показатель, фагоцитарное число и индекс активности нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте через 1 сут соответственно в 2,16; 2,31 и 1,53 раза, через 3 сут - в 1,70; 1,87 и 1,38 раза, а через 5 сут - в 1,43; 1,54 и 1,25 раза соответственно ($p < 0,05$). На 10 сут показатели достоверно не отличались от контрольных уровней.

Применение после интоксикации ФОС атропина приводило к усилению супрессии параметров, причем ФМАН в индуцированном НСТ-тесте достоверно уменьшалась по сравнению с показателем при интоксикации через 1-3 сут ($p < 0,05$).

**- в экспериментах, изложенной в данной главе, а также в их описании принимала участие И.Х. Яфарова*

Таблица 8.1. Изменение фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов крыс после острого отравления метафосом (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотами на 1-10 сут (M_{±m})

Токсиканты		Срок наблюдения, сут			
		1	3	5	10
Контроль (22)	ФП	28,7 $\pm$ 0,8			
	ФЧ	2,10 $\pm$ 0,20			
	НСТ инд	0,55 $\pm$ 0,02			
Метафос	ФП	13,5 $\pm$ 1,7*	16,9 $\pm$ 2,0*	20,0 $\pm$ 2,1*	25,0 $\pm$ 2,4
	ФЧ	0,91 $\pm$ 0,18*	1,12 $\pm$ 0,19*	1,36 $\pm$ 0,20*	1,90 $\pm$ 0,23
	НСТ инд	0,36 $\pm$ 0,03*	0,40 $\pm$ 0,03*	0,44 $\pm$ 0,03*	0,50 $\pm$ 0,03
Метафос+ атропин	ФП	9,4 $\pm$ 0,8*	16,9 $\pm$ 2,3*	20,0 $\pm$ 2,2*	26,0 $\pm$ 2,2
	ФЧ	0,53 $\pm$ 0,20*	0,70 $\pm$ 0,17*	0,96 $\pm$ 0,15*	1,80 $\pm$ 0,14
	НСТ инд	0,25 $\pm$ 0,02**	0,30 $\pm$ 0,03**	0,39 $\pm$ 0,03*	0,46 $\pm$ 0,03*
Метафос+ карбоксим	ФП	21,2 $\pm$ 1,6**	23,2 $\pm$ 2,1**	24,2 $\pm$ 2,0*	26,4 $\pm$ 2,3
	ФЧ	1,41 $\pm$ 0,19**	1,45 $\pm$ 0,20*	1,50 $\pm$ 0,17*	1,92 $\pm$ 0,19
	НСТ инд	0,33 $\pm$ 0,02**	0,40 $\pm$ 0,03*	0,46 $\pm$ 0,02*	0,50 $\pm$ 0,04
Метафос+ атропин + карбоксим	ФП	19,2 $\pm$ 1,6**	20,1 $\pm$ 2,0*	20,5 $\pm$ 2,1*	24,8 $\pm$ 2,4
	ФЧ	1,30 $\pm$ 0,19*	1,39 $\pm$ 0,18*	1,45 $\pm$ 0,17*	1,81 $\pm$ 0,18
	НСТ инд (иан)	0,33 $\pm$ 0,02**	0,36 $\pm$ 0,03*	0,40 $\pm$ 0,02*	0,49 $\pm$ 0,04

Примечание: ФП, ФЧ – соответственно фагоцитарный показатель, фагоцитарное число; НСТ инд – НСТ-тест индуцированный; иан – индекс активности нейтрофилов; в скобках – число крыс; в каждой серии использовалось 7-10 животных; * - различие с контролем достоверно $p < 0,05$; ** - различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

Индуцированный НСТ-тест оставался сниженным до 10 сут. Карбоксим после отравления метафосом увеличивал ФМАН в течение 1-10 сут. При этом существенное повышение фагоцитарного показателя, фагоцитарного числа, а также индуцированной зимозаном активности нейтрофилов в НСТ-тесте была зарегистрирована через 1 сут по сравнению с показателями при отравлении. На 3 сут карбоксим достоверно повышал по сравнению с параметрами при отравлении ФОС только фагоцитарный показатель. Параметры, которые существенно повышались под влиянием карбоксима, оставались достоверно более низкими, чем в контроле.

Комбинированное применение двух антидотов атропина и карбоксима приводило к увеличению показателей по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС в комбинации с атропином, и их уменьшению по сравнению со значениями показателей при интоксикации ФОС и использовании карбоксима.

Результаты, полученные в НСТ-тесте, свидетельствуют, что действие ТХ на ФМАН реализуется вследствие взаимодействия токсикантов и их метаболитов с НАДФ·Н, НАДФ⁺. Это подтверждают данные литературы,

полученные при исследовании других групп ядов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Таким образом, после острого действия ФОС через 1-5 сут отмечалось снижение ФМАН с практически полным восстановлением параметров на 10 сут, за исключением индекса активности нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте. По степени снижения ФМАН (интенсивности и длительности эффекта) ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Выявлена более выраженная редукция показателя при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал супрессию ФМАН.

8.2. Сывороточная активность лизоцима при остром отравлении ФОС в комбинации с их антидотами

Нами установлено, что после острого действия метафоса, хлорофоса ДДВФ в дозе 0,75 DL₅₀ (рис. 8.2) на 4 сут происходило уменьшение сывороточной активности лизоцима соответственно в 1,94; 1,72 и 1,62 раза ($p < 0,05$).

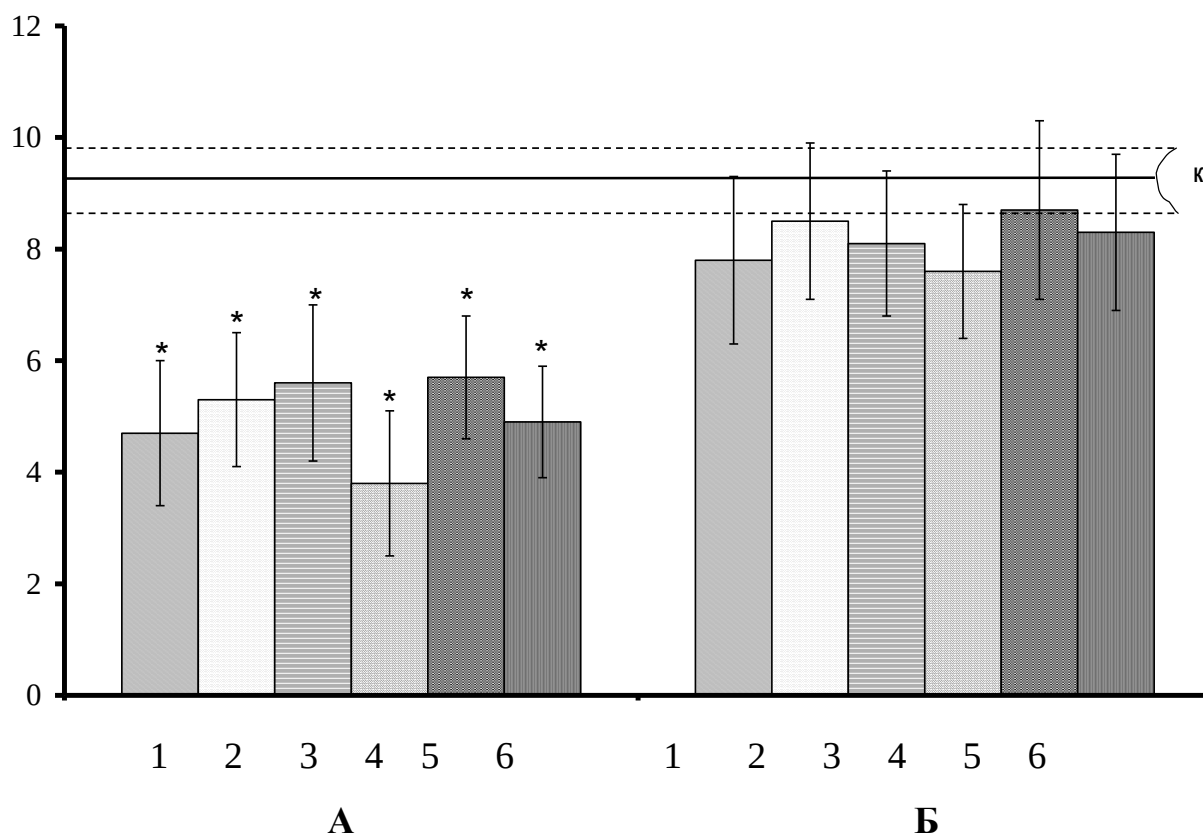


Рис. 8.2. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с их антидотами на активность лизоцима сыровотки крови крыс, мг/л ($M \pm m$)

По оси абсцисс: А, Б – срок наблюдения соответственно 5 и 10 сут; 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: активность лизоцима, мг/л, К – контроль; в каждой серии использовалось 12-15 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Учитывая наибольшее снижение показателя под влиянием метафоса, именно данное соединение применялось в последующем в комбинации с антидотами.

При действии метафоса в комбинации с атропином сульфатом, карбоксимом и в сочетании с двумя этими антидотами установлено уменьшение активности лизоцима соответственно в 2,39; 1,60 и 1,86 раза ($p < 0,05$). Несмотря на то, что различия между показателями после применения ФОС в комбинации с антидотами были незначительны, прослеживаются тенденции соответственно к увеличению и снижению супрессии активности лизоцима под влиянием атропина и карбоксима.

На 10 сут после действия ФОС, а также ФОС в комбинации с антидотами зарегистрирована незначительная супрессия синтеза лизоцима, которая находилась в пределах от 3,3 до 14,2% ($p > 0,05$), что свидетельствует о практически полном восстановлении исследованного показателя.

Комбинированное применение двух антидотов атропина и карбоксима приводило к увеличению показателя по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС в комбинации с атропином, и их уменьшению по сравнению с показателем при интоксикации ФОС и использовании карбоксима.

По интенсивности супрессии активности лизоцима ФОС в порядке снижения эффекта располагались в последовательности: метафос, ДДВФ, хлорофос. Необходимо отметить, что максимальное снижение показателя на 10 сут зарегистрировано после отравления хлорофосом и метафосом, минимальное – после действия ДДВФ.

Снижение активности лизоцима под влиянием ФОС, вероятно, связана с ингибированием эстераз клеток крови, как самим ФОС (ДДВФ), так и соединениями, образующимися в результате их метаболизма (продуктами биотрансформации хлорофоса и метафоса соответственно диметилдихлорвинилфосфатом и метаоксоном) [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983; Филов В.А., 2002; Забродский, П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Таким образом, после действия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 5 сут отмечается снижение активности лизоцима сыворотки крови с практически полным восстановлением показателя на 10 сут. По степени снижения показателя ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Установлена более выраженная супрессия показателя при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал редукцию активности лизоцима.

8.3. Сывороточная активность тромбоцитарного катионного белка при остром действии ФОС в сочетании с антидотами

Оценка активности тромбоцитарного катионного белка (ТКБ) сыворотки крови после острого действия ФОС показала (рис. 8.3), что на 5 сутки после интоксикации отмечается снижение показателя после действия метафоса, хлорофоса и ДДВФ соответственно в 1,52; 1,29 и 1,22 раза ($p < 0,05$). Принимая во внимание то, что максимальная редукция параметра выявлена под влиянием метафоса, именно данное ФОС применялось в последующем в комбинации с антидотами.

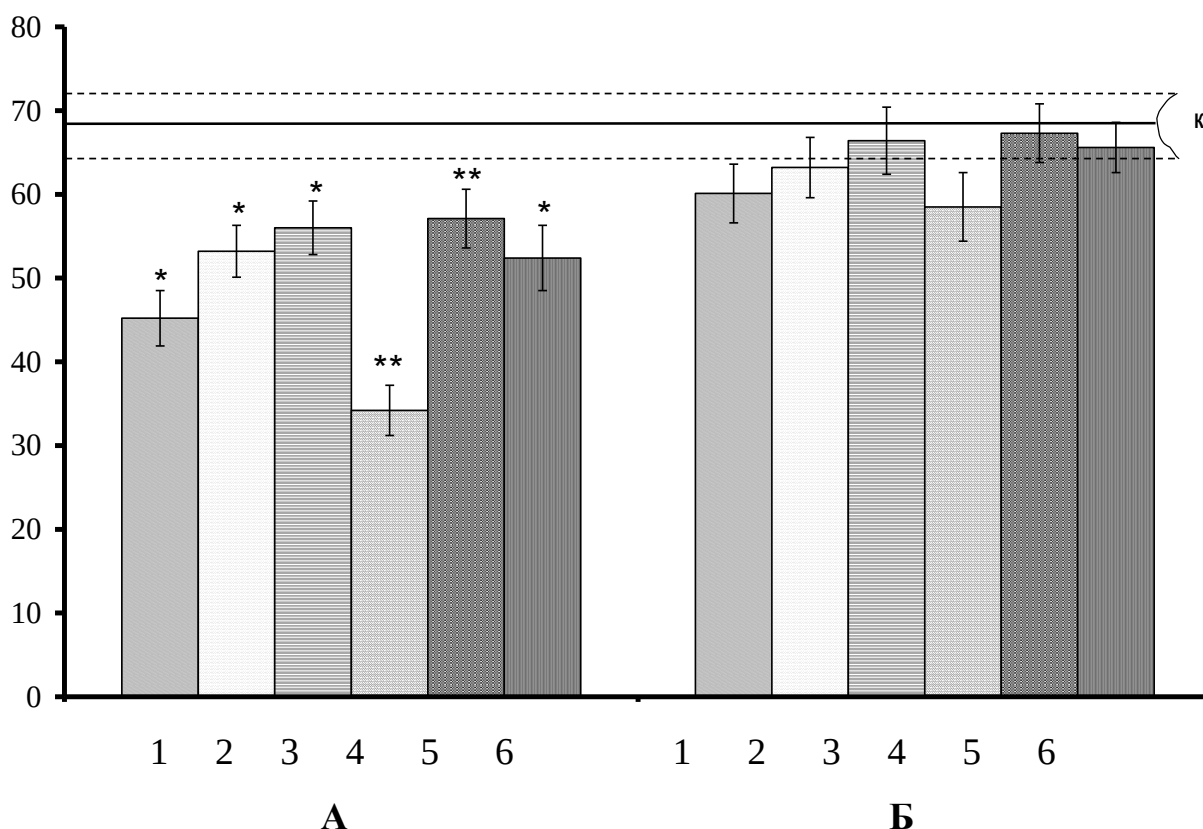


Рис. 8.3. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с их антидотами на активность тромбоцитарного катионного белка сыворотки крови крыс, % (M±m)

По оси абсцисс: А, Б – срок наблюдения соответственно 5 и 10 сут; 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: активность тромбоцитарного катионного белка, %, К – контроль; в каждой серии использовалось 12-15 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

При действии метафоса в комбинации с атропином сульфатом, карбоксимом и двумя антидотами в сочетании установлено снижение содержания ТКБ в сыворотке крови соответственно в 2,00; 1,20 и 1,31 раза ($p < 0,05$). Под влиянием атропина и карбоксима происходило соответственно снижение и увеличение активности ТКБ по сравнению с показателем при

интоксикации ФОС ($p < 0,05$). При этом показатели оставались ниже контрольного уровня.

Комбинированное применение двух антидотов атропина и карбоксима приводило к увеличению показателя по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС в комбинации с атропином, и их уменьшению по сравнению с показателем при интоксикации ФОС и использовании карбоксима.

На 10 сут после действия ФОС и комбинации метафоса с атропином и дипироксимом происходило практически полное восстановление исследованного показателя.

По интенсивности редукции активности ТКБ ФОС в порядке снижения эффекта располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Несмотря на отсутствие значимых различий между показателями в контроле и экспериментальных сериях, следует отметить, что максимальное снижение показателя на 10 сут зарегистрировано после отравления хлорофосом и метафосом, минимальное – после действия ДДВФ. Так, после действия метафоса и ДДВФ активность ТКБ оставалась сниженной соответственно на 12,3 и 3,1%.

Таким образом, после действия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 5 сут отмечается снижение активности ТКБ сыворотки крови с практически полным восстановлением параметра на 10 сут. По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах (интенсивности и длительности) располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Отмечается более выраженная редукция активности ТКБ при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал супрессию активности ТКБ.

Резюме

После действия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 5 сут отмечается снижение активности лизоцима сыворотки крови с практически полным восстановлением показателя на 10 сут. Установлена более выраженная супрессия показателя при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал редукцию активность лизоцима.

Острое отравление ФОС, а также комбинированное действия ФОС и атропина на 5 сут снижает активность ТКБ сыворотки крови с практически полным восстановлением параметра на 10 сут. Отмечается более выраженная редукция активности ТКБ при комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС снижал супрессию активности ТКБ.

После острого действия метафоса через 1-5 сут отмечалось снижение ФМАН с практически полным восстановлением параметров на 10 сут, за исключением индекса активности нейтрофилов в индуцированном НСТ-тесте. Выявлена более выраженная редукция показателя при

комбинированном действии ФОС и атропина; карбоксим после отравления ФОС уменьшал снижение ФМАН.

Комбинированное применение двух антидотов атропина и карбоксима приводило к увеличению показателей НРО по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС в комбинации с атропином, и их уменьшению по сравнению со значениями показателей при интоксикации ФОС и использовании карбоксима.

При математической обработке непараметрическими и параметрическими статистическими методами (путем вычисления средних значений супрессии при отравлении метафосом, хлорофосом и ДДВФ) установлено, что статистически значимо ($p < 0,05$) ФОС в эквивалентных дозах в порядке уменьшения факторов НРО располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Максимальная редукция параметров при эквивалентных дозах по длительности эффекта отмечается при интоксикации метафосом, а минимальная – после острого отравления ДДВФ.

ГЛАВА 9. ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ОТРАВЛЕНИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ В КОМБИНАЦИИ С ИХ АНТИДОТАМИ НА СИСТЕМУ ИММУНИТЕТА

9.1. Оценка содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета и циркулирующей крови под влиянием ФОС в комбинации с их антидотами

В тимусе происходит созревание и дифференцировка незрелых Т-клеток, которые мигрируют в этот орган из костного мозга. В литературе клетки, мигрирующие из костного мозга в тимус, называют также претимоцитами или лимфоцитами-прекурсорами [Мальцева Г.М., 2002; Ройт А., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Проведенные эксперименты показали (рис. 9.1), что под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ содержание лимфоцитов в тимусе на 2 сут снижалось соответственно в 1,89; 1,55 и 1,46 раза ($p < 0,05$), а в селезенке - 1,99; 1,88 и 1,66 раза ($p < 0,05$).

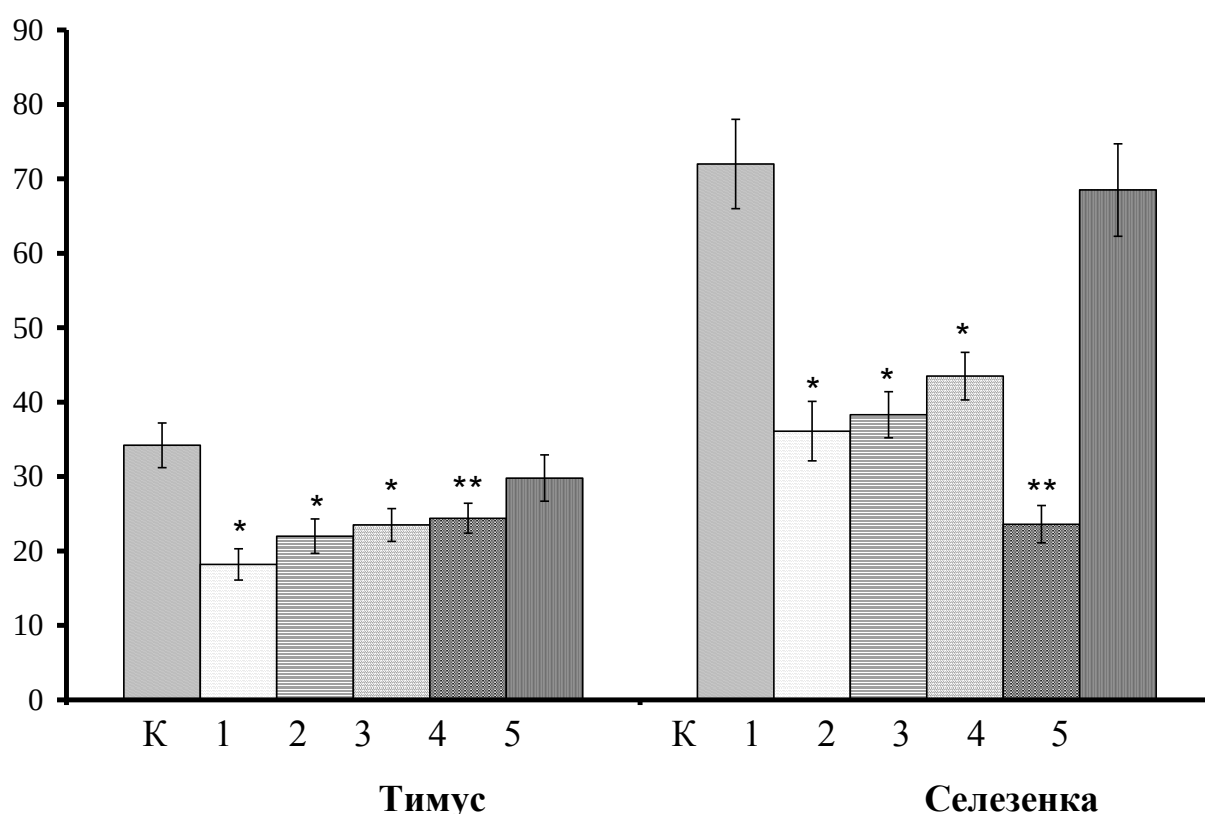


Рис. 9.1. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов в тимусе и селезенке крыс на 2 сут, $\cdot 10^7$ ($M \pm m$)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим; по оси ординат: содержание лимфоцитов в органе, $\cdot 10^7$; в каждой серии использовалось 7-9 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

Сочетание метафоса с атропином и карбоксимом уменьшало число Т-лимфоцитов в тимусе крыс на 2 сут соответственно в 1,55 и 1,45 раза ($p < 0,05$), а число лимфоцитов в селезенке - в 1,89 и 1,65 раза ($p < 0,05$) соответственно.

Атропин существенно снижал редукцию числа лимфоцитов в тимусе, вызванную метафосом, и оказывал противоположный эффект на содержание лимфоцитов в селезенке, усиливая редуцирующий эффект ФОС. Так, под влиянием атропина по сравнению с интоксикацией метафосом число лимфоцитов в селезенке возрастало в 1,34 раза ($p < 0,05$), оставаясь ниже контрольного значения.

Карбоксим восстанавливал число лимфоцитов в тимусе и селезенке практически до контрольного уровня. Результаты исследований свидетельствуют о том, что ФОС способны усиливать миграцию из тимуса и селезенки лимфоцитов в циркулирующую кровь, вероятно вследствие реализации перераспределения лимфоцитов (действия кортикостероидов и катехоламинов) [Горизонтов П.Д., 1981; Забродский П.Ф., 2002; Dhabhar F. S. et al., 1996; Pruett S., 2008].

Органы иммунной системы тесно взаимосвязаны. Известно, что тимэктомия приводит к существенному снижению содержания лимфоцитов в органах системы иммунитета вследствие супрессии лимфоидного ростка кроветворения [Жданов В.В. и соавт., 2002].

В селезенке холинергическая иннервация отсутствует, за исключением м-холинорецепторов, локализованных на пресинаптических мембранах α -адренергических нервных окончаний [Rinner I, Schauenstein K., 1991], поэтому, атропин не только не способен снизить миграцию лимфоцитов из нее, но даже усиливает этот процесс вследствие относительного увеличения активности симпатического отдела вегетативной нервной системы. Известно, что норадреналин и адреналин увеличивают миграцию лимфоцитов из селезенки, активируя ее α -адренорецепторы [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

После действия ФОС, а также их комбинаций с антидотами на 10 сут число лимфоцитов в тимусе и селезенке восстанавливалось до контрольных значений (табл. 9.1).

Таким образом, после острого воздействия ФОС в дозе 0,75 DL₅₀ зарегистрировано снижение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке на 2 сут с практически полным восстановлением показателей на 10 сут. По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Атропин существенно снижал редукцию числа лимфоцитов в тимусе, вызванную метафосом, и оказывал противоположный эффект на содержание лимфоцитов в селезенке, усиливая редуцирующий эффект ФОС. Карбоксим восстанавливал число лимфоцитов в тимусе и селезенке практически до контрольного уровня.

Таблица 9.1. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов в тимусе и селезенке крыс на 10 сут, $\cdot 10^7$ (M $\pm$ m)

Серии опытов	Число Т-лимфоцитов в тимусе	Число лимфоцитов в селезенке
Контроль	34,2 $\pm$ 3,0	72,0 $\pm$ 6,0
Метафос	30,1 $\pm$ 3,1	75,1 $\pm$ 6,3
Хлорофос	31,5 $\pm$ 3,2	73,2 $\pm$ 6,2
ДДВФ	33,7 $\pm$ 3,5	76,6 $\pm$ 6,1
Метафос+атропин	35,0 $\pm$ 3,3	74,8 $\pm$ 6,7
Метафос+ карбоксим	37,4 $\pm$ 3,6	70,4 $\pm$ 6,5

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 9 крыс.

В результате проведенных опытов нами показано (рис. 9.2), что под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ число лимфоцитов в костном мозге крыс на 2 сут увеличивалось соответственно в 1,24; 1,20 и 1,21 раза ($p < 0,05$), а число лимфоцитов в лимфоузлах - в 1,28; 1,30 и 1,27 раза ($p < 0,05$) соответственно. Существенных различий между эффектами различных ФОС выявлено не было. Атропин и карбоксим полностью восстанавливали число Т-лимфоцитов в костном мозге и лимфоузлах до контрольного уровня.

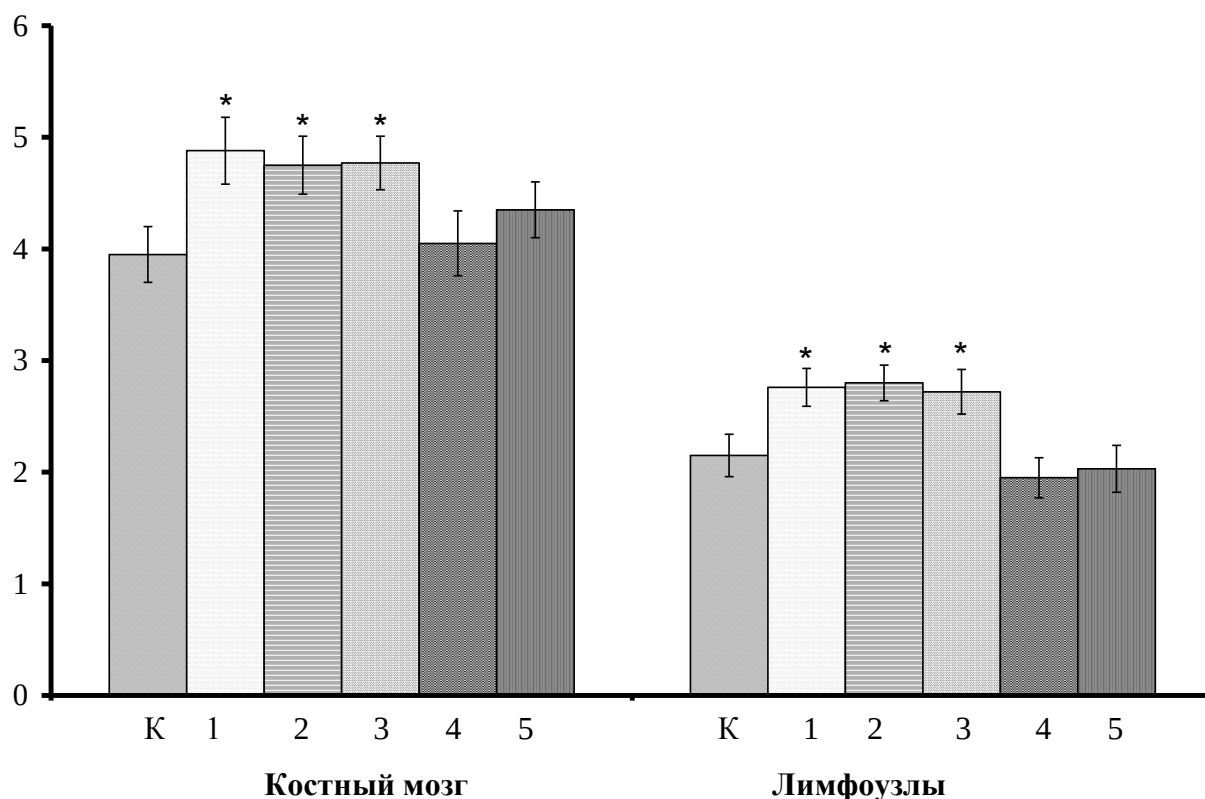


Рис. 9.2. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов ($\cdot 10^7$) в костном мозге и лимфоузлах у крыс на 2 сут (M $\pm$ m)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим; по оси ординат: содержание лимфоцитов в органе, $\cdot 10^7$; в каждой серии использовалось 7-9 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

На 10 сут содержание лимфоцитов в костном мозге и лимфоузлах под влиянием ФОС, а также их комбинации с атропином и карбоксимом восстанавливалось до контрольного уровня (табл. 9.2).

Таблица 9.2. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов ($\cdot 10^7$) в костном мозге и лимфоузлах у крыс на 10 сут ($M \pm m$)

Серии опытов	Костный мозг	Лимфоузлы
Контроль	3,95 $\pm$ 0,25	2,15 $\pm$ 0,19
Метафос	3,62 $\pm$ 0,29	1,98 $\pm$ 0,17
Хлорофос	3,53 $\pm$ 0,30	2,04 $\pm$ 0,19
ДДВФ	3,31 $\pm$ 0,31	1,88 $\pm$ 0,20
Метафос+атропин	3,40 $\pm$ 0,33	2,17 $\pm$ 0,18
Метафос+ карбоксим	3,80 $\pm$ 0,32	1,93 $\pm$ 0,21

Примечание: в каждой серии использовалось от 7 до 8 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

После острой интоксикации ФОС отмечалось увеличение лимфоцитов в циркулирующей крови на 2 сут (табл. 9.3).

Таблица 9.3. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотами на содержание лимфоцитов ($\cdot 10^9$ /л) в циркулирующей крови у крыс ($M \pm m$)

Серии опытов	Время после интоксикации, сут	
	2	10
Контроль	8,5 $\pm$ 0,2	
Метафос	9,2 $\pm$ 0,2*	8,2 $\pm$ 0,3
Хлорофос	9,8 $\pm$ 0,3*	7,8 $\pm$ 0,4
ДДВФ	9,5 $\pm$ 0,3*	8,7 $\pm$ 0,3
Метафос+атропин	8,4 $\pm$ 0,2	8,3 $\pm$ 0,4
Метафос+ карбоксим	8,7 $\pm$ 0,4	9,0 $\pm$ 0,5

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

Применение антидотных средств атропина и карбоксима после отравления ФОС полностью восстанавливало содержание лимфоцитов в крови. На 10 сут содержание лимфоцитов в крови влиянием ФОС, а также их комбинации с атропином и карбоксимом восстанавливалось до контрольного уровня.

Вполне естественно, что антитоды ФОС, блокируя м-холинорецепторы тимуса, а также, снижая эффект интоксикации путем реактивации холинэстеразы, приводят к восстановлению содержания лимфоцитов в лимфоидных органах.

Полученные данные, свидетельствующие о восстановлении количества лимфоцитов в органах системы иммунитета средствами специфической терапии, во-первых, не могут служить основанием для заключения о восстановлении функции лимфоцитов при отравлении ФОС антитодами, а во-вторых, результаты исследований позволяют полагать, что кроме антитодов для нормализации исследованных показателей в использовании иных медикаментозных средств нет необходимости.

Таким образом, на 2 сут после действия ФОС вследствие перераспределения лимфоцитов между органами иммунной системы отмечалось их увеличение в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови. На 10 сут показатели после воздействия ФОС существенно не отличались от контрольного уровня. Антитодные средства ФОС атропин и карбоксим практически полностью восстанавливали содержание лимфоцитов в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови.

9.2. Воздействие острого отравления фосфорорганическими соединениями в комбинации с их антитодами на клеточные иммунные реакции

9.2.1. Изучение функции Th1-лимфоцитов

Оценка функции Th1-лимфоцитов по формированию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) после воздействия ФОС, а также их комбинации с атропином и карбоксимом в модели, не связанной с переносом клеток, позволяет установить их действие на первичный клеточный иммунный ответ, в частности, на функцию Th1-клеток и продукцию ими ИЛ-12, γ -интерферона, β -фактора некроза опухоли и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) лимфоцитов, а также на участвующие в реализации гиперчувствительности IV типа Т-клетки памяти и макрофагов [Ройт А. и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993]. Исследование формирования ГЗТ под влиянием ФОС в комбинации с антитодами в модели с переносом сенсibilизированных лимфоцитов от крыс-доноров сингенным реципиентам позволяет оценить вторичный клеточный иммунный ответ.

В результате экспериментов на крысах популяции Вистар нами установлено (рис. 9.3), что под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ происходило снижение реакции ГЗТ (без переноса клеток) соответственно в 2,13; 1,93 и 1,66 раза ($p < 0,05$). Применение антитода ФОС атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на функцию Th1-клеток, а карбоксима – уменьшало ($p < 0,05$). При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Так, под влиянием атропина по

сравнению с контролем и показателем при интоксикации метафосом реакция ГЗТ снижалась соответственно в 3,38 и 1,59 раза ($p < 0,05$), оставаясь ниже контрольного значения, а карбоксим увеличивал по сравнению с параметром при отравлении формирование ГЗТ в 1,61 раза ($p < 0,05$). Комбинация антидотов атропина и карбоксима частично восстанавливала реакцию ГЗТ, которая оставалась ниже контрольного значения.

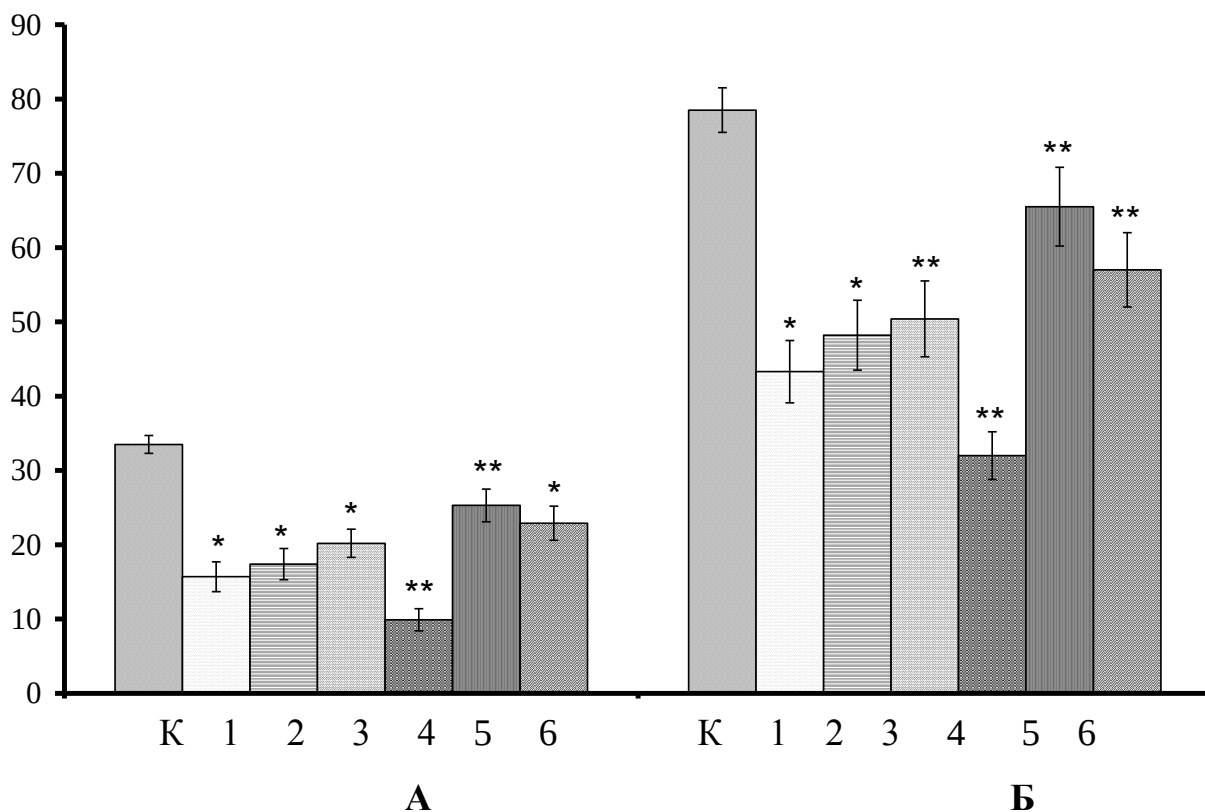


Рис. 9.3. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотами на функцию Th1-лимфоцитов крыс по формированию гиперчувствительности замедленного типа (прирост массы задней стопы, %) [M±m]

По оси абсцисс: А, Б – реакция без переноса и с переносом клеток соответственно; 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: прирост массы задней стопы, %, К – контроль (n=21); в каждой серии использовалось 7-8 животных; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

Аналогичные результаты получены при использовании модели, связанной с переносом спленоцитов крысам-реципиентам после иммунизации крыс-доноров (реакция ГЗТ отражала формирование вторичного клеточного иммунного ответа). Полученные нами данные показали, что данные ФОС снижали реакцию ГЗТ соответственно в 1,81; 1,63 и 1,56 раза ($p < 0,05$), метафос в комбинации с атропином в 2,45 раза ($p < 0,05$). Карбоксим в комбинации с ФОС увеличивал реакции по сравнению с параметром при отравлении в 1,51 раза ($p < 0,05$). Комбинация антидотов

атропина и карбоксима частично восстанавливала формирование ГЗТ. При этом реакция оставалась ниже контрольного уровня, также как при изолированном использовании атропина и карбоксима.

По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ.

Следует отметить, что кроме Th1-лимфоцитов в реакции ГЗТ, ФОС, вероятно, поражают кератиноциты, клетки Лангерганса кожи, Т-клеток памяти и макрофаги [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М и соавт., 2002; Kimber I., 1996].

Таким образом, после воздействия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина зарегистрирована редукция формирования ГЗТ, характеризующей, как первичный, так и вторичный иммунный ответ, и свидетельствующей о поражении Th1-клеток. По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Отмечается более выраженное снижение реакции ГЗТ при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал реакцию ГЗТ (функцию Th1-клеток).

9.2.2. Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности

Реализацию антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) обеспечивают клетки-киллеры - К-клетки (кроме миелоидных). Доказано, что эти клетки идентичны естественным клеткам-киллерам (ЕКК), использующим для усиления реакции антитела (IgG) [Ройт А. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lanier L. L., 2003; Hansasuta P. et al., 2004; Lee J. C., et al., 2004; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006]. Естественные клетки-киллеры (ЕКК), активированные связанными с клеткой-мишенью (например, клеткой, пораженной вирусом) антителами, уничтожают ее. При этом антитела (IgG) привлекают своим Fc-хвостом ЕКК, имеющие для этого соответствующий рецептор FcγRIII. Возникает комплекс клетка-мишень – антитело – ЕКК, в котором ЕКК реализует свою киллерную функцию в отношении клетки-мишени [Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Хаитов Р. М., 2006; Garrity D. et al., 2005].

Помимо ЕКК в эту систему АЗКЦ входят моноциты, полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ) – базофилы, эозинофилы, сегментоядерные лейкоциты, а также другие фагоцитирующие и нефагоцитирующие миелоидные клетки [Ройт А. и соавт., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003]. В использованной нами модели эксперимента исследовалась вся система АЗКЦ: ЕКК (большие зернистые лимфоциты) и ПЯЛ в индуктивном (действие ФОС в комбинации с антителами практически одновременно с иммунизацией ЭБ) и продуктивном периодах иммуногенеза (действие факторов и их сочетания на 3 сут после иммунизации).

При действии ФОС в дозе 0,75 DL₅₀ в комбинации с антителами на АЗКЦ селезенки крыс при иммунизации ЭБ одновременно с интоксикацией и

на 3 сут после нее (индуктивный и продуктивный периоды иммуногенеза) происходило статистически значимое уменьшение исследованного показателя при остром отравлении всеми исследованными ФОС ($p < 0,05$) на 5 сут после иммунизации (рис. 9.4).

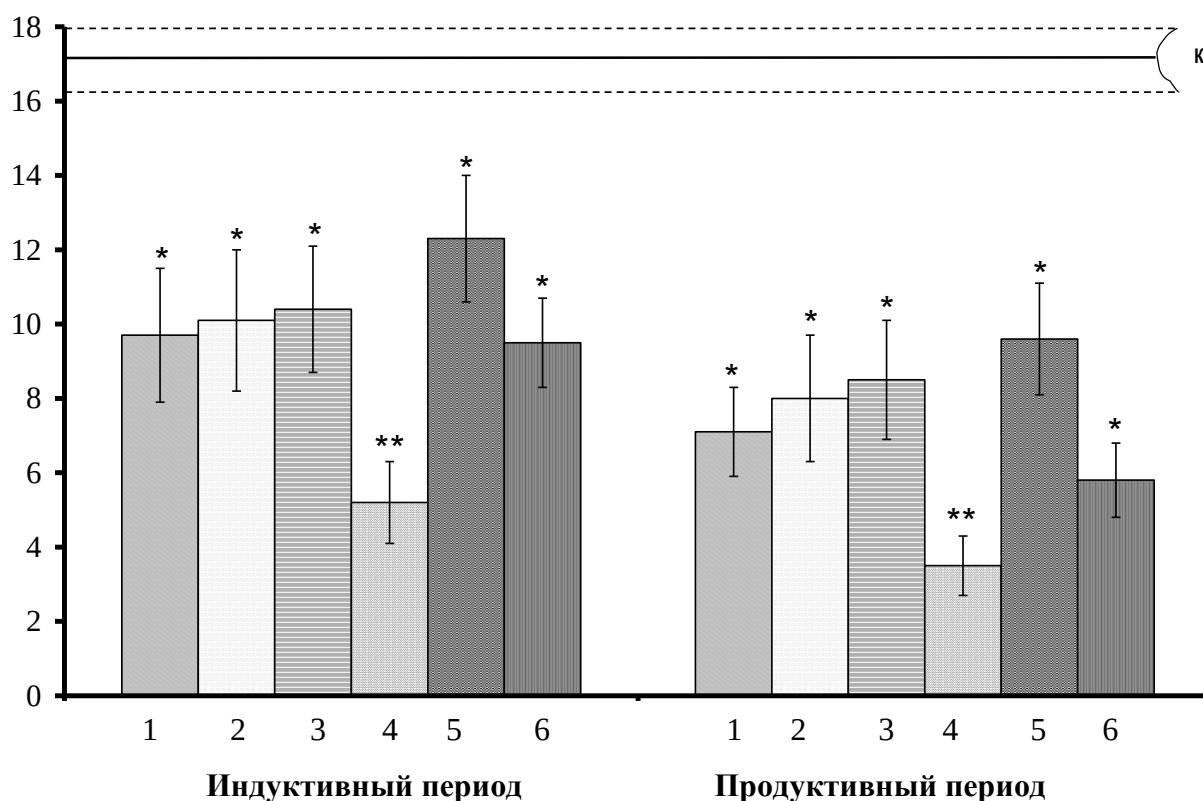


Рис. 9.4. Влияние острого отравления ФОС ($0,75 \text{ DL}_{50}$) в комбинации с антидотами на антителозависимую клеточную цитотоксичность спленоцитов крыс через 5 сут, % ($M \pm m$)

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: антителозависимая клеточная цитотоксичность, %, К – контроль ($n=21$); в каждой серии использовалось 7-10 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

Так, под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ в индуктивный период иммуногенеза происходило снижение АЗКЦ соответственно в 1,76; 1,69 и 1,64 раза ($p < 0,05$). Применение антидота ФОС атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на АЗКЦ ($p < 0,05$), а карбоксима – несущественно уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом АЗКЦ снижалась соответственно в 3,27 и 1,87 раза ($p < 0,05$), оставаясь ниже контрольного значения, а карбоксим увеличивал по сравнению с параметром при отравлении АЗКЦ в 1,27 раза ($p > 0,05$). Комбинация антидотов атропина и карбоксима не восстанавливала АЗКЦ, ее эффект был выше чем при действии ФОС и атропина и ниже, чем при действии ФОС и карбоксима..

Сравнение характера супрессии АЗКЦ в индуктивный и продуктивный периоды иммуногенеза показывает нарастание эффекта редукции при введении ФОС в комбинации с антитоксинами в продуктивный период формирования иммунного ответа. Существенных отличий в действии ФОС в комбинации с антитоксинами в индуктивной и продуктивной фазах иммуногенеза не выявлено.

По степени снижения параметра ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ, однако существенных различий в их действии на АЗКЦ не выявлено.

Вероятно ФОС снижают АЗКЦ вследствие нарушения связывания IgG (FcγR) с Fc рецепторами. Эти рецепторы связывают К-клетки с IgG-покрытыми клетками-мишенями, которые К-клетки способны уничтожить в «нормальных» условиях (без действия ФОС) [Delves P.J., Roitt I.M., 2000; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Таким образом, после воздействия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина зарегистрирована редукция АЗКЦ, как в индуктивный так продуктивный периоды иммуногенеза, что свидетельствует о поражении К-клеток. Отмечается более выраженное снижение АЗКЦ при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал АЗКЦ.

9.2.3. Оценка активности ЕКК селезенки

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. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Поверхность ЕКК имеет маркерные молекулы CD16, CD56, CD57 и CD94 (преимущественно ЕКК представлены клетками с маркерами CD16 и CD56) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lanier L. L., 2003].

При контакте с клетками опухоли и клетками, пораженными вирусами или паразитами, ксеногенными клетками ЕКК способны уничтожить их. ЕКК не обладают способностью к фагоцитозу [Ройт А. и соавт., 2000; Lanier L. L., 2003; Hansasuta P. et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Цитолиз клетки-мишени осуществляется проникновением ферментов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (порообразование перфорином) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Nogueira N., 1984; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; Lee J. C., et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Кроме того, ЕКК способны обеспечивать уничтожение чужеродной клетки путем реализации "дыхательного взрыва" (поражение активными

радикалами кислорода, гидроксильного радикала и т.п.), а также индукцией апоптоза. Активность ЕКК повышается интерферонами, интерлейкинами (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13) [Шуршалина А.В. и соавт., 2001; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986].

При контакте с клетками опухоли, клетками, пораженными вирусами или паразитами, ксеногенными клетками ЕКК способны уничтожать их без предварительного контакта с антигенами, находящимися на их поверхности. Они узнают определенные структуры высокомолекулярных гликопротеидов, которые экспрессируются на мембране инфицированных вирусом клеток. [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

На ЕКК локализованы киллер-активизирующие рецепторы, которые распознают множество различных молекул на поверхности всех ядерных клеток. На ЕКК находятся и киллер-ингибирующие рецепторы, распознают молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, которые также обычно присутствуют на всех ядерных клетках. Если активизирующие ЕКК «включаются», запускается команда, реализующая «киллинг» (уничтожение чужеродной клетки для ЕКК). Этот сигнал обычно отменяется запрещающим сигналом, который посылает ингибирующий рецептор ЕКК при распознавании им молекулы ГКГС класса I. Эта система используется ЕКК для того, чтобы распознать нормальные клетки и клетки, испытывающие на своей поверхности недостаток молекул главного комплекса гистосовместимости класса I. Киллер-активизирующие рецепторы распознают множество молекул, представленных на поверхности нормальных ядерных клеток, и, в отсутствии подавляющего сигнала от киллер-ингибирующих рецепторов киллер-активирующие рецепторы реализуют сигнал ЕКК атаковать и уничтожить другую клетку. Цитотоксические гранулы ЕКК, которые содержат перфорин и гранзимы, поляризуются на границе с клеткой-мишенью и затем проникают в клетку-мишень [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lee J. C., et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

При изучении влияния на ЕКК различных ФОС (а также наиболее токсичного метафоса в комбинации с антидотами) нами установлено (рис. 9.5; табл. 9.2), что происходило статистически значимое уменьшение активности ЕКК неинбредных белых крыс ($p < 0,05$) на 2 и 5 сут после интоксикации.

