

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОТРАВЛЕНИЙ

НАРУШЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПРИМЕНЕНИЕМ ИМУНОФАНА

П. Ф. Забродский¹, В. Г. Лим², Е. В. Стрельцова¹

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что хроническая интоксикация фосфорорганическими соединениями заринном и метилпаратионом (30 сут, суммарная доза — 0,9 DL₅₀; 0,03 мг/кг ежедневно, однократно) снижает иммунные реакции, уменьшает концентрации в крови цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10. В большей степени поражаются Th1-клетки по сравнению с Th2-лимфоцитами. Применение имунофана (20 мкг/кг в течение 5 сут, ежедневно, однократно) частично восстанавливает иммунный статус и содержание цитокинов в крови.

Ключевые слова: фосфорорганические вещества, Th1-, Th2-лимфоциты, иммунотоксичность, цитокины, имунофан

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование фосфорорганических соединений (ФОС) в сельском хозяйстве и быту может приводить к загрязнению окружающей среды, вызывать острые, подострые и хронические интоксикации [1, 2, 14]. Отравления могут вызывать также ФОС и различные антихолинэстеразные соединения (обладающие практически такой же токсикодинамикой, как ФОС), используемые в медицине. Кроме того, в настоящее время химическое оружие (ХО) на основе ФОС (российского VX, зарина, зомана) уничтожается согласно Конвенции о запрещении разработки, производства, накопления и применения ХО и его уничтожении [2, 4]. При этом не исключена возможность возникновения аварийных ситуаций в процессе уничтожения ХО, в частности, ФОС, которые могут приводить заражению почвы, воздуха, воды, приводить к поражению персонала химических объектов и населения прилегающих территорий. Существует вероятность использования ФОС в террористических и криминальных целях [4, 12].

В последнее время за рубежом активно ведутся разработки высокоэффективных антидотных средств при поражении ФОС [7, 11, 13], анализируются их отдаленные эффекты [12].

Нарушения функции иммунной системы, в частности, Th1- и Th2-лимфоцитов и синтеза Т-клетками и другими клетками крови цитокинов при хроническом отравлении ФОС практически не исследованы [2]. Существует необходимость оценки влияния хронической интоксикации ФОС на иммунные реакции и продукцию Th1- и Th2-лимфоцитами цитокинов с целью возможности фармакологической коррекции постинтоксикационных нарушений иммунного гомеостаза [1, 2].

Данные литературы позволяют предполагать, что применение имунофана (гексапептид с молекулярной массой 836 Да — аргинил-альфа-аспартил-лизил-валил-тирозил-аргинин, синтетическое производное тимопоэтина) способно обеспечить восстановление показателей системы иммунитета после хронической интоксикации ФОС [2, 3].

Целью исследования являлась оценка хронического действия ФОС (зарина и метилпаратиона) на иммунные реакции, содержание цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 в крови и возможности коррекции нарушений применением имунофана.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на беспородных белых крысах обоего пола массой 180 – 240 г. ФОС — зарин (НИИ Саратовского военного института биологической и химической безопасности), метилпаратион (“Sigma-Aldrich”) — вводили подкожно ежедневно в течение 30 сут в дозе 0,03 DL₅₀. DL₅₀ зарина и метилпаратиона при подкожном введении составляли соответственно 0,018 ± 0,004 и 0,24 ± 0,02 мг/кг. Имунофан вводили внутримышечно в течение 5 сут в дозе 20 мкг/кг (ежедневно, однократно) на 26-е сутки после первого введения ФОС. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии и иммунологии [2, 5] после хронической интоксикации ФОС через 30 сут после первой инъекции антихолинэстеразных веществ. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому антигену (эритроцитам барана, ЭБ), характеризующую способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции плазматическими клетками IgM, определяли по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке через 4 сут после иммунизации (пик продукции IgM), которую проводили внутрибрюшинно в дозе 2 · 10⁸ на 26-е сутки после первого введения ФОС. 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 · 10⁸) вводили под апоневроз стопы зад-

¹ Саратовский военный институт биологической и химической безопасности.

² Саратовский государственный медицинский университет им. В. И. Разумовского, 410710, Саратов, ул. Большая Казачья, 112.

ней лапы через 4 суток после иммунизации, которую проводили внутрибрюшинно на 26-е сутки после первого введения ФОС. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч. Функцию Th2-лимфоцитов исследовали по числу АОК, синтезирующих IgG к ЭБ, в селезенке на пике продукции данного иммуноглобулина (на 14-е сутки после иммунизации) методом непрямого локального гемолиза в геле [5]. При этом крыс иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток на 17-е сутки после первого введения ФОС. Таким образом, при оценке всех иммунных реакций животные получали суммарную дозу ФОС, составляющую 0,9 DL₅₀.

