

**РОЛЬ АЛЬФА7- НИКОТИНОВЫХ АЦЕТИЛХОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ В-
КЛЕТОК В РЕАЛИЗАЦИИ ИММУНОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА
ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ**

П.Ф. Забродский, В.В. Масляков, М.С. Громов

Саратовский филиал Самарского медицинского института «РЕАВИЗ»

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что при воздействии фосфорорганического соединения (ФОС) диметилдихлорвинилфосфата (ДДВФ) снижались Т-независимое антителообразование В-клетками и содержание в крови ИЛ-10, ИЛ-12, аналогичный эффект вызывал селективный агонист $\alpha 7$ -никотиновых ацетилхолиновых рецепторов ($\alpha 7$ nAChR) GTS-21. Антагонист nAChR хлоризондамин при комбинированном применении с ДДВФ уменьшал редукцию антителообразования по сравнению с показателями при интоксикации ДДВФ. Таким образом, ФОС и/или ацетилхолин способны воздействовать на $\alpha 7$ nAChR В-клеток и вызывать снижение их функции, сопровождающиеся супрессией антителопродукции и уменьшением концентрации в крови ИЛ-10 и ИЛ-12.

Ключевые слова: фосфорорганические соединения; В-клетки; $\alpha 7$ -никотиновые ацетилхолиновые рецепторы; ИЛ-10; ИЛ-12.

**THE ROLE ALFA7- NICOTINIC ACETYLCHOLINE RECEPTORS OF B-CELLS IN
IMPLEMENTATION OF IMMUNOTOXIC EFFECT OF ORGANOPHOSPHORUS
COMPOUNDS**

P.F. Zabrodskii, V.V. Maslyakov, M.S. Gromov

Saratov Branch of Samara Medical Institute «REAVIZ»

It was established in experiments on noninbred albino rats that the action of the organophosphorus compound (OPC) dimethyl dichlorovinyl phosphate (DDVP) decreased T-independent antibody production by B-cells and content of IL-10, IL-12 in blood, a similar effect evoked selective agonist $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor ($\alpha 7$ nAChR) GTS-21. Antagonist nAChR chlorisondamine in the combined use with DDVP decreased suppression antibody production compared with intoxication DDVP. Thus, OPC and/or acetylcholine able to act on $\alpha 7$ nAChR of B-cells and cause reduction in their function, accompanied by suppression of antibody production and decrease the blood concentration of IL-10 and IL-12.

Keywords: organophosphorus compounds, B-cell, $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors; IL-10; IL-12.

Адрес для корреспонденции: pfzabrodsky@gmail.com Забродский П.Ф.

Широкое использование фосфорорганических соединений (ФОС) в сельском хозяйстве, различных отраслях промышленности и быту может приводить к загрязнению окружающей среды, вызывать острые и хронические интоксикации человека, животных [1,3,7]. Существует вероятность использования ФОС в террористических и криминальных целях, а также в локальных вооруженных конфликтах [3,5,7,10,13,14,15]. От отравлений фосфорорганическими инсектицидами погибает более 200 тысяч человек в год [7]. При этом существенную роль в танатогенезе могут играть инфекционные осложнения и заболевания, связанные с формированием вторичного постинтоксикационного иммунодефицитного состояния [3, 12], и, в частности, с воздействием ФОС на n -холинорецепторы клеток фагоцитарно-моноцитарной системы [1].

Целью исследования являлось определение роли $\alpha 7$ -никотиновых ацетилхолиновых рецепторов ($\alpha 7nAChR$) В-лимфоцитов в реализации иммунотоксического эффекта ФОС.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на неинбредных белых крысах обоего пола массой 180-240 г. Первая группа животных являлась контрольной. ФОС диметилдихлорвинилфосфат (ДДВФ) (Sigma-Aldrich) применяли внутримышечно, однократно в дозе 0,25 DL_{50} ежедневно в течение 4-х сут (2-я группа). DL_{50} ДДВФ составляла $60,7 \pm 2,5$ мг/кг. Третьей группе крыс подкожно, однократно, ежедневно вводили антагонист n -холинорецепторов ($nAChR$) хлоризондамин дийодид – ХД (Sigma-Aldrich) в дозе 10 мг/кг в течение 4 сут. Четвертая группа животных получала ДДВФ (доза, кратность, продолжительность введения, как и в первой группе) и ХД (доза, кратность, продолжительность введения, как и в третьей группе), при этом первое введение ХД проводили за 15-30 мин до применения ДДВФ. Пятой группе крыс вводили селективный агонист $\alpha 7nAChR$ GTS-21 – 3-(2,4-dimethoxybenzylidene)-anabaseine dihydrochloride – (Sigma-Aldrich) подкожно, однократно в дозе 5 мг/кг,

ежедневно в течение 4 сут [9], учитывая период полувыведения GTS-21, составляющий 12-24 ч [11].