Так, под влиянием метафоса, хлорофоса и ДДВФ на 2 сут происходило снижение активности ЕКК соответственно в 2,39; 2,07 и 1,73 раза ($p < 0,05$). Применение антидота ФОС атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на активность ЕКК, а карбоксиа – существенно уменьшало ($p < 0,05$). При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом активность ЕКК снижалась

соответственно в 4,08 и 1,71 раза ($p < 0,05$), оставаясь ниже контрольного значения, а карбоксим увеличивал по сравнению с параметром при отравлении активность ЕКК в 1,66 раза ($p < 0,05$).

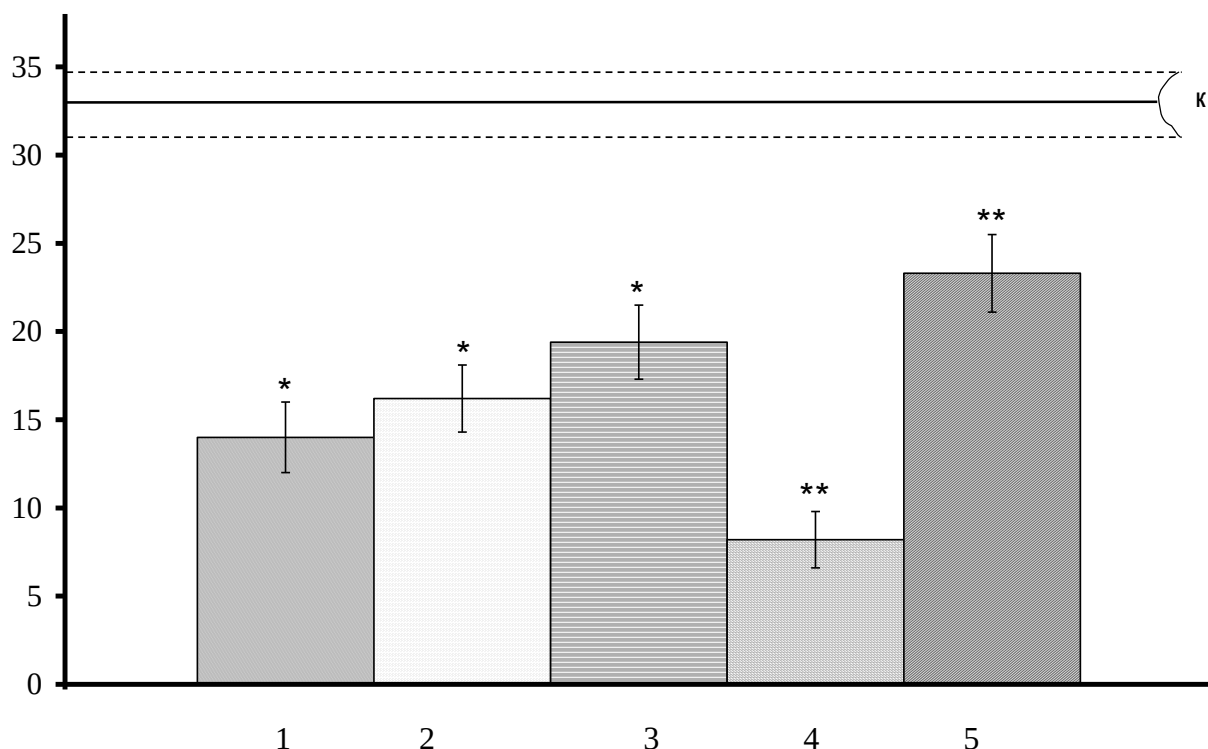


Рис. 9.5. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотными средствами на активность естественных клеток-киллеров крыс через 2 сут после интоксикации, % (M±m)

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: активность естественных клеток-киллеров, %, К – контроль (n=25); в каждой серии использовалось 7-9 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

Аналогичные но менее выраженные изменения активности ЕКК, были зарегистрированы на 5 сут.

На 10 сут происходило полное восстановление параметра как при отравлении ФОС так и при их комбинированном применении с антидотами.

По степени снижения параметра ФОС в эквилетальных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ.

Таким образом, после воздействия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина зарегистрирована супрессия активности ЕКК на 2 и 5 сут с восстановлением показателя на 10 сут после интоксикации. По степени снижения параметра ФОС в эквилетальных дозах располагались в

Таблица 9.2. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотными средствами на активность естественных клеток-киллеров крыс, % (M±m)

Серии опытов	Время после интоксикации, сут		
	2	5	10
Контроль	33,5±1,3 (25)		
Метафос	14,0±2,0*	15,7± 2,3*	28,5± 2,5
Хлорофос	16,2±1,9*	17,0±1,8*	29,0±2,4
ДДВФ	19,4±2,1*	18,1±2,0*	30,9±2,7
Метафос+атропин	8,2±1,6**	10,8±2,2**	28,8±2,6
Метафос+карбоксим	23,3±2,2**	25,1±2,5**	32,4±2,8

Примечание: в скобках – число животных; в каждой серии использовалось от 7 до 9 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** - различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Отмечается более выраженное снижение активности ЕКК при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал активность ЕКК.

9.3. Действие фосфорорганических соединений в комбинации с их антидотами на гуморальные иммунные реакции

9.3.1. Исследование Т-зависимой гуморальной иммунной реакции

В опытах на белых крысах оценивали действие острого отравления ФОС в комбинации с антидотными средствами на гуморальный иммунный ответ к тимусзависимому антигену эритроцитам барана (ЭБ) по числу антителообразующих клеток в селезенке через 5 сут при иммунизации ЭБ. Иммунизация проводилась одновременно с введением ФОС в комбинации с антидотами (оценка иммунной реакции в индуктивный период антителогенеза) на 3 сут после интоксикации (оценка антителообразования в продуктивный период антителогенеза). На 5 сут после введения ЭБ отмечается пик иммунного ответа, связанный с синтезом IgM [Ройт А. и соавт., 2000; Tumang J.R. et al., 1996; Delves P.J., Roitt I.M., 2000]. Принимая во внимание то, что Th1-лимфоциты участвуют не только в реализации клеточного иммунного ответа, но и в синтезе IgM [Pfeifer C. et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993], использованный тест дает представление о функциональной активности как В-лимфоцитов (плазмочитов), так и о Th1 -лимфоцитов [Ройт А. и соавт., 2000; Abbas A.K. et al., 1996; Fleisher T.A., Oliveira J.B., 2004; Maekawa Y., Yasutomo K., 2005].

Нами показано (рис. 9.6), что у белых крыс после острой интоксикации метафосом, хлорофосом и ДДВФ на 5 сут после иммунизации в индуктивный период иммуногенеза происходит существенное уменьшение

числа АОК соответственно в 2,33; 1,87 и 1,67 раза ($p<0,05$). По степени снижения числа АОК, синтезирующих IgM в селезенке, ФОС при их действии в индуктивной фазе иммуногенеза располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ.

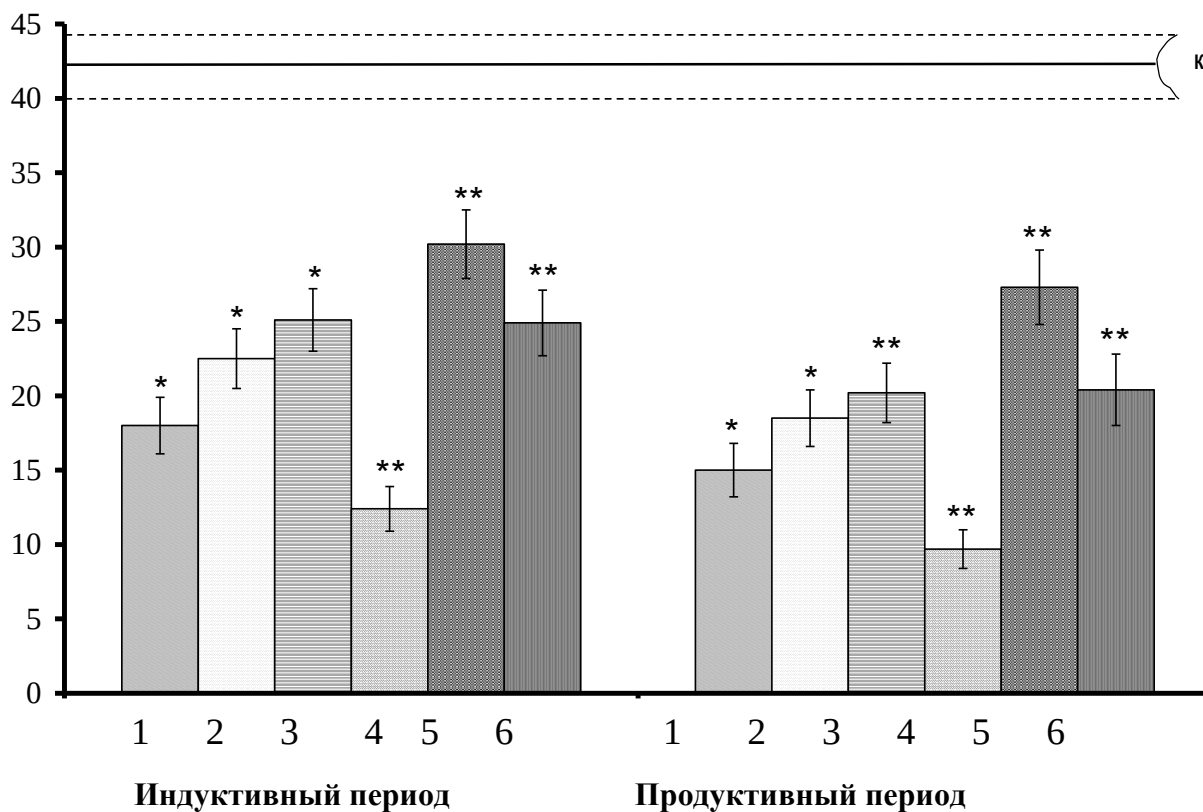


Рис. 9.6. Влияние острого отравления ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотными средствами на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана ($\cdot 10^3$), синтезирующим IgM, в селезенке белых крыс на 5 сут ($M \pm m$)

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: число антителообразующих клеток к эритроцитам барана, $\cdot 10^3$, К – контроль ($n=25$); в каждой серии использовалось 6-7 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p<0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p<0,05$.

Применение антидота ФОС атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана ($p<0,05$), а карбоксима – существенно уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом число антителообразующих клеток к эритроцитам барана снижалась соответственно в 3,39 и 1,45 раза ($p<0,05$), оставаясь ниже контрольного значения. Карбоксим и комбинация антидотов атропина и карбоксима увеличивали число антителообразующих клеток к эритроцитам барана по сравнению с показателем при интоксикации метафосом соответственно в 1,68 и 1,38 раза ($p<0,05$). При этом параметр оставался ниже контрольного уровня ($p<0,05$).

Все применявшиеся ФОС – метафос, хлорофос, ДДВФ – при их введении в продуктивный период антителогенеза вызывали более выраженное снижение АОК, чем продуктивный период иммуногенеза соответственно в 2,80; 2,27 и 2,08 раза ($p < 0,05$). Антидоты и их комбинация влияли на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана также, как и в индуктивной фазе иммуногенеза.

Данные наших исследований свидетельствуют о том, что под влиянием ФОС в продуктивной фазе иммуногенеза по сравнению с индуктивным периодом происходит более выраженная редукция функции Th1-лимфоцитов, индуцирующих продукцию иммуноглобулинов М, и В-клеток (плазмоцитов), синтезирующих IgM [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М., 2002; Pfeifer C. et al., 1991; Ellmeier W., 1999; Xiao W. et al. 2000; Grandmont M.J. et al., 2003; Woof J.M., Kerr M.A., 2004].

Это может быть вызвано большим поражающим эффектом ФОС в отношении синтеза IgM В-клетками (плазмоцитами) спленоцитов, нарушением процессов дифференцировки В-лимфоцитов, перераспределения лимфоцитов между органами системы иммунитета в период максимальной антителопродукции (3-5 сут после иммунизации), а также ингибирующим синтез антител действием кортикостероидов [Claman H.N., 1993; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], концентрация которых в крови при действии различных токсикантов увеличивается (стресс-реакция) [Селье Г., 1972; Забродский П.Ф., 2002; Pruett S., 2008].

Снижение Т-зависимой антителопродукции под влиянием ФОС, вероятно, обусловлено редукцией синтеза ряда лимфокинов, активирующих В-клетки [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Атропин усиливает супрессию антителообразования под влиянием ФОС, вероятно, вследствие блокады м-холинореактивных структур лимфоцитов в сочетании с ингибированием эстераз Т-клеток [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; MacManus J.P. et al., 1975;]. Не исключено, что данный антидот усиливает редукцию синтеза цитокинов Th1-лимфоцитами. Вполне естественно, что карбоксим, реактивируя ацетилхолинэстеразу Т-клеток, восстанавливает их активирующее действие на В-клетки, вероятно, повышая продукцию ими γ -интерферона [Ройт А. и соавт., 2000].

Таким образом, под влиянием острой интоксикации ФОС происходит снижение Т-зависимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителогенеза. По степени редукции синтеза IgM ФОС располагались в порядке снижения эффекта в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на гуморальный иммунный ответ, а карбоксима и его комбинации с атропином – снижало. При этом показатель Т-зависимого антителообразования оставались ниже контрольных значений.

9.3.2. Оценка влияния острого отравления ФОС в комбинации с антидотными средствами на число антителообразующих клеток в селезенке, синтезирующих IgG

Антителообразование на 14 сут после иммунизации ЭБ отражает синтез преимущественно IgG (преимущественно IgG1). Концентрация IgM в этот период практически не отличается от контрольного уровня [Ройт А. и соавт., 2000; Tumang J.R. et al., 1996; Delves P.J., Roitt I.M., 2000].

Исследование числа антителообразующих клеток в селезенке мышей, синтезирующих IgG, на 14 сут после иммунизации и после введения ФОС в комбинации с антидотами на 9 сут показало (рис. 9.7), что метафос, хлорофос, ДДВФ снижают исследованный показатель соответственно в 1,57; 1,42 и 1,27 раза ($p < 0,05$).

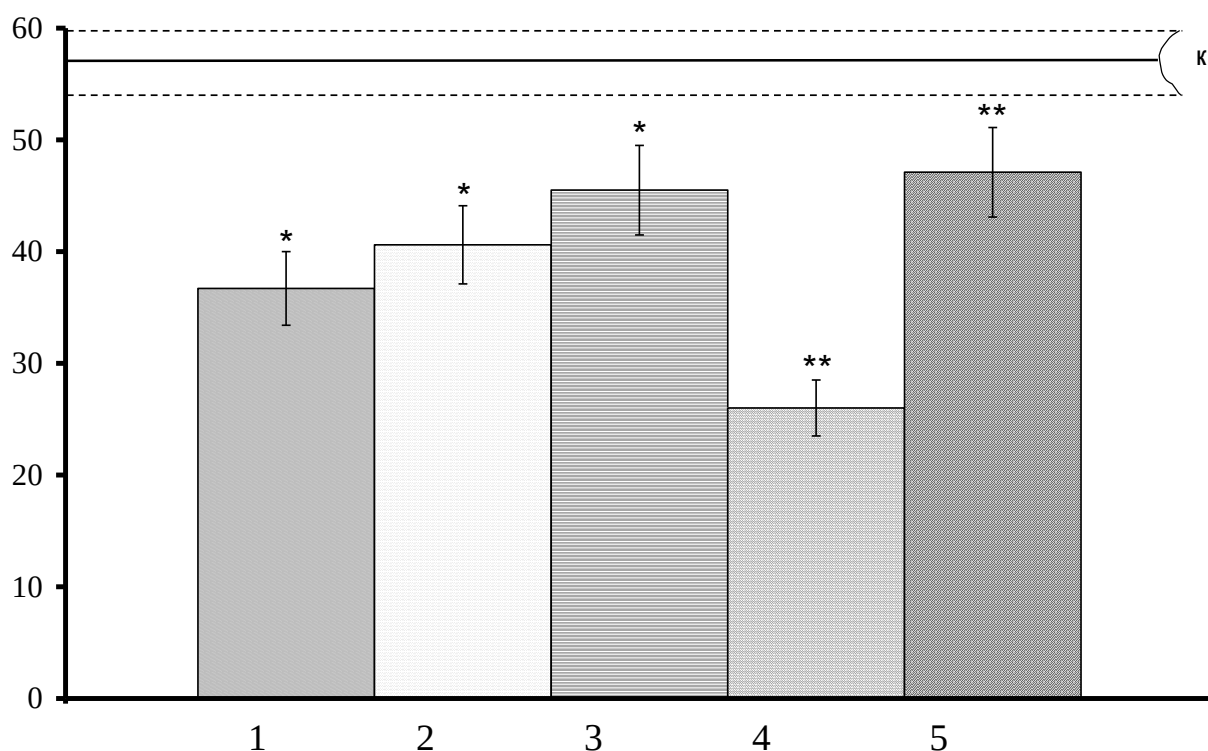


Рис. 9.7. Действие острого отравления токсичными химикатами (1,0 DL₅₀) в комбинации с антидотными средствами на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана ($\cdot 10^3$), синтезирующим IgG, в селезенке белых мышей на 14 сут ($M \pm m$)

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, по оси ординат: число антителообразующих клеток к эритроцитам барана, $\cdot 10^3$, К – контроль; в каждой серии использовалось 6-7 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

По степени снижения числа АОК, синтезирующих IgG в селезенке, ФОС располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ.

Использование атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на число антителообразующих клеток к эритроцитам

барана ($p < 0,05$), а карбоксима – существенно уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом число антителообразующих клеток к эритроцитам барана снижалась соответственно в 2,22 и 1,41 раза ($p < 0,05$), оставаясь ниже контрольного значения. Карбоксим увеличивал число антителообразующих клеток к эритроцитам барана, синтезирующих IgG, по сравнению с показателем при интоксикации метафосом 1,22 раза ($p < 0,05$). При этом параметр оставался ниже контрольного уровня ($p < 0,05$).

Можно предположить, что атропин усиливает супрессию синтеза IgG под влиянием ФОС, вероятно, вследствие блокады м-холинореактивных структур лимфоцитов в сочетании с ингибированием эстераз Th2-клеток [MacManus J.P. et al., 1975; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Не исключено, что атропин усиливает редукцию синтеза цитокинов Th2-лимфоцитами. Вполне естественно, что карбоксим, реактивируя ацетилхолинэстеразу Th2-клеток, восстанавливает их активирующее действие на В-клетки, вероятно, повышая продукцию ими ИЛ-4 [Ройт А. и соавт., 2000].

Таким образом, под влиянием ФОС происходит снижение Т-зависимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgG). По степени редукции синтеза IgG ФОС располагались в порядке снижения эффекта в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на синтез IgG, а карбоксима и его комбинации с атропином – снижало. При этом число АОК в селезенке, отражающее синтез IgG, оставалось ниже контрольных значений.

9.3.3. Изучение тимуснезависимого антителообразования

Известно, что Т-независимая антителопродукция осуществляется В-клетками без участия Т-хелперов (в данном случае Th1-лимфоцитов) [Ройт А. и соавт., 2000; Hausmann S., Wucherpfennig K.W., 1997;]. При гуморальном иммунном ответе на Т-независимый антиген синтезируются только IgM (пик иммунного ответа составляет 5 сут) [Ройт А. И соавт., 2000, Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

Экспериментально установлено (рис. 9.8), что у белых крыс после острой интоксикации метафосом, хлорофосом и ДДВФ на 5 сут после иммунизации в индуктивный период иммуногенеза происходит существенное уменьшение числа АОК, синтезирующих IgM к Vi-антигену, соответственно в 1,46; 1,33 и 1,61 раза ($p < 0,05$). По степени снижения числа АОК, синтезирующих IgM в селезенке, ФОС при их действии в индуктивной фазе иммуногенеза существенно не отличались. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на число антителообразующих клеток к Vi-антигену ($p < 0,05$), а карбоксима – статистически значимо уменьшало ($p < 0,05$). При этом показатели оставались

ниже контрольных значений. Под влиянием атропина по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом число антителообразующих клеток к Vi-антигену снижалась соответственно в 2,34 и 1,44 раза ($p<0,05$), оставаясь ниже контрольного значения. Карбоксим и комбинация антидотов атропина и карбоксима увеличивали число антителообразующих клеток к Vi-антигену по сравнению с показателем при интоксикации метафосом соответственно в 1,31 ($p<0,05$) и 1,07 раза. При этом параметр оставался ниже контрольного уровня ($p<0,05$).

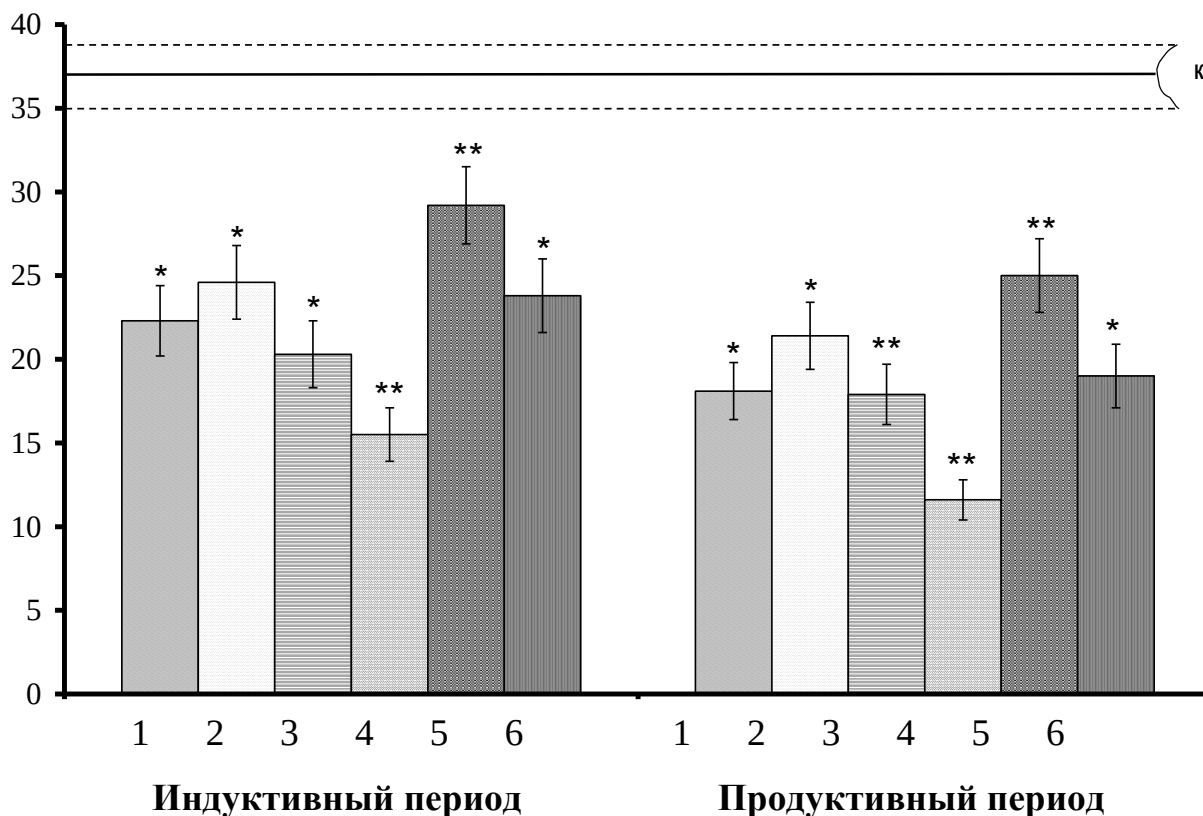


Рис. 9.8. Влияние острого отравления ФОС ($0,75 DL_{50}$) в комбинации с антидотными средствами на число антителообразующих клеток к Vi-Ag ($\cdot 10^3$), синтезирующим IgM, в селезенке белых крыс на 5 сут ($M \pm m$)

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – хлорофос, 3 – ДДВФ, 4 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим, 6 – метафос + атропин + карбоксим; по оси ординат: число антителообразующих клеток к Vi-Ag, $\cdot 10^3$, K – контроль ($n=25$); в каждой серии использовалось 6-7 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p<0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p<0,05$.

Метафос, хлорофос и ДДВФ при их введении в продуктивный период антителогенеза вызвали более выраженное снижение АОК, чем в продуктивный период иммуногенеза соответственно в 2,00; 1,69 и 2,02 раза ($p<0,05$). Антидоты и их комбинация влияла на число антителообразующих клеток к Vi-антигену так же, как и в индуктивной фазе иммуногенеза.

Снижение угнетения гуморального иммунного ответа под влиянием карбоксима связано с ослаблением токсического эффекта ФОС и возможно, восстановлением функции эстераз макрофагов, продуцирующих ИЛ-1,

необходимый для синтеза плазмочитами IgM в Т-независимом антителообразовании [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Эффект атропина, возможно, связан с устранением активирующего влияния ацетилхолина на В-лимфоциты (в определенном диапазоне концентраций), а также с блокадой м-холинорецепторов В-лимфоцитов (плазмочитов). [Адо А.Д. и соавт., 1983, 1995; MacManus J.P. et al., 1975; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1979; Maslinski W. et al., 1983, 1987].

Менее выраженное снижение Т-независимого антителообразования при действии ФОС по сравнению с Т-зависимой антителопродукцией (см. разд. 4.3.1.), вероятно, обусловлено возможным активирующим действием на В-лимфоциты ацетилхолина [Адо А.Д. и соавт., 1995] и отсутствием эффектов, связанных с инактивацией эстераз Т-клеток [Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977], поскольку Т-лимфоциты не участвуют в тимуснезависимой антителопродукции.

Таким образом, под влиянием острой интоксикации ФОС происходит снижение тимуснезависимого антителообразования (числа АОК к Vi-антигену в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителообразования. По степени снижения синтеза IgM к Vi-антигену применявшиеся ФОС существенно не отличались. Применение атропина увеличивало редуцирующее воздействие ФОС на гуморальный иммунный ответ, а карбоксима – снижало. При этом показатель Т-зависимого антителообразования оставались ниже контрольного уровня.

Резюме

Подводя итог результатам, изложенным в данной главе, можно заключить, что под влиянием острой интоксикации ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина на 2 сут зарегистрировано снижение числа лимфоцитов в тимусе и селезенке с практически полным восстановлением показателей на 10 сут. Отмечается менее выраженное снижение числа лимфоцитов в тимусе при комбинированном действии ФОС и атропина, ФОС и карбоксима по сравнению с изолированным воздействием токсиканта. Антидоты после отравления ФОС снижали редукцию числа лимфоцитов в селезенке. При этом показатели оставались ниже контрольных уровней.

После воздействия антихолинэстеразных веществ на 2 сут вследствие перераспределения лимфоцитов между органами иммунной системы отмечалось их увеличение в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови. На 10 сут показатели после воздействия ФОС существенно не отличались от контрольного уровня. Антидотные средства ФОС атропин и карбоксим практически полностью восстанавливали содержание лимфоцитов в костном мозге, лимфоузлах и циркулирующей крови.

Острая интоксикация ФОС и комбинированное действие ФОС и атропина приводит к редукции формирования ГЗТ, характеризующей, как первичный, так и вторичный иммунный ответ, и свидетельствующей о поражении Th1-клеток. Отмечается более выраженное снижение реакции ГЗТ при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал реакцию ГЗТ (функцию Th1-клеток).

После воздействия ФОС и комбинированного действия ФОС и атропина зарегистрирована редукция АЗКЦ, как в индуктивный, так и продуктивный периоды иммуногенеза, что свидетельствует о поражении К-клеток. Отмечается более выраженное снижение АЗКЦ при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал АЗКЦ.

Острое отравление ФОС и комбинированное действие ФОС и атропина приводит к супрессии активности ЕКК на 2 и 5 сут с восстановлением показателя на 10 сут после интоксикации. Отмечается более выраженное снижение активности ЕКК при комбинированном действии ФОС и атропина по сравнению с изолированным воздействием яда. Карбоксим после отравления ФОС частично восстанавливал активность ЕКК.

Под влиянием острой интоксикации ФОС происходит снижение Т-зависимого антителообразования (числа АОК в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителогенеза. Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на гуморальный иммунный ответ, а карбоксима и его комбинации с атропином – снижало. При этом показатель Т-зависимого антителообразования оставался ниже контрольных значений.

Воздействие ФОС приводит к снижению Т-зависимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgG). Применение атропина существенно увеличивало супрессирующее действие ФОС на синтез IgG, а карбоксима и его комбинации с атропином – снижало. При этом число АОК в селезенке, отражающее синтез IgG, оставалось ниже контрольных значений.

Под воздействием острой интоксикации ФОС происходит снижение тимуснезависимого антителообразования (числа АОК к Vi-антигену в селезенке, отражающему синтез IgM) в большей степени в продуктивный период иммуногенеза по сравнению с индуктивной фазой антителообразования. По степени снижения синтеза IgM к Vi-антигену применявшиеся ФОС существенно не отличались. Применение атропина увеличивало редуцирующее действие ФОС на гуморальный иммунный ответ, а карбоксима – снижало. При этом показатель Т-зависимого антителообразования оставался ниже контрольного уровня.

При математической обработке непараметрическими и параметрическими статистическими методами (путем вычисления средних

значений супрессии при отравлении метафосом, хлорофосом и ДДВФ) установлено, что статистически значимо ($p < 0,05$) по степени снижения параметров иммунного статуса ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ (средняя супрессия показателей ДДВФ была на $32 \pm 3\%$ меньше, чем при действии метафоса) . При этом максимальный по продолжительности эффект зарегистрирован при действии метафоса, а минимальный – при остром отравлении ДДВФ.

ГЛАВА 10. ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИИ TH1- И TH2-ЛИМФОЦИТОВ, КООПЕРАЦИИ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ, КОНЦЕНТРАЦИИ В КРОВИ КОРТИКОСТЕРОНА, АКТИВНОСТИ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ ЛИМФОЦИТОВ, СОСТОЯНИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ ФОС В КОМБИНАЦИИ С АНТИДОТАМИ

10.1. Исследование активности Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов под влиянием ФОС в комбинации с антидотами

Под влиянием метафоса (табл. 10.1) происходило снижение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (по числу АОК к ЭБ в селезенке), характеризующему функцию Th1-лимфоцитов и синтез IgM, через 4 сут после иммунизации по сравнению с контрольным уровнем в 1,88 раза ($p < 0,05$). При отравлении метафосом отмечалась также существенная редукция активности Th1-лимфоцитов, оцениваемая по реакции ГЗТ, соответственно в 1,54 раза ($p < 0,05$). На 8 сут после иммунизации ЭБ отмечалась супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, после интоксикации метафосом 1,34 раза ($p < 0,05$).

Снижение параметров, характеризующих клеточные гуморальные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии ФОС в среднем соответственно в 1,71 и 1,35 раза свидетельствует о том, что под влиянием ФОС в большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов.

Применение антидота ФОС атропина сульфата при отравлении метафосом существенно увеличивало супрессирующее действие антихолинэстеразного токсиканта на функцию Th1- и Th2-лимфоцитов ($p < 0,05$). Карбоксим снижал редукцию активности Th1-клеток ($p < 0,05$) и практически полностью восстанавливал активность параметров, связанных с функцией Th2-лимфоцитов. Следует отметить, под влиянием карбоксима показатели, характеризующие функцию Th1-лимфоцитов, оставались статистически значимо меньшими, чем в контроле ($p < 0,05$).

Следует отметить, что при оценке влияния ФОС на функцию Th1- и Th2-клеток, мы не принимали во внимание действие ФОС на В-клетки (плазмоциты) при оценке числа АОК к ЭБ на 5 и 8 сут после иммунизации, так как это практически не повлияло бы на полученные нами данные о сравнительной активности двух типов Th-лимфоцитов.

Таблица 10.1. Влияние интоксикации ФОС (0,75 DL₅₀) в продуктивной фазе иммуногенеза на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов (M±m, n =8-9)

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

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

Правомерность нашего подхода, свидетельствующего о существенном различии в редуции активности Th1- и Th2-лимфоцитов при интоксикации ФОС, подтверждается оценкой концентрации цитокинов в крови крыс (табл. 10.2). При остром отравлении метафосом в продуктивной фазе иммуногенеза выявлено уменьшение концентрации ИФН-γ на 5 сут после иммунизации ЭБ в 1,95 раза (p<0,05), а ИЛ-4 - в 1,52 раза (p<0,05). Аналогичные данные получены при исследовании концентрации цитокинов в крови на 8 сут. Это свидетельствуют о том, что по сравнению с ИЛ-4 концентрация ИФН-γ в крови под влиянием ФОС снижается в большей степени.

Таблица 10.2. Влияние интоксикации ФОС (0,75 DL₅₀) в продуктивной фазе иммуногенеза на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл (M±m, n =6)

Серии опытов		ИФН-γ	ИЛ-4	ИФНγ/ИЛ-4
Контроль	t	902±82	129±12	6,99±0,64
Метафос	5	463±42*	85±9*	5,44±0,53°
	8	409±46*	83±7*	4,93±0,48*
Метафос + атропин	5	236±34**	42±6**	5,62±0,43°
	8	227±30**	39±5**	5,82±0,50°
Метафос + карбоксим	5	660±60**	95±8*	6,95±0,61
	8	671±62**	97±9*	6,92±0,64

Примечание: t - 5, 8 - время исследования после иммунизации, сут; * -p<0,05 по сравнению с контролем; ° -p<0,05 по сравнению с контролем (непараметрический критерий U Вилкоксона-Манна-Уитни); ** - p<0,05 по сравнению с контролем и параметрами при интоксикации ФОС;

Применение атропина сульфата при отравлении метафосом существенно увеличивало редуцирующий эффект ФОС в равной степени на секрецию Th1- и Th2-лимфоцитами соответственно ИФН-γ и ИЛ-4 (p<0,05).

Назначение реактиватора холинэстеразы карбоксима снижало супрессию продукции ИФН- γ и ИЛ-4 ($p < 0,05$), обусловленную действием ФОС. При этом концентрация ИФН- γ увеличивалась по сравнению с показателями после отравления ФОС ($p < 0,05$), оставаясь ниже контрольного уровня ($p < 0,05$), а содержание в крови ИЛ-4 оставалось достоверно сниженным по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и статистически значимо не отличалось от параметров после интоксикации метафосом. Использование атропина сульфата не изменяло соотношения ИФН- γ /ИЛ-4, а карбоксима - восстанавливало его до контрольного значения.

Уменьшение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [Ройт А. и соавт., 2000]. Нами установлено, что при действии метафоса соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 было существенно ниже контрольного уровня ($p < 0,05$) равного $6,99 \pm 0,64$ и составляло в среднем $5,18 \pm 0,26$ (при оценке на 5 и 8 сут). Это свидетельствует о более выраженной супрессии под влиянием ФОС функции Th1-лимфоцитов по сравнению со снижением активности Th2-клеток. Вероятно, данный эффект обусловлен способностью ФОС активировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, увеличивая в крови концентрацию кортикостерона [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. При этом известно, что данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000]. Возможно также, что ФОС способны ингибировать в большей степени ацетилхолинэстеразу на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа и α -нафтил-AS-ацетатэстеразу и α -нафтилбутиратэстеразу в цитозоле этих клеток, а также большей ролью эстераз в реализации функций лимфоцитов Th1-типа [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Последнее предположение в определенной степени подтверждается способностью карбоксима в большей степени восстанавливать функцию Th1-клеток (по сравнению с активностью Th2-лимфоцитов), так как среднее значение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 существенно возрастало ($p < 0,05$) с $5,18 \pm 0,26$ (действие ФОС) до $6,94 \pm 0,44$ (комбинированный эффект ФОС и карбоксима).

Увеличение редукции функции Т-клеток, участвующих в реализации различных иммунных реакций, атропином после отравления ФОС обусловлено суммацией супрессорных эффектов, связанных с ингибированием эстераз Т-лимфоцитов и одновременной блокадой м-холинорецепторов Th1- и Th2-клеток [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Карбоксим восстанавливает активность лимфоцитов Th1- и Th2-типа, вероятно, вследствие реактивации ацетилхолинэстеразы, локализованной на их клеточной мембране [Kutty K. M. et al., 1976].

Полученные данные позволяют полагать, что относительное увеличение активности Th2-лимфоцитов по сравнению с функцией Th1-клеток при отравлении ФОС (а также при лечении отравления ФОС атропином) может приводить к увеличению вероятности вирусных инфекций (по сравнению с микробными) [Хаитов Р.М. и соавт., 2002;

Asquith B., et al., 2007], а при использовании карбоксима возможность возникновения вирусных и микробных инфекционных заболеваний, по-видимому, одинакова.

Таким образом, острое действие фос в продуктивной фазе иммуногенеза в дозе, составляющей 0,75 DL₅₀, в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. под влиянием фос в крови концентрация ИФН- γ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем концентрация ил-4, синтезируемого th2-клетками. применение атропина сульфата при острой интоксикации фос увеличивало супрессию функции Th1- и Th2-лимфоцитов и синтеза ими соответственно ИФН- γ и ИЛ-4 в равной степени, а использование карбоксима частично восстанавливало преимущественно активность Th1-клеток и синтез ИФН- γ по сравнению с функцией Th2-лимфоцитов и продукцией ими ИЛ-4.

10.2. Изменение функции лимфоцитов и содержания цитокинов в крови под влиянием атропина при остром отравлении малатионом

Определялось влияния атропина при остром отравлении наиболее широко применяемого за рубежом в качестве инсектицида ФОС малатиона в дозе 0,75 LD₅₀ на функцию лимфоцитов и содержание в крови провоспалительных, иммунорегуляторных и противовоспалительных цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 β , γ -интерферона - ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 и ИЛ-13) [Забродский П.Ф. и соавт., 2015].

Функции Th1-, Th2-лимфоцитов, В-клеток, ЕКК, оцениваемые соответственно по реакции ГЗТ, числу АОК к ЭБ (IgG), АОК к Vi-Ag и индексу цитотоксичности (ИЦ) – активности ЕКК - после острого отравления малатионом, уменьшались соответственно в 1,84; 1,41; 1,40 и 2,14 раза ($p < 0,05$), а применение атропина после введения малатиона вызывало редукцию данных параметров соответственно в 2,94; 1,92; 1,93 и 3,07 раза ($p < 0,05$) по сравнению с контролем, а по сравнению с показателями при интоксикации ФОС - в 1,60; 1,36; 1,38 и 1,44 раза ($p < 0,05$) [табл. 10.3].

Полученные данные свидетельствуют о том, что показатели клеточного иммунитета (ГЗТ, активность ЕКК) по сравнению с Т-независимой гуморальной иммунной реакцией (АОК к Vi-Ag; IgM) снижаются в большей степени, а поражение Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами при острой интоксикации малатионом более выражено. Применение атропина после интоксикации ФОС увеличивало супрессию функции лимфоцитов ($p < 0,05$).

После острой интоксикации малатионом (табл. 10.4) снижалось содержание в крови провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 соответственно в 1,76; 1,75 и 1,80 раза ($p < 0,05$). Введение атропина при интоксикации ФОС не влияло на концентрацию в крови данных цитокинов.

Таблица 10.3. Влияние атропина (10 мг/кг) на функцию лимфоцитов белых крыс при острой интоксикации малатионом (0,75 DL₅₀; M±m, n=8-10)

Лимфоциты	Параметры	Контроль	Малатион	Малатион+ атропин
Th1-типа	ГЗТ, %	32,9±4,0	17,9±2,0 ^a	11,2±1,4 ^b
Th2-типа	АОК к ЭБ (IgG), 10 ³	20,2±2,3	14,3±1,3 ^a	10,5±1,0 ^b
В-клетки	АОК к Vi-Ag (IgM), 10 ³	29,2±3,1	20,8±1,8 ^a	15,1±1,6 ^b
ЕКК	ИЦ, %	31,0±3,3	14,5±1,5 ^a	10,1±1,0 ^b

^a -p<0,05 по сравнению с контролем; ^b -p<0,05 по сравнению с контролем и показателем при интоксикации.

Таблица 10.4. Влияние атропина сульфата (10 мг/кг) на содержание цитокинов в крови белых крыс при острой интоксикации малатионом (0,75 DL₅₀) через 4 сут (пг/мл; M±m, n=6)

Цитокины	Контроль	Малатион	Малатион + Атропин
ФНОα	37±5	21±3 ^a	16±3 ^a
ИЛ-1β	28±4	16±3 ^a	15±4 ^a
ИЛ-6	45±6	25±4 ^a	19±4 ^a
ИФН-γ	905±102	390±40 ^a	250±32 ^b
ИЛ-2	1054±112	492±51 ^a	340±38 ^b
ИЛ-4	132±15	83±9 ^a	51±7 ^b
ИФНγ/ИЛ-4	6,9±0,5	4,7±0,3 ^a	4,9±0,4 ^a
ИЛ-10	287±31	220±27	206±25
ИЛ-13	105±13	88±10	93±12

^a -p<0,05 по сравнению с контролем; ^b -p<0,05 по сравнению с контролем и показателем при интоксикации.

Содержание в крови иммунорегуляторных цитокинов ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4 при острой интоксикации малатионом по сравнению с контролем снижалось соответственно в 2,32; 2,14 и 1,59 раза (p<0,05), а концентрация противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-13 существенно не отличалась от контрольного уровня. Применение атропина после отравления малатионом усиливало редукцию синтеза клетками крови цитокинов ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, уменьшая их содержание в крови соответственно в 1,56; 1,45 и 1,63 раза по сравнению с показателями при интоксикации ФОС (p<0,05), и практически не влияло на концентрацию ИЛ-10 и ИЛ-13.

Острое отравление малатионом, а также комбинированное действие ФОС и атропина снижало соотношение ИФНγ/ИЛ-4. Так, в контроле оно составляло 6,9±0,5, а после действия токсиканта и комбинации его с

антидотом - $4,7 \pm 0,3$ ($p < 0,05$) и $4,9 \pm 0,4$ ($p < 0,05$) соответственно. Это подтверждает данные (табл.1), свидетельствующие о том, что под влиянием малатиона лимфоциты Th1-типа поражаются в большей степени, чем Th2-клетки. Известно, что Th1- и Th2-лимфоциты продуцируют соответственно ИФН γ и ИЛ-4 [Забродский П.Ф. и соавт, 2014]. С менее выраженным воздействием ФОС на Th2-клетки, вероятно, связано также несущественное снижение ИЛ-10 и ИЛ-13 [Ройт А. и соавт., 2000].

Уменьшение провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в крови при действии малатиона, а также его комбинации с атропином, связано с редукцией их синтеза вследствие активации $\alpha 7n$ -ацетилхолинорецепторов макрофагов и других клеток фагоцитарно-моноцитарной системы ацетилхолином [Sitapara R.A., 2014].

Снижение функции Т-, В-лимфоцитов и ЕКК (в том числе, и продукции Т-клетками ИФН- γ , ИЛ-2, и ИЛ-4 [Schoenborn J.R., Wilson C.B, 2007], а В-лимфоцитами, наряду с макрофагами, моноцитами и нейтрофилами, – ИЛ-6 [Aker W.G. et al., 2008, Sitapara R.A. et al., 2014]) при интоксикации малатионом, а также при комбинированном эффекте ФОС и атропина обусловлено действием на лимфоциты как молекулы токсиканта, так его более токсичного, метаболита малооксона [Aker W.G. et al., 2008,], вследствие ингибирования ацетилхолинэстеразы Т-клеток и ЕКК, инициации ПОЛ в лимфоцитах, эффекта кортикостероидов (вследствие активации ФОС гипоталамо-гипофизарно-адреноваевой системы), уменьшения внутриклеточного уровня порфирина в ЕКК и проникновение гранзимов этих клеток в клетку-мишень [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. На редукцию активности ЕКК влияет также супрессия продукции Т-клетками ИЛ-2, ИЛ-4 [А. Ройт и соавт, 2000].

Более выраженная редукция функции Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами может быть обусловлена существенным увеличением в крови вследствие острой интоксикации малатионом концентрации кортикостерона [Забродский П.Ф, Мандыч, В.Г. 2007], к которому более чувствительны лимфоциты Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [3]. Возможно, что ФОС способны ингибировать в большей степени ацетилхолинэстеразу на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа и другие эстеразы в цитозоле этих клеток, а также большей ролью эстераз в реализации функций лимфоцитов Th1-лимфоцитов, чем Th2-клеток [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г, 2007]. Атропин усиливает супрессию функции Т-лимфоцитов и ЕКК, а также редукцию синтеза ИФН- γ , ИЛ-2 Th1-лимфоцитами, ЕКК, цитотоксическими Т-клетками, снижение продукции ИЛ-4 Th2-лимфоцитами [3,13] при интоксикации ФОС, вероятно, вследствие блокады м-холинореактивных структур иммуноцитов в сочетании с ингибированием эстераз Т-клеток и ЕКК малатионом [Забродский П.Ф, Мандыч В.Г., 2007]. Увеличение атропином супрессии функции В-клеток (в Т-независимой иммунной реакции), не содержащих ацетилхолинэстеразы, обусловлено, видимо, воздействием антидота на их м-холинорецепторы в комбинации с

активацией молекулой ФОС и ацетилхолином н-холинорецепторов В-лимфоцитов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Таким образом, острое отравление малатионом (0,75 DL₅₀) снижает в большей степени функцию Th1-клеток, чем Th2-лимфоцитов, уменьшает активность В-клеток, ЕКК, содержание в крови ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6, ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, существенно не влияя на концентрацию ИЛ-10 и ИЛ-13. Введение при острой интоксикации малатионом его антидота атропина (10 мг/кг) увеличивает редукцию функции Т- и В-лимфоцитов, ЕКК, а также синтеза иммунорегуляторных цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4. Атропин при отравлении малатионом не влияет на супрессию синтеза клетками крови провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6, а также на содержание противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-13.

10.3. Оценка кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования *ex vivo* под влиянием ФОС в комбинации с антидотами

При изучении кооперации Т- и В-лимфоцитов мышей *ex vivo* оценка функции этих популяций иммуноцитов в данной реакции осуществлялась по формированию АОК к ЭБ. *Ex vivo* изучался данный процесс в модели, предусматривающей забор Т- или В-клеток через 1 сут от сингенных мышей доноров линии СВА после воздействия на них ФОС для изучения *in vitro* кооперации этих клеток соответственно с В- или Т-лимфоцитами интактных животных.

При исследовании кооперации Т- и В-клеток после выделения их у мышей СВА через 1 сут после введения им метафоса в дозе 0,75 DL₅₀ (а также ФОС в комбинации с антидотами), установлено (табл. 10.5), что метафос поражал в большей степени Т-клетки по сравнению с В-клетками.

Таблица 10.5. Влияние метафоса и его антидотов через 1 сут на кооперацию Т- и В-лимфоцитов мышей *ex vivo* (число АОК на 10⁶ В-клеток) [M $\pm$ m, n=5-6]

Вещества	Кооперация лимфоцитов	
	В ⁰ +Т	В+Т ⁰
Метафос	262 $\pm$ 21 ^{ac}	187 $\pm$ 19 ^a
Метафос + атропин	190 $\pm$ 20 ^{abc}	105 $\pm$ 13 ^{ab}
Метафос +карбоксим	284 $\pm$ 30 ^a	250 $\pm$ 24 ^{ab}

Примечание: контроль: В+Т - 410 $\pm$ 34 на 10⁶ В-клеток; В⁰, Т⁰ - В⁰, Т⁰ – клетки получали через 1 сут от мышей, подвергавшихся действию яда; ^a - различие с контролем (В+Т) достоверно – $p < 0,05$; ^b - $p < 0,05$ по сравнению с действием метафоса; ^c - $p < 0,05$ по сравнению с В⁰+Т.

