

# ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

## РОЛЬ М-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ В РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИИ Th1- И Th2-ЛИМФОЦИТОВ

П. Ф. Забродский, В. Г. Германчук, В. Г. Мандыч<sup>1</sup>

В экспериментах на крысах Вистар установлено, что активация м-холинорецепторов ацеклидином (ежедневное подкожное введение в дозе 0,05 DL<sub>50</sub> в течение 3 сут) в большей степени увеличивает функцию Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-лимфоцитами, а при блокаде м-холинорецепторов атропином в эквивалентной дозе супрессия функции Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-клетками более выражена.

**Ключевые слова:** м-холинорецепторы, регуляция иммунного ответа, Th1-, Th2-лимфоциты, цитокины

### ВВЕДЕНИЕ

В 1974 г. было доказано наличие м- и н-холинорецепторов на Т-лимфоцитах мышей, крыс и других животных, а также человека [2, 15]. При этом стимуляция м-холинорецепторов увеличивала активность Т-лимфоцитов [13]. Ацетилхолин (АХ) является одним из важнейших регуляторов иммунного ответа [1, 2], передача сигнала через м- или н-холинорецепторы запускает множество внутриклеточных процессов: активацию трансмембранных ионных потоков, активацию тирозинкиназ, G-белков, мобилизацию внутриклеточного кальция; увеличение концентрации цГМФ, выделение NO, простагландинов и других биологически активных молекул [4]. В настоящее время роль м-холинорецепторов в регуляции функции Th1- и Th2-лимфоцитов не исследована. Данный вопрос представляет теоретический интерес, а также имеет большое практическое значение в связи с широким использованием в медицине, промышленности, сельском хозяйстве и быту холинотропных веществ [2, 4], уничтожением антихолинэстеразных токсичных химикатов — ТХ (боевых отравляющих веществ), являющихся основным элементом химического оружия [3, 5], существующей возможностью использования антихолинэстеразных ТХ в террористических, криминальных и военных целях [5, 9, 11, 12, 14].

Целью исследования являлось изучение роли м-холинорецепторов в регуляции функции Th1 и Th2-лимфоцитов.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на крысах Вистар обоего пола массой 180 – 240 г. М-холиномиметик ацеклидин (АЦ) и м-холиноблокатор атропина сульфат вводили

однократно подкожно в дозе 0,05 DL<sub>50</sub> ежедневно в течение 3 сут после внутрибрюшинной иммунизации животных эритроцитами барана — ЭБ. DL<sub>50</sub> ацеклидина и атропина при подкожном введении составляли  $4,1 \pm 0,2$  и  $675 \pm 43$  мг/кг соответственно. Показатели системы иммунитета оценивали методами, принятыми в экспериментальной иммунологии [2]. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому антигену (ЭБ) определяли на 5-е сутки по числу антителобразующих клеток (АОК) в селезенке после иммунизации данным антигеном в дозе  $2 \cdot 10^8$  клеток, которую проводили практически одновременно с первым введением холинотропного вещества (ХТВ). В использованном тесте гуморальная иммунная реакция на введение ЭБ характеризует способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции В-лимфоцитами (плазматическими клетками) IgM [8]. АОК к ЭБ, синтезирующие IgG, определяли в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле на 8-е сутки [6]. Данная иммунная реакция характеризует преимущественно функцию Th2-лимфоцитов. Th1-лимфоциты обеспечивают возможность образования в этот период антителогенеза IgM и IgG2a, составляющих не более 20 % от всех подклассов IgG [6].

Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) через 4 суток после первого введения ХТВ спектрофотометрически. Формирование гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), характеризующую функцию Th1-лимфоцитов [8], определяли у животных по приросту массы стопы задней лапы в процентах. При этом крыс иммунизировали внутрибрюшинно  $10^8$  ЭБ через 30 мин после введения ХТВ. Разрешающую дозу ЭБ ( $5 \cdot 10^8$ ) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 суток. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч.

<sup>1</sup> Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической защиты, Саратов, 410037, ул. 50 лет Октября, 5.

Концентрацию цитокинов ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4, характеризующих функцию, соответственно, Th1- и Th2-лимфоцитов [6, 8], определяли в периферической крови крыс через 4 и 7 суток после первой инъекции ХТВ методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) [6], используя наборы (ELISA Kits) фирмы "BioSource Int".

