

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКОГО СОЕДИНЕНИЯ ДИМЕТИЛДИХЛОРВИНИЛФОСФАТА, АГОНИСТА n-ХОЛИНОРЕЦЕПТОРОВ GTS-21 И АДРЕНАЛИНА НА КОНЦЕНТРАЦИЮ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ И ВЫЖИВАЕМОСТЬ МЫШЕЙ ПРИ СЕПСИСЕ

П. Ф. Забродский, В. В. Масляков, М. С. Громов¹

В эксперименте на неинбредных белых мышах установлено, что фосфорорганическое соединение (ФОС — ДДВФ) в дозе 0,15 LD₅₀ (внутримышечно однократно, ежедневно, в течение 4 сут), агонист n-холинорецепторов (GTS-21) в дозе 5 мг/кг (подкожно, однократно, ежедневно, в течение 4 сут) и адреналин в дозе 0,3 мг/кг (однократно, подкожно, ежедневно в течение 4 сут) через 4 ч после моделирования сепсиса (внутрибрюшинное введение $2,5 \cdot 10^9$ суточной культуры микробных тел *E. coli*) существенно снижали летальность, по сравнению с ее уровнем при сепсисе без применения препаратов, соответственно на 26; 19,4 и 21,7 % (контроль — 36,0 %), а через 24 ч — на 30; 23,4 и 27,4 % (контроль — 90 %), соответственно ($p < 0,05$), а также концентрации в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 по сравнению с показателями при сепсисе без применения препаратов. При воздействии ФОС снижение летальности мышей от сепсиса связано с уменьшением концентрации в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 и обусловлено как реализацией холинергического противовоспалительного пути, в частности, активацией n-холинорецепторов, так и возбуждением симпатической нервной системы — адренорецепторов.

Ключевые слова: фосфорорганические соединения; адреналин; n-холинорецептор; сепсис; провоспалительные цитокины; мыши.

ВВЕДЕНИЕ

Фосфорорганические соединения (ФОС) широко применяются в сельском хозяйстве, промышленности и быту, способны вызывать загрязнение окружающей среды, а также острые и хронические интоксикации. Следует отметить, что антихолинэстеразные препараты, используемые в медицине, обладают практически такой же токсикодинамикой, как ФОС [3, 7, 13]. Не исключена возможность применения ФОС в локальных вооруженных конфликтах, в террористических и криминальных целях [3, 6]. Острые и хронические отравления ФОС снижают гуморальные и клеточные иммунные реакции [3]. Заслуживает внимания дальнейшее изучение механизмов реализации установленного в 1987 г. “парадоксального эффекта” ФОС, при котором холинергическая стимуляция существенно снижала летальность белых мышей от сепсиса [1]. В последующем доказана целесообразность применения холиномиметиков для экстренной активации неспецифической противомикробной резистентности организма [2], а выявленный феномен [1] и его механизмы стали

называть “холинергическим противовоспалительным путем” — (cholinergic anti-inflammatory pathway) [2, 3, 9, 11, 12].

Холинергический противовоспалительный путь включает: 1) активацию ацетилхолином m-холинорецепторов 1 типа (m1AChR) головного мозга, модулирующих иммунорегуляторную функцию блуждающего нерва; 2) возбуждение эфферентных волокон *n. vagus*; 3) действие ацетилхолина на n-холинорецепторы ($\alpha 7nAChR$) клеток моноцитарно-макрофагальной системы с последующим ингибированием продукции этими клетками провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 [3, 4, 5, 14, 15] и в результате — снижение воспаления и летальности животных от сепсиса на фоне активации парасимпатической импульсации [1, 2, 3, 8].

При реализации холинергического противовоспалительного пути, кроме описанных эффектов, происходит: а) активация n-холинорецепторов мозгового вещества надпочечников и симпатических ганглиев, что приводит к секреции адреналина и норадреналина, которые возбуждают адренорецепторы клеток моноцитарно-макрофагальной системы и снижают продукцию ими провоспалительных цитокинов [11]; б) *n. vagus*, высвобождение ацетилхолина в чревном ганг-

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

лии вызывает возбуждение нервных волокон селезенки, которые секретируют норадреналин; в) норадреналин активирует адренорецепторы Т-лимфоцитов; г) Т-лимфоциты продуцируют ацетилхолин, который активирует $\alpha 7nAChR$ клеток моноцитарно-макрофагальной системы селезенки и вызывает редукцию синтеза провоспалительных цитокинов [4, 11].