Атропин увеличивал редукцию кооперации Т- и В-лимфоцитов, а карбоксим – снижал. Так, зарегистрировано существенное снижение активности В-лимфоцитов в эффекте кооперации клеток после действия

метафоса в дозе 0,75 DL₅₀ соответственно в 1,56 раза, а Т-клеток - соответственно в 2,19 раза ($p < 0,05$).

Применение антидота ФОС атропина при интоксикации мышей, у которых выделяли В-клетки, существенно увеличивало супрессирующее действие метафоса на кооперацию лимфоцитов ($p < 0,05$), а карбоксима – практически не уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина при интоксикации мышей, у которых выделяли В-клетки, по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом кооперация Т- и В-лимфоцитов снижалась соответственно в 2,15 и 1,38 раза ($p < 0,05$), оставаясь ниже контрольного значения.

Применение атропина при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки, существенно увеличивало редуцирующее действие метафоса на кооперацию лимфоцитов ($p < 0,05$), а карбоксима – существенно уменьшало. При этом показатели оставались ниже контрольных значений. Под влиянием атропина при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки, по сравнению с контролем и параметром при интоксикации метафосом кооперация Т- и В-лимфоцитов снижалась соответственно в 3,90 и 1,78 раза ($p < 0,05$), оставаясь ниже контрольного значения. Карбоксим при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки, увеличивал кооперацию Т- и В-лимфоцитов по сравнению с показателем при интоксикации метафосом соответственно в 1,34 раза ($p < 0,05$). При этом параметр оставался ниже контрольного уровня ($p < 0,05$).

Установлено преимущественное поражение Т-клеток в эффекте кооперации, которое, вероятно, обусловлено действием ФОС на ацетилхолинэстеразу Т-лимфоцитов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Ferluga J. et al., 1972; Li C.G et al., 1973].

Атропин увеличивал супрессию кооперации лимфоцитов под влиянием ФОС, вероятно, вследствие блокады их м-холинореактивных структур лимфоцитов в сочетании с ингибированием эстераз Т-клеток [MacManus J.P. et al., 1975; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Эффект карбоксима, восстанавливающий кооперацию Т- и В-лимфоцитов, доказывает его реактивирующее действие на заблокированную ФОС ацетилхолинэстеразу Т-клеток.

Таким образом, под влиянием ФОС, а также их комбинации с антидотами, существенно снижается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Установлено преимущественное поражение Т-клеток в эффекте кооперации при действии ФОС, а также при комбинации ФОС с атропином. Атропин усиливает редукцию кооперации Т- и В-лимфоцитов, а карбоксим – снижает только при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки.

10.4. Изучение содержания кортикостерона в плазме крови

Роль кортикостероидов в реализации иммунного ответа неоднозначна, физиологические концентрации их необходимы для реализации

полноценного гуморального иммунного ответа [Корнева Е.А., 1990; Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Высокие концентрации кортикостерона, в частности, при интоксикации ФОС, этанола и атразина [Иванова А.С., 1998; Szot R.J., Murphy S.D., 1970], вызывают супрессию ряда показателей системы иммунитета [Хусинов А.А. и соавт., 1991; Забродский П.Ф., 1993; 2002; Claman H.N., 1993; Tiefenbach B. et al., 1983, 1985; Stephen B. P. et al., 2003; Pruett S., 2008].

Нами установлено (табл. 5.4), что под влиянием метафоса содержание кортикостерона в плазме крови крыс увеличивается через 1 ч после интоксикации (рис. 10.1) и в дальнейшем к 24 ч (табл. 10.6) снижается до контрольного уровня. ДДВФ оказывает такой же эффект, но в отличие от действия метафоса при отравлении ДДВФ содержание в крови кортикостерона восстанавливается через 12 ч (табл. 10.6).

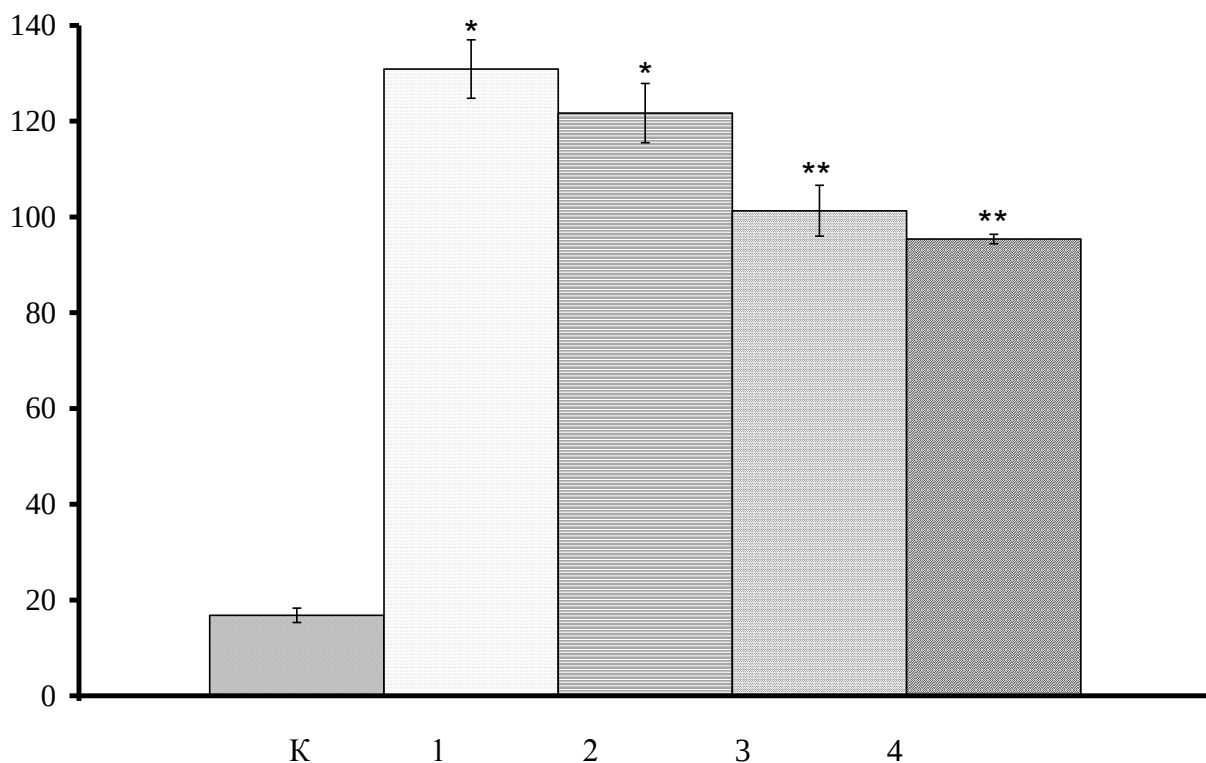


Рис. 10.1. Влияние острой интоксикации ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотными средствами на содержание кортикостерона в плазме крови крыс через 1 ч, нг/мл ($M \pm m$)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – метафос, 2 – ДДВФ, 3 – метафос + атропин, 5 – метафос + карбоксим; по оси ординат: содержание кортикостерона, нг/мл, К – контроль; в каждой серии использовалось 7-11 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$; ° - различие достоверно по сравнению с действием ФОС - $p < 0,05$.

Таблица 10.6. Влияние острой интоксикации ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотными средствами на содержание кортикостерона в плазме крови крыс, нг/мл (M ± m)

Серии опытов	К	Время после воздействия, ч			
		1	3	12	24
Метафос	16,8± 1,5	130,9±6,1*	65,3±4,0*	31,0±2,2*	17,6±2,0
ДДВФ		121,7±6,2*	45,7±4,2*	19,7±2,5	13,4±1,9
Метафос + Атропин		101,3±5,3**	45,0±4,1**	15,9±2,7°	19,6±2,5
Метафос + Карбоксим		95,4±5,0**	40,1±3,8**	16,7±2,6°	15,0±2,2

Примечание: К – контроль; в каждой серии использовалось от 7 до 11 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p<0,05$; ** - различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p<0,05$; ° - различие достоверно по сравнению с действием ФОС - $p<0,05$.

Это связано с особенностью токсикодинамики применявшихся ФОС: метафос метаболизируется до более токсичного метаоксона («летальный синтез»), а ДДВФ биотрансформируется до нетоксичных соединений [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983; Филов В.А., 2002].

Так, под влиянием острой интоксикации метафосом через 1 и 3 ч концентрация кортикостерона увеличивалась соответственно в 7,79 и 3,89 раза ($p<0,05$), снижаясь до контрольного уровня через 24 ч, а под влиянием ДДВФ содержание кортикостерона в крови повышалось через 1 и 3 ч соответственно в 7,24 и 2,72 раза, уменьшаясь до контрольного значения через 12 ч..

Применение после отравления метафосом антидотов существенно изменяло концентрацию гормона в плазме крови. Атропин и карбоксим снижали концентрацию кортикостерона по сравнению с действием метафоса через 1-12 ч ($p<0,05$), при этом она существенно не отличалась от контроля через 24 ч.

Увеличение кортикостерона в крови под влиянием ФОС обусловлено реализацией общего адаптационного синдрома (увеличение продукции адreno-кортикотропного гормона гипофизом [Селье Г., 1972; Лемус В. Б., Давыдов В. В., 1974; Бирбин В.С., 2003; Dhabhar F.S. et al., 1996; Stephen B. P. et al., 2003; Pruett S., 2008]).

При вычислении коэффициентов корреляции между концентрацией кортикостерона в крови (через 1 ч) и АОК к ЭБ при остром отравлении крыс метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином (см. разд. 4.3.1.) установлено, что они составляли соответственно $-0,725$ ($p<0,05$) [$n=8$] и $-0,731$ ($p<0,05$) [$n=8$]. Коэффициенты корреляции при остром отравлении метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином между концентрацией кортикостерона в крови (через 1 ч) и реакцией ГЗТ составляли соответственно $-0,740$ ($p<0,05$) [$n=8$] и $-0,732$ ($p<0,05$) [$n=8$].

Значения r между активностью ЕКК крыс и концентрацией кортикостерона в крови при острой интоксикации метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином составляли соответственно $-0,707$ ($p < 0,05$) и $-0,786$ ($p < 0,05$).

Таким образом, острая интоксикация метафосом и ДДВФ повышает концентрацию кортикостерона в плазме крови соответственно через 1-12 ч и через 1-3 ч, что обусловлено особенностями токсикокинетики этих ядов. Выявлена выраженная отрицательная корреляция между концентрацией кортикостерона при воздействии ФОС, а также ФОС в сочетании с применением атропина и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа. Атропин и карбоксим снижали концентрацию кортикостерона по сравнению с действием метафоса через 1-12 ч, при этом она существенно не отличалась от контроля через 24 ч.

10.5. Исследование активности ацетилхолинэстеразы Т-клеток под влиянием ФОС в комбинации с антидотами

Эстеразы иммуноцитов, являясь лизосомальными ферментами, наряду с другими энзимами, играют важную роль в реализации функций ЕКК и различных субпопуляций Т-лимфоцитов, моноцитов и макрофагов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Ледванов М. Ю., Киричук В. Ф., 1996; Ferluga J. et al., 1972; Li C. Y. et al., 1973; Asquith B. et al. 2007; Frasc S.C. et al. 2007; Tomoiu A. et al. 2007]. Изменение эстеразной активности в клетках отражает, с одной стороны, функциональную активность иммуноцитов, с другой - может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови, так как именно эта субпопуляция лимфоцитов является эстеразопозитивной [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977; Asquith B. et al. 2007]. Роль ацетилхолинэстеразы на поверхности Т-лимфоцитов [Kutty K. M. et al., 1976; Szelenyi J.G. et al., 1982] до сих пор не вполне ясна. Возможно, она регулирует влияние ацетилхолина на холинореактивные структуры Т-лимфоцитов [Забродский П.Ф. и соавт., 2001; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1989; Tomoiu A. et al. 2007].

Проведенные нами опыты показали (рис. 10.2), что под влиянием метафоса и ДДВФ активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки у белых крыс на 5 сут существенно снижалась.

Острое отравление метафосом и ДДВФ вызывало статистически значимое уменьшение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки соответственно в 9,14 и 7,25 раза ($p < 0,05$).

Несомненно, что ингибирование ацетилхолинэстеразы ФОС имеет существенное значение в формировании постинтоксикационного иммунодефицитного состояния. При этом Т-лимфоциты, возможно, существенно утрачивают свои функции, что приводит к редукции Т-зависимого гуморального иммунного ответа, снижению цитотоксической активности Т-клеток. По-видимому, функция К-клеток и ЕКК при

интоксикации ФОС также снижается вследствие ингибирования ацетилхолинэстеразы, так как эти клетки содержат этот фермент [Ройт А.и соавт., 2000; Boix E., Nogues M.V., 2007; Tomoiu A. et al. 2007].

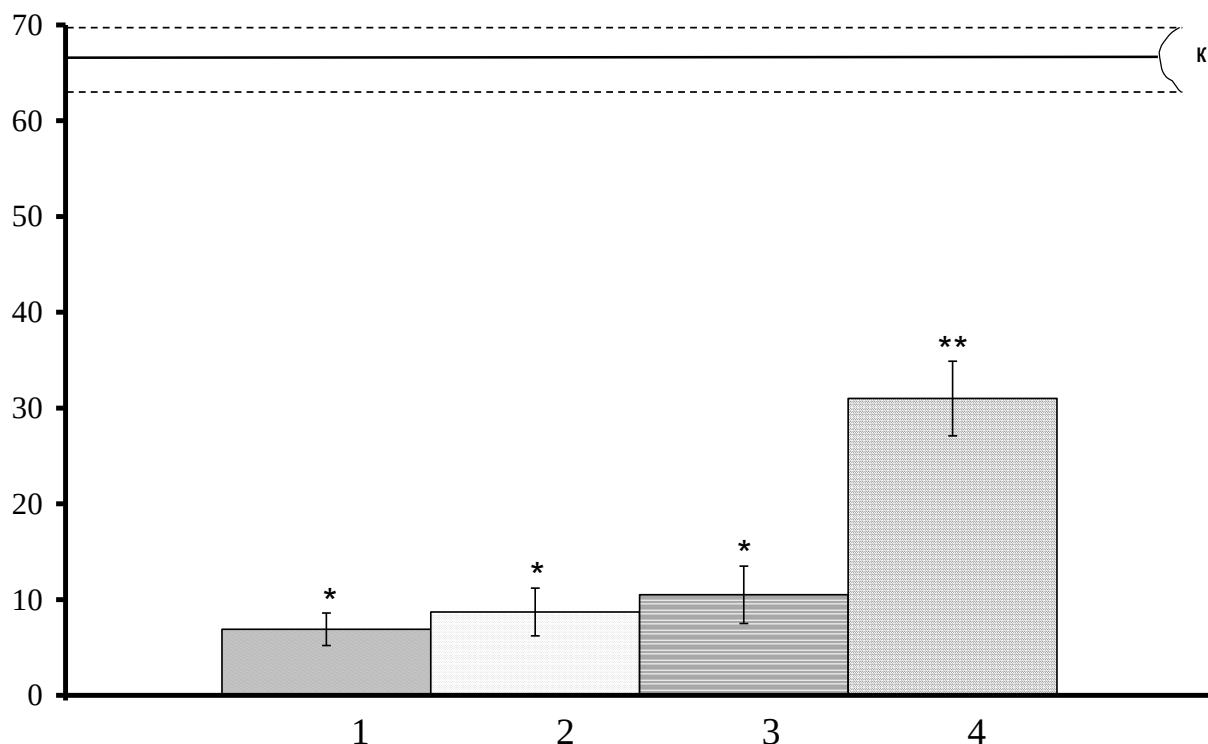


Рис. 10.2. Влияние острой интоксикации ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотами на активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки у белых крыс (мЕд/10⁹ Т-клеток) на 5 сут (M±m)

По оси абсцисс: 1 – метафос, 2 – ДДВФ, 3 – метафос + атропин, 4 – метафос + карбоксим; по оси ординат: активность ацетилхолинэстеразы Т- лимфоцитов, мЕд/10⁹ Т-клеток, К – контроль; в каждой серии использовалось 7-11 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$; ** – различие с контролем и показателем при интоксикации ФОС достоверно - $p < 0,05$.

Использование после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки у белых крыс, а применение карбоксима после отравления ФОС существенно увеличивало исследуемый показатель ($p < 0,05$). Однако он оставался ниже контрольного уровня.

Коэффициенты корреляции между активностью ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах тимуса крыс (на 5 сут) и АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ при остром отравлении крыс метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином составляли от 0,718 до 0,772 ($p < 0,05$).

Таким образом, острое отравление ФОС вызывает существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса и селезенки. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах белых крыс, а применение карбоксима увеличивало исследуемый показатель. При этом активность ацетилхолинэстеразы в Т-

клетках статистически значимо не отличалась от контрольного значения. Установлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при воздействии ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином активностью ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах тимуса.

10.6. Изменение показателей перекисного окисления липидов после острого отравления ФОС в комбинации с антидотами

Перекисное окисление липидов мембран, в том числе и иммунокомпетентных клеток при остром отравлении различными токсикантами, действии экстремальных физических факторов и при различных патологических состояниях [Лукиянова Л.Д. и соавт., 2001; Зарубина И.В., Миронова О.П., 2002; Плужников Н.Н. и соавт., 2003; Hageman J.J. et al., 1992; Urban T. et al., 1995; Knight J.A., 1995; Jaeschke H., 1995; Ibuki Y., Goto R., 1997; Iamele L. et al., 2002] включает следующие стадии: разрыхление гидрофобной области липидного бислоя мембран, что делает белковые компоненты более доступными для протеаз; появление в гидрофобном хвосте жирной кислоты гидрофильной перекисной группы, приводящее к конформационным изменениям в фосфолипиде и липопротеидном комплексе, что изменяет биофизические свойства мембраны и ферментативные функции липопротеидных комплексов; разрушение веществ, обладающих антиоксидантной активностью (витаминов, стероидных гормонов, убихинона) и снижении концентрации тиолов в клетке; образование по мере накопления гидроперекиси липидов трансмембранных перекисных кластеров, являющихся каналами проницаемости для ионов, в частности для ионов кальция. Формирование таких каналов патологической проницаемости может играть важную роль в возникновении избытка кальция в иммунокомпетентных клетках и реализации повреждающего действия этого катиона [Абдрашидова Н.Ф., Романов Ю.А., 2001; Бурмистров С.О. и соавт., 2002].

Исследование суммарной продукции радикалов (СПР), активности каталазы, пероксидазы и малонового диальдегида является информативным показателем ПОЛ при интоксикациях [Клинцевич А.Д. и соавт., 1994]. При этом каталаза и пероксидаза характеризует антиперекисную защиту, а малоновый диальдегид (МДА) является показателем активности процессов ПОЛ.

Наши исследования показали (табл. 10.7), что под влиянием метафоса и ДДВФ происходит снижение активности каталазы, пероксидазы и увеличения суммарной продукции радикалов и содержания в крови МДА. Так, действие метафоса статистически значимо ($p < 0,05$) повышало суммарную продукцию радикалов, снижало активность каталазы и пероксидазы соответственно – в 2,15; 1,63 и 1,29 раза ($p < 0,05$), а ДДВФ – в 1,86; 1,57 и 1,35 раза ($p < 0,05$).

Таблица 10.7. Действие острой интоксикации ФОС (0,75 DL₅₀) в комбинации с антидотами на показатели перекисного окисления липидов у крыс через 3 сут (m±m)

Серии опытов	Суммарная продукция радикалов, усл. ед.	Каталаза, ммоль/мин/л	Пероксидаза, мкмоль/мин/л	Малоновый диальдегид, нмоль/мл
Контроль	25,4±3,2	255,4±25,6	37,9±3,7	6,60±0,50
Метафос	54,7±5,1*	156,8± 27,8*	22,3± 2,9*	8,52± 0,52*
ДДВФ	47,2±5,3*	163,0± 24,0*	23,0± 2,7*	8,31± 0,56*
Метафос+атропин	48,5±4,8*	171,0± 20,1*	25,1± 2,5*	8,60± 0,50*
Метафос+карбоксим	37,9±3,8**	235,2± 25,0°	32,9± 2,4°	7,01± 0,51°

Примечание: в каждой серии использовалось от 8 до 14 крыс; * - различие с контролем достоверно - $p<0,05$; ** - различие достоверно по сравнению с контролем и действием метафоса - $p<0,05$; ° - различие достоверно по сравнению с действием метафоса - $p<0,05$;

Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на ПОЛ, а применение карбоксима после отравления ФОС существенно снижало инициацию ПОЛ ($p<0,05$).

Нарушение функции иммунокомпетентных клеток вследствие инициации ПОЛ реализуется путем изменения функциональных свойств белков, входящих в состав мембран и мембраносвязанных ферментов и рецепторов, от их активации до полного ингибирования. Это может быть связано с изменением состава фосфолипидных мембран лимфоцитов, с прямым окислением SH-групп в активных центрах мембраносвязанных ферментов, с образованием внутри- и межмолекулярных "сшивок" [Плужников Н.Н. и соавт., 2003; Hageman J.J. et al., 1992; Urban T. et al., 1995; Knight J.A., 1995; Jaeschke H., 1995; Ibuki Y., Goto R., 1997; Iamele L. et al., 2002].

При вычислении коэффициентов корреляции между числом АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ (см. главу 4) при остром отравлении метафосом, а также метафосом в комбинации с атропином и суммарной продукции радикалов установлено, что они составляли от -0,715 до -0,778 ($p<0,05$) [$n=9$]. Коэффициенты корреляции при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином между АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ и содержанием пероксидазы в крови крыс находились в пределах от 0,712 до 0,765 ($p<0,05$) [$n=9$]. Коэффициенты корреляции между содержанием МДА в крови и показателями иммунного статуса при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином составляли от -0,709 до -0,775. Значения r между параметрами были статистически значимы.

Таким образом, острая интоксикация ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином приводит к инициации ПОЛ, что проявляется снижением активности показателей антиоксидантной системы (редукция каталазы и

пероксидазы) и увеличением содержания малонового диальдегида и суммарной продукции радикалов в плазме крови. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на ПОЛ, а применение карбоксима после отравления ФОС существенно снижало инициацию ПОЛ. Выявлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии ФОС (и ФОС в комбинации с атропином) и показателями антиоксидантной системы и отрицательная корреляция между иммунными реакциями и продуктами ПОЛ, что свидетельствует о том, что инициация ПОЛ под влиянием ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином является одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Резюме

Полученные данные свидетельствуют о том, что острое действие ФОС в продуктивной фазе иммуногенеза в дозе, составляющей 0,75 DL₅₀, в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. Под влиянием ФОС в крови концентрация ИФН- γ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем концентрация ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками. Применение атропина сульфата при острой интоксикации ФОС увеличивало супрессию функции Th1- и Th2-лимфоцитов и синтеза ими соответственно ИФН- γ и ИЛ-4 в равной степени, а использование карбоксима частично восстанавливало преимущественно активность Th1-клеток и синтез ИФН- γ по сравнению с функцией Th2-лимфоцитов и продукцией ими ИЛ-4.

Под влиянием ФОС, а также их комбинации с антидотами, существенно снижается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Установлено преимущественное поражение Т-клеток в эффекте кооперации при действии ФОС, а также при комбинации ФОС с атропином. Атропин усиливает редукцию кооперации Т- и В-лимфоцитов, а карбоксим – снижает только при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки.

Острая интоксикация метафосом и ДДВФ повышает концентрацию кортикостерона в плазме крови соответственно через 1 - 12 ч и через 1-3 ч, что обусловлено особенностями токсикокинетики этих ядов. Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией кортикостерона и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа. Атропин и карбоксим снижали концентрацию кортикостерона по сравнению с действием метафоса через 1-12 ч, при этом она существенно не отличалась от контроля через 24 ч. Выявлена выраженная отрицательная корреляция между иммунными реакциями при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином и концентрацией кортикостерона в плазме крови.

При остром отравлении ФОС происходит существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки. Применение

после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах, а применение карбоксима увеличивало исследуемый показатель. Установлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином и активностью ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах.

Острая интоксикация ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином приводит к инициации ПОЛ. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на показатели ПОЛ, а применение карбоксима после отравления ФОС существенно снижало их инициацию. Выявлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии ФОС (и ФОС в комбинации с антидотами) и показателями антиоксидантной системы и отрицательная корреляция между иммунными реакциями и продуктами ПОЛ.

Преимущественное поражение ФОС (ФОС в комбинации с антидотами) функции Th1-лимфоцитов, редукция кооперации Т- и В-лимфоцитов, увеличение в крови кортикостерона, инаktivация ацетилхолинэстеразы Т-клеток, активация ПОЛ являются факторами, приводящими к формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния. Антидоты при отравлении ФОС вызывают в зависимости от исследованных показателей различное по направленности и выраженности их изменение, либо не влияют на них. Атропин приводит к усилению иммунотоксических эффектов ФОС вследствие увеличения редукции кооперации Т- и В-клеток и синтеза цитокинов ИФН- γ и ИЛ-4, а карбоксим снижает эти эффекты в результате реактивации ацетилхолинэстеразы Т-клеток и увеличения синтеза ИФН- γ и ИЛ-4, а также редукции ПОЛ.

ГЛАВА 11. КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ ИММУННОГО СТАТУСА ПОСЛЕ ОСТРОГО ДЕЙСТВИЯ ФОС В КОМБИНАЦИИ С АНТИДОТАМИ

11.1. Изменение иммунотоксичности фосфорорганических соединений в зависимости от характера их метаболизма при активация Р-450-зависимых монооксигеназ

Индукция цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ барбитуратами, зиксорином и другими средствами является одним из способов терапии отравлений фосфорорганическими соединениями (ФОС) [Каган Ю.С. и соавт., 1980; Забродский П.Ф., Линючев М.Н., 1993]. Монооксигеназная система (система цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ), тесно связана с иммунологическими механизмами в системе поддержания химического гомеостаза [Саприн А.Н. и соавт., 1982; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Ферменты монооксигеназной системы содержатся в основном в печени, кроме того, в меньших количествах они находятся и в других тканях (лимфоидных органах, почках, коже). Барбитураты и другие соединения, индуцируя энзимную активность монооксигеназной системы, увеличивают ее способность осуществлять биотрансформацию ксенобиотиков в десятки раз [Козлов В.А. и соавт., 1991, Филлов В.А., 2002]. В лимфоидной ткани животных и человека идентифицированы следующие формы цитохрома Р-450: Р-450РВ-1, Р-450РВ-4, Р-450МС-1 α , Р-450МС-1 β , а также бензпиренгидроксилаза, этоксирезорифин-О-деэтилаза, аминопирин-н-деметилаза [Козлов В.А. и соавт., 1991].

Данные литературы позволяют полагать, что под влиянием индукторов монооксигеназной системы токсичные химические вещества, не метаболизирующиеся по типу «летального синтеза» (а это большинство токсикантов) могут ослаблять их иммунотоксические эффекты, в то же время, образование более токсичных продуктов в процессе биотрансформации может приводит к обратному эффекту [Саприн А.Н. и соавт., 1982; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Нами исследовалось влияние индукторов Р-450-зависимых монооксигеназ (фенобарбитала и бензонала перорально в течение трех суток в дозах соответственно 50 и 70 мг/кг) на иммунотоксические свойства фосфорорганических соединений – хлорофоса и ДДВФ, которые метаболизируются соответственно до более и менее токсичных веществ.

Ферментиндуцирующие свойства фенобарбитала и бензонала оценивали по длительности сна, вызванного гексобарбиталом в дозе 80 мг/кг [Венгеровский А.И. и соавт., 1993].

Установлено (табл. 11.1), что применение фенобарбитала приводило к незначительному увеличению гуморального иммунного ответа к Т-зависимому и Т-независимому антигенам, АЗКЦ и реакции ГЗТ соответственно в 1,26; 1,20; 1,25 и 1,17 раза ($p>0,05$), а после использования бензонала – соответственно в 1,24; 1,16; 1,31 и 1,22 раза ($p>0,05$). Под

влиянием фенobarбитала и бензонала активность ЕКК повышалась соответственно в 1,24 и 1,36 раза ($p<0,05$). Иммуностимулирующие эффекты фенobarбитала и бензонала практически не отличались.

Таблица 11.1. Действие острого отравления хлорофосом и ДДВФ на показатели системы иммунитета у крыс после применения индукторов монооксигеназной системы печени ($M\pm m$, $n=9-12$)

Серии опытов	АОК к ЭБ, 10^3	АОК к Vi- Ag, 10^3	ЕЦ, %	АЗКЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	30,5 $\pm$ 3,0	22,3 $\pm$ 2,4	27,0 $\pm$ 2,0	13,2 $\pm$ 1,4	33,0 $\pm$ 2,6
Фенobarбитал	38,4 $\pm$ 3,1	26,8 $\pm$ 2,2	33,9 $\pm$ 2,5*	16,5 $\pm$ 1,7	38,7 $\pm$ 2,5
Бензонал	37,9 $\pm$ 3,2	25,9 $\pm$ 2,8	36,8 $\pm$ 2,7*	17,3 $\pm$ 1,6	40,2 $\pm$ 3,1
ДДВФ	17,2 $\pm$ 2,3*	16,2 $\pm$ 2,0*	15,7 $\pm$ 1,7*	7,8 $\pm$ 1,5*	16,7 $\pm$ 1,9*
Хлорофос	14,4 $\pm$ 2,1*	12,6 $\pm$ 1,4*	18,0 $\pm$ 1,8*	8,4 $\pm$ 1,3*	16,0 $\pm$ 1,7*
Фенobarбитал + хлорофос	8,8 $\pm$ 1,3**	8,1 $\pm$ 1,3**	14,7 $\pm$ 1,4*	4,9 $\pm$ 1,1*	10,1 $\pm$ 2,0**
Бензонал + хлорофос	9,3 $\pm$ 1,2**	6,9 $\pm$ 1,5**	10,4 $\pm$ 1,1**	5,5 $\pm$ 1,0	8,8 $\pm$ 1,3**
Фенobarбитал + ДДВФ	24,1 $\pm$ 2,4	17,9 $\pm$ 2,3	22,8 $\pm$ 1,9	9,2 $\pm$ 1,3	27,5 $\pm$ 2,3
Бензонал + ДДВФ	26,7 $\pm$ 2,6	20,0 $\pm$ 2,1	25,5 $\pm$ 2,2	10,5 $\pm$ 1,4	28,0 $\pm$ 2,7

Примечание. * - $p<0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p<0,05$ по сравнению с контролем и показателем после интоксикации ФОС без применения индукторов монооксигеназной системы.

Острая интоксикация ДДВФ вызывала снижение Т-зависимого, Т-независимой гуморальной иммунной реакции, ЕЦ, АЗКЦ и реакции ГЗТ соответственно в 1,77; 1,38; 1,71; 1,69 и 1,98 раза ($p<0,05$), а хлорофосом соответственно в 2,10; 1,75; 1,49; 1,59 и 2,07 раза ($p<0,05$).

Хлорофос, метаболизирующийся до более токсичного ДДВФ [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983], после применения фенobarбитала вызывал супрессию антителопродукции (к Т-зависимому и Т-независимому антигенам), активности ЕКК, уменьшение АЗКЦ и функции Th1-лимфоцитов (реакции ГЗТ) соответственно в 3,43; 2,72; 1,82; 2,64 и 3,23 раза ($p<0,05$), а после использования бензонала - в 3,24; 3,19; 2,57; 2,49 и 3,71 раза ($p<0,05$) соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что редукция параметров иммунного статуса под влиянием ферментиндуцирующих средств (фенobarбитала и бензонала) после острой интоксикации ФОС, в частности, хлорофосом, метаболизирующегося до более токсичного соединения ДДВФ (феномен «летального синтеза») более выражена, чем при остром действии ДДВФ (метаболита хлорофоса) ($p<0,05$).

Иммунотоксичность при остром действии ДДВФ, который биотрансформируется до менее токсичных (или нетоксичных) веществ (диметилфосфата, дихлорвинилового спирта, дихлорацетальдегида, а также

дихлорэтанола, дихлоруксусной кислоты) [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983] после индукции фенобарбиталом и бензоном цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ значительно снижалась по сравнению с действием диметилдихлорвинилфосфата без применения индукторов монооксигеназной системы и была несущественно ниже контрольных значений ($p > 0,05$).

Под влиянием фенобарбитала и бензонала статистически значимо увеличивалось время гексеналового сна (рис. 11.1).

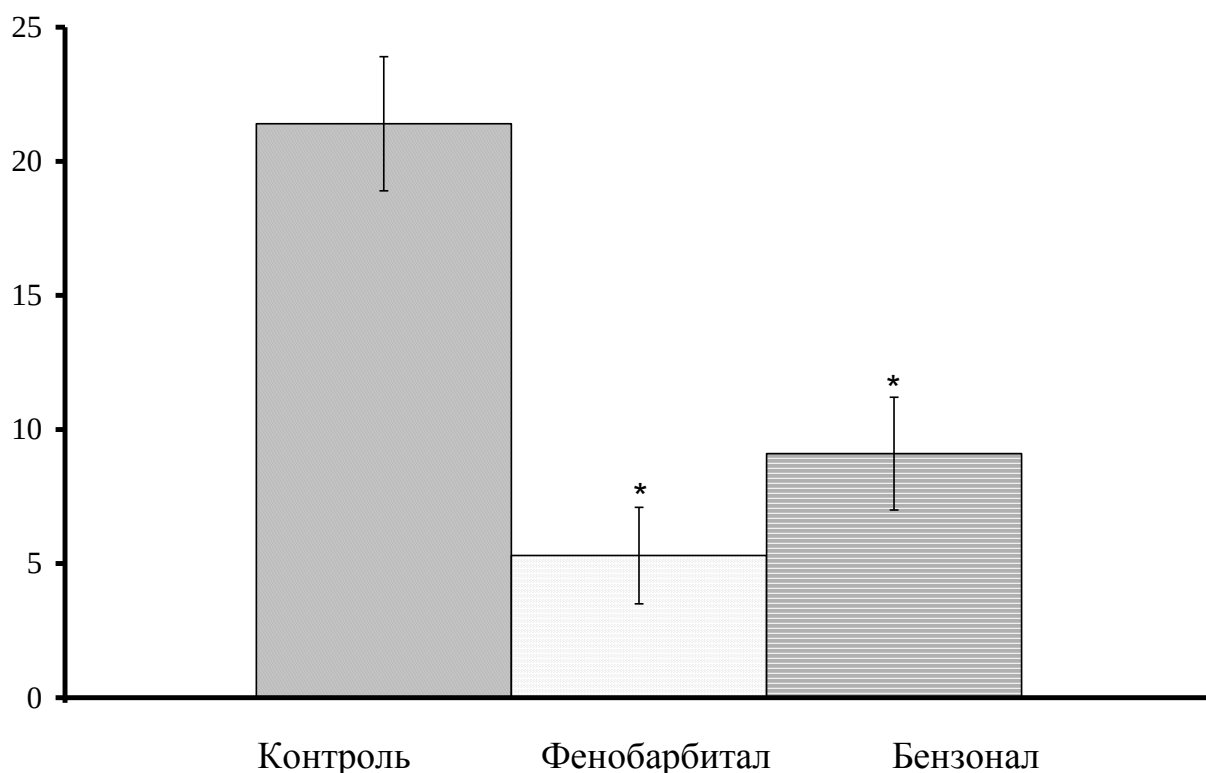


Рис. 11.1. Влияние фенобарбитала и бензонала на продолжительность гексобарбиталового сна крыс, мин ($M \pm m$)

По оси абсцисс – препараты; в каждой серии использовалось 8-9 крыс; по оси ординат – продолжительность гексобарбиталового сна, мин; * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Вероятно, это обусловлено индукцией цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ в лимфоидной ткани (иммунокомпетентных клетках). Известно, что витамин А, левамизол, фенобарбитал и другие вещества, индуцирующие монооксигеназные системы, способны повышать активность Т-лимфоцитов, ЕКК в результате индукции в иммуноцитах цитохром-Р-450-зависимых монооксигеназ [Саприн А.Н. и соавт., 1982].

Цитохром Р-450-зависимые монооксигены печени и лимфоидной ткани, значительно повышая биотрансформацию хлорофоса [Каган Ю.С. и соавт., 1980], превращают его в более токсичный ДДВФ (феномен «летального синтеза») [Голиков С.Н., 1968], что существенно увеличивает иммунотоксичность подвергнувшегося биотрансформации хлорофоса.

Поражение иммунной системы ДДВФ, снижается предварительной индукцией монооксигеназной системы, энзимы которой приводят к образованию менее ядовитых (или нетоксичных) соединений. Следует отметить, что при действии хлорофоса иммунотоксичность обусловлена как самим ФОС, так и его метаболитом ДДВФ, а при интоксикации ДДВФ супрессия иммунных реакций связана только с действием диметилдихлорвинилфосфатом (его метаболиты малотоксичны или нетоксичны) [Михайлов С.С., Щербак И.Г., 1983; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Таким образом, в зависимости от характера метаболизма ФОС (образующихся при их биотрансформации продуктов) цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы могут повышать или снижать их иммунотоксичность. Использование индукторов монооксигеназной системы фенобарбитала и бензонала перорально в течение трех суток в дозах соответственно 50 и 70 мг/кг до острого отравления животных хлорофосом, метаболизирующегося в организме до высокотоксичного соединения ДДВФ, вызывает увеличение иммунотоксических свойств хлорофоса. Применение индукторов цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ до острой интоксикации ядами, в частности, ДДВФ, которые биотрансформируются в организме до малотоксичных или нетоксичных веществ существенно уменьшают их супрессирующее действие на показатели системы иммунитета.

11.2. Влияние иммуностимуляторов на фагоцитарно-метаболическую активность нейтрофилов и показатели иммунного ответа при острой интоксикации ФОС с применением антидотов

При изучении иммуностимулирующих свойств Т-активина, имунофана и полиоксидония в опытах на крысах после острого отравления ФОС с применением антидотов в дозе 1,0 DL₅₀ установлено, что (как это уже указывалось в предыдущих главах) атропин и карбоксим (карбоксим в сочетании с атропином) соответственно увеличивал и уменьшал супрессию показателей НРО и иммунного статуса по сравнению с показателями после интоксикации ФОС. Карбоксим в сочетании с атропином незначительно увеличивал параметры по сравнению с показателями при интоксикации ФОС. При этом факторы НРО и показатели иммунного статуса оставались ниже контрольных значений. Полученные данные предполагают применение средств, направленных на восстановление нарушений НРО и иммунного гомеостаза (иммуностимуляторов).

Для оценки эффективности Т-активина, имунофана и полиоксидония, возможность восстановления которыми параметров НРО и иммунного статуса нами была обоснована в главе 5.

Нами в опытах на неинбредных белых крысах установлено (табл. 11.2), что ФМАН, активность Th1-клеток, ЕКК и гуморальный иммунный ответ к

тимусзависимому антигену (ЭБ) на 5 сут после острого воздействия метафоса снижались соответственно в 2,21; 1,80; 2,26 и 2,10 раза ($p<0,05$), при комбинации метафоса и атропина - в 3,10; 2,55; 3,72 и 2,99 раза ($p<0,05$), при действии метафоса в сочетании с карбоксимом в 1,55; 1,34; 1,44 и 1,89 раза ($p<0,05$), а при сочетанном действии метафоса, атропина и карбоксима в 2,07; 1,55; 1,63 и 1,68 раза соответственно ($p<0,05$).

Таблица 11.2. Действие имунофана и полиоксидония на ФМАН и показатели иммунного ответа при остром отравлении ФОС в дозе 1,0 DL₅₀, в комбинации с антидотами при применении иммуностимуляторов на 5 сут после отравления (M±m)

Серии опытов	ФМАН, иан	АОК к ЭБ, $\cdot 10^3$	Активность Th1-клеток, %	Активность ЕКК, %
Контроль	0,31±0,02 (28)	36,2±1,3 (25)	33,5±1,2 (21)	32,3±1,2 (21)
Метафос	0,14±0,02*	20,1±2,0*	14,8±1,8*	15,4±1,6*
ХФ	0,15±0,03*	21,0±1,9*	16,0±2,2*	15,8±1,7*
ДДВФ	0,19±0,02*	23,3±2,2*	18,1±1,9*	17,5±1,8*
ХФ + атропин	0,09±0,02**	15,1±1,6**	10,2±1,6**	10,5±1,5**
ХФ + карбоксим	0,24±0,02**	26,7±1,8**	24,0±2,1**	22,5±2,0**
ДДВФ + атропин	0,15±0,02**	16,2±1,7**	12,3±1,5**	12,0±1,4**
ДДВФ + карбоксим	0,25±0,02**	29,9±2,1**	23,8±1,8**	23,1±1,9**
Метафос+атропин	0,10±0,02*	14,2±1,4**	9,0±1,3**	10,8±1,1**
Метафос+карбоксим	0,20±0,03**	27,0±2,2**	23,2±2,1**	17,1±2,5*
Метафос+атропин+ карбоксим	0,15±0,02*	23,3±2,1*	20,6±2,2**	19,2±1,8*
Метафос+атропин+ карбоксим имунофан	0,25±0,02*	34,4±3,3	31,7±2,9	30,1±3,2
Метафос+атропин+ карбоксим + ПО	0,33±0,03°	38,7±3,5	36,0±3,2	32,5±3,3

Примечание: ХФ – хлорофос; ПО – полиоксидоний, иан – индекс активности нейтрофилов; в скобках – число крыс; в каждой группе использовалось 7-9 крыс; * - $p<0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p<0,05$ по сравнению с контролем и показателем после интоксикации ФОС; ° - $p<0,05$ по сравнению с показателем после интоксикации ФОС в комбинации с антидотами и имунофаном.

Аналогичные показатели, свидетельствующие о существенном увеличении супрессии показателей при использовании атропина ($p<0,05$) и о снижении ее при назначении карбоксима ($p<0,05$) по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС, получены в экспериментах при сочетанном применении хлорофоса, а также ДДВФ и их антидотов. При этом карбоксим не восстанавливает ФМАН и иммунные реакции до контрольного уровня. В порядке снижения эффекта ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ, что обусловлено особенностями их токсикокинетики.

Таким образом, комбинация различных ФОС с атропином независимо от

токсичности и токсикокинетики ядов увеличивают супрессию показателей и частично снижают их при назначении карбоксима.

Следует отметить, что использование атропина и реактиваторов холинэстеразы предписано всеми учебниками и руководствами по лечению острых отравлений ФОС [Голиков С.Н, 1968; Медведь Л.И. и соавт., 1968; Каган Ю.С., 1977; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Маркова И.В. и соавт., 1998; Куценко С.А., 2004]. Поэтому эффективность иммуностимуляторов оценивалась при отравлении наиболее токсичного ФОС метафоса на фоне применения атропина и карбоксима. Кроме того, антидот карбоксим полностью не восстанавливает ФМАН и иммунные реакции, а атропин даже усиливает их редукцию.

Применение имунофана после интоксикации метафосом и применении антидотов ФОС (атропина и карбоксима) приводило к увеличению ФМАН, активности Th1-клеток, ЕКК и гуморального иммунного ответа по сравнению показателями при интоксикации ФОС соответственно в 1,79; 1,71; 2,14 и 1,95 раза ($p < 0,05$). При этом по сравнению с контролем исследованные параметры были снижены соответственно – в 1,24 ($p < 0,05$); 1,05; 1,06 и 1,07 раза, что свидетельствует о том, что имунофан не восстанавливает до уровня контрольного значения ФМАН.

Назначение полиоксидония после интоксикации метафосом и применении его антидотов (атропина и карбоксима) ФОС приводило к увеличению ФМАН, активности Th1-клеток, ЕКК и гуморального иммунного ответа по сравнению показателями при интоксикации ФОС соответственно в 2,36; 1,90; 2,43 и 2,11 раза ($p < 0,05$). При этом исследованные показатели по сравнению с контролем практически не отличались, что свидетельствует о том, что полиоксидоний восстанавливает до уровня контрольного значения, наиболее поражаемые ФОС (и ФОС в комбинации с антидотами) параметры доиммунного и иммунного гомеостаза.

В целом эффективность полиоксидония несущественно превышала стимулирующий эффект имунофана, за исключением действия ПО в комбинации с антидотами при отравлении ФОС при исследовании ФМАН. В среднем имунофан увеличивал исследованные показатели в $1,89 \pm 0,17$ раза по сравнению с параметрами при интоксикации ФОС (и ФОС в комбинации с антидотами), а полиоксидоний – в $2,20 \pm 0,20$ раза.

При Т-зависимом антителообразовании действие имунофана и полиоксидония, вероятно, реализуется путем активации процесса кооперации макрофагов, Т-клеток и В-лимфоцитов, антителопродуцирующих В-клеток, функции Th1-лимфоцитов, секретирующих γ -интерферон, β -фактор некроза опухоли (лимфотоксин), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), и Th2-клеток, продуцирующих ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-10 и ГМ-КСФ [Ройт А., 2000; Хайтов Р.М. и соавт., 2002; ; Kimber I., 1996].

При остром отравлении метафосом в условиях специфической терапии атропином и карбоксимом (табл. 11.3) иммуногенеза выявлено уменьшение

концентрации ИФН- γ на 5 сут после иммунизации ЭБ в 1,77 раза ($p<0,05$), а ИЛ-4 - в 1,33 раза ($p<0,05$). Аналогичные данные получены при исследовании концентрации цитокинов в крови на 8 сут. Соотношение ИФН γ /ИЛ-4 снижалось через 5 и 8 сут соответственно до 5,25 и 5,78, что свидетельствует о преимущественном поражении Th1-клеток. Применение полиоксидония приводило к полному восстановлению содержания цитокинов в крови и соотношения ИФН γ /ИЛ-4 после интоксикации ФОС в комбинации с антидотами атропином и карбоксимом (табл. 11.3).

Таблица 11.3. Влияние интоксикации ФОС (1,0 DL₅₀) в продуктивной фазе иммуногенеза на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ($M \pm m$, $n=6$)

Серии опытов		ИФН- γ	ИЛ-4	ИФН γ /ИЛ-4
Контроль	t	902 $\pm$ 82	129 $\pm$ 12	6,99 $\pm$ 0,64
Метафос + атропин + карбоксим	5	510 $\pm$ 50**	97 $\pm$ 8*	5,25 $\pm$ 0,51*
	8	533 $\pm$ 62**	95 $\pm$ 9*	5,78 $\pm$ 0,54
Метафос + атропин + карбоксим +ПО	5	895 $\pm$ 86	118 $\pm$ 13	7,58 $\pm$ 0,73
	8	910 $\pm$ 88	125 $\pm$ 14	7,28 $\pm$ 0,70

Примечание: ПО – полиоксидоний; t - 5, 8 - время исследования после иммунизации, сут;
* - $p<0,05$ по сравнению с контролем; ** - $p<0,05$ по сравнению с контролем и параметрами при интоксикации ФОС.

Доказанная нами возможность восстановления имунофаном и полиоксидонием основных показателей гуморального и клеточного иммунитета и концентрации цитокинов в крови дает основания предполагать, что механизм их действия может быть связан с неспецифической стимуляцией функций клеток организма, способных к пролиферации, а также с увеличением секреции цитокинов Т-клетками. Иммуностимулирующие свойства имунофана и полиоксидония обусловлены помимо активации зрелых лимфоцитов полипотентных стволовых кроветворных клеток [Лебедев В.В. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А., 2003; Михайлова М.Н. и соавт., 2003; Попова Е.А. и соавт., 2003; Щеглова М.Ю., Макарова Г.А., 2003]. Этот механизм, вероятно, при действии имунофана обеспечивается стимуляцией синтеза энзимов и других белков вследствие активации иммуностимуляторами циклического аденозинмонофосфата, РНК-полимеразы, синтеза ДНК [Белокрылов Г.А. и соавт., 1999].