Концентрацию цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 исследовали в плазме крови крыс через 30 сут после первой инъекции ФОС методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits) фирмы "BioSource Int". При этом ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10 определяли через 4 сут после иммунизации ЭБ, а ИЛ-4 — на 14-е сутки. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После хронической интоксикации заринном и метилпараатином (табл. 1) через 30 сут происходило снижение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (по числу АОК к ЭБ в селезенке через 4 сут после иммунизации), характеризующему функцию Th1-лимфоцитов и синтез IgM, по сравнению с контрольным уровнем соответственно в 2,02 и 2,35 раза ($p < 0,05$).

После хронической интоксикации заринном и метилпараатином отмечалась также существенная редукция активности Th1-лимфоцитов, оцениваемая по реакции ГЗТ, соответственно в 1,97 и 2,16 раза ($p < 0,05$). Через 30-сут после интоксикации заринном и метилпараатином отмечалась супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке на 14-е сутки после иммунизации ЭБ), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, соответственно в 1,6 и 1,48 раза ($p < 0,05$).

Параметры, характеризующие клеточную и гуморальную иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, после хронического воздействия ФОС в среднем снижались соответственно в 2,13 и 1,54 раза. Это свидетельствует о том, что под влиянием ФОС в большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов.

Таблица 1. Влияние имунофана на функцию Th1- и Th2-лимфоцитов белых крыс после хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,9 DL₅₀, 30 сут), пг/мл ($M \pm m$, $n = 9 - 12$)

Серия опытов	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10^3	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10^3
Контроль	47,1 ± 4,3	37,9 ± 3,5	55,2 ± 5,6
Зарин	23,3 ± 2,8*	19,2 ± 2,0*	34,5 ± 3,6*
Метилпараатин	20,0 ± 2,4*	17,1 ± 1,9*	37,4 ± 4,6*
Зарин + имунофан	39,1 ± 3,7	32,2 ± 3,1	43,0 ± 4,4
Метилпараатин + имунофан	41,9 ± 3,8	29,9 ± 3,0	46,7 ± 4,8

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

Имунофан частично восстанавливал иммунные реакции, характеризующие функцию Th1- и Th2-лимфоцитов. При этом данные параметры отличались от контрольных значений несущественно ($p > 0,05$).

Полученные данные в отношении большей редукции активности Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-лимфоцитами после хронической интоксикации ФОС подтверждаются оценкой концентрации цитокинов в крови крыс (табл. 2). После интоксикации заринном и метилпараатином через 30 сут выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ (на 5-е сутки после иммунизации ЭБ) — в 2,46 и 2,28 раза ($p < 0,05$), а ИЛ-4 (на 14-е сутки после иммунизации ЭБ) — в 1,52 и 1,81 раза ($p < 0,05$) соответственно. Это свидетельствует о том, что по сравнению с ИЛ-4 концентрация ИФН- γ в крови под влиянием ФОС снижается в большей степени.

Уменьшение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 характеризует большее снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [5, 6]. Так, установлено, что при действии зарина и метилпараатиона соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 было существенно ниже контрольного уровня, равного 9,8, и составляло в среднем 6,9.

Вероятно, данный эффект обусловлен способностью ФОС активировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, увеличивая в крови концентрацию кортикостерона [2]. При этом известно, что данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [5]. 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 [2].

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 [8].

Применение имунофана частично восстанавливало содержание ИФН- γ , ИЛ-4 и соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 до контрольных уровней. При этом данные параметры отличались от контроля статистически незначимо ($p > 0,05$).

При исследовании концентрации в плазме крови крыс цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10 (табл. 3) установлено уменьшение их содержания через 30 сут после хронического действия зарина соответственно в 1,9; 1,75 и 1,41 раза ($p < 0,05$), а при действии метилпараатиона — в 1,77; 2,07 и 1,56 раза ($p < 0,05$).

Уменьшение в крови под влиянием ФОС ИЛ-2 свидетельствует о снижении его синтеза Т-лимфоцитами (как CD4+, относящимися к лимфоцитам Th0- типа, так и неко-

Таблица 2. Влияние имунофана на содержание цитокинов в плазме крови крыс после хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,9 DL₅₀, 30 сут), пг/мл ($M \pm m$, $n = 7$)

Серия опытов	ИФН- γ	ИЛ-4	ИФН γ /ИЛ-4
Контроль	1210 ± 102	123 ± 11	9,8
Зарин	492 ± 51*	81 ± 6*	6,0
Метилпараатин	530 ± 60*	68 ± 7*	7,8
Зарин + имунофан	989 ± 97	109 ± 9	9,1
Метилпараатин + имунофан	1108 ± 99	117 ± 10	9,5

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

торыми CD8+), супрессии пролиферации Т- и В-клеток (синтеза J-цепи молекулы иммуноглобулина), активности естественных клеток-киллеров (ЕКК) [5, 9].

Снижение в крови провоспалительного цитокина ИЛ-6 (в определенных условиях этот цитокин проявляет и противовоспалительные свойства) характеризует уменьшение его синтеза макрофагами и лимфоидными дендритными клетками вследствие их поражения ФОС [5, 9].

Содержание в крови противовоспалительного цитокина ИЛ-10, продуцируемого Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками и снижающего секрецию ИФН- γ Th1-лимфоцитами [9, 10], уменьшалось после хронической интоксикации ФОС. Супрессия 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 [9].