Исходя из изложенного, представляет интерес изучение воздействия ингибиторов ацетилхолинэстеразы и адреномиметиков на воспаление на модели сепсиса у животных с оценкой их выживаемости, а также продукции клетками моноцитарно-макрофагальной системы провоспалительных цитокинов.

Цель работы — сравнительная оценка влияния ФОС (диметилдихлорвинилфосфата; ДДВФ), агониста альфа7-никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (GTS-21) и адреналина на летальность мышей и содержание в их крови провоспалительных цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 при экспериментальном сепсисе.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на 152 беспородных белых мышах обоего пола массой 18 – 22 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.

Мыши контрольной группы (контрольная группа 1, $n = 7$) получали подкожно изотонический раствор хло-

рида натрия (0,5 мл) однократно ежедневно в течение 4 сут, через 2 ч после последней инъекции внутривенно вводили 2 мл изотонического раствора хлорида натрия. Животным второй группы (контрольная группа 2, $n = 50$) вводили подкожно однократно изотонический раствор хлорида натрия (0,5 мл), ежедневно в течение 4 сут. Через 2 ч после последнего введения данного раствора мыши получали внутривенно $2,5 \cdot 10^9$ суточной культуры микробных тел *E. coli* (штамм № 675, полученный из Саратовского ВИБХБ) в 2 мл изотонического раствора хлорида натрия (моделирование сепсиса) [1]. Мышам третьей группы ($n = 30$) вводили внутримышечно однократно ежедневно в течение 4 сут ДДВФ (Sigma-Aldrich) в дозе 0,15 LD₅₀ в объеме 0,5 мл 0,25 % водного раствора диметилсульфоксида — ДМСО (ДДВФ растворяли в диметилсульфоксиде, готовили 0,25 % водный раствор ДМСО, содержащий токсикант). LD₅₀ ДДВФ составляла (52,5 ± 3,3) мг/кг. Мыши четвертой группы ($n = 30$) получали агонист $\alpha 7nAChR$ препарат GTS-21 [3-(2,4-dimethoxybenzylidene)anabaseine dihydrochloride] (Sigma-Aldrich) подкожно однократно в дозе 5 мг/кг в 0,5 мл физиологического раствора, ежедневно в течение 4 сут, учитывая период полувыведения GTS-21, составляющий 12 – 24 ч [10, 14]. Мыши пятой группы ($n = 35$) получали раствор адреналина гидрохлорида (Sigma-Aldrich) подкожно однократно в дозе 0,3 мг/кг в 0,5 мл физиологического раствора ежедневно в течение 4 сут. У мышей в группах 3, 4 и 5 через 2 ч после последнего введения препаратов моделировали сепсис. Регистрацию летальности мышей (группы 2 – 5) после моделирования сепсиса проводили через 4 и 24 ч.

Концентрацию ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 исследовали в плазме крови мышей всех групп методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits MyBioSource) в соответствии с инструкциями изготовителя. Для определения концентрации провоспалительных цитокинов применяли моноклональные антитела MyBioSource (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6). Кровь для исследований забирали из ретроорбитального венозного синуса в объеме 0,5 мл через 4 и 24 ч после моделирования сепсиса. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Порог статистической значимости был установлен на уровне $p = 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Применение ФОС (ДДВФ), GTS-21 и адреналина за 2 ч до моделирования сепсиса вызывало уменьшение ($p < 0,05$) летальности мышей через 4 ч по сравнению с контрольной группой 2 (сепсис) соответственно в 3,6; 2,2 и 2,5 раз ($p < 0,05$) (на 26,0; 19,4 и 21,7 %), а через 24 ч — в 1,5; 1,3 и 1,4 раза (на 30,0; 23,4 и 27,4 %) ($p < 0,05$), соответственно (табл. 1).

