

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ ОТРАВЛЕНИЙ

РЕДУКЦИЯ ИММУННЫХ РЕАКЦИЙ И СИНТЕЗА ЦИТОКИНОВ, СВЯЗАННЫХ С ФУНКЦИЕЙ TH1-, TH2-ЛИМФОЦИТОВ, И ИХ КОРРЕКЦИЯ ПОЛИОКСИДОНИЕМ ПРИ ПОДОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

П. Ф. Забродский¹, В. Ф. Киричук², И. Х. Яфарова², В. Г. Лим², А. А. Свистунов²

В экспериментах на крысах Вистар установлено, что при подостром отравлении фосфорорганическими соединениями (ФОС) в суммарной дозе 1 DL₅₀ супрессия клеточных и гуморальных реакций и снижение концентрации в крови цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4) с уменьшением соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 свидетельствует о том, что редукция функции Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-клетками более выражена. Иммуномодулятор полиоксидоний (700 мкг/кг) при ежедневном применении в течение четырех суток при подострой интоксикации ФОС восстанавливает клеточный и гуморальный иммунный ответ и синтез цитокинов.

Ключевые слова: фосфорорганические соединения, иммуноотоксичность, Th1-, Th2-лимфоциты, цитокины, полиоксидоний

ВВЕДЕНИЕ

Широкое использование фосфорорганических (ФОС) в сельском хозяйстве может приводить к загрязнению местности (почва, вода), вызывать острые, подострые и хронические интоксикации. Это предполагает изучение механизмов формирования постинтоксикационного иммунодефицитного состояния при отравлениях ФОС с целью профилактики и лечения возникающих при этом инфекционных осложнений и заболеваний [1]. Не исключено возникновение аварийных ситуаций на промышленных предприятиях и химических объектах, занимающихся уничтожением токсичных химикатов антихолинэстеразного действия (фосфорорганических отравляющих веществ). Это может сопровождаться выбросом в окружающую среду ФОС, а также поражением людей [1, 4].

В настоящее время за рубежом ведутся разработки высокоэффективных антидотных средств при поражении боевыми ФОС [9, 12, 14], анализируются их отдаленные эффекты [13].

Разработка наряду с антидотными средствами способов снижения поражения системы иммунитета различными ФОС предполагает дальнейшее изучение их иммуотропных эффектов с целью обоснования способов коррекции постинтоксикационного нарушения иммунного гомеостаза [1, 2].

Можно полагать, что в реализации иммуноотоксических эффектов при отравлениях ФОС существенное

значение имеет поражение ими Th1- и Th2-лимфоцитов [2]. Данные литературы позволяют предполагать, что применение полиоксидония (ПО), обладающего иммуностимулирующим действием в отношении преимущественно Т-лимфоцитов [3], а также антиоксидантными, детоксикационными и мембраностабилизирующими свойствами [8], способно обеспечить восстановление показателей Т- и В-систем иммунитета после отравления ФОС.

Целью исследования являлась оценка супрессии иммунных реакций, связанных с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов (соответственно ИФН- γ и ИЛ-4), а также исследование эффективности полиоксидония для коррекции нарушений иммунного гомеостаза при подостром отравлении ФОС.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на крысах Вистар обоего пола массой 180 – 240 г. Отравление вызывали ФОС — диметилдихлорвинилфосфатом (ДДВФ), малатионом и диметилпаратионом. ФОС применяли в дозе 1/4 DL₅₀ в течение 4-х суток и 1/13 DL₅₀ в течение 13-и суток для оценки соответственно функции Th1- и Th2-лимфоцитов. DL₅₀ ДДВФ, малатиона и диметилпаратиона при подкожном введении составляли соответственно 64,5 ± 2,3; 815,4 ± 28 и 25,3 ± 2,6 мг/кг. При оценке эффективности иммуностимулятора ПО его вводили внутримышечно в течение 4-х суток в дозе 700 мкг/кг (ежесуточно, однократно). Первую дозу ПО животные получали практически одновременно с иммунизацией эритроцитами барана (ЭБ) и введением первой дозы

¹ Саратовский военный институт биологической и химической безопасности.

² Саратовский государственный медицинский университет, Саратов, 410710, ул. Большая Казачья, 112.

