

# ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

## ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИИ ЛИМФОЦИТОВ И СОДЕРЖАНИЯ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ ПОД ВЛИЯНИЕМ АТРОПИНА ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ МАЛАТИОНОМ

П. Ф. Забродский, В. В. Масляков, М. С. Громов<sup>1</sup>

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что острое отравление малатионом (0,75 LD<sub>50</sub>) снижает в большей степени функцию Th1-клеток, чем Th2-лимфоцитов, уменьшает активность В-клеток, ЕКК, содержание в крови ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4, существенно не влияя на концентрацию ИЛ-10 и ИЛ-13. Атропин (10 мг/кг) при острой интоксикации малатионом увеличивал редукцию функции Т- и В-лимфоцитов, ЕКК, а также синтеза иммунорегуляторных цитокинов ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4. Атропин при отравлении малатионом не влиял на супрессию синтеза клетками крови провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, а также на содержание противовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-13.

**Ключевые слова:** малатион; атропин; Th1-; Th2-лимфоциты; иммунотоксичность; цитокины.

### ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование фосфорорганических соединений (ФОС) в сельском хозяйстве, различных отраслях промышленности и быту, а также применение в медицине антихолинэстеразных препаратов, обладающих практически такой же токсикодинамикой, как ФОС, может приводить к острым интоксикациям данными веществами [1, 9, 10]. От острых отравлений фосфорорганическими инсектицидами погибает более 200 тыс. человек в год [8]. Не исключено возникновение аварийных ситуаций на объектах, занимающихся уничтожением химического оружия, в частности, ФОС, в соответствии с международными соглашениями. При этом возможны групповые и массовые острые отравления ФОС [1]. Существует вероятность использования ФОС в террористических и криминальных целях, а также в локальных вооруженных конфликтах [1, 12, 8, 11, 15]. В настоящее время в качестве антидотного средства при острой интоксикации ФОС применяется атропин [1, 11, 9, 15]. Иммунотоксические эффекты ФОС достаточно хорошо изучены, однако до сих пор практически не известно влияние этих соединений в комбинации с атропином на функцию лимфоцитов и синтез клетками крови иммунорегуляторных, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов [1]. Исследование данного вопроса представляет большой интерес для обоснования оптимальной фармакологической коррекции нарушений иммунного статуса после острой интоксикации ФОС и примене-

нии антидотов (в частности, м-холинблокаторов) с целью профилактики и лечения постинтоксикационного иммунодефицитного состояния, сопровождающегося различными инфекционными осложнениями и заболеваниями [1].

Целью исследования являлось определение влияния атропина при остром отравлении ФОС в дозе 0,75 LD<sub>50</sub> на функцию лимфоцитов и содержание в крови провоспалительных, иммунорегуляторных и противовоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ ,  $\gamma$ -интерферона - ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 и ИЛ-13).

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 135 беспородных белых крысах обоего пола массой 180 – 240 г, полученных из питомника РАМН (филиал “Столбовая” ГУ НЦБМТ РАМН), после 2-недельного карантина в виварии института. Животных содержали в условиях вивария в соответствии с санитарными нормами, предусмотренными “Правилами лабораторной практики” (приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708 н) при свободном доступе к воде и сбалансированному по питательности брикетированному гранулированному комбикорму фирмы “МЭСТ”. Экспериментальные группы животных формировали методом случайной выборки с учетом массы тела в качестве определяющего показателя. В качестве ФОС использовался малатион (карбофос, фосфотион-50, фосфотион, ФОГ-3, соединение 4049) — инсектицидный и акарицидный препарат широкого спектра действия, отравления которым происходят наиболее часто [6]. Концентрат эмульсии малатиона (ООО “Алина-Нова”) разводили дистиллиро-

<sup>1</sup> Саратовский филиал Самарского медицинского института “РЕАВИЗ”, 410076, Саратов, Дегтярная площадь, д. 1А, Россия.