Таблица 1. Влияние профилактического применения ДДВФ 0,15 LD₅₀ внутримышечно ежедневно в течение 4 сут, GTS-21 5 мг/кг подкожно ежедневно в течение 4 сут и адреналина гидрохлорида 0,3 мг/кг подкожно ежедневно в течение 4 сут на летальность мышей от сепсиса ($M \pm m$)

Серия опытов	Летальность мышей после введения <i>E. coli</i> , %	
	4 ч	24 ч
Контрольная группа 1 (интактные мыши $n = 7$)	0	0
Сепсис (контрольная группа 2, $n = 50$)	36,0 ± 6,8	90,0 ± 4,2
ДДВФ + сепсис (группа 3, $n = 30$)	10,0 ± 5,5*	60,0 ± 8,9*
GTS-21 + сепсис (группа 4, $n = 30$)	16,6 ± 6,9*	66,6 ± 8,6*
Адреналин + сепсис (группа 5, $n = 35$)	14,3 ± 5,9*	62,6 ± 8,2*

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

При использовании ФОС, агониста $\alpha 7nAChR$ (GTS-21) и адреналина через 2 ч после моделирования сепсиса (группы 3, 4, 5) существенная разница в летальности мышей отсутствовала. Это позволяет полагать, что при действии ФОС ацетилхолин активирует $\alpha 7nAChR$ клеток моноцитарно-макрофагальной системы приблизительно в такой же степени, как и агонист этих рецепторов препарат GTS-21. Эффект адреналина обусловлен возбуждением адренорецепторов макрофагов и моноцитов (действие ацетилхолина на н-холинорецепторы мозгового вещества надпочечников) [3, 4, 9].

После моделирования сепсиса (контрольная группа 2) в крови мышей через 4 ч существенно увеличивалось содержание цитокинов ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 по сравнению с контрольной группой 1 (интактные животные), соответственно, в 19,9; 21,8 и 68,5 раза ($p < 0,05$), через 24 ч концентрация данных цитокинов в крови значительно снижалась, тем не менее превышая параметры группы 1 в 1,6 ($p > 0,05$), 4,7 и 8,6 раза ($p < 0,05$), соответственно (табл. 2).

Введение мышам ФОС (ДДВФ) снижало через 4 ч после моделирования сепсиса (группа 3) концентрации в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6, по сравнению с показателями контрольной группы 2 (сепсис без применения препаратов) соответственно в 2,8; 2,1 и 6,5 раза ($p < 0,05$). При этом содержание провоспалительных цитокинов в крови достоверно ($p < 0,05$) превышало соответствующие показатели контрольной группы 1. Через 24 ч после моделирования сепсиса содержание ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 уменьшалось по сравнению с данными параметрами через 4 ч, оставаясь ниже значений группы 2 в 1,4 ($p > 0,05$), 2,3 и 2,5 раза ($p < 0,05$), соответственно.

Концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в крови мышей при применении агониста $\alpha 7nAChR$ GTS-21 через 4 ч после моделирования сепсиса (группа 4) снижались по сравнению с параметрами контрольной группы 2 соответственно в 3,6; 2,5 и 8,4 раза ($p < 0,05$). Выявлено уменьшение содержания в крови провоспа-

лительных цитокинов через 24 ч после моделирования сепсиса по сравнению с соответствующими значениями через 4 ч, при этом концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 оставались ниже показателей группы 2 соответственно в 1,7; 2,2 и 2,9 раза ($p < 0,05$).

При использовании ДДВФ и агониста $\alpha 7nAChR$ (GTS-21) после моделирования сепсиса (группы 3 и 4) существенной разницы исследованных параметров в крови мышей выявлено не было.

При воздействии адреналина концентрации ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 в крови мышей через 4 ч после моделирования сепсиса (группа 5) уменьшались по сравнению с показателями контрольной группы 2 (сепсис) соответственно в 3,9; 2,9 и 8,0 раз ($p < 0,05$).

Через 24 ч содержание в крови данных цитокинов существенно снижалось по сравнению со значениями через 4 ч, а по сравнению с соответствующим параметром группы 2 концентрация ФНО- α достоверно не отличалась. Отмечалось снижение ИЛ-1 β и ИЛ-6 в группе 5 по сравнению с данными показателями в группе 2 соответственно в 2,9 и 3,2 раза ($p < 0,05$). Содержание провоспалительных цитокинов в группах 3, 4 и 5 было статистически значимо ($p < 0,05$) меньше соответствующих значений контрольной группы 1.

Уровни ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 при введении ФОС (ДДВФ), агониста $\alpha 7nAChR$ (GTS-21) и адреналина при моделировании сепсиса (группы 3, 4, 5) снижались приблизительно в равной степени, по сравнению с их значениями при сепсисе без применения препаратов (группа 2).

