

# ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

## ВЛИЯНИЕ РЕАКТИВАТОРА ХОЛИНЭСТЕРАЗЫ КАРБОКСИМА НА АКТИВНОСТЬ АЦЕТИЛХОЛИНЭСТЕРАЗЫ Т-ЛИМФОЦИТОВ И ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ФОСФОРОРГАНИЧЕСКИМИ СОЕДИНЕНИЯМИ

П. Ф. Забродский, Е. В. Стрельцова, В. А. Гришин<sup>1</sup>

В экспериментах на неинбредных крысах установлено, что карбоксим (однократно, 10 мг/кг) существенно снижает вызванную острым отравлением фосфорорганическими соединениями (зарин, метафос в дозе 1 LD<sub>50</sub>), инактивацию ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, восстанавливая частично или практически полностью гуморальные и клеточные иммунные реакции. Карбоксим не оказывает влияния на Т-независимый гуморальный иммунный ответ, сниженный вследствие редукции ФОС функции В-лимфоцитов (плазмочитов).

**Ключевые слова:** реактиватор холинэстеразы, карбоксим, фосфорорганические соединения, ацетилхолинэстераза, Т-лимфоциты

### ВВЕДЕНИЕ

Применение фосфорорганических соединений (ФОС) в сельском хозяйстве и быту, уничтожение фосфорорганических веществ (российского VX, зарина, зомана) может способствовать отравлению данными веществами [1, 2, 4], приводящему к поражению иммунокомпетентных клеток [1, 2, 10] и формированию вторичного иммунодефицитного состояния [1, 2]. Интоксикации могут вызывать также ФОС и различные антихолинэстеразные соединения (обладающие практически такой же токсикодинамикой, как ФОС), используемые в медицине [1, 15]. Существует вероятность использования ФОС в террористических и криминальных целях [1, 4, 9]. Реактиваторы холинэстеразы являются эффективными антидотными средствами при отравлении ФОС. Синтез новых лекарственных средств этой группы [4 – 6, 8, 12, 13] и изучение их активности наряду с исследованием терапии интоксикации ФОС применением бутирилхолинэстеразы [11] и других препаратов является актуальной задачей фармакологии и токсикологии [1, 2].

Влияние реактиваторов холинэстеразы (оксимов), в частности, карбоксима на нарушения функций иммунной системы, вызванных отравлением антихолинэстеразными веществами, и их связи с активностью ацетилхолинэстеразы (АХЭ) на фоне применения не изучено. Исследование данного вопроса представляет большой интерес для обоснования оптимальной фармакологической коррекции нарушений иммунного статуса при интоксикации ФОС [1, 2].

Целью исследования являлась оценка влияния реактиватора холинэстеразы карбоксима при остром отрав-

лении ФОС на активность АХЭ Т-лимфоцитов на основные иммунные реакции.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на беспородных белых крысах обоего пола массой 180 – 240 г. ФОС — зарин и метафос — применяли подкожно в дозе 1 DL<sub>50</sub>, которая составляла соответственно 0,24 ± 0,02 и 28,4 ± 2,8 мг/кг. Иммунизацию крыс проводили практически одновременно с введением крысам ФОС внутрибрюшинным введением эритроцитов барана (ЭБ) — 2 · 10<sup>8</sup> клеток. Карбоксим (10 мг/кг) вводили однократно через 5 – 10 мин после введения ФОС. Активность АХЭ в Т-лимфоцитах определяли через 4 сут после интоксикации, выделяя клетки путем фильтрования селезеночной и тимусной взвеси через нейлоновую вату (“Нитрон”) и осуществляя реакции и расчеты по описанному методу [1]. За единицу активности АХЭ (ЕД) принимали мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл суспензии, содержащей 10<sup>9</sup> Т-лимфоцитов.

Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии [1 – 3]. Гуморальный иммунный ответ к Т-зависимому (эритроцитам барана) и Т-независимому (Vi-Ag) антигенам определяли через 4 сут по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке после действия исследованных факторов с одновременной внутрибрюшинной иммунизацией крыс данными антигенами в дозах 2 · 10<sup>8</sup> клеток и 8 мкг/кг соответственно. Активность естественных клеток-киллеров (ЕКК) определяли по показателю естественной цитотоксичности (ЕЦ) спектрофотометрически по числу оставшихся неразрушенными в ходе цитотоксического теста клеток-мишеней через 4 сут после действия ФОС и ФОС в комбинации с карбоксимом. Антитело-

<sup>1</sup> Саратовский государственный медицинский университет, 410012, Саратов, ул. Большая Казачья, 112.

зависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) исследовали через 4 сут, используя спленоциты крыс, спектрофотометрическим методом. Формирование реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), отражающей функцию клеточного иммунного ответа (в частности, активность Th1-лимфоцитов), а также моноцитов и макрофагов, оценивали у крыс по приросту (в %) массы стопы задней лапы. При этом животных иммунизировали внутрибрюшинным введением  $10^8$  ЭБ. Разрешающую дозу ЭБ ( $5 \cdot 10^8$ ) вводили под апоневроз стопы задней лапы на 4-е сутки после иммунизации. Реакцию ГЗТ определяли через 24 ч.

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

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После острой интоксикации заринном и метафосом активность АХЭ Т-лимфоцитов тимуса у крыс через 4 сут существенно снижалась соответственно в 8,43 и 6,62 раза ( $p < 0,05$ ). Введение карбоксима после интоксикации заринном и метафосом увеличивало активность АХЭ Т-клеток соответственно в 3,73 и 4,05 раза ( $p < 0,05$ ) по сравнению с показателями при интоксикации ФОС (табл. 1). При этом данный параметр оставался ниже контрольного значения при действии зарины в 2,26 раза ( $p < 0,05$ ), при отравлении метафосом — в 1,63 раза ( $p < 0,05$ ). Аналогичная супрессия активности АХЭ Т-лимфоцитов после острого отравления ФОС и ее увеличение под влиянием карбоксима выявлены при исследовании спленоцитов.

Под влиянием зарины и метафоса (табл. 2) происходило снижение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (по числу АОК к ЭБ в селезенке), характеризующему функцию Th1-лимфоцитов и синтез В-клетками (плазмочитами) IgM, через 4 сут после интоксикации заринном и метафосом соответственно в 2,75 и 2,12 раза ( $p < 0,05$ ). Снижение данного показателя косвенно характеризует редукцию Th1-лимфоцитов. Известно, что данные Т-клетки, по-

Таблица 1. Влияние карбоксима после острой интоксикации ФОС (1 DL<sub>50</sub>) на активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах тимуса и селезенки у крыс (мЕД/10<sup>9</sup> Т-клеток) через 4 сут ( $M \pm m$ ,  $n = 8 - 9$ )

Серия опытов	Активность ацетилхолинэстеразы, мЕД/10 <sup>9</sup> Т-клеток	
	Тимус	Селезенка
Контроль	74,2 ± 6,4	61,2 ± 6,0
Зарин	8,8 ± 1,8*	6,3 ± 1,6*
Метафос	11,2 ± 2,3*	8,6 ± 1,8*
Зарин + карбоксим	32,9 ± 3,4**	27,8 ± 3,2**
Метафос + карбоксим	45,4 ± 4,5**	38,0 ± 3,6**

**Примечание.** \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и показателем при интоксикации ФОС.

мимо клеточных иммунных реакций, способны активировать синтез IgM и IgG2a [1, 7].

Применение карбоксима увеличивало число АОК к ЭБ после отравления заринном и метафосом (по сравнению с показателями при интоксикации) соответственно в 1,66 и 1,44 раза ( $p < 0,05$ ). При этом под влиянием зарины и метафоса при использовании их антитода карбоксима по сравнению с контролем Т-зависимое антителообразование (число АОК к ЭБ) оставалось сниженным соответственно в 1,65 и 1,47 раза ( $p < 0,05$ ). Частичное восстановление гуморальной иммунной реакции к Т-зависимому антигену обусловлено восстановлением активности АХЭ Т-клеток карбоксимом.

После отравления заринном и метафосом отмечалась редукция Т-независимого антителообразования (число АОК к Vi-Ag) менее выраженная, чем Т-зависимая антителопродукция. Так, данные ФОС снижали исследованный показатель соответственно в 1,64 и 1,35 раза ( $p < 0,05$ ).

Карбоксим не влиял на число АОК к Vi-Ag после отравления заринном и метафосом, так как для реализации данной иммунной реакции необходимы только В-клетки (плазмочиты), которые не содержат АХЭ [1].

При воздействии зарины и метафоса происходила супрессия клеточных иммунных реакций (табл. 3). Так, зарин и метафос снижали по сравнению с контролем активность ЕКК (ЕЦ) соответственно в 2,21 и 1,89 раза ( $p < 0,05$ ), АЗКЦ — в 1,76 и 1,57 раза ( $p < 0,05$ ), а реакцию ГЗТ в 1,92 и 1,88 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно. Это свидетельствует о том, что под влиянием антихолинэстеразных ядов поражается функция Th1-лимфоцитов [1], что приводит к снижению ими клеточных иммунных реакций вследствие редукции синтеза  $\gamma$ -интерферона [3]. Использование карбоксима повышало после интоксикации заринном и метафосом (по сравнению с параметрами при отравлении) активность ЕКК соответственно в 1,55 и 1,39 раза ( $p < 0,05$ ), АЗКЦ — в 1,47 и 1,38 раза ( $p < 0,05$ ), а формирование ГЗТ в 1,38 и 1,46 раза ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Коэффициенты корреляции между активностью АХЭ в Т-лимфоцитах тимуса крыс (на 5-е сутки) и