ванной водой и вводили однократно внутримышечно в дозе 0,75 LD<sub>50</sub> (1 мл на 200 г массы животного; группа 1). LD<sub>50</sub> малаиона составляла (780 ± 18) мг/кг. Атропина сульфат (Sigma-Aldrich) вводили подкожно в дозе 10 мг/кг (водный раствор, 0,5 мл на 200 г массы животного) через 10 – 30 мин после введения малаиона (группа 2). Контрольная группа получала соответственно внутрибрюшинно и через 10 – 30 мин подкожно такие же объемы воды, как и при введении малаиона и атропина. Показатели системы иммунитета определяли общепринятыми методами в экспериментальной иммунитологии и иммунологии [1, 3]. Функцию Th1-лимфоцитов оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Формирование ГЗТ исследовали у животных по приросту массы стопы задней лапы в %. Разрешающую дозу ЭБ (5 · 10<sup>8</sup>) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут после иммунизации. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч. Функцию Th2-лимфоцитов определяли по гуморальному иммунному ответу к Т-зависимому антигену — эритроцитам барана (ЭБ) — по числу антителообразующих клеток (АОК), синтезирующих IgG к ЭБ, в селезенке через 7 сут после иммунизации методом непрямого локального гемолиза в геле [1, 3]. Следует отметить, число АОК к ЭБ в данном тесте отражает не только активность Th2-клеток, но и В-лимфоцитов. Функцию Th1- и Th2-лимфоцитов оценивали также по концентрации интерферона-γ (ИФН-γ) и ИЛ-4. В описанных тестах крыс иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе 2 · 10<sup>8</sup> клеток через 60 – 90 мин после введения малаиона. Активность В-клеток исследовали по гуморальной иммунной реакции к Т-независимому брюшнотифозному Vi-антигену (Vi-Ag), отражающей синтез IgM плазмочитами селезенки крыс. При этом проводили иммунизацию животных Vi-Ag (Научный центр молекулярно-генетических исследований — ДНКМ) в дозе 8 мкг/кг.

Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) определяли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 413 нм через 4 сут после введения малаиона [1]. Оценивали количество гемоглобина, выделившегося из неразрушенных ЕКК (эффektорами) эритроцитов курицы (ЭК) (мишени), путем лизиса осадка 0,25 % додецилсульфатом натрия (Merck KGaA). Активность ЕКК оценивали по индексу цитотоксичности (ИЦ) по формуле:

$$\text{ИЦ} = \frac{E_k - E_o}{E_k} \cdot 100,$$

где  $E_k$  — оптическая плотность лизированного осадка ЭК контрольной пробы без эффекторов (ЕКК) против лизирующего раствора;  $E_o$  — оптическая плотность лизированных оставшихся в осадке опытной пробы неразрушенных ЭК против лизированного осадка эффекторных клеток без ЭК.

Концентрацию в крови иммунорегуляторных (ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4), провоспалительных (ФНОα, ИЛ-1β, ИЛ-6) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-10, ИЛ-13) [3, 5] определяли в плазме крови крыс через 4 сут после иммунизации методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits MyBioSource) в соответствии с инструкциями изготовителя. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия достоверности Стьюдента. Порог статистической значимости был установлен на уровне  $p = 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Функции Th1-, Th2-лимфоцитов, В-клеток, ЕКК, оцениваемые соответственно по реакции ГЗТ, числу АОК к ЭБ (IgG), АОК к Vi-Ag и ИЦ после острого отравления ФОС малаионом, уменьшались соответственно в 1,84; 1,41; 1,40 и 2,14 раза ( $p < 0,05$ ), а применение атропина после введения малаиона вызывало дальнейшую 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. 1).

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 малаионом более выражено. Применение атропина после интоксикации ФОС увеличивало супрессию функции лимфоцитов ( $p < 0,05$ ).

После острой интоксикации малаионом (табл. 2) снижалось содержание в крови провоспалительных цитокинов ФНОα, ИЛ-1β 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.

Содержание в крови иммунорегуляторных цитокинов ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4 при острой интоксикации ма-

Таблица 1. Влияние атропина (10 мг/кг) на функцию лимфоцитов белых крыс при острой интоксикации малаионом (0,75 LD<sub>50</sub>;  $M \pm m$ ,  $n = 8 - 10$ )

Лимфоциты	Параметр	Контроль	Малаион	Малаион + атропин
Th1-типа	ГЗТ, %	32,9 ± 4,0	17,9 ± 2,0 <sup>a</sup>	11,2 ± 1,4 <sup>b</sup>
Th2-типа	АОК к ЭБ (IgG), 10 <sup>3</sup>	20,2 ± 2,3	14,3 ± 1,3 <sup>a</sup>	10,5 ± 1,0 <sup>b</sup>
В-клетки	АОК к Vi-Ag (IgM), 10 <sup>3</sup>	29,2 ± 3,1	20,8 ± 1,8 <sup>a</sup>	15,1 ± 1,6 <sup>b</sup>
ЕКК	ИЦ, %	31,0 ± 3,3	14,5 ± 1,5 <sup>a</sup>	10,1 ± 1,0 <sup>b</sup>

<sup>a</sup> —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; <sup>b</sup> —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и показателем при интоксикации.