При воздействии ФОС, как уже упоминалось, вследствие воздействия ацетилхолина на н-холинорецепторы, надпочечники и эфферентные волокна симпатической нервной системы продуцируют адреналин и норадреналин [3, 4]. Активация блуждающего нерва вызывает синтез ацетилхолина в чревном ганглии, возбуждая селезеночный нерв, эфферентные волокна которого в селезенке выделяют норадреналин, действующий на Т-лимфоциты. Эти клетки продуцируют ацетилхолин [9]. Происходит активация этим медиато-

Таблица 2. Влияние профилактического введения ДДВФ $0,15 LD_{50}$ внутримышечно ежедневно в течение 4 сут, GTS-21 5 мг/кг подкожно ежедневно в течение 4 сут и адреналина 0,3 мг/кг подкожно ежедневно в течение 4 сут на концентрацию провоспалительных цитокинов в крови мышей через 4 и 24 ч после моделирования сепсиса, пг/мл ($M \pm m$)

Серия опытов	ФНО- α		ИЛ-1 β		ИЛ-6	
	4 ч	24 ч	4 ч	24 ч	4 ч	24 ч
Контрольная группа 1	29 \pm 5 (7)	31 \pm 6 (7)	20 \pm 4 (7)	24 \pm 5 (7)	27 \pm 6 (7)	22 \pm 4 (7)
Сепсис (контрольная группа 2)	577 \pm 79 ^a (7)	49 \pm 7 ^c (5)	435 \pm 60 ^a (7)	112 \pm 19 ^{ac} (5)	1850 \pm 220 ^a (7)	190 \pm 32 ^{ac} (5)
ДДВФ + сепсис (группа 3)	205 \pm 27 ^{ab} (7)	35 \pm 5 ^c (6)	205 \pm 26 ^{ab} (7)	48 \pm 6 ^{abc} (6)	283 \pm 35 ^{ab} (7)	77 \pm 8 ^{abc} (6)
GTS-21 + сепсис (группа 4)	159 \pm 21 ^{ab} (7)	29 \pm 5 ^{bc} (7)	174 \pm 18 ^{ab} (7)	51 \pm 7 ^{abc} (7)	220 \pm 27 ^{ab} (6)	65 \pm 9 ^{abc} (7)
Адреналин + сепсис (группа 5)	148 \pm 20 ^{ab} (6)	44 \pm 6 ^c (7)	150 \pm 28 ^{ab} (7)	38 \pm 6 ^{abc} (7)	232 \pm 27 ^{ab} (6)	60 \pm 10 ^{abc} (7)

Примечание: 4 и 24 ч — время после моделирования сепсиса; в скобках — число животных; ^a $p < 0,05$ по сравнению с контролем (группа 1); ^b $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим параметром при сепсисе (контрольной группы 2); ^c $p < 0,05$ по сравнению с аналогичным показателем через 4 ч.

ром $\alpha 7nAChR$ клеток моноцитарно-макрофагальной системы селезенки и редукция синтеза провоспалительных цитокинов. Данные литературы позволяют полагать, что действие адреналина и норадреналина на макрофаги и моноциты вызывает аналогичный эффект [4, 11].

Таким образом, снижение летальности мышей от сепсиса и уменьшение концентрации в крови провоспалительных цитокинов при воздействии ФОС обусловлено как реализацией холинергического противовоспалительного пути, в частности, активацией $\alpha 7nAChR$ клеток моноцитарно-макрофагальной системы [1, 3, 10, 11], так и связанным с этим путем (его звеньями) возбуждением симпатической нервной системы и действием адреналина и норадреналина на адренорецепторы макрофагов и моноцитов [4, 9].

Ингибиторы ацетилхолинэстеразы, н-холиномиметики и адреномиметики могут рассматриваться как перспективные препараты, наряду с другими лекарственными средствами, для терапии септических состояний, воспалительных заболеваний кишечника и других инфекционных заболеваний [2, 3, 4, 11, 14].

ВЫВОДЫ

1. Профилактическое введение ДДВФ в дозе 0,15 LD₅₀ (внутримышечно однократно ежедневно в течение 4 сут), агониста н-холинорецепторов (GTS-21) в дозе 5 мг/кг (подкожно однократно ежедневно в течение 4 сут) и адреналина гидрохлорида в дозе 0,3 мг/кг (подкожно однократно ежедневно в течение 4 сут) через 4 ч после моделирования сепсиса существенно снижало летальность мышей по сравнению с уровнем летальности при сепсисе без применения препаратов, соответственно, на 26,0; 19,4 и 21,7 % (контроль — 36,0 %), а через 24 ч — на 30,0; 23,4 и 27,4 % (контроль — 90,0 %) соответственно ($p < 0,05$).