ФОС (ДДВФ, обладающим наибольшей иммунотоксичностью). Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии [1, 5]. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому антигену (ЭБ), характеризующую способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции В-лимфоцитами (плазматическими клетками) IgM, определяли по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке через 4 суток после иммунизации, функцию Th1-лимфоцитов — по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Формирование ГЗТ исследовали у животных по приросту массы стопы задней лапы в %. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы на 4-е сутки после иммунизации. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч. Функцию Th2-лимфоцитов исследовали по числу АОК, синтезирующих IgG к ЭБ, в селезенке на пике продукции данного иммуноглобулина (14 сут) методом непрямого локального гемолиза в геле [5]. Крыс иммунизировали ЭБ внутривенно в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток одновременно с первым введением ФОС. Таким образом, при оценке всех иммунных реакций животные получали суммарную эквивалентную дозу ФОС (1 DL₅₀). Концентрацию цитокинов ИФН- γ и ИЛ-4, характеризующих функцию соответственно Th1- и Th2-лимфоцитов [5, 7], определяли в крови крыс на 5-е и 14-е сутки после первой инъекции ФОС методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) [Po5], используя наборы (ELISA Kits) фирмы "BioSource Int". Сроки определения цитокинов в крови соответствовали особенностям иммуногенеза при иммунизации эритроцитами барана. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия достоверности Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Под влиянием ФОС (табл. 1) происходило снижение гуморального иммунного ответа через 4 суток по сравнению с контрольным уровнем к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов. Так,

Таблица 1. Влияние подострой интоксикации фосфорорганических соединений на показатели системы иммунитета крыс ($M \pm m, n = 7 - 9$)

Серия опытов	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10^3	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10^3
Контроль	47,5 ± 4,0	40,3 ± 2,9	58,9 ± 4,6
ДДВФ	20,7 ± 2,1*	19,5 ± 2,1*	40,4 ± 3,7*
Малатион	25,6 ± 2,3*	24,2 ± 2,4*	46,0 ± 3,9*
Диметилпаратион	23,9 ± 2,5*	22,3 ± 2,3*	44,1 ± 3,6*

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

ДДВФ, малатион и диметилпаратион уменьшали данную реакцию соответственно в 2,29; 1,86 и 1,99 раза ($p < 0,05$). При отравлении ДДВФ, малатионом и диметилпаратионом отмечалась также существенная редукция функции Th1-лимфоцитов, оцениваемая по реакции ГЗТ, соответственно в 2,07; 1,67 и 1,81 раза ($p < 0,05$). На 14-е сутки после иммунизации отмечалась супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, при применении ДДВФ, малатиона и диметилпаратиона соответственно в 1,46; 1,28 и 1,34 раза ($p < 0,05$).

Показатели, характеризующие различные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при подостром действии ФОС в среднем снижались соответственно в 1,95 и 1,36 раза. Это свидетельствует о том, что под влиянием ФОС в существенно большей степени поражается функция Th1-лимфоцитов.

Применение полиоксидония восстанавливало функцию лимфоцитов Th1- и Th2-типа, оцениваемую по иммунным реакциям, до контрольного уровня.

Данное заключение подтверждается исследованием концентрации цитокинов в периферической крови крыс (табл. 2). При подострой интоксикации ДДВФ, малатионом и диметилпаратионом выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ в 1,95; 1,77 и 2,09 раза ($p < 0,05$), а ИЛ-4 — в 1,57; 1,45 и 1,66 раза ($p < 0,05$) соответственно. Полученные данные свидетельствуют 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 снижение функциональной активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [5, 6]. Нами установлено, что при действии ДДВФ, малатиона и диметилпаратиона соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 было существенно ниже контрольного уровня, равного 6,6, и составляло соответственно 5,3; 5,4 и 5,2. Это свидетельствует о более выраженной супрессии ФОС функции Th1-лимфоцитов по сравнению со снижением активности Th2-клеток. Вероятно, данный эффект обусловлен способностью ФОС акти-

Таблица 2. Влияние подострой интоксикации фосфорорганических соединений на содержание цитокинов в крови крыс, пг/мл ($M \pm m, n = 7$)

Серия опытов	ИФН- γ	ИЛ-4	ИФН- γ /ИЛ-4
Контроль	905 ± 75	138 ± 13	6,6
ДДВФ	465 ± 47*	88 ± 7*	5,3
Малатион	510 ± 43*	95 ± 10*	5,4
Диметилпаратион	432 ± 42*	83 ± 8*	5,2
ДДВФ + ПО	867 ± 70	124 ± 12	7,0

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

вировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему, увеличивая в крови концентрацию кортикостерона [1]. 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 на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа и α -нафтил-AS-ацетатэстеразу и α -нафтилбутиратэстеразу в цитозоле этих клеток [1], а эстеразы играют большую роль в реализации функций лимфоцитов Th1-типа.