латионом по сравнению с контролем снижалось соответственно в 2,32; 2,14 и 1,59 раза ( $p < 0,05$ ), а концентрация прогнатовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-13 существенно не отличалась от контрольного уровня. Применение атропина после отравления малатионом усиливало редукцию синтеза клетками крови цитокинов ИФН- $\gamma$ , 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 ИФН $\gamma$ /ИЛ-4. Так, в контроле оно составляло ( $6,9 \pm 0,5$ ), 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- $\gamma$  и ИЛ-4 [1, 3]. С менее выраженным воздействием ФОС на Th2-клетки, вероятно, связано также несущественное снижение ИЛ-10 и ИЛ-13 [3, 7].

Уменьшение уровня провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  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 [2, 14].

Снижение функции Т-, В-лимфоцитов и ЕКК (в том числе и продукции Т-клетками ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2 и ИЛ-4 [1, 3, 13], а В-лимфоцитами, наряду с макрофагами, моноцитами и нейтрофилами, — ИЛ-6 [1, 2, 3, 14]) при интоксикации малатионом, а также при комбинированном эффекте ФОС и атропина обусловлено действием на лимфоциты как молекулы токсиканта, так и

его более токсичного метаболита малооксона [4] вследствие ингибирования ацетилхолинэстеразы Т-клеток и ЕКК, инициации перекисного окисления липидов (ПОЛ) в лимфоцитах, эффекта кортикостероидов (вследствие активации ФОС гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы), уменьшения внутриклеточного уровня порфирина в ЕКК и проникновения гранзимов этих клеток в клетку-мишень [1]. На редукцию активности ЕКК влияет также супрессия продукции Т-клетками ИЛ-2, ИЛ-4 [1, 3].

Более выраженная редукция функции Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами может быть обусловлена существенным увеличением в крови вследствие острой интоксикации малатионом концентрации кортикостерона [1], 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 [1]. Атропин усиливал супрессию функции Т-лимфоцитов и ЕКК, а также редукцию синтеза ИФН- $\gamma$ , 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 [1]. Увеличение атропином супрессии функции В-клеток (в Т-независимой иммунной реакции), не содержащих ацетилхолинэстеразы, обусловлено, видимо, воздействием антидота на м-холинорецепторы в комбинации с активацией молекулой ФОС (ее метаболитами) и ацетилхолином н-холинорецепторов В-лимфоцитов [1].

## ВЫВОДЫ

1. Острое отравление малатионом ( $0,75 LD_{50}$ ) снижает в большей степени функцию Th1-клеток, чем Th2-лимфоцитов, уменьшает активность В-клеток, ЕКК, содержание в крови ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4, существенно не влияя на концентрацию ИЛ-10 и ИЛ-13.

2. Введение при острой интоксикации малатионом атропина ( $10 \text{ мг/кг}$ ) увеличивает редукцию функции Т- и В-лимфоцитов, ЕКК, а также синтеза иммунорегуляторных цитокинов ИФН- $\gamma$ , ИЛ-2, ИЛ-4. Атропин при отравлении малатионом не влияет на супрессию синтеза клетками крови провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$  и ИЛ-6, а также на содержание прогнатовоспалительных цитокинов ИЛ-10 и ИЛ-13.

## ЛИТЕРАТУРА

1. П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, *Иммунотоксикология ксенобиотиков*, СВИБХБ, Саратов (2007).
2. П. Ф. Забродский, М. С. Громов, В. В. Масляков, *Токсикол. вестник*, 3, 22 – 25 (2014).