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия достоверности Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После применения ацеклидина и атропина (табл. 1) происходило соответственно увеличение и снижение Т-зависимого гуморального иммунного ответа через 4 суток (по числу АОК в селезенке), характеризующего синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов, по сравнению с контрольным уровнем соответственно в 1,74 и 1,67 раза ( $p < 0,05$ ). АЦ через 7 суток после иммунизации приводил к возрастанию синтеза IgG (по числу АОК в селезенке) в 1,34 раза, которое свидетельствует о повышении преимущественно функции Th2-лимфоцитов. Атропин снижал активность этих клеток, оцениваемую по числу АОК в селезенке через 7 суток, в 1,39 раза ( $p < 0,05$ ). При действии АЦ и атропина отмечалась соответственно активация и редукция функции ЕКК соответственно в 1,47 и 1,61 раза ( $p < 0,05$ ) и реакции ГЗТ соответственно в 1,43 и 1,48 раза ( $p < 0,05$ ). Это обусловлено, вероятно, активацией АЦ и блокадой атропином м-холинорецепторов ЕКК и Th1-лимфоцитов и изменением вследствие этого продукции ИФН- $\gamma$  Th1-клетками. Известно, что данный цитокин активируют ЕКК [6, 10].

Параметры, характеризующие иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов, при действии АЦ в среднем повышались в 1,55, а иммунный ответ, обеспечиваемый Th2-лимфоцитами, — в 1,34 раза. Атропин снижал реакции, связанные с лимфоцитами Th1-типа в среднем в 1,57 раза, а иммунный ответ, в реализации которого участвуют Th2-лимфоциты — в 1,39 раза. Полученные данные свидетельствуют о том, что под влиянием АЦ происходит увеличение активности Th1-лимфоцитов в большей степени, чем Th2-лимфоцитов. Атропин в большей степени по срав-

нению с Th2-клетками снижал функцию Th1-лимфоцитов.

Это подтверждается исследованием концентрации цитокинов в периферической крови крыс (табл. 2). При действии АЦ выявлено увеличение концентрации ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 на 5-е сутки соответственно в 1,52 и 1,33 раза ( $p < 0,05$ ), а на 8-е — в 1,33 ( $p < 0,05$ ) и 1,12 раза ( $p > 0,05$ ) соответственно. Атропин вызывал уменьшение содержания в крови ИФН- $\gamma$  и ИЛ-4 на 5-е сутки в 1,79 и 1,45 раза ( $p < 0,05$ ), а на 8-е — соответственно в 1,64 и 1,35 раза ( $p < 0,05$ ). Полученные данные свидетельствуют о том, что при действии м-холинотропного АЦ по сравнению с ИЛ-4 концентрация ИФН- $\gamma$  в крови повышалась в большей степени, а при введении м-холиноблокатора атропина отмечалось снижение ИЛ-4 в меньшей степени, чем содержание ИФН- $\gamma$ .

Увеличение соотношения ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 по сравнению с контролем (6,5) при действии ацеклидина, составляющее 7,5 и 7,7 на 5-е и 8-е сутки соответственно характеризует повышение активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-лимфоцитов, а снижение соотношения ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4 при действии атропина, составляющее 5,3 и 5,4 соответственно на 5-е и 8-е сутки, свидетельствует о редукции функции лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток в большей степени [7].

Вероятно, данный эффект обусловлен наличием большего числа рецепторов к ацетилхолину (в частности, м-холинорецепторов) на мембране Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-клетками.

## ВЫВОДЫ

1. При активации м-холинорецепторов ацеклидином (ежедневно подкожно в дозе 0,05 DL<sub>50</sub> в течение 3 сут) происходит увеличение активности Th1-лимфоцитов в большей степени, чем Th2-лимфоцитов. Атропин в эквивалентной дозе в большей степени по сравнению с Th2-клетками снижал функцию Th1-лимфоцитов.

