

УДК 615.285.7:546.18

ВЛИЯНИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИХ ИНСЕКТИЦИДОВ НА ФУНКЦИЮ ТН1- И ТН2-ЛИМФОЦИТОВ И ПРОДУКЦИЮ ИМИ ЦИТОКИНОВ

© 2007 Г.В. Шляхтин¹, П. Ф. Забродский², А.М. Кадушкин²

¹ Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского

² Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической защиты, г. Саратов

В экспериментах на беспородных крысах установлено, что при подостром отравлении фосфорорганическими инсектицидами диметилдихлорвинилфосфатом (ДДВФ), карбофосом и метафосом (ежедневное подкожное введение в дозе 1/7 DL₅₀ в течение 6 сут.) отмечается супрессия клеточных и гуморальных реакций, а также снижение концентрации в крови цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4) с уменьшением соотношения ИФН- γ /ИЛ-4. Это свидетельствует о том, что редукция функции Th1-лимфоцитов по сравнению с Th2-клетками более выражена.

Введение

В современных условиях особую актуальность представляет изучение действия веществ антропогенного происхождения на живые организмы, системы жизнеобеспечения и различные их ответные реакции, в частности, иммунные. Эта проблема является одной из центральных в общей и экспериментальной экологии. Особый интерес представляют фосфорорганические инсектициды (ФОИ), которые, согласно оценке Всемирной организации здравоохранения (2002 г.), относятся к наиболее опасным ксенобиотикам окружающей среды. Так, за последние 20 лет в 60 странах мира зарегистрировано 34 000 отравлений фосфорорганическими соединениями, при этом более 20% случаев было связано с их использованием в качестве инсектицидов в сельском хозяйстве [1, 2], загрязнением данными токсикантами воды, воздуха и почвы [1, 3]

Широкое распространение ФОИ может оказывать неблагоприятное воздействие на человека, животных, вызывать острые и хронические интоксикации. Это предполагает изучение механизмов формирования постинтоксикационного иммунодефицитного состояния с целью профилактики, возникающих в условиях экологического неблагополучия, различных инфекционных осложнений и заболеваний [3]. Не исключено возникновение аварийных ситуаций на промышленных

предприятиях и химических объектах, сопровождающихся выбросом в окружающую среду ФОИ, а также антихолинэстеразных токсичных химикатов (фосфорорганических отравляющих веществ – ФОВ) и поражением людей [4]. В настоящее время за рубежом активно ведутся разработки профилактических и лечебных средств при поражении ФОВ [5-7], анализируются их отдаленные эффекты [8]. В связи с этим представляется очень важным изучение иммуотрофных эффектов при поражении системы иммунитета человека и животных различными ФОИ, особенно воздействие их на функции Th1- и Th2-лимфоцитов [1, 3].

Можно предположить, что в реализации иммуотоксических эффектов при отравлениях ФОИ существенное значение имеет поражение ими Th1- и Th2-лимфоцитов [1].

Целью исследования являлась оценка роли Th1-, Th2-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-4) в формировании супрессии гуморальных и клеточных иммунных реакций при подостром отравлении ФОИ.

Материал и методы исследования

Эксперименты проводились на беспородных крысах обоего пола массой 180-240 г. Отравление вызывали ФОИ диметилдихлорвинилфосфатом (ДДВФ), карбофосом и метафосом, которые вводили животным ежедневно

подкожно в дозе $1/7 DL_{50}$ подкожно в течение 6 сут. (DL_{50} ДДВФ, карбофоса и метафоса при введении составляли, соответственно, $64,5 \pm 2,3$; $815,4 \pm 28,0$ и $25,3 \pm 2,6$ мг/кг). Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии [1]. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому антигену (эритроцитам барана – ЭБ) определяли на 5 сут. по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке после первого введения ФОИ с одновременной внутрибрюшинной иммунизацией крыс данными антигенами в дозах $2 \cdot 10^8$ клеток. В использованном тесте гуморальная иммунная реакция на введение ЭБ характеризует способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции В-лимфоцитами (плазматическими клетками) IgM [9]. При этом животные получали суммарную дозу токсиканта, составляющую $4/7 DL_{50}$. Кроме того, АОК к ЭБ, синтезирующие IgG, определяли в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле на 8 сут. [9, 10]. При этом животные получали суммарную дозу ФОИ, составляющую $6/7 DL_{50}$. Данные литературы позволяют считать, что этот метод характеризует преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, обеспечивающих синтез IgG₁, составляющих около 70% общего числа молекул данного этого класса [9]. Следует отметить, что Th1-лимфоциты обеспечивают возможность образования в этот период антителогенеза, кроме IgM и IgG_{2a}, составляющих не более 20% от всех подклассов IgG [9, 11].

Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) через 4 сут. после первого введения ФОИ спектрофотометрически. Формирование гиперчувствительно-

сти замедленного типа (ГЗТ), характеризующую функцию Th1-лимфоцитов [9], определяли у животных по приросту массы стопы задней лапы (в %). При этом крыс внутрибрюшинно иммунизировали 10^8 ЭБ через 30 мин. после введения ФОИ. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 час. Концентрацию цитокинов ИФН- γ и ИЛ-4, характеризующих функцию соответственно, Th1- и Th2-лимфоцитов [9, 12], определяли в периферической крови крыс через 4 и 7 сут. после первой инъекции ФОИ методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) [Ройтб], используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Под влиянием ФОИ происходило снижение гуморального иммунного ответа через 4 сут. по сравнению с контрольным уровнем к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов (табл. 1). Так, ДДВФ, карбофос и метафос уменьшали данную реакцию соответственно, в 2,40; 2,04 и 2,14 раза ($p < 0,05$). Через 7 сут. отмечалась супрессия продукции IgG (по числу АОК в селезенке), отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов, при ДДВФ, карбофоса и метафоса, соответственно, в 1,60 ($p < 0,05$); 1,20 ($p > 0,05$) и 1,39 раза ($p < 0,05$). При отравлении этими интоксикантами отмечалась также существенная редукция активности ЕКК в 2,14; 1,79 и 2,23 раза ($p < 0,05$) и реакции ГЗТ в 2,15; 1,73 и 1,90 раза (p

Таблица 1. Влияние подострой интоксикации ФОИ (ежедневное подкожное введение в дозе $1/7 DL_{50}$ в течение 6 сут.) на показатели системы иммунитета крыс ($n = 7-9$)

Серии опытов	АОК к ЭБ (IgM), 10^3	АОК к ЭБ (IgG), 10^3	ЕЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	$39,2 \pm 3,5$	$17,1 \pm 1,5$	$32,3 \pm 3,1$	$34,9 \pm 2,4$
ДДВФ	$16,3 \pm 1,6^*$	$10,7 \pm 1,2^*$	$15,1 \pm 2,3^*$	$16,2 \pm 2,2^*$
Карбофос	$19,2 \pm 1,8^*$	$14,2 \pm 1,1$	$18,0 \pm 2,1^*$	$20,2 \pm 2,0^*$
Метафос	$18,3 \pm 1,7^*$	$12,3 \pm 1,0^*$	$14,5 \pm 2,0^*$	$18,4 \pm 1,8^*$

Примечание: *) различия достоверны при $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

< 0,05) соответственно.

Согласно литературным данным, число АОК к ЭБ через 4 сут. характеризует синтез IgM B-лимфоцитами и функцию Th1-клеток. Активность ЕКК и формирование ГЗТ также свидетельствуют о способности Th1-лимфоцитов влиять на данные реакции, а число АОК к ЭБ в реакции непрямого локального гемолиза в геле через 7 сут. отражает синтез IgG и функцию Th2-лимфоцитов [9-11]. Показатели, характеризующие различные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при подостром действии ФОИ в среднем снижались в 2,06 и 1,40 раза соответственно. При этом, как уже упоминалось, Th1-лимфоциты подвергались действию ФОИ при введении токсикантов в дозе $4/7 DL_{50}$, а Th2-лимфоциты - в дозе $6/7 DL_{50}$. Это свидетельствует о том, что под влиянием ФОИ в существенно большей степени поражается функ-

ция Th1-лимфоцитов.

Данное заключение подтверждается исследованием концентрации цитокинов в периферической крови крыс (табл. 2). При подострой интоксикации ДДВФ выявлено уменьшение концентрации ИФН- γ и ИЛ-4, на 5 сут. в 1,95 и 1,57 раза ($p < 0,05$), а на 8 сут. - в 1,86 и 1,44 раза ($p < 0,05$) соответственно. Действие карбофоса и метафоса вызывало в целом такую же редукцию исследованных параметров. Так, карбофос снижал концентрацию ИФН- γ и ИЛ-4 через 5 сут. в 1,80 и 1,38 раза ($p < 0,05$), а метафос - в 2,09 и 1,62 раза ($p < 0,05$) соответственно. В среднем через 5-8 сут. содержание в крови ИФН- γ и ИЛ-4 под влиянием ФОИ уменьшалось в 1,90 и 1,44 раза соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что по сравнению с ИЛ-4 концентрация ИФН- γ в крови под влиянием ФОИ снижается в большей степени.

Таблица 2. Влияние подострой интоксикации ФОИ (ежедневное подкожное введение дозе $1/7 DL_{50}$ в течение 6 сут.) на содержание цитокинов в периферической крови крыс, пг/мл ($n = 6$)

Серии опытов		ИФН- γ	ИЛ-4	ИФН- γ /ИЛ-4
Контроль		905 \pm 75	141 \pm 13	6,4
ДДВФ	5*	465 \pm 47**	90 \pm 7**	5,1
	8	487 \pm 55**	98 \pm 9**	4,9
Зарин	5	502 \pm 43**	105 \pm 8**	4,8
	8	514 \pm 50**	110 \pm 11	4,7
Метафос	5	432 \pm 42**	87 \pm 7**	5,0
	8	467 \pm 53**	103 \pm 9**	4,5