Имунофан частично восстанавливал содержание интерлейкинов в крови вследствие его иммуностимулирующего действия на все звенья системы иммунитета, а также в результате его детоксицирующего, гепатопротекторного и антиоксидантного эффектов [1]. Известно, что антиоксидантное действие имунофана предотвращает повреждение ДНК лимфоцитов и гранулоцитов, вызванное химическими факторами окружающей среды (токсикантами) [3].

ВЫВОДЫ

1. Хроническое действие ФОС (зарина и метилпаратиона) в течение 30 сут в суммарной в дозе, составляющей 0,9 DL₅₀ (по 0,03 DL₅₀ ежедневно), в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов, по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-клеток.

2. После хронического воздействия ФОС концентрация в крови ИФН- γ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижается в большей степени, чем содержание ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками.

3. Хроническая интоксикация ФОС снижает концентрацию в крови ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10.

4. Имунофан (20 мкг/кг в течение 5 сут, ежедневно, однократно) частично восстанавливает иммунный статус и содержание цитокинов в крови.

Таблица 3. Влияние имунофана на содержание цитокинов ИЛ-2, ИЛ-6 и ИЛ-10 в плазме крови крыс после хронической интоксикации ФОС (суммарная доза 0,9 DL₅₀, 30 сут), пг/мл ($M \pm m$, $n = 7$)

Серия опытов	ИЛ-2	ИЛ-6	ИЛ-10
Контроль	1342 ± 105	91 ± 11	530 ± 51
Зарин	705 ± 80*	52 ± 5*	377 ± 41*
Метилпаратион	758 ± 81*	44 ± 5*	340 ± 36*
Зарин + имунофан	1130 ± 98	79 ± 8	476 ± 45
Метилпаратион + имунофан	1092 ± 103	87 ± 9	505 ± 54

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

ЛИТЕРАТУРА

1. П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, *Иммунотоксикология ксенобиотиков*, СВИБХБ, Саратов (2007).
2. П. Ф. Забродский, *Общая токсикология*, Б. А. Курляндский, В. А. Филов (ред.), Медицина, Москва (2002), сс. 352 – 384.
3. А. В. Караулов, В. Ф. Ликов, И. В. Евстигнеева, Д. В. Кокушкова, *Аллергология и иммунология*, **6**(2), 136 – 137 (2005).
4. А. Н. Петров, Г. А. Софронов, С. П. Нечипоренко, И. Н. Соколин, *Рос. хим. журн.*, **XLVIII**(2), 110 – 116 (2004).
5. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, *Иммунология (Пер. с англ.)*, Мир, Москва (2000).
6. Г. Т. Сухих, Н. М. Касабулатов, Л. В. Ванько и др, *Бюл. экпер. биол.*, **140**(12), 622 – 624 (2005).
7. G. Amitai, R. Adani, E. Fishbein, et al., *J. Appl. Toxicol.*, **26**(1), 81 – 87 (2006).
8. B. Asquith, Y. Zhang, A. J. Mosley, C. M. de Lara, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**(19), 8035 – 8040 (2007).
9. V. St. Georgiev, J. E. Albright, *Immunomodulation drugs, Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.*, **685**, 284 – 602 (1993).
10. H. S. Kim, J. H. Eom, H. Y. Cho, et al., *J. Toxicol. Environ. Health*, **70**(15 – 16), 1278 – 1287 (2007).
11. D. E. Lenz, D. M. Maxwell, I. Korlovich, et al., *Chem. Biol. Interact.*, 157 – 158, 205 – 210 (2005).
12. D. Sharp, *Lancet*, **14**(367), (9505), 95 – 97 (2006).
13. T. M. Shin, R. K. Kan., J. H. McDonough, *Chem. Biol. Interact.*, 157 – 158, 293 – 303 (2005).
14. P. Tremolada, A. Finizio, S. Villa, et al., *Aquat. Toxicol.*, **67**(1), 87 – 103 (2004).

Поступила 12.05.11

DISTURBANCES OF IMMUNE STATUS AND CYTOKINE PROFILE CAUSED BY CHRONIC INTOXICATION WITH ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS AND THEIR CORRECTION BY ADMINISTRATION OF IMUNOFAN

P. F. Zabrodskii¹, V. G. Lim², and E. V. Strel'tsova¹

¹ Saratov Military Institute of Biological and Chemical Safety, prosp. 50 Let Oktyabrya 5, Saratov, 410037, Russia

² Razumovskiy Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410710, Russia

Experiments on noninbred rats showed that the chronic intoxication with organophosphorus compounds sarin and methylparathion (30 days; total dose, 0.9 LD₅₀; single daily dose, 0.03 mg/kg,) significantly decreases the immune responses and reduces the concentrations of blood cytokines IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, and IL-10. The damage is more pronounced in Th1 cells than in Th2 lymphocytes. The administration of imunofan (single daily dose, 20 μ g/kg) for 5 days partly recovers the immune status and the content of cytokines in the blood.

Key words: Organophosphorus compounds, Th1 and Th2-lymphocytes, immunotoxicity, cytokines, imunofan