2. Профилактическое введение мышам ДДВФ, агониста н-холинорецепторов GTS-21 и адреналина через 4 ч после моделирования сепсиса уменьшало концен-

трацию в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6, по сравнению с показателями при сепсисе без применения препаратов в 3,6; 2,5 и 8,4 раза, а через 24 ч, соответственно, — в 1,7; 2,2 и 2,9 раза ($p < 0,05$).

3. При воздействии ФОС снижение летальности мышей от сепсиса, по-видимому, связано с уменьшением концентрации в крови ФНО- α , ИЛ-1 β и ИЛ-6 и обусловлено как реализацией холинергического противовоспалительного пути, в частности, активацией н-холинорецепторов, так и возбуждением симпатической нервной системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. П. Ф. Забродский, *Фармакол. и токсикол.*, **50**(1), 57 – 60 (1987).
2. П. Ф. Забродский, *Бюл. эксперим. биол. и мед.*, **119**(8), 164 – 167 (1995).
3. П. Ф. Забродский, *Иммунотоксикология фосфорорганических соединений*, Саратовский источник, Саратов (2016).
4. V. L. Bonaz, C. N. Bernstein, *Gastroenterology*, **144**(1), 36 – 49 (2013).
5. J. Egea, I. Buendia, E. Parada, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **97**(4), 463 – 472 (2015).
6. E. J. Hulse, J. O. Davies, A. J. Simpson, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **190**(12), 1342 – 1354 (2014).
7. A. M. King, C. K. Aaron, *Emerg. Med. Clin. North Am.*, **33**(1), 133 – 151 (2015).
8. M. Kox, P. Pickkers, *Nephron.*, **131**(2), 79 – 84 (2015).
9. D. Martelli, M. J. McKinley, R. M. McAllen, *Auton. Neurosci.*, **182**, 65 – 69 (2014).
10. G. J. Norman, J. S. Morris, K. Karelina, et al., *J. Neurosci.*, **31**(9), 3446 – 3452 (2011).
11. V. A. Pavlov, H. Wang, C. J. Czura, et al., *Mol. Med.*, **9**(5 – 8), 125 – 134 (2003).
12. T. B. Payolla, S. F. Lemes, T. de Fante, et al., *Mol. Cell Endocrinol.*, **422**, 192 – 202 (2016).
13. J. V. Peter, T. I. Sudarsan, J. L. Moran, *Indian J. Crit. Care Med.*, **18**(11), 735 – 745 (2014).
14. R. A. Sitapara, D. J. Antoine, L. Sharma, et al., *Mol. Med.*, **20**, 238 – 247 (2014).
15. D. J. Song, X. Y. Huanq, L. C. Ren, et al., *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.*, **25**(1), 36 – 41 (2009).

Поступила 30.01.17

THE INFLUENCE OF ORGANOPHOSPHORUS COMPOUND DIMETHYLDICHLOROVINYL PHOSPHATE (AGONIST OF $\alpha 7n$ -ACETYLCHOLINE RECEPTOR GTS-21) AND EPINEPHRINE ON CONCENTRATION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES IN BLOOD AND MORTALITY OF MICE IN SEPSIS

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

Saratov Branch of the Medical Institute "REAVIZ" (Samara), Degtyarnaya ploshchad 1A, Saratov, 410076 Russia

Experiments on outbred albino mice showed that the effects of organophosphorus compound DDVP (dimethyldichlorovinyl phosphate, agonist of $\alpha 7n$ -acetylcholine receptors GTS-21) in a single dose of 0.15 LD₅₀ (5 mg/kg daily for 4 days) and epinephrine in a dose of 0.3 mg/kg (s.c. once daily for 4 days) in 4 h after sepsis modeling (intraperitoneal injection of 24-h *E. coli* culture $2.5 \cdot 10^9$ microbial bodies) significantly reduced the mortality of mice within 4 and 24 h and the blood levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 as compared to the parameters in sepsis without the use of drugs. The DDVP-induced decrease of mortality from sepsis in mice is associated with a decrease in the concentration of blood TNF- α , IL-1 β and IL-6 and is due both to the implementation of the cholinergic anti-inflammatory pathways, particularly with the activation of $\alpha 7n$ -acetylcholine receptors and excitation of the sympathetic nervous system.

Keywords: organophosphorus compounds; epinephrine; $\alpha 7n$ -acetylcholine receptor; sepsis; proinflammatory cytokines; sepsis; mice.