Таблица 2. Влияние атропина сульфата ( $10 \text{ мг/кг}$ ) на содержание цитокинов в крови белых крыс при острой интоксикации малатионом ( $0,75 LD_{50}$ ) (4 сут,  $\mu\text{г/мл}$ ;  $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Цитокины	Контроль	Малатион	Малатион + атропин
ФНО $\alpha$	$37 \pm 5$	$21 \pm 3^a$	$16 \pm 3^a$
ИЛ-1 $\beta$	$28 \pm 4$	$16 \pm 3^a$	$15 \pm 4^a$
ИЛ-6	$45 \pm 6$	$25 \pm 4^a$	$19 \pm 4^a$
ИФН- $\gamma$	$905 \pm 102$	$390 \pm 40^a$	$250 \pm 32^b$
ИЛ-2	$1054 \pm 112$	$492 \pm 51^a$	$340 \pm 38^b$
ИЛ-4	$132 \pm 15$	$83 \pm 9^a$	$51 \pm 7^b$
ИФН $\beta$ /ИЛ-4	$6,9 \pm 0,5$	$4,7 \pm 0,3^a$	$4,9 \pm 0,4^a$
ИЛ-10	$287 \pm 31$	$220 \pm 27$	$206 \pm 25$
ИЛ-13	$105 \pm 13$	$88 \pm 10$	$93 \pm 12$

<sup>a</sup> —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; <sup>b</sup> —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и показателем при интоксикации.

3. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, *Иммунология*, пер. с англ., Мир, Москва (2000).
4. W. G. Aker, X. Hu, P. Wang, H. M. Hwang, *Environ. Toxicol.*, **23**(4), 548 – 554 (2008).
5. K. L. Becker, E. S. Nyle., J. C. White, et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **89**(4), 1512 – 1525 (2004).
6. M. R. Bonner, J. Coble, A. Blair, et al., *Am. J. Epidemiol.*, **166**(9), 1023 – 1034 (2007).
7. C. E. Brightling, S. Saha, F. Hollins, *Clin. Exp. Allergy*, **40**(1), 42 – 49 (2010).
8. E. J. Hulse, J. O. Davies, A. J. Simpson, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **190**(12), 1342 – 1354 (2014).
9. A. M. King, C. K. Aaron, *Emerg. Med. Clin. North Am.*, **33**(1), 133 – 151 (2015).
10. J. V. Peter, T. I. Sudarsan, J. L. Moran, *Indian J. Crit. Care Med.*, **18**(11), 735 – 745 (2014).
11. G. RamaRao, P. Afley, J. Acharya, B. K. Bhattacharya, *BMC Neurosci.*, **15**(47), 1 – 11 (2014).
12. T. W. Sawyer, J. Mikler, F. Worek, et al., *Toxicol. Let.*, **204**(1), 52 – 56 (2011).
13. J. R. Schoenborn, C. B. Wilson, *Adv. Immunol.*, **96**, 41 – 101 (2007).
14. R. A. Sitapara, D. J. Antoine, L. Sharma, et al., *Mol. Med.*, **20**, 238 – 247 (2014).
15. N. Yanagisawa, *Brain Nerve*, **66**(5), 561 – 569 (2014).

Поступила 13.01.15

## CHANGES IN THE FUNCTION OF LYMPHOCYTES AND CYTOKINE CONCENTRATION IN BLOOD CAUSED BY THE ACTION OF ATROPINE UNDER CONDITIONS OF ACUTE MALATHION INTOXICATION

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

Saratov Branch of Samara Medical Institute REAVIZ, Degtyarnaya ploshch. 1-A, Saratov, 410076 Russia

It was established in experiments on noninbred albino rats that acute intoxication with malathion (0.75 LD<sub>50</sub>) reduced the function of Th1 cells more significantly than the function of Th2 lymphocyte, decreases the activity of B cells and NK cells, blood levels of TNFα, IL-1b and IL-6, IFN-γ, IL-2, and IL-4, while not significantly affecting the concentration of IL-10 and IL-13. Atropine (10 mg/kg) under conditions of acute malathion intoxication improved the function of T cells and B lymphocytes, NK cells, as well as the synthesis of immunoregulatory cytokines IFN-γ, IL-2, and IL-4. At the same time, atropine in malathion intoxicated rats had no effect on suppression of the synthesis of proinflammatory cytokines TNF, IL-1g and IL-6 as well as the content of anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-13.

**Keywords:** malathion; atropine; Th1- and Th2-lymphocytes; immunotoxicity; cytokines.