Полиоксидоний, вероятно, стимулирует В-клетки (плазмоциты), синтезирующие IgM (в использованном тесте), а также ЕКК после интоксикации ФОС в комбинации с антидотами вследствие способности активировать выработку γ -интерферона Th1-лимфоцитами. Этот лимфокин активирует ЕКК и восстанавливает постинтоксикационное нарушение их функции, а также индуцирует экспрессию рецепторов ИЛ-2 на их поверхности [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Полиоксидоний, вероятно, как и имунофан активируют Th1-лимфоциты, Th1-клетки памяти и макрофаги

вследствие увеличения активности РНК-полимеразы и синтеза ДНК лимфоцитов [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2000, 2002].

Таким образом, полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ФОС в дозе 1,0 DL₅₀ (и ФОС в комбинации с антидотами) достигается применением полиоксидония, который увеличивает секрецию ИФН γ и ИЛ-4 соответственно Th1- и Th2-клетками. Имунофан восстанавливает практически до контрольных значений все основные показатели системы иммунитета, за исключением ФМАН.

11.3. Влияние полиоксидония на показатели системы иммунитета после острого отравления фосфорорганическими соединениями

Нами исследовались влияние полиоксидония, как наиболее эффективного иммуностимулятора, на основные показатели иммунного статуса у людей, получивших отравление средней степени тяжести ФОС (ДДВФ, хлорофосом, метафосом) (табл. 11.4).

Таблица 11.4. Влияние полиоксидония на показатели иммунного гомеостаза у лиц, получивших острые отравления ФОС средней степени тяжести на 10 сут

Показатели	Контроль (30)	Отравление (11)	Лечение (10)
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	5,7 $\pm$ 0,5	9,2 $\pm$ 0,9*	7,6 $\pm$ 0,8*
Лимфоциты, % / 10 ⁹ /л	31,8 $\pm$ 1,6/ 1,81 $\pm$ 0,12	17,1 $\pm$ 2,7*/ 1,57 $\pm$ 0,16	25,6 $\pm$ 2,5 / 1,91 $\pm$ 0,17
CD3, % /10 ⁹ /л	77,0 $\pm$ 2,8/ 1,39 $\pm$ 0,08	58,0 $\pm$ 2,5*/ 0,91 $\pm$ 0,05*	62,1 $\pm$ 2,7/ 1,23 $\pm$ 0,06
CD4, % /10 ⁹ /л	41,5 $\pm$ 2,3/ 0,57 $\pm$ 0,03	35,5 $\pm$ 3,3*/ 0,32 $\pm$ 0,04*	37,7 $\pm$ 3,4/ 0,47 $\pm$ 0,05
CD8, % /10 ⁹ /л	18,2 $\pm$ 1,5/ 0,25 $\pm$ 0,01	23,4 $\pm$ 2,4*/ 0,21 $\pm$ 0,03*	20,1 $\pm$ 2,5/ 0,24 $\pm$ 0,04
CD4/CD8	2,28 $\pm$ 0,26	1,52 $\pm$ 0,18*	1,87 $\pm$ 0,20
CD16, % /10 ⁹ /л	19,3 $\pm$ 1,5/ 0,27 $\pm$ 0,02	17,7 $\pm$ 2,0/ 0,16 $\pm$ 0,03*	18,0 $\pm$ 2,1/ 0,22 $\pm$ 0,03
CD72, % /10 ⁹ /л	11,2 $\pm$ 1,1/ 0,20 $\pm$ 0,02	16,8 $\pm$ 2,1*/ 0,15 $\pm$ 0,02*	15,5 $\pm$ 1,9*/ 0,19 $\pm$ 0,03
IgA, г/л	1,96 $\pm$ 0,16	2,81 $\pm$ 0,37*	2,52 $\pm$ 0,27*
IgM, г/л	1,46 $\pm$ 0,07	1,24 $\pm$ 0,08*	1,35 $\pm$ 0,10
IgG, г/л	12,2 $\pm$ 0,4	10,0 $\pm$ 0,5*	12,0 $\pm$ 0,6
РБТЛ с ФГА, %	22,3 $\pm$ 2,5	15,0 $\pm$ 2,3*	18,4 $\pm$ 2,4
АЗКЦ, %	12,3 $\pm$ 1,3	8,0 $\pm$ 1,4*	13,5 $\pm$ 1,8

Примечание: РБТЛ – реакция бласттрансформации лейкоцитов, ФГА – фитогемагглютинин; в скобках – число наблюдений; * - различие с контролем (практически здоровые люди в возрасте 20-45 лет) достоверно - $p < 0,05$; ° - различие с контролем и показателями у больных.

Больные с отравлениями получали антидоты атропин и карбоксим в дозах, рекомендованных современными учебниками и руководствами [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000; Маркова И.В. и соавт., 1998; Куценко С.А., 2004]. Полиоксидоний применялся ежедневно внутримышечно в дозе 12 мг один раз в сутки ежедневно, через день, общим курсом 9 инъекций, начиная с первых суток поступления больного в стационар.

Установлено, что после острых отравлений ФОС средней степени применение полиоксидония на 10 сут приводило к практически полному или частичному (но статистически не значимому – $p < 0,05$) восстановлению большинства показателей иммунного статуса. После лечения оставались увеличенным синтез IgA (вероятно, вследствие увеличения их продукции в результате воспалительных изменений слизистых оболочек дыхательных путей), сохранялось увеличенное содержание в крови числа лейкоцитов, а также вследствие сохранившегося после лечения лейкоцитоза относительное содержание В-лимфоцитов (CD72).

Таким образом, применение полиоксидония после поступления больных в стационар с отравлением ФОС средней степени тяжести в условиях применения атропина и карбоксима восстанавливало практически все показатели иммунного статуса на 10 сут. Результаты клинических наблюдений подтверждают полученные экспериментальные данные.

Резюме

Заключая данную главу, можно постулировать, что в зависимости от характера метаболизма ФОС (образующихся при их биотрансформации продуктов) цитохром Р-450-зависимые монооксигеназы могут повышать или снижать их иммунотоксичность. Использование индукторов монооксигеназной системы фенobarбитала и бензонала перорально в течение трех суток в дозах соответственно 50 и 70 мг/кг до острого отравления животных хлорофосом, метаболизирующегося в организме до высокотоксичного соединения ДДВФ, вызывает увеличение иммунотоксических свойств хлорофоса. Применение индукторов цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ до острой интоксикации ядами, в частности, ДДВФ, которые биотрансформируются в организме до малотоксичных или нетоксичных веществ существенно уменьшают их супрессирующее действие на показатели системы иммунитета.

В порядке снижения эффекта ФОС в эквивалентных дозах располагались в последовательности: метафос, хлорофос, ДДВФ. ФОС независимо от их токсичности и токсикокинетики при сочетанном применении с атропином увеличивают супрессию показателей и частично снижают ее при назначении карбоксима. При этом карбоксим не восстанавливает ФМАН и иммунные реакции до контрольного уровня.

Полное восстановление показателей иммунного статуса после острого отравления ФОС в дозе 1,0 DL₅₀ (и ФОС в комбинации с антидотами) достигается применением полиоксидония, который увеличивает секрецию ИФН γ и ИЛ-4 соответственно Th1- и Th2-клетками. Имунофан восстанавливает практически до контрольных значений все основные показатели системы иммунитета, за исключением ФМАН.

Применение полиоксидония после поступления больных с отравление ФОС средней степени тяжести в стационар, восстанавливало практически все показатели иммунного статуса. Результаты клинических наблюдений подтверждают полученные экспериментальные данные.

ГЛАВА 12. СНИЖЕНИЕ КЛЕТОЧНЫХ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ, ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ. ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ

12.1. Изучение функции Th1-лимфоцитов и оценка эффективности коррекции нарушений

В качестве ФОВ использовали российский VX и зарин, которые вводили подкожно в дозе, составляющей 0,01 DL₅₀, ежедневно в течение 30 сут (суммарная доза – 0,3 DL₅₀). В ряде экспериментальных моделей интоксикация проводилась на протяжении 60 сут (0,01 DL₅₀, ежедневно). DL₅₀ вещества VX и зарина при подкожном введении крысам составляли соответственно 0,018±0,02 и 0,21±0,02 мг/кг.

Исследуемые токсодозы ФОВ соответствуют условиям, возникающим при аварии на химическом предприятии IV класса опасности. Это предполагает нарушение экологической системы с периодом самовосстановления не менее 3-х лет. При использованных токсодозах ФОВ возможна хроническая интоксикация не только в результате аварии, но и вследствие грубого нарушения техники безопасности. Степень возможного вредного воздействия на окружающую природную среду устанавливалась на основании данных табл. 1 «Приказа Министерства природных ресурсов "Об утверждении критериев отнесения опасных отходов к классу опасности для окружающей природной среды" (Приказ от 15 июня 2001 г. № 511).

Исследуемые токсодозы ФОВ, превышающие воздействие ПДК в течение 30 и 60 сут (суммарные дозы – соответственно 0,3 и 0,6 DL₅₀) в несколько раз, могут вызывать поражение органов и систем без проявления клинических симптомов интоксикации даже на уровне поражения легкой степени тяжести [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Отравление ФОВ может быть диагностировано на основании биохимических (иммунологических исследований) [Заугольников С.Д. и соавт., 1978; Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Через 30 или 60 сут после интоксикации у животных (и людей) практически не будут проявляться симптомы отравления ФОВ легкой степени тяжести [Лудевиг Р., Лос К., 1983; Могуш Г., 1984; Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Использованные токсодозы ФОВ (данные получены при исследовании фосфорорганических инсектицидов) по данным ряда исследователей практически не влияют на показатели системы иммунитета [Koller L.D. et al., 1976; Desi I. et al., 1986; Fernandez-Cabezudo M.J. et al., 2008], а в ряде случаев увеличивают антителопродукцию [Шафеев М.Ш., 1976; Kossman S. et al., 1985].

В качестве иммуностимуляторов (иммуномодуляторов) в эксперименте использовали Т-активин (20 мкг/кг), имунофан (20 мкг/кг), полиоксидоний (150 мкг/кг) в эквитерапевтических дозах, то есть дозах, вызывающих

рекомендуемый данными литературы и справочниками, одинаковый терапевтический эффект (высшая разовая доза). Препараты вводили внутримышечно однократно, ежедневно в течение 7 сут при хронической интоксикации ФОВ в течение 30 сут, начиная с 24 сут, а при интоксикации в течение 60 сут – начиная с 54 сут. Дозы иммуностимуляторов для животных обоснованы данными литературы и расчетами (исходя из данных, приведенных в справочниках с описанием и рекомендациями назначения лекарственных средств для человека). Исследование функции Th1-лимфоцитов по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) после воздействия ФОС позволяет установить их действие на один из элементов клеточного иммунного ответа, в частности, на функцию Th1-клеток и продукцию ими ИЛ-2, γ -интерферона (ИФН- γ), β -фактора некроза опухоли и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (ГМ-КСФ) лимфоцитов, а также на участвующие в реализации гиперчувствительности IV типа Т-клетки памяти и макрофагов [Ройт А. и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993].

В результате экспериментов на белых крысах нами установлено (рис. 12.1), что под влиянием вещества VX и зарина происходило снижение реакции ГЗТ (без переноса клеток) соответственно в 2,17 и 1,88 раза ($p < 0,05$). По степени снижения параметра действие ФОВ в эквивалентных дозах практически не отличалось.

Известно, что кроме Th1-лимфоцитов в реакции ГЗТ, ФОС, вероятно, способны поражать кератиноциты, клетки Лангерганса кожи, Т-клетки памяти и макрофаги [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М и соавт., 2002; Kimber I., 1996; Descotes J., 2004].

При исследовании содержания цитокинов ИФН- γ и ИЛ-2, продуцируемых Th1-лимфоцитами и играющими основную роль в формировании контактного варианта гиперчувствительности IV типа установлено (табл. 12.1), что через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена ЭБ концентрации ИФН- γ и ИЛ-2 через 30 сут после интоксикации VX снижались соответственно в 1,85 и 1,74 раза ($p < 0,05$).

По степени снижения показателей действие ФОВ в эквивалентных дозах практически не отличалось. При хронической интоксикации ФОВ (вещество VX) Т-активин, имунофан, полиоксидоний восстанавливали активность Th1-лимфоцитов при назначении на 24 сут и применении в течение 7 сут.

Существенных отличий между стимулирующими эффектами различных иммуномодуляторов выявлено не было, хотя отмечалась статистически незначимая более высокая эффективность полиоксидония по сравнению с другими иммуностимуляторами.

Использование Т-активина, имунофана и полиоксидония практически полностью восстанавливало содержание цитокинов ИФН- γ и ИЛ-2.

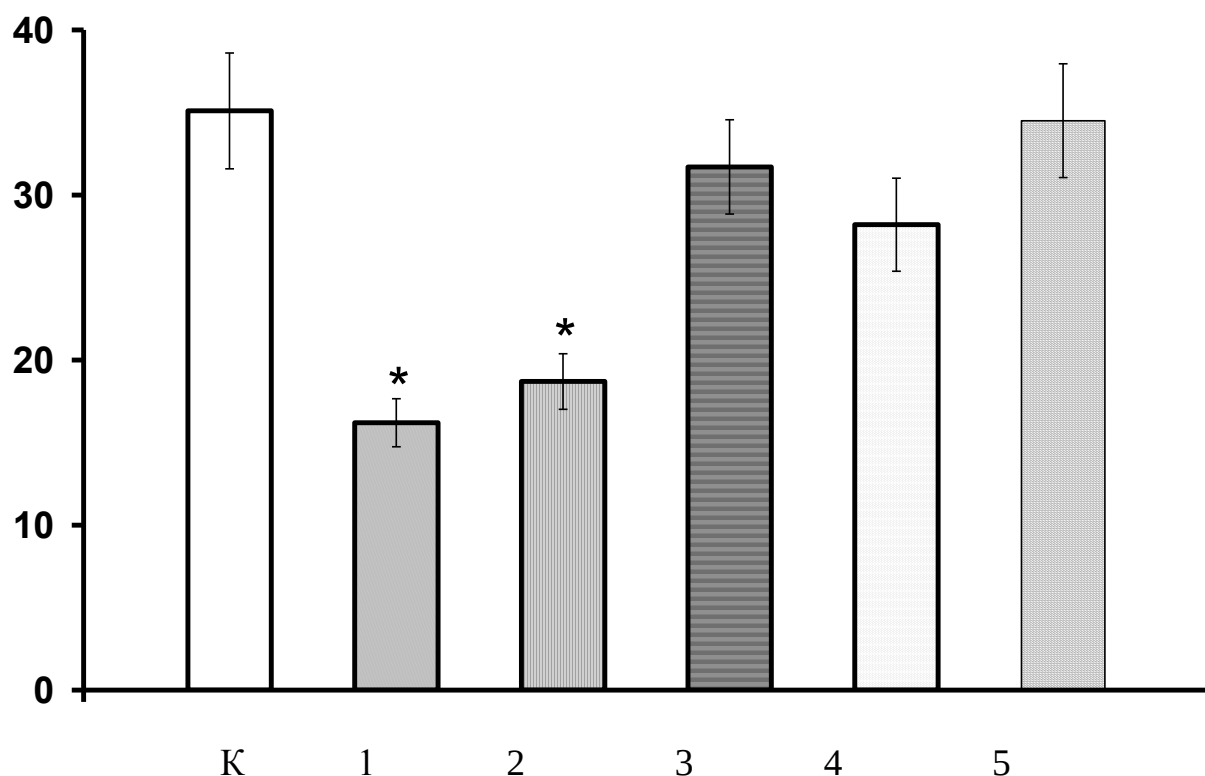


Рис. 12.1. Влияние хронического отравления ФОС и комбинированного действия VX с иммуномодуляторами на функцию Th1-лимфоцитов крыс по формированию гиперчувствительности замедленного типа (прирост массы задней стопы, %) [$M \pm m$; $n=7-8$].

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – зарин, 3 – VX + Т-активин, 4 – VX + имунофан, 5 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: прирост массы задней стопы, %, * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Таким образом, после хронического воздействия ФОС снижается формирование ГЗТ, а также уменьшаются концентрации цитокинов ИФН- γ и ИЛ-2 в крови, свидетельствующее о поражении Th1-клеток. Применение Т-активина, имунофана и полиоксидония в равной степени восстанавливало функцию Th1-лимфоцитов и содержание в крови ИФН- γ и ИЛ-2.

Таблица 12.1. Влияние хронического отравления ФОС и комбинированного действия VX и иммуномодуляторов на содержание цитокинов ИФН- γ и ИЛ-2 в плазме крови пг/мл ($M \pm m$, $n = 7$)

Серии опытов	ИФН- γ	ИЛ-2
Контроль	1005 $\pm$ 78	1352 $\pm$ 105
Вещество VX	543 $\pm$ 71*	778 $\pm$ 75*
VX + Т-активин	805 $\pm$ 79	1090 $\pm$ 103
VX + имунофан	893 $\pm$ 88	1140 $\pm$ 110
VX + полиоксидоний	987 $\pm$ 80	1204 $\pm$ 117

12.2. Исследование антителозависимой клеточной цитотоксичности и эффективности иммунокоррекции

Антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) определяет функция клеток-киллеров (К-клеток). Доказано, что эти клетки идентичны естественным клеткам-киллерам (ЕКК), использующим для усиления реакции антитела (IgG) [Ройт А. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lanier L. L., 2003; Hansasuta P. et al., 2004; Lee J. C., et al., 2004; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006]. ЕКК, активированные связанными с клеткой-мишенью (например, клеткой, пораженной вирусом) антителами, уничтожают ее. При этом антитела (IgG) привлекают своим Fc-хвостом ЕКК, имеющие для этого соответствующий рецептор FcγRIII. Возникает комплекс клетка-мишень – антитело – ЕКК, в котором ЕКК реализует свою киллерную функцию в отношении клетки-мишени [Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Хаитов Р. М., 2006; Garrity D. et al., 2005].

В систему АЗКЦ помимо ЕКК входят моноциты, полиморфноядерные лейкоциты (ПЯЛ) – базофилы, эозинофилы, сегментоядерные лейкоциты, а также другие фагоцитирующие и нефагоцитирующие миелоидные клетки [Ройт А. и соавт., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003].

При хроническом воздействии VX и зарина на АЗКЦ селезенки крыс при иммунизации ЭБ на 26 сут после первого введения ФОВ происходило статистически значимое уменьшение исследованного показателя соответственно в 1,87 и 1,50 раза ($p < 0,05$) на 5 сут после иммунизации (через 30 сут после интоксикации) (рис. 12.2). По степени снижения параметра действие ФОВ в эквивалентных дозах практически не отличалось.

ФОВ снижают АЗКЦ, вероятно, вследствие нарушения связывания IgG (FcγR) с Fc рецепторами. Эти рецепторы связывают К-клетки с IgG-покрытыми клетками-мишенями, которые К-клетки способны уничтожить в «нормальных» условиях (без действия ФОС) [Delves P.J., Roitt I.M., 2000; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006]. ФОВ способны уменьшать АЗКЦ вследствие нарушения электролитного обмена клетки и изменения соотношения цАМФ/цГМФ [Trinchiev G., de Marchi M., 1976; Lanier L. L., 2003] и реализации апоптоза К-клеток [Li Q., Kawada T., 2006].

Существуют основания полагать, что токсикант снижает АЗКЦ вследствие нарушения связывания IgG (FcγR) с Fc рецепторами К-клеток. [Delves P.J., Roitt I.M., 2000; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Применение Т-активина, имунофана и полиоксидония при хронической интоксикации ФОВ (вещество VX) восстанавливали активность АЗКЦ. Выявлен максимальный стимулирующий эффект у полиоксидония.

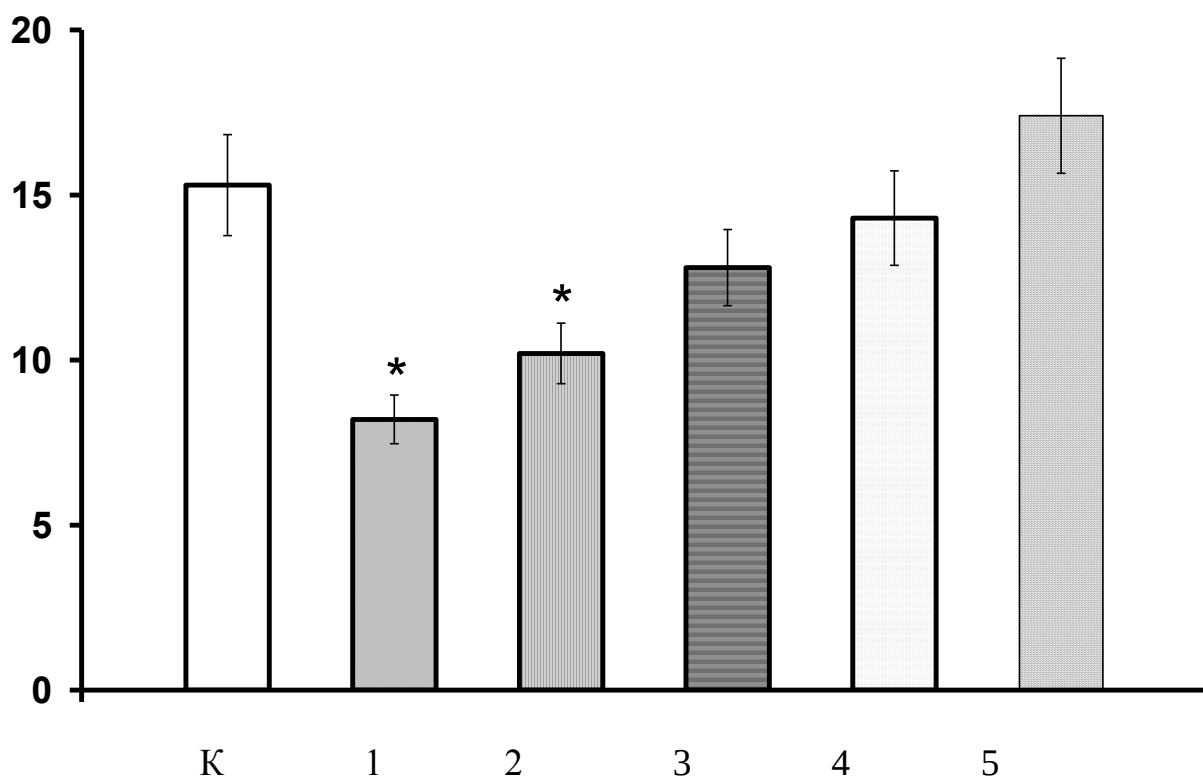


Рис. 12.2. Влияние хронического отравления ФОВ и комбинированного действия VX с иммуномодуляторами на антителозависимую клеточную цитотоксичность спленоцитов крыс, % ($M \pm m$; $n=7-9$)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – зарин, 3 – VX + Т-активин, 4 – VX + имунофан, 5 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: антителозависимая клеточная цитотоксичность спленоцитов, %, * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Таким образом, после воздействия ФОВ снижается АЗКЦ, что свидетельствует о поражении К-клеток. Установлен наибольший стимулирующий эффект у полиоксидония.

12.3. Оценка активности ЕКК селезенки. Фармакологическая коррекция

Как уже упоминалось, ЕКК были открыты в 1976 году. К ним относятся клетки, не имеющие антигенных маркеров Т- и В-лимфоцитов (так называемые, О-клетки). ЕКК происходят из предшественников Т-лимфоцитов [Ройт А., 1991; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2007; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

ЕКК имеет маркерные молекулы CD16, CD56, CD57 и CD94 (преимущественно ЕКК представлены клетками с маркерами CD16 и CD56) [Хайтов Р.М. и соавт., 2000; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; Lanier L. L., 2003; French A. R., Yokoyama W. M., 2007].

Известно, что ЕКК не обладают способностью к фагоцитозу [Петров

P.B., 1987; Ройт А. и соавт., 2000; Lanier L. L., 2003; Hansasuta P. et al., 2004; Garrity D. et al., 2005]. Цитолиз клетки-мишени осуществляется проникновением ферментов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (порообразование перфорином) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000. 2006; Nogueira N., 1984; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; Lee J. C., et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

ЕКК, кроме того, способны обеспечивать уничтожение чужеродной клетки путем реализации "дыхательного взрыва" (поражение активными радикалами кислорода, гидроксильного радикала и т.п.), а также индукцией апоптоза. Активность ЕКК повышается интерферонами, интерлейкинами (ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13) [Хаитов Р. М. и соавт., 2000; Шуршалина А.В. и соавт., 2001; Kimber I., More M., 1985; Marx J.L., 1986].

ЕКК способны уничтожать клетки опухоли, клетки, пораженные вирусами или паразитами, ксеногенные клетки без предварительного контакта с антигенами, находящимися на их поверхности [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р. М. и соавт., 2006]. В частности, они узнают определенные структуры высокомолекулярных гликопротеидов, которые экспрессируются на мембране инфицированных вирусом клеток [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

Киллер-активизирующие рецепторы, локализованные на ЕКК, распознают множество различных молекул на поверхности всех ядерных клеток. На ЕКК находятся и киллер-ингибирующие рецепторы, распознают молекулы главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) класса I, которые также обычно присутствуют на всех ядерных клетках. Если активизирующие ЕКК «включаются», запускается команда, реализующая «киллинг» (уничтожение чужеродной клетки для ЕКК). Этот сигнал обычно отменяется запрещающим сигналом, который посылает ингибирующий рецептор ЕКК при распознавании им молекулы ГКГС класса I. Эта система используется ЕКК для того, чтобы распознать нормальные клетки и клетки, испытывающие на своей поверхности недостаток молекул главного комплекса гистосовместимости класса I. Киллер-активизирующие рецепторы распознают множество молекул, представленных на поверхности нормальных ядерных клеток, и, в отсутствии подавляющего сигнала от киллер-ингибирующих рецепторов киллер-активирующие рецепторы реализуют сигнал ЕКК атаковать и уничтожить другую клетку. Цитотоксические гранулы ЕКК, которые содержат перфорин и гранзимы, поляризуются на границе с клеткой-мишенью и затем проникают в клетку-мишень [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Lee J. C., et al., 2004; Garrity D. et al., 2005; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

При изучении влияния на ЕКК вещества VX и зарина нами установлено (рис. 12.3), что при применении иммуномодуляторов происходило статистически значимое уменьшение активности ЕКК белых крыс ($p < 0,05$) через 30 сут после интоксикации соответственно в 2,01 и 1,69 раза ($p < 0,05$).

По степени снижения параметра действие ФОВ в эквивалентных дозах не отличались.

Существуют основания полагать, что редукция активности ЕКК ФОВ обусловлена снижением концентрации в крови ИЛ-2 и ИЛ-4, а также блокированием проникновения гранзимов из гранул ЕКК в цитоплазму клетки-мишени (или снижением их синтеза) и нарушением процесса порообразования перфорином [Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Nogueira N., 1984; French A. R., Yokoyama W. M., 2003; Garrity D. et al., 2005], усилением апоптоза ЕКК под влиянием ФОВ [Хаитов Р. М. и соавт., 2002; Kimber I., More M., 1985; Durant S., 1986; Marx J.L., 1986; Delves P.J., Roitt I.M., 2000; Garrity D. et al., 2005; Li Q., Kawada T., 2006; MacFarlane A.W., Campbell K.S., 2006].

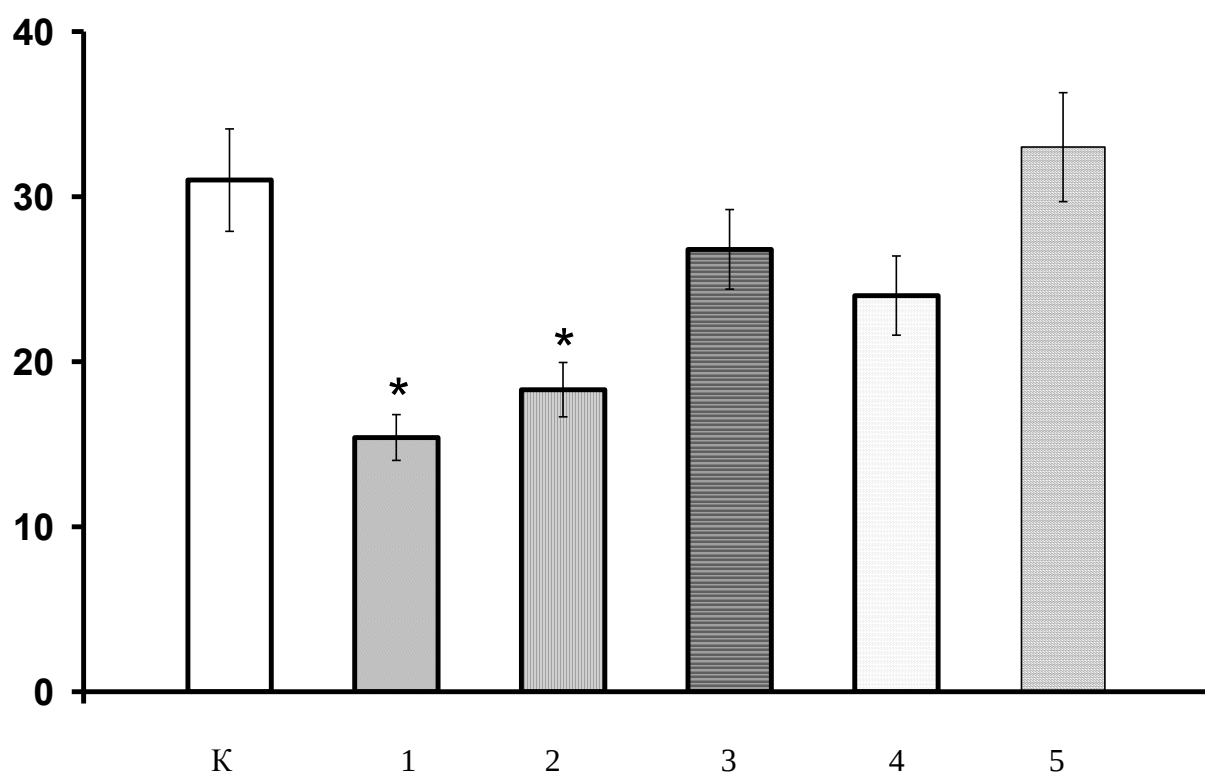


Рис. 12.3. Влияние хронического отравления ФОС в комбинации с иммуномодуляторами на активность естественных клеток-киллеров крыс, % (М+м; n=7-8)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – зарин, 3 – VX + Т-активин, 4 – VX + имунофан, 5 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: активность естественных клеток-киллеров, %, * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Снижение активности ЕКК при воздействии ФОС, вероятно, связано с увеличением концентрации кортикостерона и катехоламинов вследствие активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой и симпатико-адреналовой системы [Pruett S.B. et al., 2009; Glover M. et al., 2009], в результате чего активность ЕКК уменьшается [Glover M. et al., 2009].

Применение Т-активина, имунофана и полиоксидония в эквитерапевтических дозах при хронической интоксикации ФОВ

практически полностью восстанавливало активность естественных клеток-киллеров (рис. 4.3). Выявлен максимальный стимулирующий эффект у полиоксидония.

Таким образом, после хронической интоксикации ФОС выявлено снижение активности ЕКК. Применение Т-активина, имунофана и полиоксидония в эквитерапевтических дозах восстанавливало функцию ЕКК. Установлен наибольший стимулирующий эффект у полиоксидония.

Резюме

Результаты исследований, изложенные в данной главе, позволяют заключить, что хроническое воздействие ФОВ вызывает снижение формирования ГЗТ, а также уменьшение концентрации цитокинов ИФН- γ и ИЛ-2 в крови, свидетельствующее о поражении Th1-клеток. Применение Т-активина, имунофана и полиоксидония в равной степени восстанавливало функцию Th1-лимфоцитов и концентрацию ИФН- γ и ИЛ-2.

Воздействия ФОВ в течение 30 сут снижает АЗКЦ и активность ЕКК. Применение различных иммуномодуляторов - Т-активина, имунофана и полиоксидония - в эквитерапевтических дозах восстанавливало АЗКЦ и функцию ЕКК. Установлен наибольший стимулирующий эффект у полиоксидония.

ГЛАВА 13. ВЛИЯНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ФОС НА ГУМОРАЛЬНЫЕ ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ, КООПЕРАЦИЮ Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ И СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ. ИММУНОКОРРЕКЦИЯ

13.1. Исследование Т-зависимой гуморальной иммунной реакции содержание ИФН- γ в крови

В опытах на белых крысах оценивали действие острого отравления ФОС на гуморальный иммунный ответ к тимусзависимому антигену эритроцитам барана (ЭБ) по числу антителообразующих клеток в селезенке через 5 сут при иммунизации ЭБ. Иммунизация проводилась на 26 сут после первой инъекции ФОВ. Таким образом на 5 сут (через 30 сут после интоксикации ФОВ) после введения ЭБ отмечается пик иммунного ответа, связанный с синтезом IgM [Ройт А. и соавт., 2000; Tumang J.R. et al., 1996; Delves P.J., Roitt I.M., 2000]. Принимая во внимание то, что Th1-лимфоциты участвуют не только в реализации клеточного иммунного ответа, но в синтезе IgM [Pfeifer C. et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993], использованный тест дает представление о функциональной активности как В-лимфоцитов (плазмоцитов), так и о Th1 -лимфоцитов [Ройт А. и соавт., 2000; Abbas A.K. et al., 1996; Fleisher T.A., Oliveira J.B., 2004; Maekawa Y., Yasutomo K., 2005].

Нами показано (рис. 13.1), что у белых крыс после острой интоксикации VX и заринном через 30 сут происходит существенное уменьшение числа АОК соответственно в 1,89 и 1,55 раза ($p < 0,05$). По степени снижения числа АОК, синтезирующих IgM в селезенке, эффект VX несущественно превышал действие зарины.

Данные наших исследований свидетельствуют о том, что при хронической интоксикации ФОС происходит редукция функции, как Th1-лимфоцитов, так и В-клеток (плазмоцитов), продуцирующих IgM [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М., 2002; Pfeifer C. et al., 1991; Ellmeier W., 1999; Xiao W. et al. 2000; Grandmont M.J. et al., 2003; Woof J.M., Kerr M.A., 2004]. Таким образом, при Т-зависимой антителопродукции наряду с поражением ФОВ Th1-клеток могут нарушаться процессы дифференцировки В-лимфоцитов, а также реализовываться эффект активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, сопровождающийся повышением кортикостероидов в крови, снижающих синтез антител [Claman H.N., 1993; Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Это повышение может быть обусловлено, как стресс-реакцией, реализующейся при действии физических и химических факторов достаточно высокой интенсивности [Селье Г., 1972; Забродский П.Ф., 2002; Pruett S., 2008], так и активацией м-холинорецепторов гипоталамуса ацетилхолином вследствие воздействия ФОВ [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

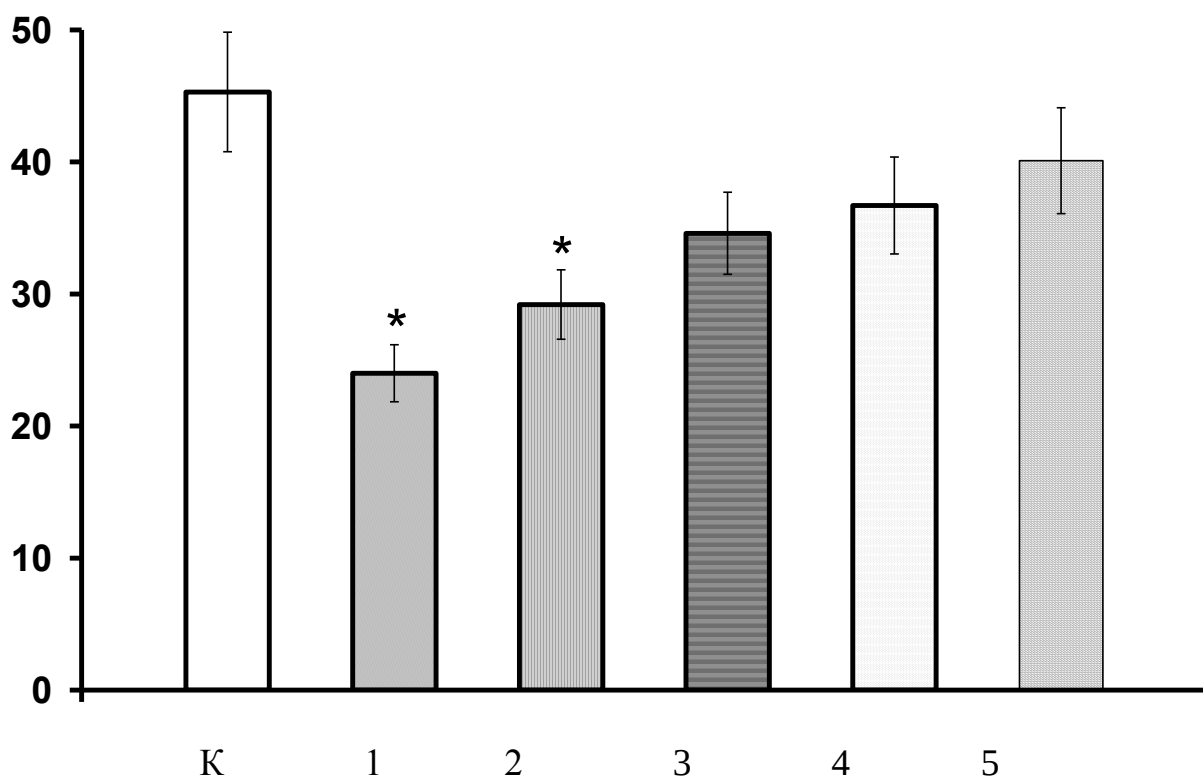


Рис. 13.1. Влияние хронической интоксикации ФОВ и ее комбинированного действия с иммуностимуляторами на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана (10^3), синтезирующим IgM, в селезенке белых крыс ($M \pm m$, $n = 7-8$)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – зарин, 3 – VX + Т-активин, 4 – VX + имунофан, 5 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: число антителообразующих клеток к эритроцитам барана (10^3), * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Уменьшение Т-зависимой антителопродукции (синтеза IgM) под влиянием ФОС, может быть, обусловлено и редукцией синтеза ряда лимфокинов, активирующих В-клетки [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002], в частности ИФН- γ .

Нами экспериментально установлено, что через 30 сут после воздействия VX и зарина выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, в 1,85 и 1,79 раза ($p < 0,05$) соответственно (рис. 13.2). Известно, что данный цитокин активирует В-клетки (плазмциты), способствуя синтезу IgM [Ройт А. и соавт., 2000].

В экспериментах на крысах установлено (табл. 5.1), что при хронической интоксикации веществом VX Т-активин, имунофан, полиоксидоний увеличивали число АОК в селезенке, синтезирующих IgM, соответственно в 1,35; 1,53 и 1,67 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателями при интоксикации. Таким образом, максимальный иммуностимулирующий эффект был выявлен у полиоксидония. Применение этого препарата практически полностью восстанавливало функцию синтеза IgM АОК селезенки.

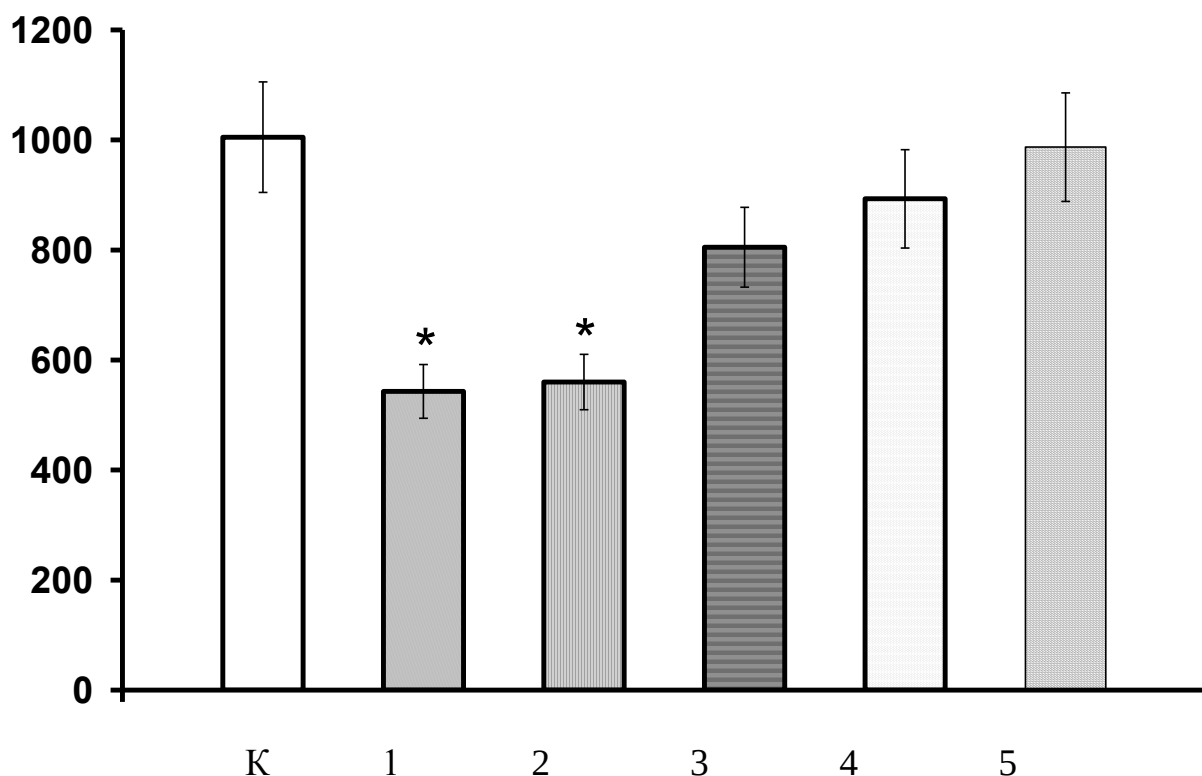


Рис. 13.2. Влияние иммуностимуляторов при хронической интоксикации ФОВ (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на содержание ИФН-γ в плазме крови крыс, пг/мл (M+m, n=7)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – зарин, 3 – VX + Т-активин, 4 – VX + имунофан, 5 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: содержание ИФН-γ, пг/мл, * – различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

У имунофана эффект был несущественно ниже, чем у полиоксидония, а у Т-активина – ниже, чем у имунофана. Применение Т-активина, имунофана и полиоксидония в эквитерапевтических дозах в равной степени восстанавливало Т-зависимое антителообразование (синтез IgM).

Иммуномодуляторы также повышали концентрацию ИФН-γ в крови. При этом она существенно не отличалась от контрольного уровня.

Эффект Т-активина обусловлен его способностью повышать активность В-звена иммунитета [Имантаева Г.М., 2005], активировать макрофаги [Большаков и соавт., 1991], представляющие антиген Т-клеткам, выработку ИФН-γ Th1-лимфоцитами [Ханафиева И.В. и соавт., 1992; Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993], который стимулирует синтез IgM плазмоцитами, увеличивать пролиферацию, дифференцировку и функциональную активность Т-клеток [Стасий Е.Д. и соавт., 1990; Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф., 1991].

Иммуностимулирующее действие имунофана при хронической интоксикации ФОВ обусловлено его иммунорегулирующим, детоксикационным, инактивацией свободнорадикальных процессов ПОЛ [Лебедев В.В. и соавт., 1999а, 1999б, 2000]. При этом достигается коррекция иммунной и окислительно-антиокислительной систем организма.

Эффект полиоксидония обусловлен его иммуностимулирующим действием в отношении Т-, В-лимфоцитов, плазматических клеток и других клеток иммунной системы, а также его антиоксидантными, детоксикационными и мембраностабилизирующими свойствами [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

Таким образом, под влиянием хронической интоксикации ФОС (30 сут, суммарная доза - 0,3 DL₅₀) происходит снижение Т-зависимого антителообразования (отражающему синтез IgM). Применение иммуномодуляторов при хронической интоксикации ФОС практически полностью восстанавливало Т-зависимое антителообразование (синтез IgM АОК селезенки), а также концентрацию в крови ИФН-γ. Эффективность иммуностимулирующих эффектов иммуномодуляторов существенно не отличалась.

13.2. Влияние хронического отравления ФОС на число антителообразующих клеток в селезенке, синтезирующих IgG, и на концентрацию ИЛ-4 в крови. Коррекция нарушений

После хронического отравления ФОС с иммунизацией ЭБ на 16 сут после первого введения токсиканта антителообразование через 30 сут отражает синтез преимущественно IgG (в основном - IgG1) [Ройт А. и соавт., 2000; Tumang J.R. et al., 1996; Delves P.J., Roitt I.M., 2000].

Исследование числа антителообразующих клеток в селезенке мышей, синтезирующих IgG через 14 сут после иммунизации и после введения ФОВ в течение 30 сут, показало (рис. 5.3), что вещество VX и зарин снижают исследованный показатель соответственно в 1,43 и 1,33 раза ($p < 0,05$).

Супрессия синтеза IgG при действии ФОВ, вероятно, связано с инактивацией эстераз Т-лимфоцитов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Вероятно, ФОВ в результате этого эффекта, а также реализации стресс-реакции (увеличении в крови кортикостерона) снижает наряду с активностью Th1-лимфоцитов функцию и Th2-клеток, участвующих в продукции IgG В-лимфоцитами [Pfeifer C. et al., 1991; Georgiev V.St., Albright J.E., 1993].

При хроническом отравлении веществом VX Т-активин, имунофан, полиоксидоний увеличивали число АОК в селезенке, синтезирующих IgG, соответственно в 1,25; 1,29 и 1,41 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателями при интоксикации. Таким образом, максимальный иммуностимулирующий эффект был выявлен у полиоксидония. Применение этого препарата полностью восстанавливало функцию синтез IgG АОК селезенки.

Установлено (рис. 13.3), что через 30 сут после воздействия VX и зарина отмечается уменьшение концентрации ИЛ-4 (на 14 сут после иммунизации ЭБ), продуцируемого Th2-лимфоцитами, в 1,45 и 1,33 раза ($p < 0,05$) соответственно. Этот цитокин активирует В-клетки (плазмоциты), способствуя синтезу IgG [Ройт А. и соавт., 2000].