Функцию В-клеток оценивали по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке на 5 и 8 сут, характеризующему синтез IgM к Т-независимому брюшнотифозному Vi-антигену (Vi-Ag) [3,4], после иммунизации данным антигеном, содержанию в крови ИЛ-10 и ИЛ-12, продуцируемых В-лимфоцитами (и другими клетками) [4,6,8]. В отличие от Т-лимфоцитов и естественных клеток-киллеров (ЕКК) В-лимфоциты не содержат ацетилхолинэстеразу (АХЭ) и другие эстеразы и, следовательно, при воздействии на них ФОС исключены иммунотоксические эффекты, обусловленные ингибированием данных энзимов [3]. Иммунизацию Vi-Ag в дозе 8 мкг/кг проводили внутривентрально всем группам крыс через 15-30 мин после введения ДДВФ, ХД, их комбинации и GTS-21. Контрольная группа животных до иммунизации Vi-Ag получала изотонический раствор хлорида натрия в соответствующем объеме. Концентрацию цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-12 определяли в плазме крови всех групп крыс на 5 сут после иммунизации Vi-Ag методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits MyBioSource) в соответствии с инструкциями изготовителя (номера в каталоге соответственно - MBS8506064, MBS7224515). Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Интоксикация ДДВФ (группа 2), а также введение селективного агониста $\alpha 7$ nAChR 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.

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 на 5 и 8 сут после иммунизации по сравнению с соответствующими параметрами (группа 2) соответственно в 1,66 и 1,55 раза (табл.1).

Таблица 1. 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.

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. 2).

Таблица 2. 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 $\pm$ 34	172 $\pm$ 20
ДДВФ	2	200 $\pm$ 26	105 $\pm$ 17
Хлоризондамин	3	296 $\pm$ 32	169 $\pm$ 21
ДДВФ + хлоризондамин	4	265 $\pm$ 30	156 $\pm$ 27
GTS-21	5	193 $\pm$ 24	110 $\pm$ 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.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что под влиянием ДДВФ существенно снижается функция В-клеток, причем этот эффект не связан с ингибированием АХЭ данных иммунцитов, так как В-лимфоциты являются эстеразонегативными клетками [3]. Следует отметить, инактивацией АХЭ Т-клеток и ЕКК обусловлены основные иммунотоксические эффекты ФОС [3]. Антагонист

nAChR ХД восстанавливает способность В-клеток продуцировать IgM при интоксикации ФОС в результате блокирования их nAChR. При этом практически исключается действие молекулы ДДВФ (или ацетилхолина - АХ, концентрация которого в крови и лимфоидных органах увеличивается вследствие ингибирования ФОС АХЭ) [3] 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 [2]. 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 [4,6,8].

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.

ЛИТЕРАТУРА

1. Забродский П.Ф., Гришин В.А., Бородавко В.К. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2013. Т. 155, № 4. С. 457-459.
2. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Шехтер М.С., Кузьмин А.В. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2012. Т. 153, № 5. С. 657-659.
3. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков: Монография. Саратов, 2007.
4. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. (Пер. с англ.) М.: Мир, 2000.
5. Chilukuri N., Duysen E.G., Parikh K. et al. // Mol. Pharmacol. 2009. Vol. 76, № 3. P. 612-617.
6. Holan V., Zajicova A., Javorkova E. et al. // Immunology. 2014. Vol. 141, № 4. P. 577-586.
7. Hulse E.J., Davies J.O, Simpson A.J. et al. // Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2014. Vol. 190, № 12. P. 1342-1354.

8. Lasek W, Zagożdżon R, Jakobisiak M. // Cancer Immunol. Immunother. 2014. Vol. 63, № 5. P. 419-435.
9. Norman G.J., Morris J.S., Karelina K. et al. // J. Neurosci. 2011. Vol. 31, № 9. P. 3446-3452..
10. Parikh K., Duysen E.G., Snow B. et al. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2011. Vol.337, № 1. P. 92-101.
11. Pavlov V.A., Ochani M., Yang L.H., et al. // Crit. Care Med. 2007. Vol.35. P. 1139–1144.
12. Pena-Philippides J.C., Razani-Boroujerdi S., Singh S.P. et al. // Toxicol. Sci. 2007. Vol. 97, № 1. P. 181-188.
13. RamaRao G., Afley P., Acharya J., Bhattacharya B.K. // BMC Neurosci. 2014. Vol. 15, № 47. P. 1-11.
14. Sawyer T.W., Mikler J., Worek F. et al. // Toxicol. Lett. 2011. Vol. 204, № 1. P. 52-56 .
15. Yanagisawa N. // Brain Nerve. 2014. Vol. 66, № 5. P. 561-569.