2. При действии м-холинотропного ацеклидина концентрация ИФН- $\gamma$  в крови по сравнению с ИЛ-4

Таблица 1. Влияние холинотропных веществ (ежедневное подкожное введение в дозе 0,05 DL<sub>50</sub> в течение 3 сут) на показатели системы иммунитета крыс ( $M \pm m$ ,  $n = 7 - 9$ )

Серия опытов	АОК к ЭБ (IgM), 10 <sup>3</sup>	АОК к ЭБ (IgG), 10 <sup>3</sup>	ЕЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	40,2 ± 3,8	17,2 ± 1,8	29,4 ± 3,0	32,2 ± 2,6
Ацеклидин	69,8 ± 5,3*	23,1 ± 2,0*	43,0 ± 2,8*	45,9 ± 3,1*
Атропин	24,1 ± 2,2*	12,4 ± 1,1*	18,3 ± 2,1*	21,7 ± 2,3*

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

Таблица 2. Влияние холинотропных веществ (ежедневное подкожное введение в дозе 0,05 DL<sub>50</sub> в течение 3 сут) на содержание цитокинов в периферической крови крыс, пг/мл ( $M \pm m$ ,  $n = 6$ )

Серия опытов	ИФН- $\gamma$	ИЛ-4	ИФН- $\gamma$ /ИЛ-4	
Контроль	897 ± 72	138 ± 12	6,5	
Ацеклидин	5	1365 ± 76*	183 ± 15*	7,5
	8	1196 ± 68*	155 ± 14	7,7
Атропин	5	502 ± 51*	95 ± 8*	5,3
	8	547 ± 52*	102 ± 10*	5,4

Примечание. 5, 8 — время исследования после иммунизации, сут; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем.

повышалась в большей степени, а при введении м-холинорецептора атропина отмечалось снижение ИЛ-4 в меньшей степени, чем содержание ИФН- $\gamma$ .

## ЛИТЕРАТУРА

1. П. Ф. Забродский, *Общая токсикология*, Б. А. Курляндский, В. А. Филов (ред.), Медицина, Москва (2002), сс. 352 – 384.
2. П. Ф. Забродский, В. Г. Лим., Г. М. Мальцева, А. О. Молотков, *Иммуотропные свойства холинергических веществ*, П. Ф. Забродский (ред), Издательство «Научная книга», Саратов (2005).
3. Е. И. Малочкина, Т. А. Зотова, А. И. Торубаров и др., *Токсикол. вестник*, № 5, 22 – 27 (2006).
4. Г. И. Нежинская, Н. А. Лосев, Н. С. Сапронов, *Экспер. и клин. фармакология*, № 6, 63 – 67 (2006).
5. А. П. Петров, Г. А. Софронов, С. П. Нечипоренко, И. Н. Сомин, *Рос. хим. ж.*, XLVIII(2), 110 – 116 (2004).
6. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, *Иммунологи (Пер. с англ.)*, Мир, Москва, (2000).
7. Г. Т. Сухих, Н. М. Касабулатов, Л. В. Ванько и др, *Бюл. экпер. биол.*, № 12, 622 – 624 (2005).
8. Р. М. Хаитов, Г. А. Игнатъева, И. Г. Сидорович, *Иммунология (2-е изд., перераб. и доп)*, Медицина, Москва (2002).
9. G. Amitai, R. Adani, E. Fishbein, et al., *J. Appl. Toxicol.*, **26**(1), 81 – 87 (2006).
10. P. J. Delves and I. M. Roitt, *New Engl. J. Med.*, **343**, 37 – 49, (2000).
11. D. E. Lenz, D. M. Maxwell, I. Korlovich, et al., *Chem. Biol. Interact.*, 157 – 158, 205 – 210 (2005).
12. N. Masuda, M. Tahatsu, Y. Mjnnau, and T. Ozawa, *Lancet*, 8962, 1446 – 1447 (1995).
13. D. P. Richman and B. G. W. Arnason, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**(9), 4632 – 4635 (1979).
14. D. Sharp, *Lancet*, **14**(367(9505)), 95 – 97 (2006).
15. T. B. Strom, A. T. Sytkowski, C. B. Carpenter, and J. P. Merrill, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**(4), 1330 – 1333 (1974).

Поступила 13.09.07

## THE ROLE OF M-CHOLINORECEPTORS IN REGULATION OF THE FUNCTION OF Th1 AND Th2 LYMPHOCYTES

P. F. Zabrodskii, V. G. Germanchuk, and V. G. Mandych

Saratov Military Institute of Radiation, Chemical and Biological Defense, Saratov, 410037, Russia

Experiments on Wistar rats showed that the activation of m-cholinoreceptors by aceclidine (daily administration in a dose of 0.05 LD<sub>50</sub>, s.c., for 3 days) enhanced the function of Th1 lymphocytes to a greater extent in comparison to Th2 lymphocytes. The blockage of m-cholinoreceptors by the atropin led to a more pronounced suppression of Th2 lymphocytes function in comparison to Th1 cells.