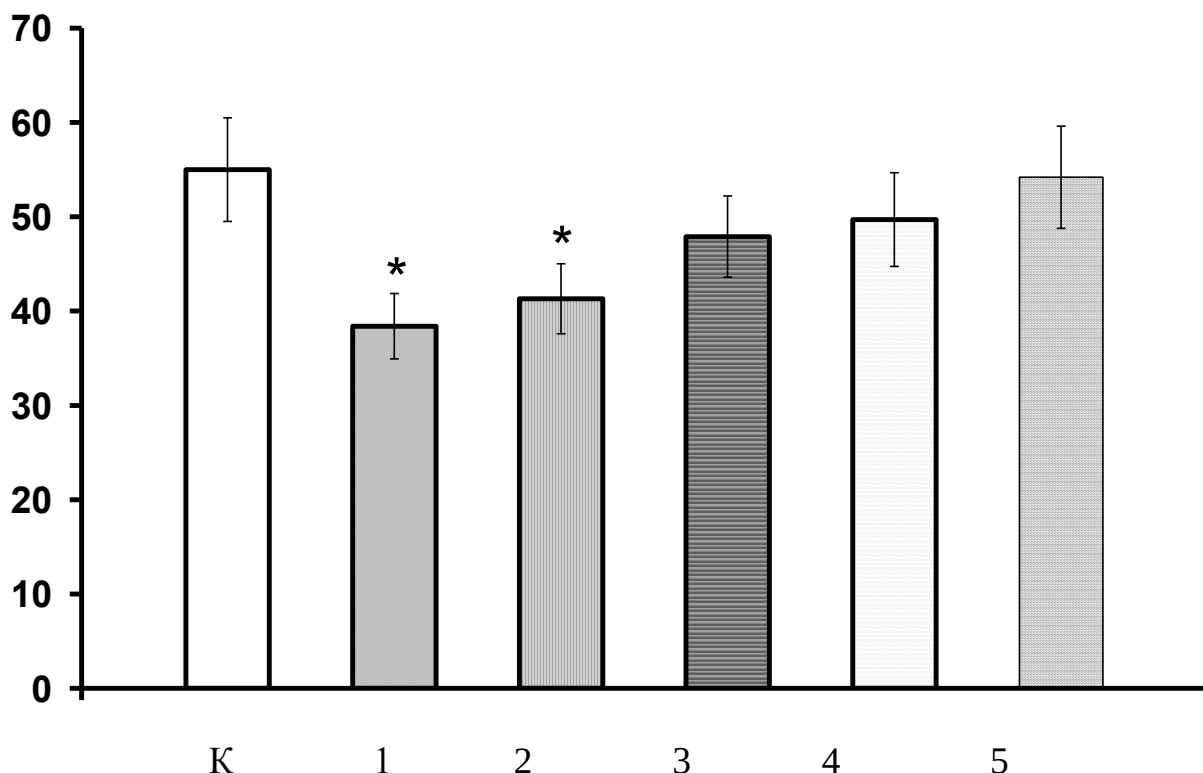


Рис. 13.3. Влияние хронической интоксикации ФОВ и ее комбинированного действия с иммуностимуляторами на число антителообразующих клеток к эритроцитам барана (10^3), синтезирующим IgG, в селезенке белых крыс ($M \pm m$, $n = 7-8$)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – зарин, 3 – VX + Т-активин, 4 – VX + имунофан, 5 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: число антителообразующих клеток к эритроцитам барана (10^3), синтезирующим IgG); * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

При хронической интоксикации веществом VX Т-активин, имунофан, полиоксидоний увеличивали содержание ИЛ-4 в плазме крови соответственно в 1,20; 1,30 и 1,45 раза ($p < 0,05$) по сравнению с показателями при интоксикации. При этом оно существенно не отличалось от контрольного значения (рис. 13.4).

Существенных различий в эффективности исследуемых иммуномодуляторов выявлено не было. Однако, максимальный иммуностимулирующий эффект отмечался у полиоксидония. Применение этого иммуномодулятора полностью восстанавливало содержание ИЛ-4 в плазме крови крыс, что свидетельствует об увеличении его синтеза Th2-клетками [Ройт А. и соавт., 2000].

У имунофана эффект был несущественно ниже, чем у полиоксидония, а у Т-активина – ниже, чем у имунофана. Применение Т-активина, имунофана и полиоксидония в эквитерапевтических дозах в равной степени восстанавливало Т-зависимое антителообразование (синтез IgG).

Иммуностимуляторы также повышали концентрацию ИФН- γ в крови. При этом она существенно не отличалась от контрольного уровня.

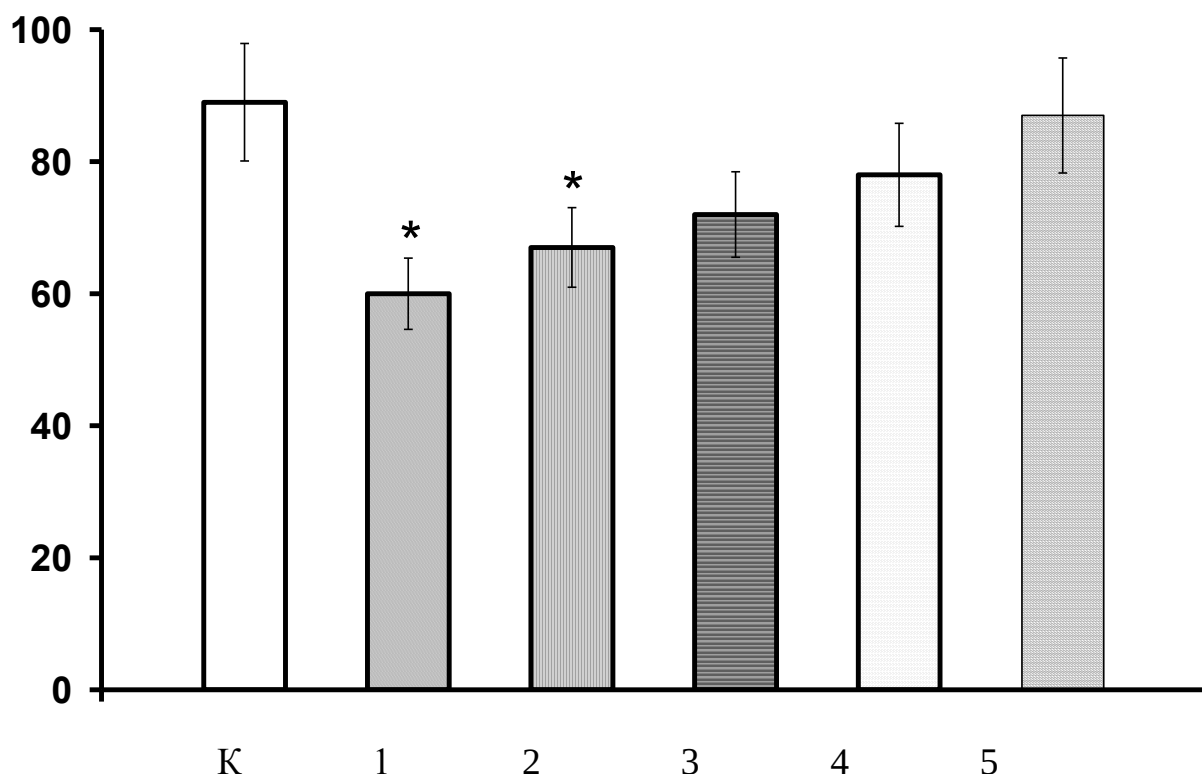


Рис. 13.4. Влияние иммуностимуляторов при хронической интоксикации ФОВ (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на содержание ИЛ-4 в плазме крови крыс, пг/мл (М±m, n =7)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – зарин, 3 – VX + Т-активин, 4 – VX + имунофан, 5 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: содержание ИЛ-4 в крови, пг/мл; * – различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Таким образом, под влиянием ФОВ происходит снижение Т-зависимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgG). Использование Т-активина, имунофана и полиоксидония в эквитерапевтических дозах восстанавливало Т-зависимое антителообразование (синтез IgG) и содержание в крови ИЛ-4.

13.3. Нарушение кооперации Т- и В-клеток в формировании антителообразования *ex vivo* под влиянием ФОС и его коррекция

Кооперацию Т- и В-клеток следует рассматривать, как этап, предшествующий синтезу иммуноглобулинов [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002], то есть, как определенную стадию антителообразования. При изучении кооперации Т- и В-лимфоцитов крыс Вистар *ex vivo* оценка функции этих популяций иммуноцитов в данной реакции осуществлялась по формированию АОК к ЭБ. *Ex vivo* изучался данный процесс в модели, предусматривающей забор Т- или В-клеток через 1 сут от крыс доноров

Вистар после воздействия на них ФОВ для изучения *in vitro* кооперации этих клеток соответственно с В- или Т-лимфоцитами интактных животных.

При исследовании кооперации Т- и В-клеток после выделения их у крыс Вистар через 30 сут после введения им вещества VX (рис. 13.5) установлено, что ФОВ поражало в большей степени Т-клетки по сравнению с В-клетками. Так, зарегистрировано существенное снижение активности Т-лимфоцитов в эффекте кооперации клеток после хронического действия ФОВ соответственно в 1,74 раза, а Т-клеток - соответственно в 1,31 раза ($p < 0,05$).

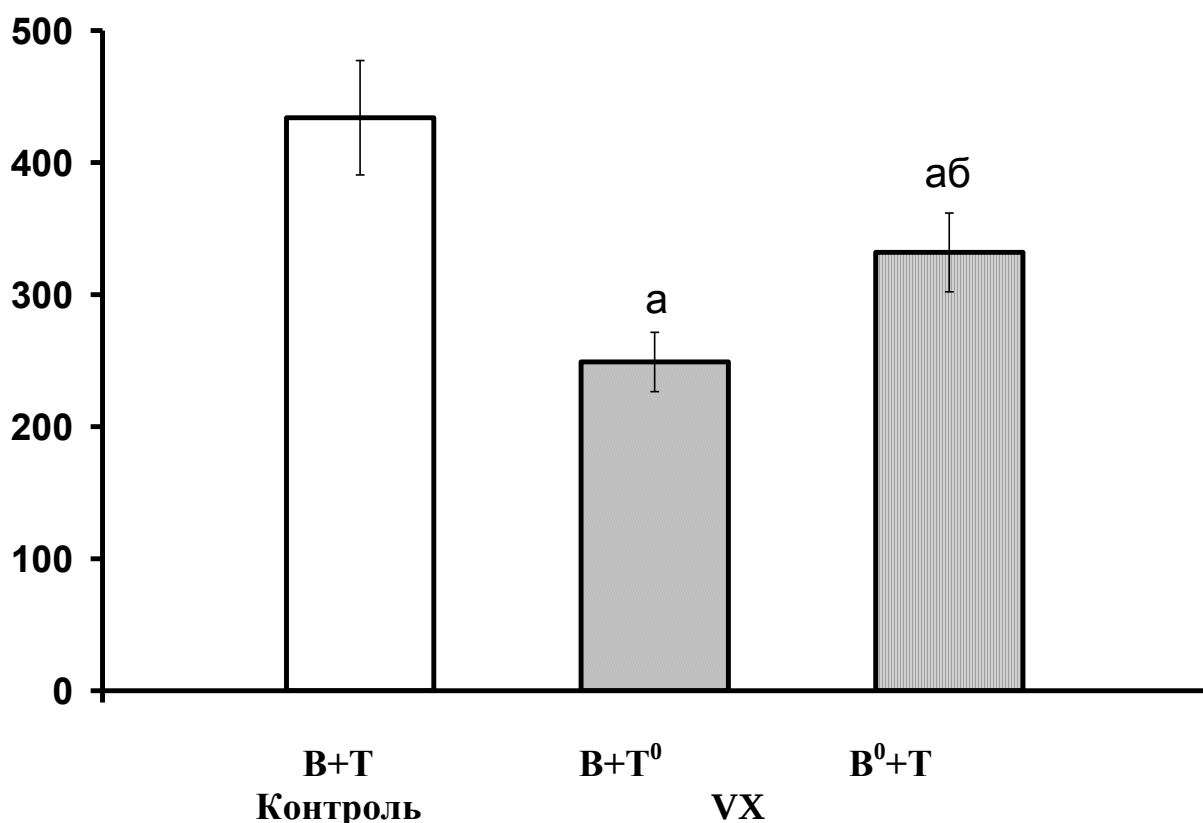


Рис. 13.5. Влияние VX через 30 сут на кооперацию Т- и В-лимфоцитов крыс *ex vivo* (число АОК на 10^6 В-клеток) [М+м, n=5-6]

По оси абсцисс: серии опытов (контроль, действие VX), В⁰, Т⁰ - В⁰, Т⁰ - клетки получали через 30 сут от мышей, подвергавшихся действию ФОВ; по оси ординат: число АОК на 10^6 В-клеток; ^а - различие с контролем (В+Т) достоверно - $p < 0,05$; ^б - $p < 0,05$ по сравнению с контролем и В⁰+Т.

Нами установлено (рис. 13.6), что при хронической интоксикации ФОВ отмечается преимущественное поражение Т-клеток в эффекте кооперации, которое, вероятно, обусловлено действием ФОВ на ацетилхолинэстеразу Т-лимфоцитов [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Ferluga J. et al., 1972; Li C.G et al., 1973].

Имунофан, полиоксидоний, которые вводили за 7 сут до последнего введения ФОВ крысам Вистар, увеличивали реакцию кооперации Т- и В-

лимфоцитов. В данной модели Т- и В- лимфоциты после назначения иммуностимуляторов получали из суспензии спленоцитов одной крысы.

В ходе экспериментов установлено, что Т-активин, имунофан, полиоксидоний увеличивали реакцию кооперации Т- и В-лимфоцитов соответственно в 1,22 ($p>0,05$); 1,37 и 1,70 раза ($p<0,05$) по сравнению с параметрами при хроническом отравлении ФОВ.

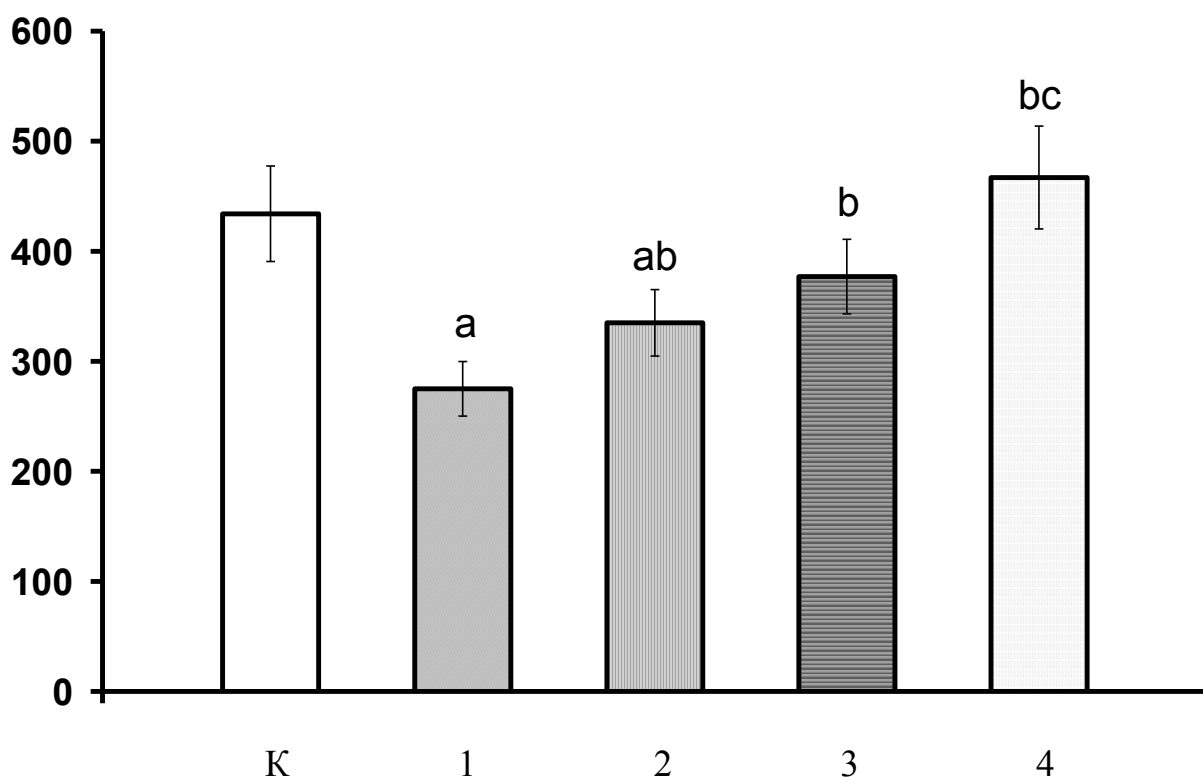


Рис.13.6. Влияние иммуностимуляторов на кооперацию Т- и В-лимфоцитов крыс *ex vivo* при хронической интоксикации ФОВ (число АОК на 10^6 В-клеток) [М+m, n=7-8]

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – VX + Т-активин, 3 – VX + имунофан, 4 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: число АОК на 10^6 В-клеток; ^a - различие с контролем достоверно - $p<0,05$; ^b - различие достоверно по сравнению с показателем при интоксикации - $p<0,05$; ^c - различие достоверно по сравнению с показателями при использовании Т-активина - $p<0,05$.

Незначительный эффект у Т-активина обусловлен его способностью повышать выработку ИФН- γ Th1-лимфоцитами [Ханафиева И.В. и соавт., 1992; Базарный В.В., Ястребов Ф.П., 1993], активировать пролиферацию, дифференцировку Т-клеток [Стасий Е.Д. и соавт., 1990; Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф., 1991]. Кроме того, существуют основания считать, что Т-активин может увеличивать продукцию ИЛ-2 Th1-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000]. Как показали результаты эксперимента, в реакции кооперации лимфоцитов свойства Т-активина проявляются несущественно.

Стимулирующее действие имунофана на кооперацию Т- и В-лимфоцитов при хронической интоксикации ФОВ обусловлено его увеличивать активность Т- и В-клеток, снижать пероксидацию липидов, играющую иммуносупрессивную роль [Лебедев В.В. и соавт., 1999, 2000].

Максимальный иммуностимулирующий эффект был выявлен у полиоксидония, данный препарат практически полностью восстанавливал реакцию кооперации Т- и В-лимфоцитов крыс при ее оценке *ex vivo*. Эффект имунофана был несущественно ниже, чем у полиоксидония. Повышение полиоксидонием кооперации Т- и В-лимфоцитов связано с его способностью с его антиоксидантным и мембраностабилизирующим эффектом, а также способностью цепочки полимера-поликатиона, которым является полиоксидоний, собирать молекулы мембранных белков в кластер, изменяя ионную проницаемость мембраны иммунокомпетентной клетки. Предполагают, что это приводит к активации иммуноцитов [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

Таким образом, под влиянием хронической интоксикации ФОВ происходит снижение кооперации Т- и В-лимфоцитов крыс в основном вследствие поражения Т-клеток. Применение полиоксидония и имунофана практически полностью восстанавливало кооперацию Т- и В-лимфоцитов крыс *ex vivo* при хронической интоксикации ФОВ. По степени эффективности иммуностимулирующего эффекта в порядке его увеличения иммуностимуляторы располагались в последовательности: Т-активин, имунофан, полиоксидоний.

13.4. Изучение тимуснезависимого антителообразования. Фармакологическая коррекция нарушений

Т-независимая антителопродукция осуществляется В-клетками без участия Т-хелперов (в данном случае Th1-лимфоцитов) [Ройт А. и соавт., 2000; Hausmann S., Wucherpfennig K.W., 1997]. При гуморальном иммунном ответе на Т-независимый антиген синтезируются только IgM (пик иммунного ответа составляет 5 сут) [Ройт А. И соавт., 2000, Хаитов Р.М. и соавт., 2002].

При исследовании содержания АОК к Vi-Ag в селезенке у крыс после хронической интоксикации ФОВ через 30 сут было установлено (рис. 13.7), что вещество VX и зарин снижают исследованный показатель соответственно в 1,41 и 1,33 раза ($p < 0,05$).

Менее выраженное снижение Т-независимого антителообразования при действии ФОВ по сравнению с Т-зависимой антителопродукцией, вероятно, обусловлено наряду с отрицательными эффектами ФОВ возможным активирующим действием на В-лимфоциты ацетилхолина [Адо А.Д. и соавт., 1984, 1985а, 1985б, 1986, 1987, 1995] и отсутствием эффектов, связанных с инактивацией эстераз Т-клеток [Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977], поскольку Т-

лимфоциты не участвуют в тимуснезависимой антителопродукции. Кроме того, это обусловлено, наряду с другими механизмами, действием ФОВ в Т-зависимой гуморальной иммунной реакции одновременно на макрофаги, В-лимфоциты и Т-клетки (в использованной нами экспериментальной модели на субпопуляцию лимфоцитов Th1-типа), участвующие в реализации данной иммунной реакции, в то время как Т-независимый гуморальный иммунный ответ обеспечивается в основном функцией В-клеток, активируемых антигеном в присутствии ИЛ-1, секретируемом макрофагами [Ройт и соавт., 2000; Gillbert K. M., Hoffman M. K., 1985].

Вполне естественно, что иммунотоксическое действие на три элемента, взаимодействующих в процессе антителообразования, проявляется большим его угнетением, чем при поражении одного или двух элементов, если нет оснований предполагать возможность селективного иммунотропного эффекта. Полученные данные подтверждают результаты наших экспериментов по изучению эффекта кооперации Т- и В-лимфоцитов, в которых доказано поражение ФОВ Т-лимфоцитов в большей степени, чем В-клеток.

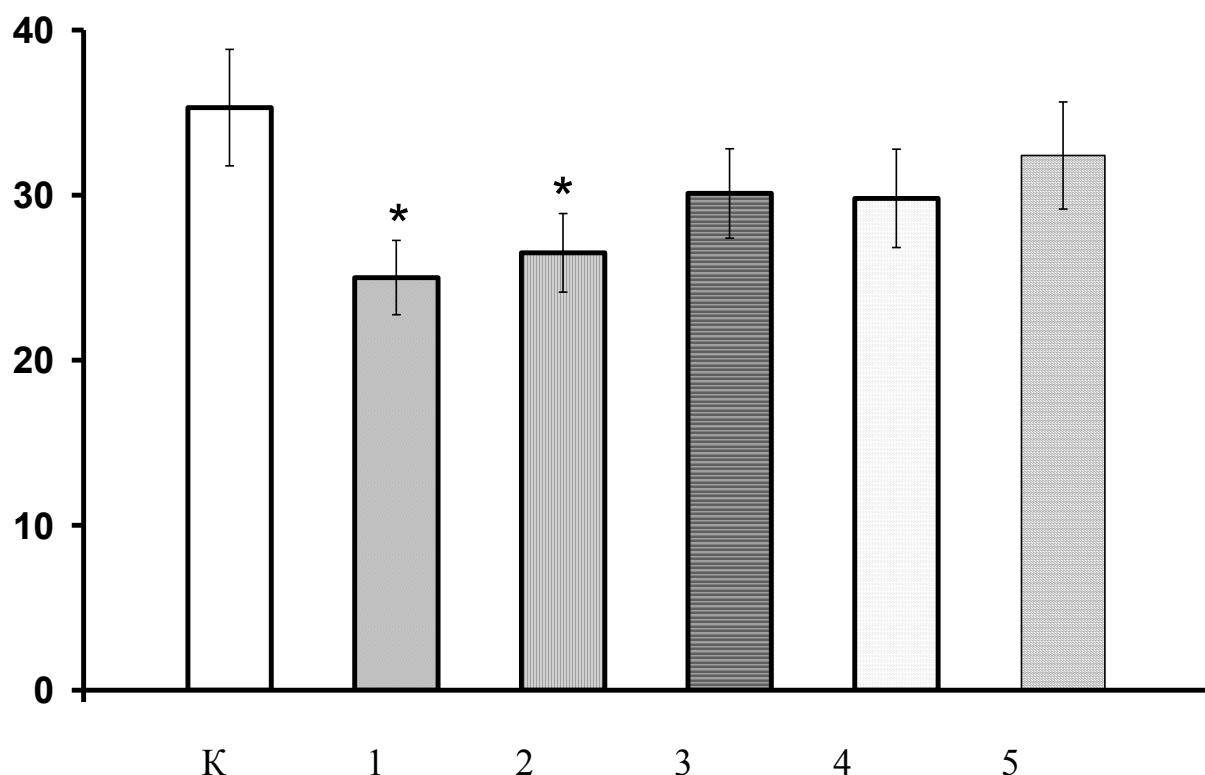


Рис. 13.7. Влияние хронической интоксикации ФОВ и ее комбинированного действия с иммуностимуляторами на число антителообразующих клеток к Vi-Ag (10^3), синтезирующим IgM, в селезенке белых крыс ($M \pm m$, $n = 7-8$)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – зарин, 3 – VX + Т-активин, 4 – VX + имунофан, 5 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: число антителообразующих клеток к Vi-Ag (10^3), синтезирующим IgM; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Т-активин, имунофан, полиоксидоний восстанавливали число АОК к Vi-Ag в селезенке, синтезирующих IgM, до контрольного уровня в равной степени. Однако, следует отметить, что снижение параметра под влиянием ФОВ было весьма небольшое, а иммуномодуляторы повышали Т-независимое антителообразование по сравнению с показателем при интоксикации несущественно.

Т-независимое антителообразование не требует участия Т-лимфоцитов для синтеза иммуноглобулинов плазмócитами [Ройт А. и соавт., 2000], а стимуляция Т-активином макрофагов, который синтезируя ИЛ-1, активируют В-клетки, видимо, недостаточна [Большаков и соавт., 1991; Gillbert K. M., Hoffman M. K., 1985].

Активирующее действие имунофана на Т-независимое антителообразование при хронической интоксикации ФОВ обусловлено его способностью активировать синтез плазмócитами иммуноглобулинов и снижением ПОЛ [Лебедев В.В. и соавт., 1999, 2000]. Повышение полиоксидонием Т-независимой антителопродукции связано с его способностью повышать функцию В-лимфоцитов, плазматических клеток, а также с его антиоксидантным и мембраностабилизирующим эффектом [Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., 2005].

Уменьшение Т-независимого антителообразования под влиянием ФОВ может быть обусловлено активацией гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007; Pruett S.B. et al., 2009] и действием на В-клетки кортикостерона (это действие существенно меньше, чем на Т-лимфоциты [Ройт А. и соавт., 2000]), инициацией перекисного окисления липидов (ПОЛ), мембранотоксическим эффектом ФОВ [Забродский П.Ф. и соавт., 2007], ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования в В-клетках (плазмócитах) [Ротенберг Ю.С., 1982].

Таким образом, под влиянием хронической интоксикации ФОВ (30 сут, суммарная доза - 0,3 DL₅₀) происходит снижение тимуснезависимого антителообразования (числа АОК к Vi-антигену в селезенке, отражающему синтез IgM). Применение иммуномодуляторов (Т-активина, имунофана и полиоксидония) при хронической интоксикации ФОВ восстанавливало антителообразование (синтез IgM АОК селезенки).

Резюме

Данные представленные в данной главе, позволяют постклировать, что под влиянием хронической интоксикации ФОВ (30 сут, суммарная доза - 0,3 DL₅₀) происходит снижение Т-зависимого антителообразования (отражающего синтез IgM). Применение иммуномодуляторов при хронической интоксикации ФОВ практически полностью восстанавливало Т-зависимое антителообразование (синтез IgM АОК селезенки), а также концентрацию в крови ИФН-γ. Эффективность иммуностимулирующих эффектов иммуностимуляторов существенно не отличалась.

Хроническое отравление влиянием ФОВ вызывает снижение Т-зависимого антителообразования (оцениваемого по числу АОК в селезенке, отражающему синтез IgG). Использование Т-активина, имунофана и полиоксидония в эквитерапевтических дозах восстанавливало Т-зависимое антителообразование (синтез IgG) и содержание ИЛ-4.

Под влиянием хронической интоксикации ФОВ происходит снижение кооперации Т- и В-лимфоцитов крыс в основном вследствие поражения Т-клеток. Применение полиоксидония и имунофана практически полностью восстанавливало кооперацию Т- и В-лимфоцитов крыс *ex vivo* при хронической интоксикации ФОВ. По степени эффективности иммуностимулирующего эффекта в порядке его увеличения иммуностимуляторы располагались в последовательности: Т-активин, имунофан, полиоксидоний.

Под влиянием хронической интоксикации ФОВ (30 сут, суммарная доза - 0,3 DL₅₀) происходит снижение тимуснезависимого антителообразования (числа АОК к Vi-антигену в селезенке, отражающему синтез IgM). Применение иммуномодуляторов (Т-активина, имунофана и полиоксидония) при хронической интоксикации ФОВ восстанавливало Т-независимое антителообразование (синтез IgM АОК селезенки).

ГЛАВА 14. ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИИ Th1- И Th2-ЛИМФОЦИТОВ, КОНЦЕНТРАЦИИ В КРОВИ КОРТИКОСТЕРОНА, АКТИВНОСТИ ЭСТЕРАЗ Т-ЛИМФОЦИТОВ СОСТОЯНИЯ ПЕРЕКИСНОГО ОКИСЛЕНИЯ ЛИПИДОВ ПОСЛЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ФОС

14.1. Исследование активности Th1- и Th2-лимфоцитов и содержания цитокинов в крови после хронической интоксикации ФОС в течение 30 сут

Под влиянием вещества VX и зарина при хронической интоксикации в течение 30 сут (табл. 14.1) происходило снижение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (по числу АОК к ЭБ в селезенке), характеризующему функцию Th1-лимфоцитов и синтез IgM, через 4 сут после иммунизации по сравнению с контрольным уровнем соответственно в 1,89 и 1,55 раза ($p < 0,05$).

Таблица 14.1. Влияние хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов у белых крыс (M±m, n = 9-12)

Вещества	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10 ³	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10 ³
Контроль	45,3±4,0	39,1±3,6	55,0±5,3
VX	24,0±2,4*	22,0±2,3*	38,4±3,3*
Зарин	29,2±3,3*	24,2±2,9*	41,3±3,7*

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

После отравления VX и заринотом отмечалась также существенная редукция активности Th1-лимфоцитов, оцениваемая по реакции ГЗТ, соответственно в 1,78 и 1,62 раза ($p < 0,05$). На 14 сут после иммунизации ЭБ отмечалась супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, после интоксикации VX и заринотом, соответственно в 1,43 и 1,33 раза ($p < 0,05$).

Параметры, характеризующие клеточную и гуморальную иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии ФОВ в среднем снижались соответственно в 1,71 и 1,38 раза. Это свидетельствует о том, что под влиянием антихолинэстеразных ядов в большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов.

Необходимо отметить, что при оценке влияния ФОС на функцию Th1- и Th2-клеток, мы не принимали во внимание действие ФОС на В-клетки (плазмоциты) при оценке числа АОК к ЭБ на 5 и 14 сут после иммунизации, так как это практически не повлияло бы на полученные нами данные о сравнительной активности двух типов Th-лимфоцитов.

Полученные данные в отношении большей редукции активности Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-лимфоцитами при интоксикации ФОС, подтверждается оценкой концентрации цитокинов в крови крыс (табл. 14.2). После хронической интоксикации VX и зарин ом выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ на 5 сут после иммунизации ЭБ в 1,85 и 1,79 раза ($p < 0,05$), а ИЛ-4 на 14 сут после иммунизации ЭБ - в 1,48 и 1,33 раза ($p < 0,05$) соответственно. Это свидетельствуют о том, что по сравнению с ИЛ-4 концентрация ИФН- γ в крови под влиянием ФОС снижается в большей степени.

Таблица 14.2. Влияние хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ($M \pm m$, $n = 7$)

Серии опытов	ИФН- γ	ИЛ-4	ИФН γ /ИЛ-4
Контроль	1005 $\pm$ 78	89 $\pm$ 8	11,6
VX	543 $\pm$ 71*	60 $\pm$ 6*	9,0
Зарин	560 $\pm$ 61*	67 $\pm$ 5*	8,3

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

Уменьшение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 характеризует большее снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [Ройт А. и соавт., 2000; Сухих Г.Т. и др., 2005]. Так, установлено, что при действии VX и зарина соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 было существенно ниже контрольного уровня равного 11,6 и составляло в среднем 8,6.

Вероятно, данный эффект обусловлен способностью ФОС активировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, увеличивая в крови концентрацию кортикостерона [Забродский, П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. При этом известно, что данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000;]. Возможно также, что ФОС способны ингибировать в большей степени ацетилхолинэстеразу (АХЭ) на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа, а также большей ролью АХЭ в реализации функций лимфоцитов Th1-типа [Забродский, П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Полученные данные позволяют полагать, что относительное увеличение активности Th2-лимфоцитов по сравнению с функцией Th1-клеток после отравления ФОС может приводить к увеличению вероятности вирусных инфекций (по сравнению с микробными) [Asquith B. et al., 2007]. При исследовании концентрации в плазме крови крыс цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10 (табл. 14.3) установлено уменьшение их содержания через 30 сут после хронического действия VX соответственно в 1,74; 1,62 и 1,36 раза ($p < 0,05$), а при действии зарина – в 1,57; 1,46 и 1,38 раза ($p < 0,05$).

Снижение в плазме крови под влиянием ФОС ИЛ-2 свидетельствует о супрессии его продукции Т-лимфоцитами (как CD4⁺, относящимися к лимфоцитам Th0- и Th1-типа), так и некоторыми CD8⁺, редукции пролиферации Т- и В-клеток (синтеза J-цепи молекулы иммуноглобулина),

активности естественных клеток-киллеров (ЕКК) [Ройт А. и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E. , 1993].

Таблица 14.3. Влияние хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл (M±m, n = 7)

Цитокины	Контроль	VX	Зарин
ИЛ-2	1352±105	778±75*	860±95*
ИЛ-6	115±10	71±7*	79±8*
ИЛ-10	990±83	725±67*	740±70*

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

Уменьшение в крови ИЛ-6 (провоспалительного цитокина) характеризует редукцию его синтеза макрофагами и лимфоидными дендритными клетками вследствие их поражения ФОС [Ройт А. и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E. , 1993].

Концентрация ИЛ-10 (антивоспалительный цитокин), продуцируемого Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками и снижающего секрецию ИФН-γ Th1-лимфоцитами [Georgiev V.St., Albright J.E. , 1993; Kim H.S. et al., 2007] уменьшалась при хронической интоксикации ФОС. Снижение синтеза ИЛ-10 в меньшей степени, чем ИФН-γ, подтверждает установленный нами больший поражающий эффект ФОС в отношении Th1-лимфоцитов. Относительно небольшая редукция ИЛ-10, вероятно, связана со значительным снижением ФОС синтеза ИФН-γ. При этом не реализуется эффект ИЛ-10, продуцируемого Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками, который способен усилить супрессию функции Th1-лимфоцитов и синтез ими ИФН-γ в еще большей степени [Georgiev V.St., Albright J.E. , 1993].

Таким образом, хроническое действие ФОС (русского VX и зарина) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL₅₀ (по 0,01 DL₅₀ ежедневно), в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. После хронического воздействия ФОС концентрация в крови ИФН-γ, продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем содержание ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками. Хроническая интоксикация ФОС снижает концентрацию в крови ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10.

14.2. Исследование активности Th1- и Th2-лимфоцитов и содержания цитокинов в крови после хронической интоксикации ФОС в течение 60 сут

Под влиянием хронической интоксикации VX и зарина в течение 60 сут (табл. 14.4) происходило снижение гуморального иммунного ответа к Т-

зависимому антигену (по числу АОК к ЭБ в селезенке), характеризующему функцию Th1-лимфоцитов и синтез IgM, через 4 сут после иммунизации по сравнению с контрольным уровнем соответственно в 1,66 и 1,56 раза ($p < 0,05$).

Таблица 14.4. Влияние хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,6 DL₅₀, 60 сут) на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов у белых крыс (M±m, n = 9-12)

Вещества	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10 ³	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10 ³
Контроль	42,0±4,1	37,5±3,5	57,2±5,5
VX	25,3±2,6*	24,5±2,4*	35,7±3,5*
Зарин	27,0±3,0*	28,7±2,6*	40,6±3,9*

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

После интоксикации веществом VX и зарином отмечалась также существенная редукция активности Th1-лимфоцитов, оцениваемая по реакции ГЗТ, соответственно в 1,53 и 1,31 раза ($p < 0,05$). На 14 сут после иммунизации ЭБ отмечалась супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, после интоксикации VX и зарином, соответственно в 1,60 и 1,41 раза ($p < 0,05$).

Параметры, характеризующие клеточную и гуморальную иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при действии ФОВ в среднем снижались соответственно в 1,52 и 1,51 раза. Это свидетельствует о том, что под влиянием антихолинэстеразных ядов функция Th1- и Th2- лимфоцитов поражается в равной степени.

Полученные данные в отношении одинаковой редукции активности Th1- и Th2- лимфоцитов при хронической интоксикации ФОВ, подтверждается оценкой концентрации цитокинов в крови крыс (табл. 14.5).

Таблица 14.5. Влияние хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,6 DL₅₀, 60 сут) на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл (M±m, n =7)

Серии опытов	ИФН-γ	ИЛ-4	ИФНγ/ИЛ-4
Контроль	1023±75	91±9	11,2
VX	532±70*	51±6*	10,5
Зарин	563±63*	48±5*	11,7

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

После хронической интоксикации VX и зарином через 60 сут выявлено уменьшение концентрации ИФН-γ на 5 сут после иммунизации ЭБ в 1,92 и 1,82 раза ($p < 0,05$), а ИЛ-4 на 14 сут после иммунизации ЭБ - в 1,78 и 1,89 раза ($p < 0,05$) соответственно. Это свидетельствуют о том, что концентрации ИФН-γ и ИЛ-4 в крови под влиянием ФОВ снижается в равной степени.

Приблизительно равное соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 в контроле и при действии ФОВ характеризует одинаковое снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа и функции Th2-клеток [Ройт А. и соавт., 2000; Сухих Г.Т. и др., 2005].

Данный эффект, вероятно, обусловлен снижением активности концентрации в крови кортикостероидов через 60 сут после воздействия ФОВ (стадия истощения общего адаптационного синдрома и снижение способности ФОВ активировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Так, через 15, 20 и 30 сут концентрация кортикостерона в крови при воздействии вещества VX (n=7) увеличивалась по сравнению с контролем ($20,1 \pm 2,1$ нг/мл) соответственно до $35,3 \pm 3,5$, $44,8 \pm 4,6$ и $30,0 \pm 3,2$ ($p < 0,05$), а через 60 сут уменьшалась до $13,2 \pm 1,4$ нг/мл ($p < 0,05$) (см. раздел 5.3).

Известно, что данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000] и при снижении его содержания до контрольного уровня отмечается приблизительно равная супрессия функции Th1- и Th2-клеток вследствие действия иных супрессирующих иммунные реакции факторов.

Полученные данные позволяют полагать, что при одинаковом снижении двух основных типов Th-лимфоцитов равновероятно развитие, как микробной (основная защитная роль выполняется Th2-лимфоцитами и связанными с ними клетками и иммуноглобулинами), так и вирусной инфекции (основная защитная роль наряду с другими Т-клетками и естественными клетками киллерами принадлежит Th2-лимфоцитам) [Asquith B. et al., 2007].

При исследовании концентрации в плазме крови крыс цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 (табл. 14.6) установлено уменьшение их содержания через 60 сут после хронического действия VX соответственно в 1,42 и 1,39 раза ($p < 0,05$), а при действии зарина – в 1,53 и 1,37 раза ($p < 0,05$). Содержание в крови ИЛ-10 уменьшалось незначительно.

Таблица 14.6. Влияние хронической интоксикации ФОВ (суммарная доза 0,6 DL₅₀, 60 сут) на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ($M \pm m$, n=)

Цитокины	Контроль	VX	Зарин
ИЛ-2	1198 $\pm$ 107	846 $\pm$ 89*	820 $\pm$ 90*
ИЛ-6	92 $\pm$ 8	60 $\pm$ 5*	67 $\pm$ 6*
ИЛ-10	987 $\pm$ 85	851 $\pm$ 86	807 $\pm$ 77

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

Как уже упоминалось, уменьшение в плазме крови под влиянием ФОВ ИЛ-2 свидетельствует о супрессии его продукции Т-лимфоцитами (Th0-, Th1-клеткам, цитотоксическим Т-клеткам) [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007], угнетении пролиферации Т- и В-клеток, активности ЕКК [Ройт А. и

соавт., 2000]. Снижение в крови ИЛ-6 (провоспалительного цитокина) характеризует редукцию его синтеза макрофагами и лимфоидными дендритными клетками в печени вследствие ее поражения ФОВ [Ройт А. и соавт., 2000; Georgiev V.St., Albright J.E. , 1993].

Концентрация ИЛ-10 (антивоспалительный цитокин), продуцируемого Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками и снижающего секрецию ИФН- γ Th1-лимфоцитами [Georgiev V.St., Albright J.E. , 1993; Kim H.S. et al., 2007] практически не изменялась при хронической интоксикации ФОВ (действие токсиканта 60 сут). Это вероятно, связано со значительным снижением ФОВ синтеза ИФН- γ . При этом в меньшей степени продуцируется ИЛ-10 Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками, так как ИЛ-10 способен усилить супрессию функции Th1-лимфоцитов и снижение синтеза ими ИФН- γ в еще большей степени (проявление реакции, регулирующей функцию Th-лимфоцитов первого типа [Georgiev V.St., Albright J.E. , 1993]). По-видимому, проявляется эффект регуляции оптимальной продукции цитокинов различных типов.

Таким образом, хроническое действие ФОВ (российского VX и зарина) в течение 60 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,6 DL₅₀ (по 0,01 DL₅₀ ежедневно), в равной степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов. Хроническая интоксикация ФОВ снижает концентрацию в крови ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-2, ИЛ-6 и не влияет на содержание в крови концентрации ИЛ-10.

14.3. Фармакологическая коррекция концентрации в крови цитокинов после хронической интоксикации ФОС

Коррекция концентрации в крови цитокинов ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-2 после хронической интоксикации ФОВ применением Т-активина, имунофана и полиоксидония была рассмотрена в соответствующих разделах. Следует отметить, что концентрация в крови ИЛ-10 при хронической интоксикации ФОВ в течение 60 сут не изменяется.

Иммуномодуляторы, как это было показано в соответствующих разделах, частично или практически полностью восстанавливали содержание в крови цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4 (табл. 14.6).

При исследовании концентрации в плазме крови крыс цитокинов ИЛ-6 и ИЛ-10 (табл. 14.7) установлено уменьшение их содержания через 30 сут после хронического действия VX соответственно в 1,62 и 1,37 раза ($p < 0,05$), а при действии зарина – в 1,46 и 1,34 раза ($p < 0,05$).

Для сравнительной оценки влияния различных иммуномодуляторов на восстановление содержания исследованных цитокинов в крови нами в таблице повторно приведены данные, изложенные в других разделах работы. Применение Т-активина, имунофана и полиоксидония повышало содержание ИЛ-6 в крови соответственно в 1,27 ($p > 0,05$); 1,44 и 1,58 раза ($p < 0,05$), а ИЛ-

10 - в 1,08 ($p>0,05$); 1,18 ($p>0,05$) и 1,29 раза ($p<0,05$) соответственно по сравнению с показателями при интоксикации VX.

Таблица 14.7. Влияние иммуномодуляторов на содержание цитокинов в плазме крови крыс после хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут), пг/мл (M±m, n =7)

Серии опытов	ИФН-γ	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-10
Контроль	1005±78	1352±105	89±8	115±10	990±83
VX	543±71 ^a	778±75 ^a	60±6 ^a	71±7 ^a	725±67 ^a
Зарин	560±61 ^a	860±95 ^a	67±5 ^a	79±8 ^a	740±70 ^a
VX + Т-активин	805±79 ^б	1090±103 ^б	72±7	90±8 ^a	784±78
VX +имунофан	893±88 ^б	1140±110 ^б	78±8	102±9 ^б	855±86
VX +полиокси- доний	987±80 ^б	1204±117 ^б	87±8	112±11 ^б	957±87 ^б

Примечание. ^a - $p<0,05$ по сравнению с контролем; ^б - $p<0,05$ по сравнению с показателем при интоксикации VX.

В порядке увеличения их иммуностимулирующего эффекта они располагались в последовательности: Т-активин, имунофан и полиоксидоний. Следует отметить, что на содержание в крови ИЛ-10 при интоксикации ФОВ Т-активин и имунофан существенного влияния не оказывали. После хронической интоксикации ФОВ (VX) в течение 60 сут применение Т-активина, имунофана и полиоксидония в эквитерапевтических дозах также, как и воздействию токсиканта в течение 30 сут (суммарная доза – 0,3 DL₅₀), частично или практически полностью восстанавливало содержание в крови исследованных интерлейкинов. Следует отметить, что увеличение концентрации цитокинов в крови после применения иммуностимулирующих препаратов было выражено в меньшей степени, чем при воздействии ФОВ в течение 30 сут. Иммуномодуляторы в порядке увеличения их эффекта располагались в последовательности: Т-активин, имунофан и полиоксидоний (табл. 14.8).

Учитывая то, что изменение концентрации ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 полностью отражало характер нарушения функции иммуноцитов, можно полагать, что иммуномодуляторы восстанавливали их при интоксикации ФОВ в течение 60 сут в той же степени.

Полиоксидоний, вероятно, стимулирует В-клетки (плазмоциты), синтезирующие IgM (в использованном тесте), а также ЕКК после интоксикации ФОС в комбинации с антидотами вследствие способности активировать выработку γ-интерферона Th1-лимфоцитами [Ройт А. и соавт., 2000]. Этот лимфокин активирует ЕКК и восстанавливает постинтоксикационное нарушение их функции, а также индуцирует экспрессию рецепторов ИЛ-2 на их поверхности [Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Полиоксидоний, вероятно, как и имунофан активируют Th1-

лимфоциты, Th1-клетки памяти и макрофаги вследствие увеличения активности РНК-полимеразы и синтеза ДНК лимфоцитов [Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2000, 2002].

Таблица 14.8. Влияние иммуномодуляторов на содержание цитокинов в плазме крови крыс после хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,6 DL₅₀, 60 сут), нг/мл (M±m, n =7)

Серии опытов	ИФН-γ	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-6
Контроль	1023±75	1198±107	91±9	92±8
VX	532±70 ^a	846±89 ^a	51±6 ^a	60±5*
Зарин	563±63 ^a	820±90 ^a	48±5 ^a	67±6*
VX +Т-активин	810±74 ^o	987±101 ^o	68±6	70±6
VX +имунофан	882±84 ^o	1005±104 ^o	73±7	78±7
VX +полиоксидоний	969±85 ^o	1098±112 ^o	82±8	81±8

Примечание. ^a -p<0,05 по сравнению с контролем; ^o - p<0,05 по сравнению с показателем при интоксикации VX.

Таким образом, при хронической интоксикации ФОВ (30 и 60 сут) применение Т-активина, имунофана и полиоксидония частично или практически полностью восстанавливало содержание ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-6 в крови. Концентрация в крови ИЛ-10 по сравнению с показателем при интоксикации в течение 30 сут существенно возрастала только при назначении полиоксидония. По степени эффективности иммуностимулирующего эффекта в порядке его увеличения иммуностимуляторы располагались в последовательности: Т-активин, имунофан, полиоксидоний.

14.4. Изучение содержания кортикостерона в плазме крови

Роль кортикостероидов в реализации иммунного ответа неоднозначна, физиологические концентрации их необходимы для реализации полноценного гуморального иммунного ответа [Корнева Е.А., 1990; Ройт А. и соавт., 2000; Хаитов Р.М. и соавт., 2002]. Высокие концентрации кортикостерона, в частности, при интоксикации ФОВ, этанолом и атразином [Иванова А.С.. 1998; Szot R.J., Murphy S.D.. 1970], вызывают супрессию ряда показателей системы иммунитета [Хусинов А.А. и соавт., 1991; Забродский П.Ф., 1993; 2002; Claman H.N., 1993; Tiefenbach B. et al., 1983, 1985; Stephen V. P. et al., 2003].

В наших экспериментах показано, (табл. 14.9), что через 15, 20 и 30 сут концентрация кортикостерона в крови при воздействии вещества VX (n=7) увеличивалась по сравнению с контролем (20,1±2,1 нг/мл) соответственно до 35,3±3,5, 44,8±4,6 и 30,0±3,2 (p<0,05), а через 60 сут уменьшалась до 13,2±1,4 нг/мл (p<0,05).

Увеличение кортикостерона в крови под влиянием ФОВ обусловлено реализацией общего адаптационного синдрома (увеличение продукции адрено-кортикотропного гомона гипофизом [Селье Г., 1972; Лемус В. Б., Давыдов В. В., 1974; Бирбин В.С., 2003; Dhabhar F.S. et al., 1996; Stephen B. P. et al., 2003], а также активацией м-холинорецепторов гипоталамуса ацетилхолином [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Существуют основания считать, что кортикостероиды играют основную роль в супрессии иммунных реакций при острых и хронических интоксикациях ФОС [Хусинов А.А. и соавт., 1991; Tiefenbach B., Lange P., 1980; Tiefenbach B. et al., 1983; Tiefenbach B., Wichner S., 1985]. Однако, многочисленные исследования показали, что это всего лишь один из факторов иммунодепрессии при действии ФОВ, причем не основной [Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., 2007].