Примечание: *) 5, 8 – время исследования после иммунизации, сут; **) различия достоверны при $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Известно, что ИФН- γ продуцируют Th1-лимфоциты, а ИЛ-4 – Th2-лимфоциты [9, 11, 13]. Увеличение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 характеризует снижение функциональной активности лимфоцитов Th2-типа по сравнению с функцией Th1-клеток [13]. Нами установлено, что на 5 и 8 сут. при действии ДДВФ соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 было существенно ниже контрольного уровня (6,4) и составляло 5,1 и 4,9 соответственно. Аналогичные данные получены при действии других ФОИ. Это свидетельствует о более выраженной супрессии ФОИ функции Th1-лимфоцитов. Вероятно, данный эффект обусловлен способностью ФОИ активировать гипоталамо-гипофизарно-адреналовую систему,

увеличивая в крови концентрацию кортикостерона. При этом известно, что данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа, по сравнению с Th2-лимфоцитами [9]. Возможно, что ФОИ 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, 3, 14], а также большей ролью эстераз в реализации функций лимфоцитов Th1-типа. Редукция активности ЕКК под влиянием ФОИ, по-видимому, связана со снижением продукции ИФН- γ Th1-клетками. Известно, что данные цитокины активируют ЕКК [9, 11, 12].

Выводы

Полученные результаты позволяют полагать [9, 12], что снижение функции лимфоцитов Th1-типа при отравлении ФОИ может увеличивать риск развития вирусных инфекций, а относительное повышение активности Th2-лимфоцитов приводит к увеличению синтеза В-клетками IgE и формированию респираторных аллергических реакций.

Таким образом, подострое действие ФОИ (ежедневно, в течение 6 сут. в дозе 1/7 DL₅₀), в большей степени снижает иммунные реакции, связанные с функцией Th1-лимфоцитов по сравнению с иммунным ответом, обусловленным активацией Th2-лимфоцитов. Это подтверждается более выраженным уменьшением под влиянием ФОИ концентрации в периферической крови ИФН-γ по сравнению с ИЛ-4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Забродский П.Ф., Лим В.Г., Мальцева Г.М., Молотков А.О.* Иммуотропные свойства холинергических веществ / Под ред. П.Ф. Забродского. Саратов: Изд-во «Научная книга», 2005.
2. *Лужников Е.А., Костомарова Л.Г.* Острые отравления: Руководство для врачей. 2-е изд., перераб и доп. М.: Медицина. 2000.
3. *Забродский П.Ф.* Влияние ксенобиотиков на иммунный гомеостаз // *Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова.* М.: Медицина, 2002.
4. *Петров А.П., Софронов Г.А., Нечипоренко С.П., Сомин И.Н.* Антитоксические фосфорорганических отравляющих веществ // *Рос. хим. журн.* 2004. Т. 48, № 2.
5. *Amitai G., Adani R., Fishbein E. et al.* Bifunctional compounds eliciting anti-inflammatory and anti-cholinesterase activity as potential treatment of nerve and blister chemical agents poisoning // *J. Appl. Toxicol.* 2006. V. 26, № 1.
6. *Lenz D.E., Maxwell D.M., Korlovich I. et al.* Protection against soman or VX poisoning by human butyrylcholinesterase in guinea pigs and cynomolgus monkeys // *Chem. Biol. Interact.* 2005. V. 157-158.
7. *Shin T.M., Kan R.K., McDonough J.H.* In vivo cholinesterase inhibitory specificity of organophosphorus nerve agents // *Chem. Biol. Interact.* 2005. V. 157-158.
8. *Sharp D.* Long-term effects of sarin // *Lancet.* 2006. V. 14, № 367 (9505).
9. *Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д.* Иммунология. Пер. с англ. М.: Мир, 2000.
10. *Smialowicz R. J., Luebke R.W., Riddle M. M.* Assessment of the immunotoxic potential of the fungicide dinocap in mice // *Toxicology.* 1992. V. 75, № 5.
11. *Georgiev V.St., Albright J.E.* Cytokines // *Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.* 1993. V. 685.
12. *Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г.* Иммунология. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2002.
13. *Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др.* Соотношение Th1- и Th2-лимфоцитов в периферической крови и уровни провоспалительных цитокинов в лохиях родильниц с эндометритом // *Бюл. эксперимент. биол. и мед.* 2005. Т. 140, № 12.
14. *Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д.* Иммунологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983.

THE INFLUENCE OF ORGANOPHOSPHORUS INSECTICIDES ON TH1- AND TH2-LYMPHOCYTES FUNCTION AND CYTOKINES PRODUCED BY THEM

© 2007 G.V. Shliachtin¹, P. F. Zabrodskii², A.M. Kadushkin²

¹ Saratov State University

² Saratov Military Institute of Nuclear, Biological and Chemical Defense, Saratov

After the experiments on noninbred rats it was stated that subacute intoxication of organophosphorus insecticides dimethyldichlorovinylphosphate (DDVF), carbophos and metaphos (daily hypodermic administration at a dose of 1/7 LD₅₀, during 6 days) invoked the suppression of cellular and humoral immune responses and decrease of concentration in a blood cytokines (IFN_γ, IL-4) with diminution of a relation an IFN_γ/IL-4. It occurs that the reduction of function of Th1-lymphocytes is more appreciable in comparison with Th2-cells.