Полученные данные позволяют полагать, что относительное увеличение активности Th2-лимфоцитов по сравнению с функцией Th1-клеток при отравлении ФОС может приводить к увеличению вероятности вирусных инфекций (по сравнению с микробными) и респираторных аллергических реакций вследствие относительно более высокого синтеза В-клетками IgE [5, 7, 10, 11].

Применение полиоксидония восстанавливало функцию лимфоцитов Th1- и Th2-типа, оцениваемую по продукции ими соответственно ИФН- γ и ИЛ-4, до контрольного уровня (табл. 2).

ВЫВОДЫ

1. Подострое действие фосфорорганических соединений (ФОС) (ДДВФ, малатион, диметилпаратион) в суммарной дозе, составляющей 1 DL_{50} , в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов, по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-лимфоцитов.

2. Под влиянием ФОС концентрация в крови ИФН- γ , продуцируемого Th1-лимфоцитами, снижает-

ся в большей степени, чем концентрация ИЛ-4, синтезируемого Th2-клетками.

3. Применение полиоксидония (ежедневно, однократно, в течение 4-х суток в дозе 700 мкг/кг) при подострой интоксикации ФОС восстанавливает сниженные иммунные реакции и синтез цитокинов ИФН- γ и ИЛ-4, связанные соответственно с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, *Иммунотоксикология ксенобиотиков*, СВИБХБ, Саратов (2007).
2. П. Ф. Забродский, В. Г. Германчук, В. Г. Мандыч, *Бюл. экпер. биол.*, **146**(8), 622 – 624 (2008).
3. И. В. Нестерова, *Аллергология и иммунология*, **6**(2), 139 – 140 (2005).
4. А. Н. Петров, Г. А. Софронов, С. П. Нечипоренко, И. Н. Солин, *Рос. хим. ж.*, **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. Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович, *Иммунология* (2-е изд., перераб. и доп.), Медицина, Москва (2002).
8. Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, *Иммунология*, **26**(4), 197 (2005).
9. G. Amitai, R. Adani, E. Fishbein, et al., *J. Appl. Toxicol.*, **26**(1), 81 – 87 (2006).
10. B. Asquith, Y. Zhang, A. J. Mosley, and C. M. de Lara, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**(19), 8035 – 8040 (2007).
11. P. J. Delves and I. M. Roitt, *New Engl. J. Med.*, **343**, 37 – 49, (2000).
12. D. E. Lenz, D. M. Maxwell, I. Korlovich, et al., *Chem. Biol. Interact.*, 157 – 158, 205 – 210 (2005).
13. D. Sharp, *Lancet*, **14**(367) (9505), 95 – 97 (2006).
14. T. M. Shin, R. K. Kan, and J. H. McDonough, *Chem. Biol. Interact.* 157 – 158, 293 – 303 (2005).

Поступила 20.11.08

REDUCTION OF THE IMMUNE RESPONSES AND SYNTHESIS OF CYTOKINES ASSOCIATED WITH TH1 AND TH2 LYMPHOCYTE FUNCTION AND THEIR CORRECTION BY POLYOXIDONIUM UNDER CONDITIONS OF SUBACUTE INTOXICATION BY ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS

P. F. Zabrodskii¹, V. F. Kirichuk², I. Kh. Yafarova², V. G. Lim², and A. A. Svistunov²

¹ Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410710, Russia

² Saratov Military Institute of Biological and Chemical Safety, Saratov, 410037, Russia

Experiments on Wistar rats showed that subacute poisoning by organophosphorus compounds dimethyldichlorovinyl phosphate (DDVF), malation, and dimethylparation (total dose, 1.0 LD_{50}) suppresses both cell and humoral immune responses and significantly decreases the level of blood cytokines (IFN γ , IL-4) and the IFN γ /IL-4 ratio in comparison to the control, which is evidence for a greater lesion of Th1 cells in comparison to Th2 cells. The immunomodulator polyoxidonium administered for four days in a daily dose of 700 μ g/kg under conditions of subacute intoxication with organophosphorus compounds restores the cell and humoral immune responses and the synthesis of cytokines.

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