Таблица 14.9. Влияние хронической интоксикации вещества VX (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на содержание кортикостерона в плазме крови крыс, нг/мл (M±m; n=7)

Серии опытов	К	Время после воздействия, сут			
		15	20	30	60
VX (30 сут)	17,0±2,2	40,5±3,8*	51,5±5,3*	37,2±3,8*	-
VX (60 сут)	20,1±2,1	35,3±3,5*	44,8±4,6*	30,0±3,2*	13,4±1,9*

Примечание: К – контроль; * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$;

При вычислении коэффициентов корреляции между концентрацией кортикостерона в крови (через 30 сут), АОК к ЭБ (IgM и IgG), реакцией ГЗТ, активностью ЕКК при хроническом отравлении крыс VX установлено, что они составляли соответственно от $-0,755$ ($p < 0,05$) до $-0,767$ ($p < 0,05$).

Не существует оснований полагать, что применение иммуностимуляторов способно корректировать концентрацию кортикостерона в крови [Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007]. Даже в случае такой возможности (например, использование средств, подавляющих синтез гормонов коры надпочечников), рассчитывать на снижение кортикостерона, (один из иммуносупрессирующих факторов при интоксикации ФОВ), при котором возможно существенное восстановление показателей системы иммунитета вряд ли стоит. Кроме того, подавление общего адаптационного синдрома при хронической интоксикации нецелесообразно с общебиологических позиций и может привести к различным нежелательным последствиям.

Таким образом, хроническая интоксикация ФОВ в течение 30 сут повышает концентрацию кортикостерона в плазме крови. Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией кортикостерона и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа. При интоксикации ФОВ в течение 60 сут отмечалось снижение концентрации

кортикостерона вследствие стадия истощения общего адаптационного синдрома.

14.5. Исследование активности ацетилхолинэстеразы Т-клеток после хронической интоксикации ФОС

Эстеразы иммуноцитов, являясь лизосомальными ферментами, наряду с другими энзимами, играют важную роль в реализации функций ЕКК и различных субпопуляций Т-лимфоцитов, моноцитов и макрофагов [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Ferluga J. et al., 1972; Li C. Y. et al., 1973; Asquith B. et al. 2007; Frasc S.C. et al. 2007; Tomoiu A. et al. 2007]. Изменение эстеразной активности в клетках отражает, с одной стороны, функциональную активность иммуноцитов, с другой - может служить количественным критерием Т-клеток в циркулирующей крови, так как именно эта субпопуляция лимфоцитов является эстеразопозитивной [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Kutty K. M. et al., 1976; Kullenkampff J. et al., 1977; Asquith B. et al. 2007]. Роль ацетилхолинэстеразы на поверхности Т-лимфоцитов [Kutty K. M. et al., 1976; Szelenyi J.G. et al., 1982] до сих пор не вполне ясна. Возможно, она регулирует влияние ацетилхолина на холинореактивные структуры Т-лимфоцитов [Забродский П.Ф. и соавт., 2001; Richman D.P., Arnason B.G.W., 1989; Tomoiu A. et al. 2007].

Проведенные нами опыты показали (рис. 14.1), что под влиянием ФОВ (вещества VX) активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки у белых крыс через 30 сут существенно снижалась в 1,84 раза ($p < 0,05$).

Ингибирование ацетилхолинэстеразы ФОС имеет существенное значение в формировании постинтоксикационного иммунодефицитного состояния [Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д., 1983; Ferluga J. et al., 1972; Li C. G et al., 1973; Asquith B. et al. 2007; Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007]. При этом Т-лимфоциты, возможно, существенно утрачивают свои функции, что приводит к редукции Т-зависимого гуморального иммунного ответа, снижению цитотоксической активности Т-клеток.

Несомненно, функция К-клеток (определяющих АЗКЦ) и ЕКК при интоксикации ФОВ также снижается вследствие ингибирования ацетилхолинэстеразы, так как эти клетки содержат этот фермент [Ройт А.и соавт., 2000; Voix E., Nogues M.V., 2007; Tomoiu A. et al. 2007].

Коэффициенты корреляции между активностью ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки крыс (на 5 сут) и АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ, активностью ЕКК при остром отравлении крыс VX составляли от 0,747 до 0,773 ($p < 0,05$).

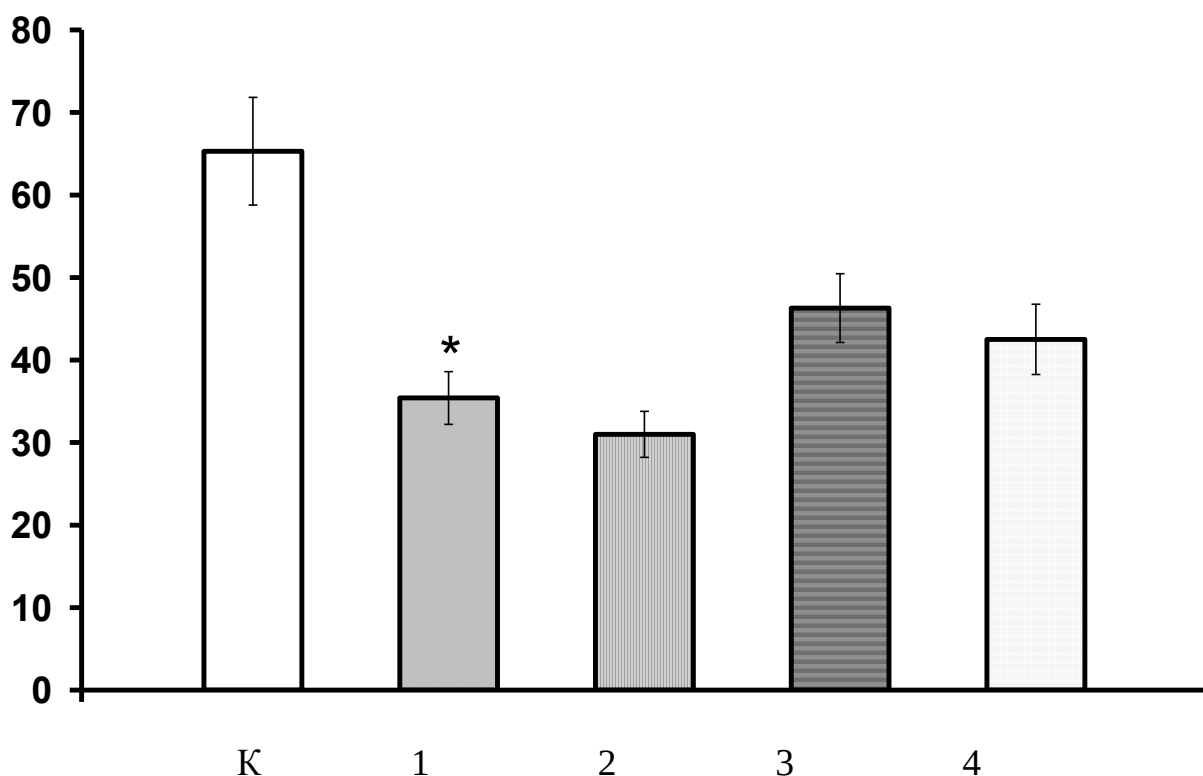


Рис. 14.1. Влияние хронической интоксикации вещества VX (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на активность ацетилхолинэстеразы Т- лимфоцитов селезенки у белых крыс (мЕд/10⁹ Т-клеток) ($\bar{M} \pm m$; n=7)

По оси абсцисс: К – контроль, 1 – VX, 2 – VX + Т-активин, 3 – VX + имунофан, 4 – VX + полиоксидоний; по оси ординат: активность ацетилхолинэстеразы Т- лимфоцитов селезенки у белых крыс (мЕд/10⁹ Т-клеток); * - различие с контролем достоверно - $p < 0,05$.

Таким образом, хроническое отравление ФОВ вызывает существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки. Применение после отравления VX иммуномодуляторов не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах крыс. Установлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями и активностью ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах.

14.6. Изменение показателей антиоксидантной системы перекисного окисления липидов после хронического отравления ФОС. Коррекция нарушений

Перекисное окисление липидов мембран, в том числе и иммунокомпетентных клеток при остром отравлении различными токсикантами, действии экстремальных физических факторов и при различных патологических состояниях [Лукиянова Л.Д. и соавт., 2001; Зарубина И.В., Миронова О.П., 2002; Плужников Н.Н. и соавт., 2003а, 2003б; Hageman J.J. et al., 1992; Urban T. et al., 1995; Knight J.A., 1995; Jaeschke H., 1995; Ibuki Y., Goto R., 1997; Iamele L. et al., 2002] включает следующие стадии: разрыхление гидрофобной области липидного бислоя

мембран, что делает белковые компоненты более доступными для протеаз; появление в гидрофобном хвосте жирной кислоты гидрофильной перекисной группы, приводящее к конформационным изменениям в фосфолипиде и липопротеидном комплексе, что изменяет биофизические свойства мембраны и ферментативные функции липопротеидных комплексов; разрушение веществ, обладающих антиоксидантной активностью (витаминов, стероидных гормонов, убихинона) и снижении концентрации тиолов в клетке; образование по мере накопления гидроперекиси липидов трансмембранных перекисных кластеров, являющихся каналами проницаемости для ионов, в частности для ионов кальция. Формирование таких каналов патологической проницаемости может играть важную роль в возникновении избытка кальция в иммунокомпетентных клетках и реализации повреждающего действия этого катиона [Абдрашидова Н.Ф., Бурмистров С.О. и соавт., 2002].

Исследование суммарной продукции радикалов (СПР), активности каталазы, пероксидазы и малонового альдегида является информативным показателем ПОЛ при интоксикациях [Клинцевич А.Д. и соавт., 1994]. При этом каталаза и пероксидаза характеризует антиперекисную защиту, а малоновый альдегид (МДА) является показателем активности процессов ПОЛ.

Наши исследования показали (табл. 14.10), что под влиянием VX происходит снижение активности каталазы, пероксидазы и увеличения суммарной продукции радикалов и содержания в крови МДА.

Таблица 14.10. Влияние хронической интоксикации вещества VX (суммарная доза 0,3 DL₅₀, 30 сут) на а показатели перекисного окисления липидов у крыс (M $\pm$ m; n=8-13)

Серии опытов	Суммарная продукция радикалов, усл. ед.	Каталаза, ммоль/мин/л	Пероксидаза, мкмоль/мин/л	Малоновый диальдегид, нмоль/мл
Контроль	27,5 $\pm$ 3,3	267,4 $\pm$ 25,7	40,1 $\pm$ 4,2	6,71 $\pm$ 0,60
VX	45,9 $\pm$ 5,0*	170,3 $\pm$ 18,5*	25,0 $\pm$ 2,5*	8,50 $\pm$ 0,52*
VX +Т-активин	40,2 $\pm$ 4,2*	165,2 $\pm$ 20,1*	28,0 $\pm$ 2,7*	8,33 $\pm$ 0,55*
VX +имунофан	20,5 $\pm$ 3,2	203,0 $\pm$ 20,4	30,9 $\pm$ 3,2	7,25 $\pm$ 0,60
VX +полиоксидоний	25,2 $\pm$ 3,0	230,2 $\pm$ 24,0	35,7 $\pm$ 3,4	7,05 $\pm$ 0,61

Примечание: * - различие с контролем достоверно - $p<0,05$; ** - различие достоверно по сравнению с контролем и действием метафоса - $p<0,05$; ° - различие достоверно по сравнению с действием метафоса - $p<0,05$;

Так, действие VX статистически значимо ($p<0,05$) повышало суммарную продукцию радикалов, содержание МДА в крови соответственно в 1,66 и в 1,27 раза ($p<0,05$), снижало активность каталазы и пероксидазы соответственно – в 1,57 и 1,60 раза ($p<0,05$).

При вычислении коэффициентов корреляции между числом АОК к ЭБ, реакцией ГЗТ при хроническом отравлении VX и суммарной продукции радикалов установлено, что они составляли от -0,727 до -0,779 ($p < 0,05$).

Нарушение функции иммунокомпетентных клеток вследствие инициации ПОЛ реализуется путем изменения функциональных свойств белков, входящих в состав мембран и мембраносвязанных ферментов и рецепторов, от их активации до полного ингибирования. Это может быть связано с изменением состава фосфолипидных мембран лимфоцитов, с прямым окислением SH-групп в активных центрах мембраносвязанных ферментов, с образованием внутри- и межмолекулярных "сшивок" [Плужников Н.Н. и соавт., 2003а, 2003б, 2003в; Hageman J.J. et al., 1992; Urban T. et al., 1995; Knight J.A., 1995; Jaeschke H., 1995; Ibuki Y., Goto R., 1997; Iamele L. et al., 2002].

Выявлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии VX показателями антиоксидантной системы и отрицательная корреляция между иммунными реакциями и продуктами ПОЛ. Это свидетельствует о том, что инициация ПОЛ под влиянием ФОВ, является одним из факторов, способствующим формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Таким образом, хроническая интоксикация ФОВ приводит к инициации ПОЛ, что проявляется снижением активности показателей антиоксидантной защиты (редукция каталазы и пероксидазы) и увеличением содержания малонового альдегида и суммарной продукции радикалов в плазме крови. Применение Т-активина не влияло на показатели антиоксидантной защиты и ПОЛ (СПР и МДА), а имунофан и полиоксидоний при хроническом отравлении ФОВ существенно снижали инициацию ПОЛ, восстанавливая показатели антиоксидантной защиты и ПОЛ практически до контрольных значений.

Резюме

Данные, изложенные в данной главе, позволяют заключить, что хроническое действие ФОВ (российского VX и зарина) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL₅₀ (по 0,01 DL₅₀ ежедневно), в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. После хронического воздействия ФОВ концентрация в крови ИФН- γ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем содержание ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками. Хроническая интоксикация ФОВ снижает концентрацию в крови ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10.

Хроническое действие ФОВ в течение 60 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,6 DL₅₀ (по 0,01 DL₅₀ ежедневно), в равной степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов.

Хроническая интоксикация ФОВ снижает концентрацию в крови ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-2, ИЛ-6 и не влияет на содержание в крови концентрации ИЛ-10.

При хронической интоксикации ФОВ (30 и 60 сут) применение Т-активина, имунофана и полиоксидония частично или практически полностью восстанавливало содержание ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-6 в крови. Концентрация в крови ИЛ-10 по сравнению с показателем при интоксикации в течение 30 сут существенно возросла только при назначении полиоксидония.

Хроническая интоксикация ФОВ в течение 30 сут повышает концентрацию кортикостерона в плазме крови. Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией кортикостерона и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа. При интоксикации ФОВ в течение 60 сут концентрация кортикостерона в крови снижается.

После хронического отравления ФОВ происходит существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки. Применение после отравления VX иммуномодуляторов не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-клетках крыс. Установлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями и активностью ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах.

Одним из механизмов иммуносупрессии после хронического отравления ФОВ является инициация ПОЛ и снижение параметров антиоксидантной системы.

Назначение Т-активина не влияло на показатели ПОЛ и антиоксидантной системы, а имунофан и полиоксидоний при хроническом отравлении ФОВ существенно снижали инициацию ПОЛ, восстанавливая показатели антиоксидантной защиты и ПОЛ практически до контрольных значений.

По степени эффективности иммуностимулирующего эффекта в порядке его увеличения иммуномодуляторы располагались в последовательности: Т-активин, имунофан, полиоксидоний.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Загрязнение окружающей среды фосфорорганическими соединениями (ФОС), широко используемыми в сельском хозяйстве и быту, возможность аварий на химических объектах и массовых поражений при транспортировке и хранении ФОС, рост острых и хронических интоксикаций данными соединениями, снижающие гуморальные и клеточные иммунные реакции, может вызывать различные инфекционные, онкологические и аллергические заболевания [Хаитов Р.М. и соавт., 1995б; Агапов В.И. и соавт., 2004; Забродский П.Ф., 2002; Loose L.D., 1985; Luster M.J. et al., 1987; Sullivan J. B., 1989; Kimber I., 1996; Gunnell D., 2007; Salazar K.D., 2008; Patel V. et al., 2012]. Особую актуальность проблема изучения иммунотоксичности ФОС приобрела в связи с тем, что в последнее время частота острых интоксикаций данными соединениями существенно увеличилась.

В 60 странах мира за 20 лет зарегистрировано более 34000 отравлений ФОС, при этом 73% случаев отравлений связано с их употреблением. В России больные с острыми отравлениями ФОС составляют до 3% поступающих в специализированные токсикологические центры. Из них в лечебных учреждениях погибает в настоящее время 20-24% больных [Лужников Е.А., Костомарова Л.Г., 2000]. Несомненно, что в танатогенезе при отравлениях ФОС существенную роль играет нарушение патогенетических механизмов иммунного статуса, а также редукция факторов НРО [Забродский П. Ф., Мандыч В.Г., 2007].

В настоящее время ФОВ, которые являются элементом химического оружия, подлежат уничтожению согласно международным соглашениям на специальных промышленных объектах [Жуков В.Е. и соавт., 2002; Петров А.Н. и соавт. 2004]. Позитивные шаги международного сообщества, в том числе и России, в области ликвидации и полного запрета химического оружия не уменьшили реальность его использования в террористических и криминальных целях [Masuda N. et al, 1995; Morita H. et al., 1995], а также в локальных вооруженных конфликтах [Balali-Moode M. et at., 2005; McManus J., Huebner K. M., 2005; Amitai G. et al., 2006; Saladi R.N et al., 2006; Sellestrom A. et al., 2013]

Существует целый ряд не исследованных вопросов в отношении нарушения иммунного статуса при хронической интоксикации ФОС, (несмотря на обширные данные литературы в отношении их иммунотоксических эффектов.

Данных различных исследователей зачастую противоречивы, не ясна роль механизмов, реализующихся на уровне органов и систем и при воздействии ФОВ на популяции и субпопуляции лимфоцитов [Schans M. J. et al., 2004; Bide R.W. et al., 2005; Shin T.M. et al., 2005; Lenz D.E. et al., 2005; Amitai G. et al., 2005; Sharp D., 2006; Li Q., Kawada T., 2006].

Данных литературы позволяют заключить, что получение новых результатов исследований в отношении нарушения ФОС факторов НРО и иммунного статуса позволит обосновать адекватную характеру нарушений

патогенетических механизмов регуляции иммуногенеза, возможность использования из большого арсенала иммуностимуляторов наиболее перспективных иммуностимулирующих средств – Т-активина, имунофана и полиоксидония – для профилактики постинтоксикационных инфекционных осложнений и заболеваний. Это позволит существенно снизить смертность больных при отравлении ФОС в лечебных учреждениях от возможных инфекционных осложнений.

Острое действие ФОС в продуктивной фазе иммуногенеза в дозе, составляющей 0,75 DL₅₀, в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток. Под влиянием ФОС в крови концентрация ИФН-γ, продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем концентрация ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками. Применение атропина сульфата при острой интоксикации ФОС увеличивало супрессию функции Th1- и Th2-лимфоцитов и синтеза ими соответственно ИФН-γ и ИЛ-4 в равной степени, а использование карбоксима частично восстанавливало преимущественно активность Th1-клеток и синтез ИФН-γ по сравнению с функцией Th2-лимфоцитов и продукцией ими ИЛ-4.

Под влиянием ФОС, а также их комбинации с антидотами, существенно снижается кооперация Т- и В-лимфоцитов. Установлено преимущественное поражение Т-клеток в эффekte кооперации при действии ФОС, а также при комбинации ФОС с атропином. Атропин усиливает редукцию кооперации Т- и В-лимфоцитов, а карбоксим – снижает только при интоксикации мышей, у которых выделяли Т-клетки.

Острая интоксикация метафосом и ДДВФ повышает концентрацию кортикостерона в плазме крови соответственно через 1 - 12 ч и через 1-3 ч, что обусловлено особенностями токсикокинетики этих ядов. Выявлена отрицательная корреляция между концентрацией кортикостерона и показателями гуморального и клеточного иммунного ответа. Атропин и карбоксим снижали концентрацию кортикостерона по сравнению с действием метафоса через 1-12 ч, при этом она существенно не отличалась от контроля через 24 ч. Выявлена выраженная отрицательная корреляция между иммунными реакциями при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином и концентрацией кортикостерона в плазме крови.

При остром отравлении ФОС происходит существенное снижение активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах селезенки. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на редукцию активности ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах, а применение карбоксима увеличивало исследуемый показатель. Установлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии метафоса, а также метафоса в комбинации с атропином и активностью ацетилхолинэстеразы в Т- лимфоцитах.

Острая интоксикация ФОС, а также ФОС в комбинации с атропином приводит к инициации ПОЛ. Применение после отравления метафосом его антидота атропина практически не влияло на показатели ПОЛ, а применение

карбоксима после отравления ФОС существенно снижало их инициацию. Выявлена выраженная положительная корреляция между иммунными реакциями при действии ФОС (и ФОС в комбинации с антитоксинами) и показателями антиоксидантной системы и отрицательная корреляция между иммунными реакциями и продуктами ПОЛ.

Преимущественное поражение ФОС (ФОС в комбинации с антитоксинами) функции Th1-лимфоцитов, редукция кооперации Т- и В-лимфоцитов, увеличение в крови кортикостерона, инактивация ацетилхолинэстеразы Т-клеток, активация ПОЛ являются факторами, приводящими к формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния. Антитоксины при отравлении ФОС вызывают в зависимости от исследованных показателей различное по направленности и выраженности их изменение, либо не влияют на них. Атропин приводит к усилению иммунотоксических эффектов ФОС вследствие увеличения редукции кооперации Т- и В-клеток и синтеза цитокинов ИФН- γ и ИЛ-4, а карбоксим снижает эти эффекты в результате реактивации ацетилхолинэстеразы Т-клеток и увеличения синтеза ИФН- γ и ИЛ-4, а также редукции ПОЛ.

Хроническое воздействие ФОВ вызывает снижение формирования ГЗТ, а также уменьшение концентрации цитокинов ИФН- γ и ИЛ-2 в крови, свидетельствующее о поражении Th1-клеток. Применение Т-активина, имунофана и полиоксидония в равной степени восстанавливало функцию Th1-лимфоцитов и концентрацию ИФН- γ и ИЛ-2.

Воздействия ФОВ в течение 30 сут снижает АЗКЦ и активность ЕКК. Применение различных иммуномодуляторов - Т-активина, имунофана и полиоксидония - в эквитерапевтических дозах восстанавливало АЗКЦ и функцию ЕКК. Установлен наибольший стимулирующий эффект у полиоксидония.

Хроническая интоксикация ФОВ вызывает супрессию факторов НРО, уменьшает функцию моноцитарно-фагоцитарной системы вследствие стимуляции н-холинорецепторов ацетилхолином, что проявляется уменьшением концентрации в крови провоспалительных цитокинов ФНО α , ИЛ-1 β и ИЛ-6; снижает гуморальные и клеточные иммунные реакции. Факторами, приводящими к формированию постинтоксикационного иммунодефицитного состояния при действии ФОВ являются преимущественное поражение функции Th1-лимфоцитов, редукция кооперации Т- и В-лимфоцитов, в определенной степени увеличение в крови кортикостерона, инактивация ацетилхолинэстеразы Т-клеток, активация ПОЛ. Действие ФОВ (российского VX и зарина) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,3 DL₅₀, в большей степени снижает функцию Th1-лимфоцитов по сравнению с активностью Th2-клеток, а при интоксикации ФОВ в течение 60 сут (суммарная доза - 0,6 DL₅₀) функция Т-лимфоцитов этих типов уменьшалась в равной степени. Хроническая интоксикация ФОВ (30 сут) снижает концентрацию в крови ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10, а отравление в течение 60 сут – только ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6. При хронической интоксикации ФОВ (30 и 60 сут) применение

Т-активина, имунофана и полиоксидония частично или практически полностью восстанавливало содержание ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4 и ИЛ-6 в крови. Концентрация в крови ИЛ-10 при интоксикации в течение 30 сут существенно возрастала только при назначении полиоксидония. Использование Т-активина, имунофана и полиоксидония восстанавливало Т-зависимое антителообразование (синтез IgM и IgG), АЗКЦ и функцию ЕКК; имунофан и полиоксидоний при хроническом отравлении ФОВ увеличивали активность лизоцима и ТКБ в сыворотки крови; кооперацию Т- и В-лимфоцитов крыс; существенно снижали инициацию ПОЛ, восстанавливая показатели антиоксидантной защиты и ПОЛ практически до контрольных значений. В целом по степени эффективности иммуностимулирующего эффекта в порядке его увеличения иммуностимуляторы располагались в последовательности: Т-активин, имунофан, полиоксидоний.

Данная монография не дает полных ответов на далеко неоднозначные и не вполне ясные иммунологические механизмы при действии ФОС. ксенобиотиков. Нашей целью являлось обобщение данных литературы по иммунотоксическому действию ФОС и результатов собственных экспериментальных исследований для понимания патогенеза нарушений показателей врожденного и адаптивного иммунитета различными ФОС с целью целенаправленной их коррекции.

Нерешенность многих вопросов, противоречивость и неоднозначность результатов исследований механизмов нарушения показателей врожденного иммунитета, регуляции иммуногенеза, Т- и В-звена иммунитета после острой и хронической интоксикации различными ФОС предполагает дальнейшее изучение этой проблемы, решение которой позволит существенно снизить смертность больных при отравлениях антихолинэстеразными ядами, уменьшить степень их инвалидизации, а также сократить продолжительность их лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абрамов В.В., Ширинский В.С., Лозовой В.П., Козлов В.А. Влияние ацетилхолина на синтез IgG и пролиферацию лимфоцитов в культуре мононуклеаров, выделенных от больных ревматоидным артритом, раком молочной железы и здоровых доноров // Иммунология. 1986. № 6. С. 83-86.
2. Абдрашидова Н.Ф., Романов Ю.А. Состояние эритроцитарной системы и ПОЛ-окислительной активности у больных хроническим бронхитом, вдыхавших и не вдыхавших озон // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т.132, №9. С. 317-319.
3. Агапов В.И., Гладких В.Д., Кирьянов В.В., Колосов Р.В., Кулажин О.А. Изменение неспецифической и иммунологической резистентности при остром отравлении норборнаном // Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты. СПб.: ООО «Изд. Фолиант», 2004. С. 74-75.
4. Адо А.Д., Гольдштейн М.М., Донцов В.И. Ацетилхолининдуцированная подвижность лимфоцитов интактных и сенсibilизированных мышей //Бюл. эксперим. биологии и медицины. 1983. № 4, С. 66-67.
5. 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, № 2. С. 177-178.
6. Адо А.Д., Алексеева Т.А., Авдеева Т.А. О взаимодействии холиновых и иммунных рецепторов В-лимфоцитов человека //Иммунология. - 1985а. № 4. С. 57-59.
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.-1985б. Т. 100, № 5. С. 587-588.
8. 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, № 5. С. 587-588.
9. 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, № 9.С. 325-327.
10. Адо А.Д. Некоторые вопросы нервной регуляции иммунных и аллергических реакций (об отношении холиновых и антигенсвязывающих рецепторов // Эксперим. и клин. фармакология. 1995.№ 3.С.43-45.
11. Александров В.Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества: Учебное пособие.- 2-е изд., перераб и доп. М.: Военное издательство, 1990. 271 с.
12. Александров В. Н. Патология иммунной системы при травме // Пат. физиол. и эксперим. терапия. 1982. № 6. С. 45 - 47.
13. Александров В. Н. Гуморальный иммунный ответ после травмы различной тяжести // Пат. физиол. и эксперим. терапия. 1983. №4. С. 70-72.
14. Александров В. Н., Емельянов В.И. Отравляющие вещества: Учебное пособие. 2-е изд., перераб и доп. М.: Военное издательство, 1990. 271 с.
15. Алексеев Г.И., Аббасов Р.Ю., Першин В.Н. и др. Коррекция нарушений иммунной системы организма людей при острых отравлениях фосфорорганическими соединениями // Патогенез, клиника и профилактика поражений отравляющими веществами вероятного противника. Медицинские средства защиты: Тез. докл. научн. конф. 20-21 мая 1981 г.- Л., ВмедА, 1981. С. 5-6.
16. Алексеев Г.И., Лихущин П.П., Мошкин Е.А. Профилактика, диагностика и лечение острых отравлений в войсках. М.: Военное издательство.1983. 156 с.
17. Алехин Е.К., Лазарева Д.Н., Сибиряк С.В., Иммунотропные свойства лекарственных средств. Уфа, БГМИ, 1993. 208 с.

18. Алимов Н.И., Лобур А.Ю., Солодкова Л.Н. Разработка алгоритма комплексного анализа почвы, зараженной люизитом и продуктами его деструкции // Доклады Академии военных наук Поволжское отделение. Серия: Прикладные проблемы уничтожения запасов химического оружия и военной экологии. Саратов, «Слово». 2000. С. 14-21.
19. Арчаков А.И. Оксигенация биологических мембран. М.: Медицина, 1993. 234 с.
20. Алимова М. Т., Маджидов А. В., Арипова Т. У. Влияние пестицидов на антителообразование и иммунорегуляторные показатели лимфоцитов у мышей // Иммунология. 1991. № 2. С. 33-34.
21. Ананченко В.Г., Лужников Е.А., Алехин Ю.Д. и др. Влияние фосфорорганических пестицидов на систему иммунитета при острых пероральных отравлениях // Сов. мед. 1987. № 3. С. 106-108.
22. Андропова М. Н., Башкирцев А. С., Орницан Э. Ю., Абламунец К. Я. Показатели минерального обмена и неспецифической резистентности организма на фоне различных рационов питания при воздействии неорганических соединений фтора // Актуал. пробл. питания пром. раб. Л., 1988. С. 61-67.
23. Аничков С.В. Нейрофармакология: (Руководство)/АМН СССР. Л.: Медицина, 1982. 384 с.
24. Арион В.Я. Иммунологически активные факторы тимуса // Медиаторы иммунной системы. М.: ВИНТИ, 1981. (Итоги науки и техники. Сер. Иммунология; Т.9). С. 232.
25. Арион В.Я., Иванушкин Е.Ф. Принципы иммунокорректирующей терапии препаратом тимуса Т-активин // Хирургия. 1984. №11. С. 44-48.
26. 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.
27. 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, № 9. С. 332-334.
28. Арипова Т. У., Маджидов А. В., Алибекова М. Г., Камалов З.С. Влияние пестицидов на продукцию интерлейкина-2 // Иммунология. 1991. № 2. С. 67-68.
29. Арчаков А.И. Оксигенация биологических мембран. М.: Медицина, 1993.
30. Аскалонов А. А., Гордиенко С. М., Авдюничева О. Е. и др. Активность клеток-супрессоров при травматическом переломе костей // Иммунология. 1985, № 1. С. 62-64.
31. Ахматова М.А., Саватеев Н.В., Тиунов Л.А. Исследование биологических мембран при регламентировании содержания химических веществ в окружающей среде. Гиг. труда и проф. забол. 1982. №10. С. 55-57.
32. 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.
33. Бажигитова Б.Б., Шортанбаев А.А. Динамика иммунологических показателей у больных с частыми повторными заболеваниями респираторного тракта в результате применения имунофана // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. 2003. Т.5. №2. С. 205.
34. Базарный В.В., Ястребов А.П. Действие некоторых иммуномодуляторов на гемопоэз // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1993. Т. 115, № 2. С. 53-54.
35. Баранова И.Д., Молотиллов В.Ф., Симонова А.В. Иммунологическая эффективность применения иммуномодуляторов в лечении больных фурункулезом // Иммунология. 1998. № 4. С. 63-64.
36. Барштейн Ю. А., Палий Г. К., Персидский Ю.В. и др. Иммунофармакологический анализ длительной интоксикации малыми дозами гербицида симазана // Бюл. экспер. биол. и медицины. 1991. № 12. С. 657-659.

37. Барышников И.И., Смирнова О.И. Влияние холинергических препаратов на миграционную активность лейкоцитов // Фармакол. и токсикол. 1981. №1. С. 85-87.
38. Бастрянова Л.В. Чухловина М.Л., Нгема Нгема А.Ч. Тимус и резистентность к кишечным инфекциям // Журн. микробиол. 1991. № 1. С. 77-80.
39. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта: 2-е изд. Л.: Медицина, 1963. 235 с.
40. 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.
41. Белокрылов Г.А., Молчанов И.В. Левамин и церебролизин как иммуностимуляторы // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1991. № 2. С. 165-166.
42. 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. № 1. С. 53-55.
43. 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.
44. Белокрылов Г.А., Попова О.Я. Лизосомально-катионный тест и тест восстановления НСТ лишь частично отражают степень завершенности фагоцитарного процесса в гранулоцитах человека // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1999. Т.133, № 1. С. 75-77.
45. Белокрылов Г.А., Попова О.Я., Сорочинская Е.И. Сходство иммуно-, фагоцитозмодулирующих и антиоксидантных свойств дипептидов и составляющих их аминокислот // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1999. Т.127, № 6. С. 674-676.
46. Бельцкий С. М., Снастина Г. И. Механизм защиты от гнойной инфекции // Иммунология. 1985. №2. С. 14-20.
47. Бережной Р.В. Судебно-медицинская экспертиза отравлений техническими жидкостями. М.: Медицина, 1977. С. 110-130.
48. Бертрам Г. Базисная клиническая фармакология. СПб., «Невский диалект», 2000. Т. 2. 672 с.
49. Бирбин В.С. Нарушение иммунного гомеостаза при сочетанном действии ядов общетоксического действия (нитрилов) и механической травмы и его коррекция (экспериментальное исследование) // Дисс. ... канд. мед. наук. Саратов, СГМУ. 2003. 173 с.
50. 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.
51. Борисов В.А. Влияние антигениндуцированного супрессорного фактора селезенки на иммунный ответ к различным антигенам // Физиол. журнал.-Киев, 1990. Т. 36, № 4. С. 48-51.
52. Борисова А.М. Алексева А.Б., Сидоров М.З. др. Роль естественной цитотоксичности в иммунопатогенезе рецидивирующей герпетической инфекции и влияние иммуномодуляторов на клинико-иммунологический статус // Иммунология. 1991. №6. С. 60-62.
53. Борисова А.М. Алексева А.Б., Сидоров М.З. др. Роль естественной цитотоксичности в иммунопатогенезе рецидивирующей герпетической инфекции и влияние иммуномодуляторов на клиникоиммунологический статус // Иммунология. 1991. №6. С. 60-62.
54. Брюхин Г. В., Михайлова Г. И. Интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа у потомства крыс с хроническими поражениями печени // Физиол. журн. Киев. 1990. Т 36. №6. С. 94-100.

55. Бурмистров С.О., Арутюнян А.В., Степанов М.Г., Опарина Т.И., Прокопенко В.М. Нарушение активности свободнорадикальных процессов в ткани яичников и мозга крыс при хронической ингаляции толуолом и диоксином // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т.132, №9. С. 257-262.
56. Бухарин О.В., Бичеева Р.Ч. Фотонейтронный метод определения бета-лизинов в сыворотке крови // Лаб. дело. 1970. №3. С. 160-162.
57. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Лизоцим и его роль в биологии и медицине. Томск, 1974. 209 с.
58. Бухарин О. В., Васильев Н. В. Система β -лизина и его роль в клинической и экспериментальной медицине. Томск, 1977. 166 с.
59. Бухарин О. В., Сетко Н. П., Желудева Г. Н. Иммунологические сдвиги у экспериментальных животных при воздействии комплекса химических веществ // Гигиена труда. 1985. №3. С. 45-46.
60. Бухарин О.В., Сулейманов К.Г., Чернов О.Л. Способность микроорганизмов к инаktivации бактерицидного действия тромбоцитарного катионного белка (β -лизина) // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1998. №7. С. 66-67.
61. Валеева И.Х., Зиганшина Л.Е., Бурнашова З.А., Зиганшин А. У. Влияние диметилфосфата и ксидифона на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крыс, длительно получавших преднизолон // Эксперим. и клин. фармакология.- 2002. Т.65, № 2. С. 40-43.
62. Варенин С.А., Поделякин Н.А., Кашеварова А.Д. Проблемы медицинской защиты населения при химических катастрофах. 1992. №1. С. 66-71.
63. Валеева И.Х., Зиганшина Л.Е., Бурнашова З.А., Зиганшин А. У. Влияние диметилфосфата и ксидифона на показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы крыс, длительно получавших преднизолон // Эксперим. и клин. фармакология. 2002. Т.65, № 2. С. 40-43.
64. 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 Всесоюзного конгресса по болезням органов дыхания.- Киев, 9-12 окт., 1990. Киев, 1990. С. 750.
65. 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.
66. Виноградов В.М., Гембицкий Е.В., Мухин Е.А., Фролов С.Ф. Фармакология средств с преимущественным действием на обмен веществ и противомикробных препаратов. Л.:Изд-во ВМА, 1986. 404 с.
67. Владимиров В.А. Сильнодействующие ядовитые вещества и защита от них. М., Военное издательство. 1989. 176 с.
68. Вольский Н.Н., Цырлова И.Б., Козлов В.А. Селективное действие зиксорины , индуктора цитохрома Р-450, на гуморальный иммунный ответ и реакцию гиперчувствительности замедленного типа // Иммунология.-1985. № 3. С. 47-49.
69. Гаврилов О.К., Козинец Г.И., Черняк Н.Б. Клетки костного мозга и периферической крови (структура, биохимия, функция). М.: Медицина, 1985. 284 с.
70. Галактионов В. Г. Графические модели в иммунологии. М.: Медицина, 1986. 240 с.
71. Галактионов С. Г., Михнева Л.М., Николайчик В.В. К вопросу о неспецифичности действий «средних молекул» на аппарат клеточного иммунитета // Химия и биол. иммунорегуляторы. Рига. 1985. С. 253- 264.
72. Галактионов С. Г., Цейтин В. М., Леонова В. И. и др. Пептиды группы средних молекул // Биоорганич. химия. 1984, № 1. С. 5-17.
73. Гембицкий Е.В., Кожемякин Л.А., Корольюк 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.

74. Генес В. С. Таблицы достоверных различий между группами наблюдений по качественным показателям. М.: Медицина, 1964. 80 с.
75. Гольдберг Д. И., Гольдберг Е. Д. Справочник по гематологии. Томск, изд-во Томского ун-та. 1980. 266 с.
76. Гольдберг Е. Д., Штернберг И. Б., Михайлова Т. Н. Состояние лимфоидной ткани при введении рубомицина С // Пат. физиол. и эксперим. терапия. 1972. №2. С. 67-68.
77. Гонтова И.А., Громыхина Н.Ю., Козлов В.А. Механизмы влияния ацетилхолина на интенсивность гуморального иммунного ответа // Иммунология. 1989. № 4. С. 52-55.
78. Голиков С.Н. Профилактика и терапия отравлений фосфорорганическими инсектицидами. М., 1968. 168 с.
79. Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсического действия/ АМН СССР. Л.: Медицина, 1986. 280 с.
80. Гордиенко С. М. Нерадиометрические методы оценки естественной цитотоксичности на эритроцитарные клетки-мишени // Иммунология. 1984. №1. С. 31-36.
81. Гордиенко С.М. Приемлемый для клинической практики метод оценки активности естественных и антителозависимых киллерных клеток // Лаб. дело. 1983. № 9. С. 45-48.
82. Гордиенко С.М., Авдюничева О.Е., Козлова В.А. Эффекторная и регуляторная активность мононуклеарных фагоцитов и естественных киллерных клеток при травматическом переломе костей // Иммунология. 1987. № 2. С. 78 - 81.
83. Горизонтов П. Д. Система крови как основа резистентности и адаптации организма // Физиол. журн. Киев. 1981а. Т 27. №3. С. 317-321.
84. Горизонтов П. Д. Стресс. Система крови в механизме гомеостаза. Стресс и болезни // Гомеостаз. М.: Медицина. 1981б. С. 538-573.
85. Горизонтов П. Д., Протасова Т. Н. Детоксикация как один из механизмов гомеостаза и резистентности // Гомеостаз. М.: Медицина, 1981. С. 234 - 258.
86. Гребенюк А.Н., Антушевич А.Е., Беженарь В.Ф. и др. Нейтрофил и экстремальные воздействия/ Под ред. А.Н. Гребенюка и В.Г. Бовтюшко. СПб., 1998. 215 с.
87. Гребенюк А.Н., Романенко О.И. Общие механизмы иммуноцитологических реакций при химических воздействиях // Сб. материалов XIII научн. докл. молодых ученых и специалистов военно-медицинской академии. СПб., 1996. С. 21-22.
88. Гублер Е. В. Вычислительные методы анализа и распознавания патологических процессов. Л.: Медицина, 1978. 296 с.
89. Гурин В.Н. Роль центральных холинергических структур в механизме стимуляции гипоталамо-адреноренальной системы фармакологическими средствами // Фармакологическая регуляция жизнедеятельности организма через холинергические системы.- Л.: Лен. сан.-гиг. мед. ин-т. 1970. С. 174-175.
90. Гушин Н.В., Хайдарова Д.С., Кугушева Л.И. и др. Активность ацетилхолинэстеразы лимфоцитов крыс при интоксикации пестицидами // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1991. Т. 111, № 2. С. 144-146.
91. Гюллинг Э.В., Гоц Т.Ю., Гремяков В.А. Модуляция реактивности базофилов низкомолекулярными тимическими препаратами // Докл. АН УССР. 1991. № 6. С. 174-175.
92. Давыдов В.В. Флюорометрическое определение неконъюгированных 11-оксикортикостероидов в биологических средах организма // Патология экстремальных состояний. Труды ВМА им. С.М. Кирова. Т. 189. Л.: ВмедА, 1970. С. 85-86.
93. Давыдова Е.В., Алексеев С.М., Бонитенко Е.Ю., Гребенюк А.Н., Романенко О.А., Сидоров Д.А. Состояние нейтрофилов периферической крови в условиях острых воздействий токсикантов различных групп // Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты. СПб.: ООО «Изд. Фолиант», 2004. С. 74-75.

94. Давыдова Е.В., Бонитенко Е.Ю., Романенко О.А., Шилов В.В., Гребенюк А.Н. Лейкоцитарная защита при острых отравлениях липофильными ксенобиотиками // Медико-биологические проблемы противолучевой и противохимической защиты – СПб.: ООО «Изд. Фолиант». 2004. С. 75-77.
95. Давыдова Е.В., Романенко О.И., Шилов В.В., Гребенюк А.Н. Состояние лейкоцитарной защиты при экспериментальных отравлениях карбофосом и дихлорэтаном // Актуальные проблемы теоретической и прикладной токсикологии: Тез. Докл. 1 Всероссийской конференции токсикологов.- СПб, 1995. С. 44.
96. Денисенко П.П. Роль холинореактивных систем в регуляторных процессах. М: Медицина. 1980. С. 296.
97. Денисенко П.П., Чередниченко Р.П. Взаимное влияние нервных и иммунных процессов // В кн.: Фармакологическая регуляция жизнедеятельности через хлинергические системы: Тезисы докладов к конференции 23-25 сентября 1970 г. Л., Ленинградский сан.-гиг. мед. институт. 1970. С. 25.
98. Денисенко П.П., Чередниченко Р.П. Влияние синаптотропных препаратов на специфический и неспецифический гуморальный иммунитет // Фармакол. и токсикол. 1974. №1. С. 66-70.
99. 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.
100. 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, № 5. С. 61-63.
101. 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
102. Дешевой Ю.Б. Реакция эзинофилов костного мозга у интактных и адреналэктомированных крыс на введение препаратов, действующих преимущественно в области периферических М-холинорецепторов // Бюл. эксперим. биол. и мед.-1984.- № 10.-С. 512. (Реф. рукописи, деп. в ВИНТИ 23.05.1984 г., № 3344-84 Деп).
103. Дорошевич А.Л. Влияние фосфорорганических соединений на содержание некоторых биогенных аминов: Автореф. дис... канд. мед. наук. Минск. 1971. С. 23.
104. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты : Пер. с англ. М.: Мир, 1982. Т 2. 806 с.
105. Долинская С. И., Лурье Л. М., Таги-заде Р. К. Влияние пестицидов на миграционную активность макрофагов и некоторые показатели метаболизма //Гигиена и сан. 1989. № 7. С. 76-77.
106. Дорошевич А.Л. Влияние фосфорорганических соединений на содержание некоторых биогенных аминов: Автореф. дис... канд. мед. наук. Минск.-1971. С. 23.
107. Диноева С.К. Динамика изменений иммунной структуры лимфатических фолликулов селезенки при интоксикации пестицидами. //Гигиена и санитария. 1974. №3. С. 85-87.
108. Дыгай А.М., Богдашин И.В., Шерстобоев Е.Ю. и др. Роль тимуса в регуляции продукции интерлейкина-1 и фактора некроза опухоли клетками костного мозга мышей при стресс-реакции // Иммунология. 1992. № 3. С. 36-38.
109. Дьячук И. А. Состояние иммунобиологической реактивности организма работников индейководческих птицефабрик //Гигиена. труда. 1979. № 2. С. 53-55.
110. Дьячук И. А. Состояние иммунобиологической реактивности организма работников индейководческих птицефабрик //Гигиена. труда.1979. № 2. С. 53-55.
111. Евсеев В. А., Магаева С. В. Стресс в механизмах развития вторичных иммунодефицитных состояний // Вестн. АМН СССР.-1985. №8. С. 18-23.

112. Елизарова Н.Л., Арион В.Я., Зими́на И.В. Опиоиды в составе тактивина: β -эндорфин // Аллергология и иммунология. 2005. Т. 6, № 2. С. 204.
113. Ершов Ф.И. Иммуномодуляторы - новое поколение противовирусных средств // Эксперим. и клин. фармакол. - 1995. Т. 58, № 2. С. 74-78.
114. Ершов Ю.А., Плетенева Т.В. Механизм токсического действия неорганических соединений. М.: Медицина, 1989. 272 с.
115. Жамсаранова С.Д., Лебедева С.Н., Ляшенко В.А. Оценка функциональной активности макрофагов при воздействии карбофоса и 2,4 Д // Сборник науч. трудов ВНИИ гигиены и пестицидов, полимеров и пласт. масс. 1988 № 18. С. 143-147.
116. Жамсаранова С.Д., Миронова Э.С., Сергеева З.Д. и др. Использование показателей иммунной системы организма животных при оценке пороговых доз пестицидов // Гигиена и санитария. 1990. № 2. С. 75-76.
117. Жданов В.В., Лукьянова Т.А., Кириенкова Е.В. Механизмы кроветворения у бестимусных крыс // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2002. Т.133, №5. С. 522-524.
118. Жминько П.Г. Токсикодинамика и особенности токсического действия нового пестицида циклофоса // Проблемы охраны здоровья населения и защиты окружающей среды от химических вредных факторов: Тез. докл. I Всес. съезда токсикологов.- Ростов н/Д., 1986. С. 296-297.
119. Жминько П.Г. Оценка состояния иммунной системы и неспецифической резистентности организма с позиций критерия вредности при регламентации циклофоса // Гигиена применения, токсикология пестицидов и полимерных материалов: Сб. науч. тр. Киев: ВНИИГИНТОКС, 1989. Вып.19. С. 79-83.
120. Жминько П.Г. Роль иммунных комплексов в патогенезе нейротоксического действия фосфорорганического пестицида афоса // Проблемы экологии и пути их решения: Материалы научно-практич. конф. АН УССР и ВАПВОСВ. Киев, Издание академии. 1991. С. 42-43.
121. Жубантурлиева А.Б. Имунофан в комплексном лечении больных с хроническим обструктивным заболеванием легких / Жубантурлиева А.Б., Шортанбаев А.А., Туремуратова Ш.К., Курбанбаева Н.К // Internatinal J. on Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. - 2003. Т.5. №2. С. 218.
122. Жук Е.А., Галенюк В.А. Тимоген в лечении сахарного диабета I типа // Тер. Архив. 1996. Т.68, №10. С.12-14.
123. Жуков В.Е., Клаучек В.В., Шкодич П.Е. Токсикологическая характеристика комбинированного действия иприта и льюизита // Токсикол. вестник. 2002. №5. С. 31-35.
124. 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.
125. Забродский П. Ф. Влияние армина на факторы неспецифической резистентности организма и первичный гуморальный ответ // Фармакол. и токсикол. 1987. Т. 49. №2. С. 57-60.
126. Забродский П.Ф. Роль н-холинорецепторов в реализации иммунотоксического эффекта фосфорорганических соединений // Медико-биологические проблемы токсикологии и радиобиологии: Тезисы докладов Российской научной конференции с международным участием, СПб, 4-6 июня 2015 г. СПб: Фолиант, 2015. С. 62-63.
127. Забродский П.Ф., Мышкина А.К. Влияние холинергической стимуляции на формирование гиперчувствительности замедленного типа // Фармакол. и токсикол. 1989. № 6. С. 46-48
128. Забродский П.Ф. Фармакологическая регуляция активности нейтрофилов холинотропными препаратами, барбитуратами и феназепамом // Эксперим. и клин. фармакология. 1992. Т. 55, № 6. С. 31-33.

129. Забродский П.Ф., Линючев М.Н. Оценка защиты фармакологическими средствами, индуцирующими монооксигеназные ферменты от пестицидов по показателям летальности // Эксперим. и клин. фармакология. 1993. Т. 56, № 5 С. 45-47.
130. Забродский П. Ф. Механизмы иммунотропных эффектов фосфорорганических соединений // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1993. Т. 116, № 8. С. 181 -183.
131. Забродский П.Ф. Влияние антидотных препаратов на иммунные реакции при острой интоксикации диметилдихлорвинилфосфатом // Эксперим. и клин. фармакология. 1995. № 2. С. 49-51.
132. Забродский П.Ф. Изменение антиинфекционной неспецифической резистентности организма под влиянием холинергической стимуляции // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1995. Т. 119, № 8. С. 164 - 167.
133. Забродский П.Ф. Фармакологическая коррекция нарушений системы иммунитета при острой интоксикации диметилдихлорвинилфосфатом // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1996. Т. 121, №4. С. 441 - 443.
134. Забродский П.Ф. Иммунотропные свойства ядов и лекарственных средств.- Саратов : Изд. СГМУ, 1998. 213 с.
135. Забродский П.Ф. Влияние ксенобиотиков на иммунный гомеостаз. – В кн.: Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002. С. 352-384.
136. Забродский П.Ф., Германчук В.Г. Оценка роли кортикостерона в реализации иммуносупрессивных эффектов при остром отравлении токсичными химическими веществами //Бюл. эксперим. биол. и мед. 2000. Т.129, №5. С. 552-555.
137. Забродский П.Ф., Германчук В.Г. Иммунный гомеостаз при антидотной терапии острых отравлений токсичными химическими веществами// Токсикол. вестник. 2002, №1. С. 8-11.
138. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Киричук В.Ф., Нодель М.Л., Аредаков А.Н. Антихолинэстеразный механизм как фактор иммунотоксичности различных химических соединений //Бюл. эксперим. биол. и мед. 2003. Т. 136. №8. С. 202-204.
139. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Ковалев А.Ю., Кадушкин А.М. Нарушение функции субпопуляций Т-лимфоцитов при подостром отравлении токсичными химикатами // Российский хим. журн. 2007. № 3. С. 25–28.
140. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Мандыч В.Г., Кадушкин А.М. Роль Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов в супрессии иммунных реакций при подостром отравлении антихолинэстеразными токсикантами // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2007.Т. 144, №7. С. 62-64.
141. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Нодель М.Л., Василенко О.А., Аредаков А.Н. Влияние иммунофана на показатели системы иммунитета и перекисного окисления липидов после острых отравлений токсичными химическими веществами // Эксперим. и клин. фармакология.-2004. Т. 67, № 5.-С. 28-30.
142. Забродский П.Ф., Германчук В.Г., Трошкин Н.М. Иммуностимуляторы. – Саратов, «Аквариус». 2001. 109 с.
143. Забродский П.Ф., Громов М.С., Масляков В.В. Влияние анабазина на летальность и содержание провоспалительных цитокинов в крови мышей в ранней фазе сепсиса // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014. Т.77, №11. С. 20-22.
144. Забродский П.Ф., Громов М.С., Масляков В.В. Влияние активации $\alpha 7$ н-ацетилхолинорецепторов и антител к фактору некроза опухоли- α на летальность мышей и концентрацию провоспалительных цитокинов в крови в ранней фазе сепсиса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2015. Т. 159, № 6. С. 713-15.
145. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков. Саратов: СВИБХБ. 2007. 420 с.
146. Забродский П.Ф., Масляков В.В., Громов М.С. Изменение функции лимфоцитов и содержания цитокинов в крови под влиянием атропина при остром отравлении

- малатином // Эксперим. и клин. фармакология. 2015. Т. 78, № 7. С. 20-23.
147. Забродский П.Ф., Кадушкин А.М. Относительное увеличение функции Th2-лимфоцитов при интоксикации фосфорорганическими соединениями как фактор риска развития респираторных аллергических реакций // Аллергология и иммунология. 2007. Т. 8, № 1. С. 156.
148. Забродский П.Ф., Киричук В.Ф., Германчук В.Г. Роль антихолинэстеразного механизма в супрессии антителообразования при острой интоксикации фосфорорганическими соединениями // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т. 131, №5. С. 551-553.
149. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Мальцева Г.М., Молотков А.О. Иммуотропные свойства холинергических веществ / Под ред. П.Ф. Забродского. – Саратов: Изд. «Научная книга», 2005. 251 с.
150. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., Германчук В.Г. Иммуностимулирующие свойства полиоксидония при остром отравлении антихолинэстеразными токсичными химикатами // Эксперим. и клин. фармакология. 2006. Т. 69, № 6 С. 37-39.
151. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., Германчук В.Г. Сравнительная оценка влияния острого отравления токсичными химикатами на параметры неспецифической резистентности организма и системы иммунитета // Токсикол. вестник. 2006. № 6. С. 6-9.
152. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г., Кадушкин А.М. Редукция функции Th1- и Th2-лимфоцитов при остром отравлении фосфорорганическим соединением диметилдихлорвинилфосфатом // Вестник новых мед. технологий. 2007. Т. XIV, № 1. С. 201–202.
153. Забродский П.Ф., Масляков В.В., Громов М.С. Изменение функции лимфоцитов и содержания цитокинов в крови под влиянием атропина при остром отравлении малатином // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78. №7. С. 20 – 23
154. Забродский П.Ф., Мышкина А.К. Влияние холинергической стимуляции на формирование гиперчувствительности замедленного типа //Иммунология.-1989. № 6. С. 86
155. Забродский П.Ф., Саватеев Н.В. Иммуотропная активность химических веществ как возможная причина заболеваемости в экологически неблагоприятных регионах // Воен.-мед. журн.- 1994.- №6.- С. 28-34.
156. Забродский П.Ф., Шиловостов Н.Г., Кажкин А.А. Влияние острой интоксикации фосфорорганическими инсектицидами на иммунный гомеостаз и его коррекция / Воен.-мед. факультет при СГМУ, Саратов, 1994. 9 с. Деп. в ВИНТИ 20.04.94, №958-В94
157. Забродский П.Ф., Громов М.С., Яфарова И.Х.. Нарушение функции Th1- и Th2-лимфоцитов и изменение содержания цитокинов в крови при различных сроках хронической интоксикации фосфорорганическими соединениями // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 156, №12.Р. 753-756.
158. Забродский П. Ф., Древко Б. И., Мандыч В. Г., Германчук В. Г., Балашов С.В., Кузьмин А.В.. Изменение токсичности и иммунотоксичности тетрахлорметана и карбофоса под влиянием 2,4,6-трифенил-4Н-селенопирана и их связь с Р-450-зависимой монооксигеназной системой // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008. Т.71, №6. Р. 42-44.
159. Забродский П. Ф., Киричук В.Ф., Мандыч В.Г., Серов В.В., Плахута И.А.. Супрессия иммунных реакций, связанных с функцией В-клеток, Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов, и фармакологическая коррекция этих нарушений при остром отравлении метанолом // Экспериментальная и клиническая

- фармакология. 2007. 70(5), 30-32.
160. Забродский П.Ф., Яфарова И.Х., Масляков В. В., Лим В.Г., Гришин В.А.. Ингибирование ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов ксенобиотиками и их иммуотоксический эффект // Иммуноterapia. Аллергология и иммунология. 2011. Т. 12. №1. С.47-48.
 161. Западнюк И.П., Западнюк В. И., Захария Е.А., Западнюк Б. Д. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. 3-е изд., переработ. и доп. Киев, Выща школа. 1980. 383 с.
 162. Зарубина И.В., Миронова О.П. Антиоксидантная защита головного мозга при острой гипоксии беметилом // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т.133, №2. С. 165-167.
 163. Земсков В.М. Неспецифические иммуностимуляторы //Успехи современной биологии. 1991.Т.111, № 5. С. 707-721.
 164. Зимин Ю. И., Ляхов В. Ф. Эффект кооперации в реакции зависимой от антител клеточной цитотоксичности // Иммунология.1985. №1.С. 27-30.
 165. Золотникова Г. П. О нарушении иммунологической реактивности организма под воздействием пестицидов в условиях теплиц //Гигиена труда. 1980. № 3.С. 38-40.
 166. Золотникова Г.П. К вопросу о ранней диагностике и профилактике профпатологии пестицидной интоксикации у тепличниц //Гиг. труда и проф. заболеваний. 1978. №12. С. 14-18.
 167. Зарубина И.В., Миронова О.П. Антиоксидантная защита головного мозга при острой гипоксии беметилом // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т.133, №2. С. 165-167.
 168. Заугольников С.Д., Кочанов М.М., Лойт А.О., Ставчинский И.И. Экспрессные методы определения токсичности и опасности химических веществ // Л.: Медицина, 1978. 184 с.
 169. Зимин Ю. И., Ляхов В. Ф. Эффект кооперации в реакции зависимой от антител клеточной цитотоксичности // Иммунология. 1985. №1. С. 27-30.
 170. Золотникова Г.П. О нарушении иммунологической реактивности организма под воздействием пестицидов в условиях теплиц //Гиг. труда. 1980. № 3. С. 38-40.
 171. Иванов В.В. Изменение численности и качественного состояния лимфоцитов при хроническом радиационно-химическом поражении крыс // Гигиена и санитария. 1986. № 3. С. 37-40.
 172. Иванова А.С. Характер вовлечения эндокринной системы в стресс ответе на отравления нейротропными средствами //Токсикол. вестник. 1998. №4. С. 16-19.
 173. Ивашкин В.Т. Имунный гомеостаз и имунные заболевания печени // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 2009. Т.19. №3. С.4-12.
 174. Имантаева Г.М. Иммунореабилитационная активность тактивина в комплексном лечении больных инфарктом миокарда // Аллергология и иммунология. 2005. Т.6, № 2. С. 246-247.
 175. Каган Ф.С. Токсикология фосфорорганических пестицидов. М.: Медицина, 1977. 296 с.
 176. Каган Ю.С., Кокшарева Н.В., Овсянникова Л.М., Самусенко Н.И. Использование индукции цитохрома Р-450 как один из новых принципов терапии отравлений фосфорорганическими инсектицидами //Вестн. АМН СССР. 1980. № 8. С. 55-57.
 177. Калинина Н.И. О Конвенции по запрещению химического оружия. Что о ней надо знать. М., ЗАО «Агенство Ракурс», 2000. 35 с.
 178. Калинина Н.И. Химическое разоружение России и его нормативно-правовое обеспечение. М., ЗАО «Агенство Ракурс», 2000. 52 с.
 179. Караулов А.В. Молекулярно-биологическое обоснование применения имунофана в клинической практике // Лечащий врач. 2000б. № 4. С.46-47.

180. Караулов А.В. Клинико-иммунологическая эффективность применения имунофана при оппортунистических инфекциях // Лечащий врач. 2000а. №5-6. С. 28-29.
181. Караулов А.В. Молекулярно-биологическое обоснование применения имунофана в клинической практике // Лечащий врач. 2000б. № 4. С.46-47.
182. Караулов А.В. Ликов В.Ф., Евстигнеева И.В., Кокушков Д.В. Оценка различных методов иммуномониторинга при проведении иммунокоррекции // Аллергология и иммунология. 2005. Т.6, № 2. С. 136-137.
183. Каримов И.Ф., Иванов Ю.Б., Дерябин Д.Г. Влияние тромбоцитарного катионного на биолюминесценцию и жизнеспособность рекомбинантного штамма *Escherichia coli* с клонированным *lux*-опероном *Photobacterium leiognathi* белка // Вестник ОГУ. 2009. №2. С. 138-142.
184. Каулиньш У.Я. Лизоцим: (Обзор). - Рига, 1982. 51 с.
185. Калинина Н.И. Химическое разоружение России и его нормативно-правовое обеспечение. М., ЗАО «Агенство Ракурс», 2000б. 52 с.
186. Кашенович Л.А., Разibaкиевич Р.М., Федорина Л.А. Т- и В-система иммунитета у больных интоксикацией пестицидами // Гиг. труда и проф. заболеваний. 1981. № 4. С. 17-19.
187. Кемилева З. Вилочковая железа: Пер. с болг. М.: Медицина, 1984. 256 с.
188. 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, № 11. С. 468-471.
189. Кирилина Е.А., Михайлова А.А., Малахов А.А. Гурьянов С.А., Ефремов М.А. Механизм иммунокорректирующего действия миелопида // Иммунология. 1998. № 4. С. 27-29.
190. Кириллова Е.Н., Муксинова К.Н., Смирнов Д.Г., Сокольников М.Э. Эффективность миелопида в модификации иммунных нарушений, индуцированных длительным действием радиации // Иммунология. 1991. № 6. С. 35-36.
191. Климова Д.М., Кузнецова К.К., Дмитриева Р.А. и др. Влияние хрома на сопротивляемость организма животных //Клин. и гигиен. аспекты влияния на организм хрома и др. хим. веществ. Ч. 1 /Алма-ат. гос. мед ин-т.-Актюбинск, 1990. С. 109-110.
192. Клинецвич А.Д., Баулин С.И., Головков В.Ф. и др. Сравнительный анализ изменений белкового обмена, перекисного окисления липидов и системы гемостаза при действии полихлорированных дибензо-п-диоксинов и радиации // Докл. АН. 1994. Т.335, №3. С. 378-381.
193. Ковалев И.Е. Роль иммунологических механизмов в системе поддержания химического гомеостаза //Химия и биол. иммунорегуляторов. Рига, 1985. С. 188-205.
194. Ковалев И.Е., Борисова А.Н. Влияние индукторов микросомальных оксидаз со смешанной функцией на иммунный ответ мышей, вызываемый гетерологичными эритроцитами // Журн. микробиол. 1981. № 4. С. 42-45.
195. Ковалев И.Е., Полевая О.Ю. Антитела к физиологически активным соединениям. М., 1981. С. 126.
196. Ковалев И.Е., Рубцова Е.Р., Подымова Н.Г. и др. Исследование иммунофармакологической активности перфторбутиламина //Фармакол. и токсикол. 1986. № 2. С. 28-31.
197. Ковалев И.Е., Шипулина Н.В. Реципрокное влияние циклофосфана на цитохром Р-450 печени и систему иммунитета // Фармакол. и токсикол. 1983. № 4. С. 71-75.
198. Ковальская Н.И., Арион В.Я., Бреусов Ю.Н., Линдер Р.П. Влияние длительного введения Т-активина на структуру тимуса // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1984. Т. 97, № 1. С. 101-102.

199. Ковтун С.Д., Кокшарева Н.В. Электрофизиологический анализ действия ряда антихолинэстеразных веществ на функциональное состояние периферического нерва и нервно-мышечную передачу теплокровных животных // Физиол. журн. 1980. Т. 26, № 4. С. 26-29.
200. Коготкова О. И., Буравцева Н. П., Еременко Е. И., Ефременко В. И., Аксенова Л. Ю. Сочетанное применение в эксперименте живой противосибиреязвенной вакцины СТИ с ликолипидом // Иммунология. 2004. № 2. С. 109-111.
201. Козлов В. А., Журавкин И. Н., Цырлова И. Г. Стволовая кроветворная клетка и иммунный ответ. Новосибирск: Наука, Сиб. отделение, 1982. 322 с.
202. Козлов В.К., Лебедев М.Ф., Егорова В.Н. Новые возможности иммунотерапии с использованием ронколейкина – рекомбинантного ИЛ-2 человека // Терра медика. 1992. №2. С. 15-17.
203. Козлов В.А., Любимов Г.Ю., Вольский Н.Н. Активность цитохром Р-450-зависимых монооксигеназ и функции иммунокомпетентных клеток //Вестн. АМН СССР. 1991. № 12. С. 8-13.
204. Козлов В.А., Сафронов И.В., Кудаева О.Т., Колесникова О.П. Участие интерлейкина-1 в развитии Th1- и Th2-зависимых вариантов хронической реакции «трансплантат против хозяина» // Бюл. эксперим. биол. и мед. – 2001. Т.132, №8. С. 185-187.
205. Козяков В.П., Куценко С.А., Маркин Б.А. и др. Проблемы создания средств оказания экстренной медицинской помощи при авариях на объектах уничтожения химического оружия // Рос. хим. журн. 1993. Т. 37, №3. С.99-101.
206. Константинов Б.А., Винницкий Л.И., Иванов В.А и др. Иммунореабилитация в кардиохирургии на примере больных с инфекционным эндокардитом // Inter. J. Immunorehabilitation. 2000. Vol. 2, N 1. P. 146-151.
207. Корнева Е.А. Нервная система и иммунитет // Вестн. АМН СССР. 1985. № 11. С. 76 - 85.
208. Корнева Е.А., Клименко В.М., Шхинек Э.К. Нейрогуморальное обеспечение иммунного гомеостаза. Л: Наука, 1978. 178 с.
209. Корнева Е.А. Нарушение нейрогуморальной регуляции функций иммунной систем // Вест. АМН СССР. 1990. №11. С. 36-42.
210. Корнева Е.А. Нервная система и иммунитет //Вестн. АМН СССР. 1985 №11. С. 76-85.
211. Корнева Е.А., Лесникова М.П., Яковлева Е.Э. Молекулярно-биологические аспекты изучения взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем //Пробл. и перспективы соврем. иммунол.: Методол. анал. Новосибирск, 1988. С. 87-100.
212. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. Париж, 1993. 191 с.
213. Кириллова Е.Н., Муксинова К.Н., Смирнов Д.Г., Сокольников М.Э. Эффективность миелопида в модификации иммунных нарушений, индуцированных длительным действием радиации // Иммунология. 1991. № 6. С. 35-36.
214. Колкер И.И., Минкова Г.Л., Победина В.Г. и др. Изучение влияния препарата тимуса (тималина) на заживление ожоговых ран и иммунологическую реактивность организма // Хирургия. 1984, № 10. С. 115-118.
215. Комиссаренко В.П., Резников А.Г. Ингибиторы функции коры надпочечниковых желез. – Киев, Здоров'я, 1972.- 374 с.
216. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и его уничтожении. Международная конференция по подписанию Конвенции. – Париж, 1993.
217. Константинов Б.А., Винницкий Л.И., Иванов В.А и др. Иммунореабилитация в кардиохирургии на примере больных с инфекционным эндокардитом // Inter. J. Immunorehabilitation. 2000. Vol. 2, №1. P. 146-151.

218. Корнева Е.А. Нарушение нейрогуморальной регуляции функций иммунной системы // Вест. АМН СССР. 1990. №11. С. 36-42.
219. Коробейникова Э.Н. Фотометрический метод определения молонового альдегида // Лаб. дело. 1989. №7. С.8-10.
220. Котловский Ю. В., Бекеров В. Е., Яманова М. В., Иванова В. В. Новые данные о механизме гепатотоксичности акрилатов // Метабол. аспекты действия на организм промышленных химических соединений.- Красноярск, 1988. 98 с.
221. Кузнецов В.П., Беляев Д.Л., Сливинская Ю.Г. Коррекция лейкоинфероном иммунодефицитных состояний при экспериментальных токсических и медикаментозных гепатитах // Тез. докл. I Съезда иммунологов России, Новосибирск, 23-25 июня 1992. Новосибирск, 1992. С. 259.
222. Кузник Б. И., Васильев Н. В., Цыбиков Н. Н. Иммуногенез, гомеостаз и неспецифическая резистентность организма. М: Медицина, 1989. 256 с.
223. Кузьминская У.А. Иваницкий В.А. Шилина В.Ф. Патогенетическое значение изменений состояния биогенных аминов в патологии, связанной с воздействием химических факторов внешней среды // Эндокринная система организма и токсические факторы внешней среды. Л., 1980. С. 210-219.
224. Кузьмицкий Б.Б., Дадьков И.Г., Машкович А.Е. и др. Иммуномодуляторы 8-изостероидной структуры как индукторы цитохрома Р-450 печени //Фармакол. и токсикол. 1990. Т. 53, № 1.С. 52-55.
225. Кузьминская У.А. Иваницкий В.А. Шилина В.Ф. Патогенетическое значение изменений состояния биогенных аминов в патологии, связанной с воздействием химических факторов внешней среды // Эндокринная система организма и токсические факторы внешней среды. Л., 1980. С. 210-219Кулагин В. К. Патологическая физиология травмы и шока. М.: Медицина, 1978. 160 с.
226. Кульберг А.Я. Молекулярная иммунология. М.: Высш. шк. 1985. 287 с.
227. Кульберг А.Я. Регуляция иммунного ответа.-М.:1986. 224 с.
228. Крачковский Е.А. Гигиена применения ядохимикатов. - Киев, Здоров'я. 1978. 240 с.
229. Курляндский Б.А. Филлов В.А. Общая токсикология. М.: Медицина, 2002. 608 с.
230. Куценко С.А. Военная токсикология, радиобиология и медицинская защита / С.А. Куценко, Н.В. Бутомо, А.Н. Гребенюк и др. СПб., ООО Изд. «Фолиант», 2004. 528 с.
231. Куценко С.А. Основы токсикологии: Научно-методическое издание / С.А. Куценко. СПб., ООО Изд. «Фолиант», 2004. 720 с.
232. Кушнир Е.А., Ловать М.Л., Обухова М.Ф., Шмальгаузен Е. В., Данилова Р.А., Ашмарин И.П. Использование полиоксидония для иммунологической коррекции алкогольной мотивации // Иммунология. 2004. № 2. С. 87 - 90.
233. Лазарев Н. В. Вредные вещества в производстве. Л: Химия, 1976. Т 2. С. 94-95.
234. Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета. М.: Медицина, 1985. 256 с.
235. Куценко С.А. Военная токсикология. радиобиология и медицинская защита. Санкт-Петербург, Фолиант, 2004. 588с.
236. Лазарева Д. Н., Алехин Е. К. Стимуляторы иммунитета. М.: Медицина, 1985. 256 с.
237. Лакин Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1980. 293 с.
238. Лебедев В.В. Имунофан – синтетический пептидный препарат нового поколения: иммунологические и патогенетические аспекты клинического применения // Иммунология. 1999. №1. С. 25-30.
239. Лебедев В.В., Покровский В.И. Имунофан - синтетический пептидный препарат нового поколения // Вестник Российской АМН. 1999а. №4. С. 56-61.
240. Лебедев В.В., Данилина А.В., Сгибова И.В. и др. Фармакологическая иммунореабилитация в системе специфической иммунопрофилактики и вакцинотерапии: современные подходы и перспективы развития // Inter. J. Immunorehabilitation. 2000. Vol. 2, N 1. P. 146-151.

241. Лебедев В.В., Данилина А.В., Сгибова И.В. и др. Фармакологическая иммунореабилитация в системе специфической иммунопрофилактики и вакцинотерапии: современные подходы и перспективы развития // *Inter. J. Immunorehabilitation*. 2000. Vol. 2, N 1. P. 146-151.
242. Лебедев В.В., Покровский В.И. Иммунологические и патогенетические аспекты терапии инфекционных болезней регуляторными пептидами // *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 1999б. № 2. С. 52-56.
243. Лемус В.Б., Давыдов В.В. Нервные механизмы и кортикостероиды при ожогах. Л.: Медицина. Ленингр. отд-ние, 1974. 182 с.
244. Ленинджер А. Биохимия: Молекулярные основы структуры и функции клетки. Под ред. А.А. Баева, Я.В. Варшавского; Пер. с англ. М.: Мир, 1974. 957 с.
245. Лудевиг Р., Лос К. Острые отравления: Пер. с нем. М.: Медицина, 1983. 560 с.
246. Лужников Е.А. Клиническая токсикология. М.: Медицина, 1999. 416 с.
247. Литовская А. В., Оскерко У. Ф., Егорова И. В., Шальнова В. А. Разработка экспериментальной модели оценки иммунотоксичности малых концентраций ксенобиотиков // *Иммунология*. 1997. №4. С. 53-57.
248. Лоуренс Д.Р., Беннитт П.Н. Клиническая фармакология: В 2-х т. Пер. с англ. М.: Медицина, 1991. Т.2. 2-е изд., перераб и доп. - М.: Медицина, 2000. 434 с.
249. Лужников Е.А., Костомарова Л.Г. Острые отравления: Руководство для врачей. 2-е изд., перераб и доп. М.: Медицина. 2000. 434 с.
250. Лукьянова Л.Д., Михайлова Н.Н., Фоменко Д.В., Кизиченко Н.В., Душина Е.Н. Об особенностях нарушений энергетического обмена при травматическом шоке и возможности их фармакологической коррекции // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2001. Т.132, №9. С. 263-267.
251. 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.
252. Ляхович В.В., Цырлов И.Б. Индукция ферментов метаболизма ксенобиотиков. Новосибирск, 1981. 240 с.
253. Мальцева Г.М. Именения физиологических механизмов регуляции системы иммунитета при остром отравлении атропиноподобными препаратами (м-холиноблокаторами): Автореф. дисс. канд. мед. наук. Саратов, 2002. 24 с.
254. Маркова И.В., Афанасьева В.В., Цыбульский Э.К., Неженцев М.В. Клиническая токсикология детей и подростков. СПб, Интермедика, 1998. 304 с.
255. Матлина Э.Ш. Флюорометрический метод определения катехоламинов в тканях организма // *Методы исследования гормонов и медиаторов в клинике и эксперименте*. М.: Медицина. 1965. С. 84-87.
256. Машковский М. Д. Лекарственные средства. 16-е изд., перераб., испр. и доп. М.: Медицина, 2010. 1216 с.
257. Маянский А. Н., Маянский Д. Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге.- Новосибирск: Наука. 1983. 254 с.
258. Маянский Д. Н. Система фагоцитов: методологические проблемы // *Пат. физиол. и эксперим. терапия*. 1986. Вып. 2. С. 83-86.
259. Медведев В.Н. Взаимодействие физиологических и психологических механизмов в условиях адаптации // *Физиол. человека*. 1998. Т.24, №4. С. 7-13.
260. Медведь Л.И., Каган Ю.С., Спыну Е.И. Пестициды и проблемы здравоохранения. – *Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва. им. Д.И. Менделеева)*. 1968. №3. С. 263-271.
261. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. М.: Медицина. 1984. 272 с.
262. Медуницин Н.В. Регуляция вакцинального иммунитета // *Аллергология и иммунология*. 2005. Т.6, № 2. С. 137-139.

263. Михайлова А.А., Захарова Л.А., Кирилина Е.А., Сарыбаева Д.В. Механизмы снижения иммунного ответа при стрессе и его коррекция миелопидом // Стресс и иммунитет: Тез. докл. Всес. конф. «Стресс и иммунитет (психонейроиммунология). Ростов н/Д, 1989. С.31-32.
264. Михайлова А.А. Миелопиды и иммунореабилитация // Inter. J. Immunorehabilitation. 1997. № 5. С. 5.
265. Михайлова М.Н., Меркулова Г.Ю., Стручко Л.М. Использование имунофана для коррекции изменений гематологических показателей, вызванных циклофосфаном // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. 2003. Т.5. №2. С. 230.
266. Михальчик Е.В., Иванова А.В., Ануров М.В., Титкова С.М., Пеньков Л.Ю., Коркина Л.Г. Профилактическое и лечебное действие комплексного антиоксидантного препарата при ожогой травме у крыс // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2004. Т.138, №9. С. 299-301.
267. Михеева А.Н. Кардос В.С., Клионский А.Г. и др. О нормах ферментативной активности лейкоцитов //Лаб. дело. 1970. № 1. С. 5-7.
268. Могуш Г. Острые отравления /Пер. с рум. Бухарест, Медицинское издательство, 1984. 579 с.
269. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Новый класс биологических регуляторов многоклеточных систем - цитомедины // Успехи совр. биологии. 1983. Т. 96, №3. С. 1004-1007.
270. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Характеристика и изучение механизма действия фактора тимуса (тимарина) // Докл. АН СССР. 1978. Т.240, № 4. С. 339-346.
271. Москалева Е.Ю., Федоров Н.А., Кизенко О.А., Караулов А.В. Повреждения ДНК лимфоцитов и иммунодефицитные состояния // Вестн. РАМН. 1993. № 4. С. 12 - 17.
272. Мурадян Р. И., Пангенов Н. Р., Голосова Т. В., Аникина Т. П. Значение иммунотерапии в комплексном лечении ожоговой болезни // Гематология и переливание крови. 1984, № 7. С. 3 - 8.
273. Мутускина Е.А., Багдасаров Л.А., Трубина И.Е., Заржецкий Ю.В. Некоторые показатели стресс-реакции организма на разных этапах постреанимационного периода // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т.133, №1. С. 38-41.
274. Мухамбетов Д.Д., Шайдаров М.З., Абрахманова Х.М. Коррекция иммуномодуляторами постреанимационной иммуносупрессии // Терминальные состояния и постреанимационная патология в эксперименте и клинике. Алма-Ата. 1990. С. 38-39.
275. Невидимова Т.И. Психотропные эффекты тимогена // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1995. Т.119, №2. С. 199-200.
276. Молотков А.О. Нарушения физиологических механизмов регуляции системы иммунитета при остром отравлении фосфорорганическим соединением карбофосом: Автореф. Дисс. ... канд. мед. наук.- М., 2002. 24 с.
277. Невидимова Т.И., Н.И. Суслов. Психотропные эффекты тимогена // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1995. Т.119, №2. С. 199-200.
278. Нестерова И.В. Стратегия и тактика иммунотерапии вторичных иммунодефицитных состояний с инфекционным синдромом // Аллергология и иммунология. 2005. Т.6, № 2. С. 139-140.
279. Нечаев В.И., Крылов В.В., Хованов А.В. Иммуномодуляторы при лечении больных туберкулезом по стратегии DOTS // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. 2003. Т. 5, №2. С. 204.
280. Николаев А. И., Тулякова С. Р., Султанкулов А., Рихсиева С. И. Изменение клеточных и гуморальных факторов иммунитета у морских свинок под влиянием нового гербицида тоулина //Докл. АН УзССР. 1988.№ 12. С. 54-55.

281. Николаев А.И. Пономарева Л.А. Гиллер И.С. и др. Иммунодепрессивное действие некоторых ядохимикатов //Фармакол. и токсикол. 1972. Т. 35, № 3. С. 352-355.
282. Николаев А.И. Пономарева Л.А. Гиллер И.С. и др. Иммунодепрессивное действие некоторых ядохимикатов //Фармакол. и токсикол. 1972. Т. 35, № 3. С. 352-355.
283. Новикова Л.В., Лебедева К.М., Яковлева Э.М. и др. Иммунологические методы исследования. Саранск, 1981. 92 с.
284. Осипов С.Г., Титов В.Н. Биологические функции системы комплемента //Иммунология.1984. № 6. С. 82-83.
285. 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.
286. Павлов А.В., Борисенко Н.Ф., Гуменный В.С. К проблеме влияния пестицидов на здоровье (обзор) // Гигиена и санитария. 1991. №4. С. 60.
287. Переверзев А.Е. Кроветворные колониеобразующие клетки и физические стресс-факторы. Л.: Наука, Ленинградское отделение, 1986. 172 с.
288. Перелыгин В.М. Шнирт М.Б., Арипов О.А. Действие некоторых пестицидов на иммунологическую реактивность // Гигиена и санитария. 1971. № 12. С. 29-33.
289. Петров А.П., Софронов Г.А., Нечипоренко С.П., Сомин И.Н. Антитоксические фосфорорганических отравляющих веществ // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. Хим. об-ва им Д.И. Менделеева). - 2004. – Т. XLVIII, № 2. –С.110-116.
290. Петров Р. В. Иммунология. М.; Медицина 1987. 416 с.
291. Петров Р.В. Синтетические иммуномодуляторы. М.: 1991. 199 с.
292. Петров Р.В., Кузнецова С.Ф., Ярилин Ф.Ф. Влияние миелопида на костномозговые предшественники Т-лимфоцитов // Докл. АН СССР. - Т. 305, № 3. С. 764-707.
293. Петров Р.В., Михайлова А.А., Фомина Л.А. Миелопептиды и иммунный статус // Аллергология и иммунология. 2005. Т.6, № 2. С. 204.
294. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Миграция стволовых клеток из экранированного костного мозга у неравномерно облученных мышей //Радиология. 1972. №1. С. 69-76.
295. Петров Р. В., Хаитов Р. М. Иммунологические механизмы клеточного гомеостаза // Гомеостаз. М.: Медицина, 1981. С. 312-365.
296. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Манько В. М., Михайлова А. А. Контроль и регуляция иммунного ответа. М.: Медицина, 1981. 312 с.
297. Петров Р. В., Хаитов Р. М., Сеславина Л.С. Подавление эндоколонизации селезенки у сублетально облученных мышей при трансплантации аллогенных лимфоидных клеток // Радиология. 1970. № 4. С. 532-535.
298. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор полиоксидоний: механизмы действия и аспекты клинического применения // Цитокины и воспаление. 2004. Т. 3, № 3. С. 41-47.
299. Пирцхалава А.В. Гетерогенная реакция острого отравления организма хлорофосом //Сообщ. АК ГССР. 1989. Т. 133, № 2. С. 421-424.
300. 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, № 4. С. 1017-1019.
301. Плещитый К.Д., Сухих Г.Г. Экспериментальный анализ иммуностимулирующих свойств витамина А. // Бюл. экспер. биол. и медицины. 1985. Т.100, №11. С. 600-602.
302. Плужников Н.Н., Бакулина Л.С., Легоза В.И. и др. Некоторые аспекты антирадикальной защиты мембран // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины / Под общей ред. Н.Н. Плужникова (Научн. тр./ НИИЦ (МБЗ) ГосНИИИ военной медицины, Т.4). СПб., 2003а. С. 123-139.

303. Плужников Н.Н., Гайдар Б.В., Чепур С.В. и др. Редокс-регуляция: фундаментальные и прикладные проблемы // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины / Под общей ред. Н.Н. Плужникова (Научн. тр./ НИИЦ (МБЗ) ГосНИИИ военной медицины, Т.4). СПб., 2003б. С. 139-173.
304. Плужников Н.Н., Легеза В.И., Галеев И.Ш. и др. Комплексное использование антиоксидантов с различными механизмами действия – перспективное направление повышения эффективности терапии радиационных поражений // Актуальные проблемы и перспективы развития военной медицины / Под общей ред. Н.Н. Плужникова (Научн. тр./ НИИЦ (МБЗ) ГосНИИИ военной медицины, Т.4). СПб., 2003в. С. 173-189.
305. Подосинников И.С., Гурина О.П., Бабаченко И.В. Влияние миелопида на функциональную активность лейкоцитов периферической крови // Пат. физиол. и эксперим. терапия. 1991. №4. С. 9-12.
306. Покровский В.И., Лебедев В.В., Шелепова Т.М. и др. Имунофан – пептидный препарат нового поколения в лечении инфекционных и онкологических заболеваний: свойства, область применения // Практикующий врач. 1997. № 12. С.14-15.
307. Попова Е.А., Лисун И.И., Алимов А.Д. и др. Иммунофармакотерапия имунофаном в лечении больных с гнойными менингитами // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. 2003. Т. 5, №2. С. 252.
308. Попов В.А., Шальнова Г.А., Кузьмина Т.Д., Уланова А.М. Иммуноморфологические эффекты при воздействии бериллия и его соединений (Экспериментальное исследование) //Сб. научн. тр. НИИ гигиены труда и проф. заболевл. АМН СССР, 1987. № 31. С. 184-188.
309. Присяжнюк Т.Н., Петровская О.Г., Кузьменко Н.М. Особенности воздействия хлорофоса на организм теплокровных //Гигиена и санитария. 1986. № 6. С. 65-67.
310. Прозоровский В.Б., Саватеев Н.В. Неантихолинэстеразные механизмы действия антихолинэстеразных средств. Л.: Медицина, 1976. 160 с.
311. Резников К.М., Винокурова О.В. Антиаритмические свойства тимогена // Эксперим. и клин. фармакология. 1994. Т.57, № 6. С. 31-33.
312. Рембовский В.Р., Горшенин А.В., Белобровкин Е.А. Анализ иммуотропного действия кожно-нарывных отравляющих веществ // Доклады Академии военных наук. Серия Прикладные проблемы уничтожения запасов химического оружия и военной экологии. Поволжское отделение. Саратов, «Слово». 2000. С.137-143.
313. Ройт А. Основы иммунологии / Пер. с англ. М.: Мир, 1991. 327 с.
314. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология / Пер. с англ. - М.: Мир, 2000. 582 с.
315. Романенко О.И., Гребенюк А.Н Лейкоцитарная защита при острых отравлениях // Морской мед. журн. 1997. Т.4, №4. С. 8-11.
316. Романцов М.Г., Ершов Ф.И., Горячева Л.Г. Фармакотерапевтическая эффективность циклоферона при патологических состояниях у детей // Вест. Санкт-Петербургской ГМА им. И.И. Мечникова. – 2008.- №3 (28). С.69-77.
317. Ремезов А. И., Башмаков Г. А. Методы определения естественной (неспецифической) резистентности организма. Л.: ВМедА, 1976. 65 с.
318. Ротенберг Ю.С. Токсиколого-гигиенические аспекты биоэнергетики // Всесоюзн. учред. конф. по токсикологии. Тез. докл. М., 1980. С.108.
319. Ротенберг Ю.С. Классификация ксенобиотиков по локализации их действия на ферментные системы митохондрий // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1982. №9. С. 42-45.
320. Руднева Т.Б. Осипова Е.Ю., Михайлова А.А., Манько В.М. Коррекция миелопидами дифференцировки кроветворных клеток предшественников у мышей с экспериментальным Т-иммунодефицитом // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1989. Т.107, №6. С.718-720.

321. Румянцев А.П., Тиунова Л.В., Остроумова И.А. Метаболизм соединений жирного ряда // Итоги науки и техники: Серия токсикология. М., ВИНТИ, 1981. Т. 12. С. 65-116.
322. Рыбников В.Н., Бровкина И.Л., Утешев Б.С. Влияние лизоцима на функционально-метаболическую активность полиморфно-ядерных лейкоцитов в условиях острой кровопотери // Эксперимент. и клин. фармакол. 2004. Т.67, №2. С. 45-48.
323. Рыболовлев Ю.Р. Прогнозирование действия ксенобиотиков на человека // Фармакол. и токсикол. 1982. №1. С. 110-114.
324. Саватеев Н.В. Военная токсикология, радиология и медицинская защита. Л.: ВмедА, 1978. 333 с.
325. Саватеев Н.В., Куценко С.А. Характеристика токсического действия веществ, представляющих опасность при разрушении промышленных объектов.-Л.: ВмедА им. С.М. Кирова, 1982. 44 с.
326. Саватеев Н.В., Куценко С.А. Ядовитые вещества, выделяющиеся при разрушении промышленных объектов, и мероприятия по оказанию медицинской помощи пострадавшим // Воен.-мед. журн. 1993. №6. С. 36-40.
327. Сакаева Д.Д., Лазарева Д.Н. Влияние гентамицина на иммунитет при иммунодефиците и действие иммуномодуляторов/ // Эксперим. и клин. фармакол. 1998. Т.61, №3. С. 50-53.
328. Саноцкий И. В. Пути разработки ускоренных методов установления предельно допустимых концентраций в воздухе рабочей зоны // Гигиена труда. 1969. № 7. С. 4-7.
329. Саприн А.Н., Караулов А.В., Хроменков Ю.И., Пирузян Л.А. О взаимосвязи активности цитохрома Р-450 в лимфоцитах с их иммунной функцией // Докл. АН СССР. 1982. Т. 267, № 5. С. 1276-1280.
330. Селье Г. На уровне целостного организма. Пер. с англ. М., 1972.
331. 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.
332. Семина О.В., Семенец В.И., Дейгин В.И. Стимуляция тимогеном (GW-дипептидом) восстановления кроветворения у облученных и подвегнутых действию цитостатика мышей // Иммунология. 1997. №1. С.33-35.
333. Сепетлиев Д. Н. Статистические методы в научных медицинских исследованиях. М.: Медицина, 1975. 296 с.
334. Сибиряк С.В., Алехин Е.К., Хайбуллина С.Ф., Рябчинская Л.А. Влияние некоторых стимуляторов иммунитета на антиинфекционную резистентность и активность монооксигеназной системы печени // Фармакол. и токсикол. 1990. Т. 53, № 2. С. 55-57.
335. Сидорин Г.И., Луковникова Л.В., Фролова А.Д. Адаптация как основа защиты организма от вредного действия химических веществ // Рос. хим. ж. (Ж. Хим. об-ва им. Д.И. Менделеева). 2004. Т. XLVIII, № 2. С. 44-50.
336. Сильвестров В.П., Эйнер Э.А. Влияние анаболического стероида анадура на гуморальный иммунитет и «острофазовые» белки при острой пневмонии // Фармакол. и токсикол. 1983. № 2. С. 100- 103.
337. Сиренко Е. В. Условия труда и иммунный гомеостаз у больных пылевыми заболеваниями бронхов и легких электросварщиков машиностроительного производства // Дис... канд. мед. наук: 14.02.01 / Харьковская медицинская академия последипломного образования. Харьков, 2000. 146 с.
338. Смирнов В.С., Петленко С.В., Сосюкин А.Е. Иммунотоксические эффекты химических ксенобиотиков // Иммунодефицитные состояния / ред. В.С. Смирнов и И.С.Фрейдлин. СПб: «Фолиант», 2000. С. 337-367.
339. Сосюкин А.Е., Софронов, Гребенюк А.Н. Влияние ксенобиотиков на состояние нейтрофилов // Морской мед. журн. 1997. Т.4, №8. С. 26-31.

340. Старченко А.А., Красковская С.В. Система индивидуальной психо- и иммунотерапии в нейроанестезиологической практике// Анестезиол. и реаниматол. 1996. №3. С.53-57.
341. Стасий Е.Д., Балаболин И.И., Ботвиньева, Степаненко Р.Н. Иммуномодулирующая терапия при пищевой инфекции у детей // Иммунология. 1990. №5. С. 45-48.
342. Степаненко Р.Н., Рязанов Н.К., Молдокулов О.А., Власенко Р.Я. Миелопид: иммунокоррегирующая активность при переломах лицевых костей и травматическом остеомиелите // Иммунология. 1991. № 1. С. 44-47.
343. Стеценко О.Н., Линдер Д.П., Поберий И.А. и др. Влияние Т-активина на периферические органы иммунитета животных и тимэктомированных мышей // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1984. Т. 97, № 3. С. 321-323.
344. Страйер Л. Биохимия : Пер. с нем. М.: Мир, 1985. Т 2. С. 71 - 82.
345. Стрельникова Л. А., Раткина В. Г. Влияние атмосферных загрязнений на активность лизоцима слюны и бактерицидность кожи у детей //Тр. Томск. мед. ин-т. 1983, Т. 31. С. 240-243.
346. Стручков В. И., Прозоровская К. Н., Недвецкая Л. М. Иммунология в профилактике и лечении гнойных хирургических заболеваний. М.: Медицина, 1978. 269 с.
347. Судаков К.В. Основы физиологии функциональных систем. М.: Медицина, 1983. 272 с.
348. Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др. Соотношение Th1- и Th2-лимфоцитов в периферической крови и уровни провоспалительных цитокинов в лохиях родильниц с эндометритом // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2005. Т. 140, № 12. С. 622-624.
349. Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др. Соотношение Th1- и Th2-лимфоцитов в периферической крови и уровни провоспалительных цитокинов в лохиях родильниц с эндометритом // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2005. Т. 140, № 12. С. 622-624.
350. Сухих Г.Т., Малайцев В.В. Богданова И.М. Интерлейкин-2 и его возможная роль в патогенезе стрессорных изменений иммунной системы //Докл. АМ СССР, 1984. Т. 278, № 3. С. 762-765.
351. 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.
352. Тихонов В. Н. К оценке изменений массы внутренних органов животных в токсикологических исследованиях //Гигиена и санит. 1981. №7. С. 58-59.
353. Тодрия Т.В., Цандер А. Теломеразная активность в клетках 9-суточных селезеночных колоний, образованных костным мозгом нормальных и тимэктомированных мышей // Бюл. эксперим. биологии и мед. 2004. Т. 138, № 11. С. 567-569.
354. Турсунов Б.С., Махмудов К.Д., Туйчиев Д.А. Целесообразность применения миелопида (В-активина) в комплексном лечении ожоговой болезни // Иммунология. 1992. № 6. С. 42-43.
355. Урбах В. Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. М.: Медицина, 1975. 295 с.
356. Утешев Б. С. О некоторых методологических вопросах скрининга иммуотропных средств // Фармак. и токсикол. 1984. №3. С. 5-13.
357. 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.
358. Федоров С.М., Мазина Н.М., Бухова В.П. Иммунологические показатели у больных профессиональными дерматозами, вызванными фосфорорганическими пестицидами // Вестн. дерматол. и венерол. 1988. № 8. С. 46-48.

359. Феерман И.С., Бонгард Э.М., Лашенко Н.С. К вопросу о хронической интоксикации хлорофосом // Гиг. труда. 1964. № 11. С. 36-38.
360. Филатова Г.Ф., Кузнецова Г.А., Бобков Ю.Г. Изменение содержания катехоламинов в тканях крыс после холодового воздействия // Пат. физиол. и эксперим. терапия. 1987. №4. С. 48-50.
361. Фрейдлин И. С. Система мононуклеарных фагоцитов. М.: Медицина, 1984. 271 с.
362. Фридман Г.И. Влияние севина, хлорофоса и ДДТ на некоторые специфические иммунологические показатели иммунобиологической и общей реактивности организма (к проблеме токсических воздействий малой интенсивности) // Вопросы гигиены и токсикологии пестицидов. М.: Медицина, 1970. С. 139-145.
363. Фридман Г.И. Влияние севина, хлорофоса и ДДТ на некоторые специфические иммунологические показатели иммунобиологической и общей реактивности организма (к проблеме токсических воздействий малой интенсивности) // Вопросы гигиены и токсикологии пестицидов. М.: Медицина, 1970. С. 139-145.
364. Фримель Х., Брок Й. Основы иммунологии / Пер. с нем. - 5-е изд. - М.: Мир, 1986. 254 с.
365. Фролов Б. А., Афолина С. Н., Меерсон Ф. З. Роль соотношения цАМФ/гЦМФ в постстрессорной активации первичного иммунного ответа // Пат. физиол. и эксперим. терапия. 1985. №5. С. 23-26.
366. Хабибуллаев Б.Б. Коррекция вторичных иммунодефицитов с помощью металлсодержащих соединений хитозана // Аллергология и иммунология. 2005. Т.6, № 2. С. 207.
367. Хабибуллаев Б.Б. Коррекция вторичных иммунодефицитов с помощью металлсодержащих соединений хитозана // Аллергология и иммунология. 2005. Т.6, № 2. С. 207.
368. 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.
369. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Иммуномодулирующее действие фактора тимуса в патологии // Иммунология. 1981. № 5. С. 28-31.
370. Хавинсон В.Х., Морозов В.Г. Экспериментальное клиническое изучение нового иммуномодулирующего препарата – тималина // Воен.-мед. журн. 1982. № 5. С. 37-39.
371. Хайтов Р.М., Рябова Л.В. Зависимость дифференцировки стволовых кроветворных клеток от функционального состояния тимуса // Онтогенез. 1978. № 4. С. 496-410.
372. Ханафиева И.В., Добржанская Р.С., Хусейнова Х.Х. Воздействие и активина и тималина на лейшманиозную инфекцию в эксперименте // Докл. 5 Всес. съезда протозоологов, Витебск, сент., 1992 // Цитология. 1992. Т. 34, № 4. С. 158.
373. Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. - М.: Медицина, 1983. 319 с.
374. Хлопушина Т.Г., Кринская А.В. Влияние адамантиламидов 1,3-дифенилпиразол-4-карбоновых кислот на систему цитохрома Р-450 печени // Фармакол. и токсикол. 1991. № 4. С. 39-41.
375. Хайтов Р.М. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. 320 с.
376. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Современные подходы к оценке основных этапов фагоцитарного процесса // Иммунология. 1995. №4. С. 3-8.
377. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В. Современные представления о механизме действия полиоксидония // Иммунология. 2005. Т. 26. № 4. С. 197.
378. Хайтов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: Изд-во ВНИРО, 1995. 219 с.
379. Хайтов Р. М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. М.: Медицина, 2000. 430 с.

380. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2002. 536 с.
381. Ханафиева И.В., Добржанская Р.С., Хусейнова Х.Х. Воздействие тактивина и тималина на лейшманиозную инфекцию в эксперименте // Докл. 5 Всес. Съезда протозоологов, Витебск, сент., 1992 // Цитология. 1992. Т. 34, № 4. С. 158.
382. Хейхоу Ф. Г. Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983. 319 с.
383. Ховиева Л.А., Штенберг А.И. Иммунологическое состояние организма при воздействии малых доз хлорофоса и метилнитрофоса // Гиг. и санитария. 1976. № 1. С. 98-100.
384. Хусинов А.А., Хайдарова Д.С., Гушин Г.В., Лесникова М.П. Нейроэндокринная система и специфические факторы иммунитета при отравлении пестицидами // Бюл. эксперим. биологии и мед. 1991. Т. 111, № 12. С. 623-624.
385. 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., № 4278-В90.
386. Чекнёв С.Б., Бабаева Е.Е. Активность лимфоцитов человека в присутствии соединений, содержащих углеводные компоненты // Бюл. эксперим. биологии и мед. 2004. Т. 138, № 11. С. 555-558.
387. Черноусов А.Д., Юрин Б.Л. Выделение Т-супрессоров, афинных к антигену и их взаимодействие с эффекторами гиперчувствительности замедленного типа в различных экспериментальных условиях // Иммунология. 1982. №1. С. 13-16.
388. Чертков И.Л., Дерюга Е.И., Дризе Н.И. Прimitивная стволовая кроветворная клетка // Вест. АМН СССР. 1990. №9. С.35-37.
389. Чугунихина Н.В., Хасанова М.И. Влияние пестицидов на неспецифическую сопротивляемость организма инфекции // Гиг. и санитария. 1994. №1. С. 19-21.
390. Шафеев М.Ш. Влияние хлорофоса на некоторые показатели иммунологической реактивности организма // Изучение экстремальных состояний. Казань, 1976. С. 60-63.
391. Шафеев М. Ш. Влияние некоторых пестицидов и их комбинаций на показатели иммунитета и неспецифической реактивности организма: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.- Казань, 1978. 26 с.
392. Шведов В. Л., Анисимова Г. Г. Изменение некоторых показателей клеточного иммунитета у крыс при хроническом радиационно-химическом поражении // Гигиена и сан. 1989. № 7. С. 16-19.
393. Шилов Ю.И., Ланин Д.В. Влияние гидрокортизона на функции фагоцитирующих клеток брюшной полости крыс в условиях блокады β -адренорецепторов // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т.131, №10. С. 439-442.
394. Ширинский В.С., Жук Е.А. Проблемы иммуностимулирующей терапии // Иммунология. 1991. № 3. С. 7-10.
395. Ширинский В.С., Жук Е.А. Проблемы фармакодинамики и фармакокинетики иммуностимулирующих препаратов // Иммунология.-1994. № 6. С. 27-29.
396. 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.
397. Шляхов Э. Н., Гылка В.В. Тактивин – иммуномодулирующий препарат тимуса // Здравоохранение (Кишинев). 1989. С. 20-23.
398. Штенберг А.И., Джунусова Р.М. Угнетение иммунологической реактивности организма животных под влиянием некоторых ФО пестицидов // Бюл. эксперим. биол. 1968. № 3. С. 86-88.
399. Шубик В.М. Проблемы экологической иммунологии. Л., Медицина. 1976. – 240 с.

400. Шуршалина А.В., Верясов В.Н., Сухих Г.Т. Соотношение уровней цитокинов при генитальном герпесе в различные фазы инфекционного процесса // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2001. Т.132, №7. С. 59-61.
401. Щеглова М.Ю., Макарова Г.А. Клиническая эффективность применения иммунофана у больных бронхиальной астмой // Inter. J. Immunorehabilitation. Физиология и патология иммунной системы. 2003. Т. 5, №2. С. 222.
402. Юрина Н. А., Тамахина А. Д. Действие кортикостероидов на аргофильные премедуллярные клетки тимуса // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1996. №10. С. 461-464.
403. Юшков В.В., Хавинсон В.Х. Выявление и анализ противовоспалительной активности иммуномодуляторов//Патол. физиол. и эксперим. терапия.1993.№ 2. С. 11-13.
404. Ягмуров О. Д., Огурцов О. П. Функциональная активность лимфоцитов селезенки и периферической крови при стрессорной иммунодепрессии // Бюл. эксперим. биол. и мед. 1996.Т 122. №7. С. 64-68.
405. Яковлев Г.М., Новиков В.С., Хавинсон В.Х. // Резистентность, стресс, регуляция. Л., Наука, 1990. 237 с.
406. 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.
407. Яковлев Г.М., Новиков В.С., Хавинсон В.Х.//Резистентность, стресс, регуляция. Л., Наука, 1990. 237 с.
408. Яновский О.Г., Захарова Л.А. Влияние миелопида на антителообразование в индуктивную фазу иммуногенеза // Иммунология. 1990. № 1. С. 70.
409. Abbas A.K., Murphy K.M., Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes // Nature. 1996. Vol. 383. P. 787-793.
410. Amitai G., Adani R., Fishbein E. et al. Bifunctional compounds eliciting anti-inflammatory and anti-cholinesterase activity as potential treatment of nerve and blister chemical agents poisoning // J.Appl.Toxicol. 2006 Vol. 26. № 1. P.81-87.
411. Aker W.G., Hu X., Wang P., Hwang H.M.. Comparing the relative toxicity of malathion and malaoxon in blue catfish *Ictalurus furcatus*. Environ. Toxicol. 2008. - Vol. 23, N 4 P. 548-554
412. Anderson J. The inflammatory reflex—introduction // J.Intern. Med.- 2005.- Vol. 257, №2.-P. 122-125.
413. Arroyo C.M., Burman D.L., Kahler D.L. et al. TNF-alpha expression patterns as potential molecular biomarker for human skin cells exposed to vesicant chemical warfare agents: sulfur mustard (HD) and Lewisite (L) // Cell Biol. Toxicol. 2004. Vol.20, № 6. P. 345-359.
414. Asquith B., Zhang Y., Mosley A.J., de Lara C.M. In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.2007. Vol. 104, № 19. P. 8035-8040.
415. Audre F., Gillon., Lafout S., Yourdan G. Pesticide-containing diets augments in anti-sheep red blood cell non reaginic antibody responses in mice but viay prolong murine infection with *Giardia muris* //Environ. Res.-1983. Vol. 32, № 1.P. 145-150.
416. Balali-Moode M., Hefazi M. Mahmoudi M. et at. Long-term complications of sulphur mustard poisoning in severely intoxicated Iranian veterans // Fundam. Clin. Pharmacol. 2005 Vol. 19. № 6. P. 713-721.
417. Becker K.L., Nyle E.S., White J.C. et al. // J. Clin. Endocrinol. Metab.. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. 2004. Vol. 89, N 4. P. 1512-1525.
418. Becker E.Z., Austen K.F. Mechanisms of immunologic injury of rat peritoneal mast cells. I. The effect of phosponate inhibitors on the homocytotropic component of rat complement. // J. Exp. Med. 1966. Vol. 124, № 3. P. 379-395.

419. Becker E.Z., Ward P.A. Partia 1. Biochemical characterization of the activated esterase required in the complement-dependent chemotaxis of rabbit polymorphonuclear leucocytes //J.Exp.Med.-1967.-Vol.125, N 6.-P. 1021-1030.
420. Becker E.Z., Unanue E.R. The requirement for esterase activation in the anti-immunoglobulin-triggered movement of B lymphocytes //J.Immunol.1976.Vol. 117, N 1. P. 27-32.
421. Berbée M, Hauer-Jensen M. Novel drugs to ameliorate gastrointestinal normal tissue radiation toxicity in clinical practice: what is emerging from the laboratory? Curr Opin Support Palliat Care. 2012. Vol.6. P. 54–59.
422. Bide R.W., Armour S.J., Yee E. GB toxicity reassessed using newer techniques for estimation of human toxicity from animal inhalation toxicity data: new method for estimating acute human toxicity (GB) // J. Appl Toxicol. 2005a. Vol.25, №5. P. 393-409.
423. Bide R.W, Schofield L, Risk DJ. Immediate post-dosing paralysis following severe soman and VX toxicosis in guinea pigs // J. Appl Toxicol. 2005b. Vol. 25, №5. P. 410-417.
424. Boers D. Amelsvoort L. van, Colosio C. Asthmatic symptoms after exposure to ethylenebisdithiocarbamates and other pesticides in the Europit field studies. // Hum. Exp. Toxicol. 2008. Vol. 27, № 9. P. 721-725.
425. Boix E., Nogues M.V. Mammalian antimicrobial proteins and peptides: overview on the RNase A superfamily members involved in innate host defence // Mol. Biosyst. 2007. Vol. 3, № 5. P. 317-335.
426. Bondar N.F., Golubeva M. B., Isaenya L.P. Konoplya N.F. Synthesis, immunomodulating activity and (1)H NMR studies of 7-oxo-9,11-ethano-13-azaprostanooids // Eur. J. Med. Chem. 2004. Vol. 39, № 5. P. 389-396.
427. Bonner M.R., Coble J., Blair A. et al. Malathion exposure and the incidence of cancer in the agricultural health study // Am. J. Epidemiol. 2007. Vol. 166, N 9. P. 1023-1034
428. Borovikova L.V., Ivanova S., Zhang M., Yang H., Botchkina G.I., Watkins L.R. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. Nature. 2000. Vol. 405, N 6785. P. 458- 462.
429. Brzezinski J. // The effect of poisoning with phosphorus organic insecticides on the catecholamine level in rat plasma, brain and adrenals // Diss. pharm.et pharmacol. PAN. 1972. Vol. 24, N 2. P. 217-220.
430. Casale G.P., Cohen S.D., DiCapva. R.A. The effects of organophosphate-induced cholinergic stimulation on the antibody response to sheep erythrocytes in inbred mice // Toxicol. and Appl. Pharmacol. 1983. Vol. 68, N 2. P. 198-205.
431. Casale G.P., Cohen S.D., DiCapva R.A. Parathion of humoral immunity in inbred mice //Toxicol. Lett. 1984. Vol. 23, № 2.P. 239-247.
432. Chen G. J., Huang D. S., Watzl B. Changes in T lymphocyte subsets and plasma Th1/Th2 cytokine levels in patients with occupational chronic lead poisoning / // Life Sci. – 2007. - Vol. 52, № 3.- P. 1319–1326.
433. Chilukuri N., Duysen E.G., Parikh K. et al. Adenovirus-transduced human butyrylcholinesterase in mouse blood functions as a bioscavenger of chemical warfare nerve agents // Mol. Pharmacol. 2009. Vol. 76, N 3. P. 612-617.
434. Claman H.N. Corticosteroids as immunomodulators // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. 1993. Vol. 685. P. 288-292.
435. Coffey R. G., Hadden J. W. // Neurotransmitters, hormones and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation Red. Proc.1985. Vol. 44, N 1.P. 112-117.
436. Collombet J.M., Béracochéa D., Liscia P. et al. Long-term effects of cytokine treatment on cognitive behavioral recovery and neuronal regeneration in soman-poisoned mice // Behav. Brain. Res. 2011. Vol. 221, № 1. P.261-270.
437. Corsini E., Kimber I. Factors governing susceptibility to chemical allergy // Toxicol. Lett. 2007. Vol.168, №3. P.255-299.

438. Delves P.J., Roitt I.M. The immune system (Part 1) // N. Engl. J. Med. 2000. Vol. 343, № 2. P. 37-49.
439. Descotes J. Immunotoxicology of drugs and chemicals. Amsterdam- N. Y- Oxford: Elsvier, 1986. 400 p.
440. Descotes J. Immunotoxicology of drugs and chemicals. Amsterdam - New York - Oxford: Elsvier, 2004. 397 p.
441. Desi I., Varga L. Immuntokologische Untersuchungen der Pestizide von hygienischen Standpunkt //Zbl. Pharm. Pharmakotherap. und Laboratoriumsdiagn. 1983.Vol. 122, № 2 (22 Jahrestag Yes. Pharmakol. und Toxicol. DDR, Neubrandenburg, 2-4, Sept., 1982), P. 154-155.
442. Desi I., Palotas M., Vetro G. et al. Biological monitoring and health surveillance of a group of greenhouse pesticide sprayers //Toxicol.Lett. 1986. Vol. 33, № 153. P. 91-105.
443. Devens B.H., Grayson H.M, Imamura T., Rodgers K.E. O,O,S-trimethyl phosphorothionate effects on immunocompetence //Pestic. Biochem. and Physiol. 1985.Vol. 24, № 2. P. 251-259.
444. Dhabhar F. S., Miller 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. № 4. P. 1638-1644.
445. Dressler D.W., Wortis H.H.. Use of antiglobulin serum to detect cells producing antibody with low hemolytic efficiency. Nature. 1965. Vol. 208. P. 859.
446. Dulis B.H., Gordon M.A., Wilson J.B. Identification of muscarinic binding sites in human neutrophils by direct binding //Molec. Pharmacol. 1979. Vol. 15, № 1.P. 28-34.
447. Dyakonova V.A., Dambaeva V.A., Dambaeva S.V., Khaitov R.M. Study of interaction between the polyoxidonium immunomodulator and the human immune system cells // Int. Immunopharmacol. 2004. Vol. 15, № 13. P. 1615-1623.
448. Ellman G.M., Countney K.D., Anders V. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity // Biochem. Pharm. -1961. Vol. 7, № 1. P. 88.
449. Ellmeier W., Sawada S., Littman D.R. The regulation of CD4 and CD8 coreceptor gene expression during T cell development // Ann. Rev. Immunol. 1999. Vol. 17, № 3. P. 523-554.
450. 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. № 4. P. 577-590.
451. Fernandez-Cabezudo M.J., Azimullah S., Nurulain S.M. et al. The organophosphate paraoxon has no demonstrable effect on the murine immune system following subchronic low dose exposure // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. 2008. Vol. 21, № 4. P.891-901.
452. Fernandez-Cabezudo M.J., Lorke D.E., Azimullah S. et al. Cholinergic stimulation of the immune system protects against lethal infection by Salmonella enterica serovar Typhimurium // Immunology. 2010. Vol. 130, №3. P.388-398.
453. Frasch S.C., Zemski-Berry K., Murphy R.C. Lysophospholipids of different classes mobilize neutrophil secretory vesicles and induce redundant signaling through G2A // J. Immunol. 2007. Vol. 178, № 10. P. 6540-6548.
454. Fleisher T.A., Oliveira J.B Functional and molecular evaluation of lymphocytes // J. Allergy Clin. Immunol. 2004. Vol. 114, № 4. P. 227-234.
455. French A. R., Yokoyama W. M. Natural killer cells and viral infection / / Curr. Opin. Immunol. 2003. Vol. 15. P. 45
456. Fukuyama T, Kosaka T, Hayashi K, Miyashita L, Tajima Y, Wada K, Nishino R, Ueda H and Harada T. Immunotoxicity in mice induced by short-term exposure to methoxychlor, parathion, or piperonyl butoxide. // J. Immunotoxicol. 2013. Vol. 10, N 2. P. 150-159.

457. Fukuyama T., Tajima Y., Ueda H., Hayashi K. et al. Prior exposure to immunosuppressive organophosphorus or organochlorine compounds aggravates the T(H)1- and T(H)2-type allergy caused by topical sensitization to 2,4-dinitrochlorobenzene and trimellitic anhydride // *J. Immunotoxicol.* 2011. Vol.8, №2. P. 170-82.
458. Galloway T., Handy R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides immunotoxicity / T. Galloway, R. Handy // *Ecotoxicology.* 2003. Vol. 12, № 1-4 . P. 345-363.
459. Gallowitsch-Puerta M., Pavlov V.A. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathway // *Life Sci.* 2007. Vol. 80, № 24-25. P. 2325-2329.
460. Garoroy M.R., Strom T.B., Kaliner M., Carpenter C.B. Antibody-dependent lymphocyte mediated cytotoxicity mechanism and modulation by cyclic nucleotides // *Cell. Immunol.* 1975.Vol. 20, № 2. P. 197-204.
461. Garrity D., Call M.E., Feng J., Wucherpfenning K. W. The activating NK/C2D receptors assembles in membrane with two signaling dimmers into hexameric structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. Vol. 102. P. 7641-764.
462. Georgiev V.St., Albright J.E. Immunomodulation drugs // *Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* – 1993- .Vol. 685. P. 284– 602
463. Giebeleh I.A., Leendertse M., Florquin S., van der Poll T. Stimulation of acetylcholine receptors impairs host defence during pneumococcal pneumonia // *Eur. Respir. J.* 2009. Vol. 33, N 2. P. 375-381.
464. Georgiev V.St., Albright J.E. Cytokines // *Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* 1993.Vol. 685. P.284-602.
465. Gilbert R.V., Hoffmann M.K. cAMF 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.
466. Glover M., Cheng B., Fan R., Pruett S. The role of stress mediators in modulation of cytokine production by ethanol // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009. Vol.239, №1. P. 98-105..
467. Grabczewska E., Lascowska-Bozek H., Maslinski M., Ryzewski J. Receptory muskarinowe na limfocytach ludzkich stymulowanych fitohemaglutynina // *Rreumatologia.* 1990. T. XXVIII, № 4. P. 171-179.
468. Grandmont M.J., Racine C., Roy A., Lemieux R. et al. Intravenous immunoglobulins induce the in vitro differentiation of human B lymphocytes and the secretion of IgG // *Blood.* 2003. Vol. 101. P. 3065-3073.
469. Hageman J.J., Bast A, Vermeulen N.P.E. Monitoring of oxidative free radical damage in vivo: analytical aspects // *Chem. Biol. Interact.* 1992. Vol. 82. P. 243-293.
470. Hansasuta P., Dong T., Thananchai H. et al. Recognition of HIA-A3 and HIAall by KIR3DL2 is peptide specific // *Eur. J. Immunol.* 2004. Vol. 34. P. 1673-1679.
471. Hauber H.P., Zabel P. Pathophysiology and pathogens of sepsis // *Internist. (Berl.).* 2009. Vol. 50. N 7. P. 779-80, 782-4, 786-7.
472. Hausmann S., Wucherpfennig K.W. Activation of autoreactive T cells by peptides from human pathogens // *Curr. Opin. Immunol.* 1997. Vol. 9, №4. P. 831-838.
473. Heideman M., Bentgson A. Immunological interference of high dose corticosteroids // *Acta chir. scand.* 1985. Vol.151, № 526. P. 48-55.
474. Henson P.M., Oades Z.G. Activation of platelets by platelet-activating factor (PAF) derived from IgE-sensitized basophils. II. The role of serine proteases, cyclic nucleotides, and contractile elements in PAF-induced secretion // *J. Exp. Med.* 1976. Vol. 143, № 4. P.953-968.
475. Hermanowicz A., Kossman S. Neutrophil function and infectious disease in workers occupationally exposed to phosphoorganic pesticides: role of mononuclear-derived chemotactic factor for neutrophils // *Clin. Immunol. and Immunopathol.* 1984. Vol. 33, № 1. P. 13-22.

476. Hoeger S., Fontana J., Jarczyk J., Selhorst J., Waldherr R., Krämer B.K., et al. Vagal stimulation in brain dead donor rats decreases chronic allograft nephropathy in recipients // *Nephrol . Dial. Transplant.* 2014. Vol. 29. N 3. P. 544-9.
477. Hokland M., Jorgesen H., Holm M.S. Natural effector cells in patients with acute myeloid leukemia treated with the immunomodulator Linomide after autologous bone marrow transplantation. // *Eur. J. Haematol.* 1999. Vol. 63, № 4. P. 251-258.
478. Holan V., Zajicova A., Javorkova E. et al. Distinct cytokines balance the development of regulatory T cells and interleukin-10-producing regulatory B cells // *Immunology.* 2014. Vol. 141, N 4. P. 577-586.
479. Hulse E.J., Davies J.O, Simpson A.J. et al. Respiratory complications of organophosphorus nerve agent and insecticide poisoning. Implications for respiratory and critical care // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014. Vol. 190, N 12. P. 1342-1354.
480. Gunnell D, Eddleston M, Phillips MR, Konradsen F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: systematic review. *BMC Public Health.* 2007. Vol. 7. P. 357.
481. Iamele L, Kocchi R, Vernocchi A. Evaluation of an automated spectrophotometric assay for reactive oxygen metabolites in serum // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2002. Vol. 40. P. 673-676.
482. Ibuki Y., Goto R. Enhancement of NO production from resident peritoneal macrophages by in vitro gamma-irradiation and its relationship to reactive oxygen intermediates // *Free Radic. Biol. Med.* . 1997. Vol. 22, № 6. P. 1029-1035.
483. Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* -1995. Vol. 209. P. 104-111.
484. Janik G. Kopp W.C. Levamisole-induced neopterin synthesis // *Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* 1993. Vol. 685. P. 252-258.
485. Jerne N. K., Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells // *Science.* 1963. Vol. 140. № 4. P. 405.
486. Johnke R.M., Edwards J.M., Evans M.J. et al. Circulating cytokine levels in prostate cancer patients undergoing radiation therapy: influence of neoadjuvant total androgen suppression. *In Vivo.* 2009. Vol. 23, P. 827-33
487. Kessler W., Traeque T., Westerholt A. The vagal nerve as a link between the nervous and immune system in the instance of polymicrobial sepsis // *Langenbecks Arch. Surg.* 2006. Vol. 391, №2. P. 83-87.
488. 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.
489. King A.M., Aaron C.K. Emerg Organophosphate and carbamate poisoning // *Med. Clin. North Am.* 2015. Vol. 33, N 1. P. 133-151.
490. Kim H.S., Eom J.H., Cho H.Y. Evaluation of immunotoxicity induced by pirimiphos-methyl in male Balb/c mice following exposure to for 28 days // *J. Toxicol. Environ. Health.*- 2007.- Vol. 70, № 15-16.- P. 1278-1287.
491. Kim M.H., Kim M.O., Heo J.S. et al. Acetylcholine inhibits long-term hypoxia-induced apoptosis by suppressing the oxidative stress-mediated MAPKs activation as well as regulation of Bcl-2, c-IAPs, and caspase-3 in mouse embryonic stem cells. *Apoptosis.* 2008. Vol.13. P. 295–304.
492. Kimber I., Moore M. Mechanism and regulation of natural cytotoxicity. Minireview on cancer research // *Exp. Cell Biol.*-1985. Vol. 53, № 2. P. 69-84.
493. Kimber I. Chemical – Induced Hypersensitivity // *Experimental Immunotoxicology.* Boca Raton, New York, London, Tokyo. 1996. P. 391-417.
494. Knight J.A. Diseases related to oxygen-derived free radicals // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1995. Vol. 25. P.111-121.
495. Koller L.D., Exon J.H., Roan J.G. Immunological surveillance and toxicity in mice exposed to the organophosphate pesticide coptophos // *Envir. Res.* 1976. Vol. 12, № 12. P. 238.

496. Kossman S., Konieczny B., Panek E. Immunoelktroforogram oraz sterenie immunoglobulin G, A, M, W surowicy krwi procownikov zatrunionych przy produkcji pestycydow fosforoorganicznych //Med. pr. 1985. Vol. 36, № 1. P. 27-30.
497. Kote P., Ravindra V., Chauhan R.S. Use of avian lymphocytes to detect toxicity: effects of a commonly utilized deltamethrin preparation // J. Immunotoxicol. 2006. Vol. 3, № 2. P. 101-109.
498. Kuca K., Jun D., Musilek K. Structural requirements of acetylcholinesterase reactivators // Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. 2006. Vol. 6, N 3. P. 269-277.
499. Kullenkampff J., Janossy G., Greanes M.F. Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T-lymphocytes // Brit. J. Haemat. 1977. Vol. 36, № 2. P. 231-240.
500. Kutty K. M., Chandra R. K., Chandra S. Acethylcholinesterase in erythrocytes and lymphocytes: its contribution to cell membrane structure and function // Experientia. 1976. Vol. 32.№ 3. P. 289.
501. Lanier L. L. Natura1 kil1er cell receptor signaling // Curr. Opin. Immunol. 2003. Vol. 15. P. 308-314.
502. Laskin D. L., Sunil V.R., Gardner C.R. et al. Macrophages and Tissue Injury: Agents of Defense or Destruction? // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 2011. Vol. 51. P. 267-288.
503. Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M. Interleukin 12: still a promising candidate for tumor immunotherapy? // Cancer Immunol. Immunother. 2014. Vol. 63, N 5. P. 419-435.
504. Lee T.P., Moscati R., Park B.H. Effects of pesticides on human leukocyte functions //Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol. 1979.Vol. 23, № 1.P. 597-601.
505. Lee J. C., Lee K. M., Kim D.W., Heo D. S. Elevated TGF- β secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired of NK cytotoxicity in cancer patients // J. Immunol. 2004. Vol. 172. P. 7335-7340.
506. Lenz D.E., Maxwell D.M., Korlovich I. et al. Protection against soman or VX poisoning by human butyrylcholinesterase in guinea pigs and cynomolgus monkeys // Chem. Biol. Interact 2005. Vol. 157-158. P. 205-210.
507. Li C. G., Lam R. W., Gam L. T. Esterases in human leucocytes //J. Histochem. Cytochem. 1973. Vol. 21.№ 1. P. 1-12.
508. Li Q., Kawada T. The mechanism of organophosphorus pesticide-induced inhibition of cytolytic activity of killer cells // Cell. Mol. Immunol. 2006. Vol. 3, № 3. P. 171-178.
509. Li Q. New mechanism of organophosphorus pesticide-induced immunotoxicity // J. Nippon. Med. Sch. 2007. Vol. 74, № 2 . P. 92-105.
510. Liu J.J., Li D.L., Zhou J. et al. Acetylcholine prevents angiotensin II-induced oxidative stress and apoptosis in H9c2 cells. Apoptosis. 2011. Vol. 16. P. 94-103.
511. Liu C., Shen F.M., Le Y.Y. Antishock effect of anisodamine involves a novel pathway for activating $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor // Crit. Care Med. 2009. Vol. 37, N 2. P. 634-41.
512. Lotti M. Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. Handb. Pesticide Toxicol. 2001. Vol. 2. P. 1043–1085.
513. Loose L.D. Immunotoxicology-1985 // Year Immunol. 1985-1986.Vol. 2.-Basel e.a., 1986. P. 365-370.
514. 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.
515. Maekawa Y., Yasutomo K. Antigen-driven T-cell repertoire selection // Crit. Rev. Immunol. 2005. Vol. 25, № 5. P. 59-74.
516. Masini E., Fantozzi R., Conti A. Mast cell heterogeneity in response to cholinergic stimulation // Int. Arch. Allergy and Appl. Immunol. 1985. Vol. 77, № 1-2. P. 184-185.
517. Masuda N., Tahatsu M., Mjnnau Y/ Ozawa T. Sarin poisoning in Tohyo subway // Lancet. 1995. № 8962. P. 1446-1447.

518. MacFarlane A.W., Campbell K.S. Signal transduction in natural killer cells // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2006. Vol. 298. P. 3-57.
519. MacManus J.P., Bounton A.L., Whitefield J.F. Acedylcholine-induced initiation of thymic lymphoblast DNA synthesis and proliferation // *J. Cell. Physiol.* 1975. Vol. 85, № 2. P. 321-330.
520. McManus J., Huebner K. M. Vesicants // *Crit. Care Clin.* 2005. Vol. 21, № 4. P. 707-718.
521. Mahadeshwara P., Gouda H.S., Hallikeri V.R. Plasma cholinesterase: double-edged parameter in the diagnosis of acute organophosphorus poisoning // *Med Sci Law.* 2010. Vol.50, № 3. P. 159-160.
522. Marx J.L. How killer cells kill their targets. // *Science.* 1986. Vol. 231, № 4744. P. 1367-1369.
523. 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.
524. Martin G.S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes // *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2012. Vol. 10, N 6. P. 701-706.
525. Maslinski W. Cholinergic receptors of lymphocytes // *Brain. Behav. And Immunol.* 1989. Vol.3, № 1. P. 1-14.
526. Masuda N., Tahatsu M., Mjnnau Y/ Ozawa T. Sarin poisoning in Tohyo subway // *Lancet.* 1995. №8962. P. 1446-1447.
527. Mercey G., Verdelet T., Saint-André G., et al. First efficient uncharged reactivators for the dephosphylation of poisoned human acetylcholinesterase // *Chem. Commun. (Camb).* 2011. Vol. 47, № 18. P. 5295-5297.
528. Miller K. Immunotoxicology // *Clin. and Exp. Immunol.* 1985. Vol 61, № 2. P. 219-223.
529. Morita H., Yanagisawa N., Nakajima T. Zarin poisoning in Matsumoto, Japan // *Lancet.* 1995. P. 290-293.
530. Newcombe D.S. Immune surveillance, organophosphorus exposure, and lymphomagenesis // *Lancet.* 1991. № 8792. P. 539-541.
531. Newham P., Ross D., Ceuppens P., Das S., Yates J.W., Betts C. et al. Determination of the safety and efficacy of therapeutic neutralization of tumor necrosis factor- α (TNF- α) using AZD9773, an anti-TNF- α immune Fab, in murine CLP sepsis. *Inflamm. Res.* 2014. Vol. 63, N 2. P. 149-60.
532. Nogueira N. Intracellular mechanisms of killing // *Immunobiol. Parasit. and Parasitic. Infec.-New York-London*, 1984. P. 53-69.
533. Norman G.J., Morris J.S., Karelina K. et al. Cardiopulmonary arrest and resuscitation disrupts cholinergic anti-inflammatory processes: a role for cholinergic $\alpha 7$ nicotinic receptors // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, N 9. P. 3446-3452
534. Oke S.L., Tracey K.J. From CNI-1493 to the immunological homunculus: physiology of the inflammatory reflex // *J. Leukoc. Biol.* 2008. Vol. 83, №3. P. 512-517.
535. Padgett E.L. Desparate effects of representative dithiocarbamates on selected immunological parameters in vivo and cell survival in vitro in female B6C3F1 mice / E.L. Padgett, D.B. Barnes, S.B Pruet. // *J. Toxicol. and Environ. Health.* 1992. Vol. 37, № 4. P. 559-571.
536. Pohanka M. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor is a target in pharmacology and toxicology. *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13, N 2. P. 2219-38.
537. Parikh K., Duysen E.G., Snow B. et al. Gene-delivered butyrylcholinesterase is prophylactic against the toxicity of chemical warfare nerve agents and organophosphorus compounds // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. Vol.337, № 1. P. 92-101.
538. Norman G.J., Morris J.S., Karelina K. et al. Cardiopulmonary arrest and resuscitation disrupts cholinergic anti-inflammatory processes: a role for cholinergic $\alpha 7$ nicotinic receptors // *J. Neurosci.* 2011. Vol. 31, N 9. P. 3446-3452.

539. Parikh K., Duysen E.G., Snow B. et al. Gene-delivered butyrylcholinesterase is prophylactic against the toxicity of chemical warfare nerve agents and organophosphorus compounds // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2011. Vol. 337, N 1. P. 92-101.
540. Pavlov V.A. Cholinergic modulation of inflammation // *Int. J. Clin. Med.* 2008. Vol. 1, №3. P. 203-212.
541. Pavlov V.A., Ochani M., Yang L.H. et al. Selective alpha7-nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves survival in murine endotoxemia and severe sepsis // *Crit. Care Med.* 2007. Vol. 35. P. 1139–1144.
542. Peña-Philippides J.C., Razani-Boroujerdi S., Singh S.P. et al. Long- and short-term changes in the neuroimmune-endocrine parameters following inhalation exposures of F344 rats to low-dose sarin // *Toxicol. Sci.* 2007. . Vol. 97, № 1. P. 181-188.
543. Patel V., Ramasundarahettige C., Vijayakumar L., Thakur J.S., Gajalakshmi V., Gururaj G, Suraweera W., Jha P. Million Death Study Collaborators. Suicide mortality in India: a nationally representative survey. *Lancet.* 2012. Vol. 357. P. 2343–2351.
544. Peter C., Schmidt K., Hofer S. et al. Effects of physostigmine on microcirculatory alterations during experimental endotoxemia. *Shock.* 2010. Vol. 60, N 33. P. 405-11. 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, № 2. P. 65-84.
545. Peter J.V., Sudarsan T.I., Moran J.L. Clinical features of organophosphate poisoning: A review of different classification systems and approaches // *Indian J. Crit. Care Med.* 2014. Vol. 18, N 11. P. 735-745.
546. Proskolil B.J., Bruun D.A., Lorton J.K. Antigen sensitization influences organophosphorus pesticide-induced airway hyperreactivity/ B.J. Proskolil, D.A. Bruun, J.K. Lorton // *Environ. Health. Perspect.* 2008. Vol. 116, N 3. P. 331-338.
547. Pruett S. Urinary corticosterone as an indicator of stress-mediated immunological changes in rats // *J. Immunotoxicol.* 2008. Vol. 5, N 1. P. 17-22.
548. Pruett S.B., Fan R., Cheng B. et al. Innate immunity and inflammation in sepsis: mechanisms of suppressed host resistance in mice treated with ethanol in a binge-drinking model. *Toxicol. Sci.* 2010. Vol. 117, N 2. P. 314-324.
549. Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm // *Immunol. Today.* 1997. Vol. 18, N 1. P. 36-41.
550. RamaRao G., Afley P., Acharya J., Bhattacharya B.K. // *BMC Neurosci.* 2014. Vol. 15, N 47. P. 1-11.
551. Razani-Boroujerdi S., Behl M., Hahn F.F. et al. // *J. Neuroimmunol.* 2008. Vol. 194, N 1-2. P. 83-8.
552. 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, № 9. P. 4632-4635.
553. Rodgers K.E., Imamura T., Devens B.H. Organophosphorus pesticide immunotoxicity: effects of O,O,S-trimethylphosphorothioate on cellular and humoral immune response systems // *Immunopharmacology.* 1986a. Vol. 12, № 3. P. 193-202.
554. Rodgers K.E., Leung N., Wae C.F. et al. Lack of acute and subacute administration of malathion on murine cellular and humoral immune responses // *Pestic. Biochem. and Physiol.* -1986b. -Vol. 25, N 3. -P. 358-365.
555. Rodgers K.E., Leung N., Imamura T., Devens D.H. Rapid in vitro screening assay for immunotoxic effects of organophosphorus and carbamate insecticides on the generation of cytotoxic T-lymphocyte responses. // *Pestic. Biochem. And Physiol.* 1986b. Vol. 26, № 3. P. 292-301.
556. Rodica G., Srefania M. Effects of some insecticides on the bursa of Fabricius in chicken // *Arch. Exp. Vet. Med.* 1973. Vol. 27, № 4. P. 723-728.
557. Rosas-Ballina M., Tracey K.J. Cholinergic control of inflammation // *J. Intern. Med.* 2009. Vol. 265, №6. P. 663-679.

558. Rossi A., Tria M.A., Baschieri S. et al. Cholinergic agonists selectively of inducen proliferative responses in the mature subpopulation of murine thymocytes in the mature subpopulation of murine thymocytes // *J. Neurosci. Res.* 1989. Vol. 24, № 3. P. 369-373.
559. Rosenberg Y.J. A pretreatment or post exposure treatment for exposure to a toxic substance by pulmonary delivery (inhaler) of a bioscavenger // *PCT Int. Appl. WO* 2005000195 A2. 2005. Vol. 6, № 1. 22 p.
560. Rowe A.M. Developmental immunotoxicity of atrazine in rodents // *Basic. Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2008. Vol. 102, № 2 . P. 139-145.
561. Russell B.C., Croudace I.W., Warwick P.E. Determination of (135)Cs and (137)Cs in environmental samples: A review. // *Anal. Chim. Acta.* 2015.- Vol.26, N 890.- P. 7-20.
562. Saladi R.N., Smith E., Persaud A.N. Mustard: a potential agent of chemical warfare and terrorism // *Clin. Exp. Dermatol.* 2006. Vol. 1. № 6. P. 1-5.
563. Salazar K.D., Ustyugova I.A., Blundage K.M. A review of the immunotoxicity of the pesticide 3,4-dichloropropionanilide // *J. Toxicol. Environ. Health. B. Crit. Rev.* 2008. Vol. 8, № 11. P. 630-645
564. Sawyer T.W., Mikler J., Worek F. et al. The therapeutic use of localized cooling in the treatment of VX poisoning // *Toxicol. Lett.* 2011. Vol. 204, № 1. P. 52-56 .
565. Schans M. J. van der, Polhuijs M., Dijk van C. et al. Retrospective detection of exposure to nerve agents: analysis of phosphofluoridates originating from fluoride-induced reactivation of phosphorylated BuChE // *Archives of Toxicology.* 2004. Vol.78, № 9. P. 508-524.
566. Sellestrom A, Cairns S, Barbeschi M. United nations mission to investigate allegations of the use of chemical weapons in the Syrian Arab Republic. Report on the alleged use of chemical weapons in the Ghouta area of Damascus on 21 August 2013. Geneva, Switzerland: United Nations; 2013.
567. Shin T.M., Kan R.K., McDonough J.H. In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents // *Chem. Biol. Interact.* 2005. Vol. 157-158. P.293-303.
568. Schoenborn J.R., Wilson C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses // *Adv. Immunol.* 2007. Vol. 96. P. 41–101 Sharp D. Long-term effects of sarin // *Lancet.* 2006. Vol. 14. № 367 (9505). P. 95-97.
569. Shirazi A., Mihandoost E., Ghobadi G. et al. Evaluation of radio-protective effect of melatonin on whole body irradiation induced liver tissue damage. *Cell J.* 2013. Vol. 14 P. 292-977.
570. Sifringer M, Bendix I, von Haefen C. et al. Oxygen toxicity is reduced by acetylcholinesterase inhibition in the developing rat brain. *Dev Neurosci.* 2013. Vol. 35 P. 255-254.
571. Singh N., Perfect J.R. Immune reconstitution syndrome associated with opportunistic mycoses // *Lancet Infect. Dis.* 2007. Vol. 7, № 6. P. 395-401.
572. Sitapara R.A., Antoine D.J., Sharma L. et al. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves bacterial clearance in mice by restoring hyperoxia-compromised macrophage function. *Mol. Med.* 2014. Vol. 20. P. 238-247.
573. Song D.J., Huanq X.Y., Ren L.C. et al. Effect of lentiviral vector encoding on triggering receptor expressed on myeloid cells 1 on expression of inflammatory cytokine in septic mice infected by *Bacteroides fragilis* // *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2009. Vol. 25, № 1. P. 36-41.
574. Stephen B. P., Ruping F., Qiang Z. et al. Modeling and predicting immunological effects of chemical stressors: characterization of a quantitative biomarker for immunological changes caused by atrazine and ethanol // *Toxicol. Sci.*, 2003. Vol. 75, № 10. P. 343-354.
575. Stevens G. Immunomodulation drugs: where and whither // *Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* 1993. Vol. 685. P. 430-431.

576. Su X., Mattha M.A., Malik A. B. Requisite role of the cholinergic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor pathway in suppressing Gram-negative sepsis-induced acute lung inflammatory injury // J. Immunol. 2010. Vol. 184, № 1. P. 401-410.
577. Street J.C., Sharma R.P. Alteration of induced cellular and humoral immune responses by pesticides and chemicals of environ-mental concern: quantitative studies of immunosuppression by DDT, aroclor 1254, cirbarul //Toxicol. Appl. Pharmacol. 1975.Vol. 32, № 3. P. 587-602.
578. Su X., Mattha M.A., Malik A. B. Requisite role of the cholinergic alpha7 nicotinic acetylcholine receptor pathway in suppressing Gram-negative sepsis-induced acute lung inflammatory injury.// J. Immunol. 2010. Vol. 184, № 1. P. 401-410.
579. Suke S.G. Melatonin treatment prevents modulation of cell-mediated immune response induced by propoxur in rats / S.G. Suke // Indian J. Biochem. Biophys. 2008. Vol. 45, № 4. P. 278-281.
580. Sullivan J. B. Immunological alterations and chemical exposure //J. Toxicol-Clin. Toxicol. 1989. Vol. 27, № 6. P. 311-343.
581. Sunil Kumar K.B., Ankathil R., Devi K.S. Chromosomal aberrations induced by methyl parathion in human peripheral lymphocyt of alcoholics and smokers //Hum. and Exp. Toxicol. 1993. Vol. 12, № 4. P. 285-287.
582. Szelenyi J.G., Bartha E., Hollan S.R. Acetilcholinestrerase activity of lymphocytes: an enzyme characteristic of T-cells // Brit. J. Haematol. 1982. Vol. 50, № 2. P. 241-245.
583. Szot R.J., Murphy S.D. Phenobarbital and doxamethasone inhibition of the adrenocortical response of rats to toxic chemicals and other stresses //Toxicol. Applied Pharmacol. 1970. Vol. 17, № 3. P. 761-773.
584. Taurog J.D., Fewtrell C., Becker E.L. IgE mediated triggering of rat basophil leukemia cells: lack of evidence for serine esterase activation //J. Immunol. 1979. Vol. 122, N 6. P. 2150-2153.
585. 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.-1986a.-Vol. 83, N 3.-P. 456-464.
586. Thomas I.K., Imamura T. Modulation of cellular and humoral immune responses by O,O,S-trimethyl phosphorodithioate, an impurity of commercial malathion //Toxicologist. 1986b. Vol.6, № 1. P. 169.
587. Tiefenbach B., Lange P. Studies on the action of dimethoate on the immune system //Arch. Toxicol.-1980. Suppl. 4. P. 167-170.
588. Tiefenbach B., Hennighausen G., Lange P. Zum Mechanismus der akuten Wirkungen phosphororganischer Pestizide auf das Immunsystem //Zbl. Pharm.-1983.Bd. 122, № 2. S. 156.
589. Tiefenbach B., Wichner S. Dosisabhängigkeit und Mechanismus der akuten Wirkung von Methamidophos auf das Immunsystem der Maus //Z. gesamte Hyg. und Grenzdeb. 1985. Bd. 31, № 4. S. 228-231.
590. Thomas I.K. 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/ I.K. Thomas, T. Imamura // Toxicol. and Appl. Pharmacol.1986a. Vol. 83, № 3. P. 456-464.
591. Thomas I.K. Modulation of cellular and humoral immune responses by O,O,S-trimethyl phosphorodithioate, an impurity of commercial malathion / I.K. Thomas, T. Imamura //Toxicologist. 1986b. Vol. 6, № 1. P. 169.
592. Toklu H.Z., Sehirli O., Ozyurt H.. et al. Punica granatum peel extract protects against ionizing radiation-induced enteritis and leukocyte apoptosis in rats. // J. Radiat. Res. 2009. Vol. 50. P. 345-53.

593. Tominaca K., 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. Biol.* 1989. Vol. 35, № 6. P. 679-686.
594. Tomoiu A., Larbi A. Fortin C., Dupuis G., Fulop T.Jr. Do membrane rafts contribute to human immunosenescence? // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2007. Vol. 1100. P. 98-110.
595. Trabold B., Gruber M., Frohlich D. Functional and phenotypic changes in polymorphonuclear neutrophils induced by catecholamines // *Scand. Cardiovasc. J.* 2007. Vol. 41, № 1. P. 59-64.
596. Tracey K.J. Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway // *J. Clin. Invest.* 2007. Vol. 117, № 2. P. 289-296.
597. Trinchievi G., de Marchi M. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in humans III. Effect of protease inhibitors and substrates // *J. Immunol.* 1976. Vol. 116, № 4. P. 885-891.
598. Tremolada P., Finizio A., Villa S. et al. Quantitative inter-specific chemical activity relationships of pesticides in the aquatic environment // *Aquat. Toxicol.*, 2004. Vol. 67. № 1. P. 87-103.
599. Tumang J.R., Zhou J.L., Gietl D. et al T helper cell-dependent, microbial superantigen-mediated B cell activation in vivo // *Autoimmunity.* 1996. Vol. 24. P. 247-255.
600. Urban T., Yurbain I., Urban M. et al. Oxidants and antioxidants. Biological effects and therapeutic perspectives // *Ann. Chir.* 1995. Vol. 49, № 5. P. 427-434.
601. Ulrich P., Grenet O., Bluemel J. P. Cytokine expression profiles during murine contact allergy: T helper 2 cytokines are expressed irrespective of the type of contact allergen // *Arch. Toxicol.* 2001. Vol. 75, N 8. P. 470-479.
602. Vos J.G., Klerk A., Krajnc E.I. et al. Immunotoxicity of TBTO. II. Suppression of lymphocyte transformation, activity of macrophages and natural killer cells // *Pharm. Weekbl. Sci. Ed.*- 1984. Vol. 6, № 4. P. 183.
603. Vos A.F. de, Pater J.M., Pangaart P.S. van den et al. In vivo lipopolysaccharide exposure of human blood leukocytes induces cross-tolerance to multiple TLR ligands. // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183, N 1. P. 533-542.
604. Welch K.D., Pfister J.A., Gardner D.R., Green B.T., Panter K.E. The role of the $\alpha 7$ subunit of the nicotinic acetylcholine receptor on motor coordination in mice treated with methyllycaconitine and anabasine. *J. Appl. Toxicol.* 2013. Vol. 33, N 9. P. 1017-26.
605. Wiltout R.W., Ercegovich C. D., Ceglowski W. S. Humoral immunity in mice following oral administration of selected pesticides // *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 1978. Vol. 20, № 3. P. 423-431.
606. Woodin A.M., Harris A. The inhibition of locomotion of the polymorphonuclear leukocyte by organophosphorus compounds // *Exp. cell Research.*-1973. Vol. 77, N. 1-2.-P. 41-46.
607. 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, № 3. P. 295-308.
608. Woof J.M., Kerr M.A. IgA function-variations on a theme // *Immunology.* 2004. Vol. 113. P. 175-177.
609. Xiao W., Chirmule N., Schnell M.A. et al., Route of administration determines induction of T-cell-independent humoral responses to adeno-associated virus vectors // *Mol. Ther.* 2000. Vol. 1. P. 323-329.
610. Yanagisawa N. // The nerve agent sarin: history, clinical manifestations, and treatment. *Brain Nerve.* 2014. Vol. 66, N 5. P. 561-569.

Научное издание

Павел Францевич Забродский

**Иммунотоксикология
фосфорорганических соединений**

Монография

Редактор: В.В. Макаров

Подписано в печать 07.12.2015г. Формат 60х84/16.
Печать цифровая. Бумага офсетная.
Объем 18,1 усл.печ.л. Тираж 1000 экз. Заказ 167.

г. Саратов, ул. Кутякова 138 Б, 4 этаж
т.52-05-93
Издательство «Саратовский источник»