Таблица 2. Влияние карбоксима после острого отравления ФОС (1 DL<sub>50</sub>) на гуморальные иммунные реакции крыс ( $M \pm m$ ,  $n = 8 - 9$ )

Серия опытов	АОК к ЭБ, 10 <sup>3</sup>	АОК к Vi-Ag, 10 <sup>3</sup>
Контроль	43,5 ± 4,3	29,7 ± 2,8
Зарин	15,8 ± 2,0*	18,1 ± 1,9*
Метафос	20,5 ± 2,2*	22,0 ± 1,8*
Зарин + карбоксим	26,2 ± 3,0**	21,4 ± 2,1*
Метафос + карбоксим	30,2 ± 2,8**	19,8 ± 1,9*

**Примечание.** \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и показателем при интоксикации ФОС.

Таблица 3. Влияние карбоксима после острого отравления ФОС (1 DL<sub>50</sub>) на клеточные иммунные реакции крыс ( $M \pm m$ ,  $n = 8 - 9$ )

Серия опытов	ЕЦ, %	АЗКЦ, %	ГЗТ, %
Контроль	31,0 ± 2,7	15,7 ± 1,5	37,9 ± 3,5
Зарин	14,0 ± 1,5*	8,9 ± 0,9*	19,7 ± 1,8*
Метафос	16,4 ± 1,6*	10,0 ± 1,1*	20,2 ± 2,0*
Зарин + карбоксим	20,0 ± 2,1**	13,1 ± 1,0 <sup>#</sup>	27,1 ± 2,6**
Метафос + карбоксим	22,3 ± 2,0**	13,8 ± 1,2 <sup>#</sup>	29,5 ± 3,0 <sup>#</sup>

**Примечание.** \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем и показателем при интоксикации ФОС; <sup>#</sup> —  $p < 0,05$  по сравнению с показателем при интоксикации ФОС.

АОК к ЭБ, а также клеточными иммунными реакция-ми составляли от 0,709 до 0,77 ( $p < 0,05$ ).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что карбоксим восстанавливает функцию клеточных иммунных реакций, реактивируя АХЭ на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа. Известно, что АХЭ локализована не только на Th1-клетках, определяющих реализацию ГЗТ, но и на ЕКК, от которых зависит ЕЦ и АЗКЦ [1]. Карбоксим частично восстанавливает активность ЕКК, АЗКЦ и реакцию ГЗТ, реактивируя их АХЭ. Известно, что ЕКК, а также К-клетки (ЕКК, осуществляющие реакцию АЗКЦ при помощи низких концентраций IgG), содержат этот энзим [3, 14].

Несомненно, что ингибирование АХЭ Т-клеток, ЕКК и К-клеток ФОС имеет существенное значение в формировании постинтоксикационного иммунодефицитного состояния.

Снижение Т-независимый иммунной реакции свидетельствует о том, что редукция активности гуморального иммунитета обусловлена не только ингибированием АХЭ Т-хелперов, но и поражающим действием ФОС на В-клетки (плазмодиты).

Таким образом, карбоксим существенно снижает вызванную ФОС инактивацию АХЭ Т-лимфоцитов, восстанавливая частично или практически полностью гуморальные и клеточные иммунные реакции. На Т-независимый гуморальный иммунный ответ, сниженный вследствие редукции функции В-лимфоцитов (плазмодитов), карбоксим влияния не оказывает.

## ВЫВОДЫ

1. Острая интоксикация ФОС (зарин и метафос) в дозе, составляющей 1 DL<sub>50</sub>, снижает Т-зависимую гуморальную иммунную реакцию вследствие ингибирования АХЭ Т-лимфоцитов, Т-независимый иммунный ответ в результате супрессии функции В-лимфоцитов (плазмодитов).

2. При остром отравлении ФОС уменьшаются клеточные иммунные реакции вследствие инактивации АХЭ Th1-лимфоцитов, ЕКК, К-клеток.

3. Карбоксим (однократно, 10 мг/кг) при острой интоксикации ФОС (1 DL<sub>50</sub>) снижает редукцию Т-зависимого гуморального иммунного ответа и клеточных иммунных реакций вследствие реактивации АХЭ Т-клеток.

## ЛИТЕРАТУРА

1. П. Ф. Забродский, В. Г. Мандыч, *Иммунотоксикология ксенобиотиков*, СВИБХБ Саратов, (2007).
2. П. Ф. Забродский, И. Х. Яфарова, В. Г. Лим и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **72**(6), 40 – 42 (2009).
3. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, *Иммунология (пер. с англ.)*, Мир, Москва (2000).
4. А. Н. Петров, Г. А. Софронов, С. П. Нечипоренко, И. Н. Сомян, *Рос. хим. журн.*, **XLVIII**(2), 110 – 116 (2004).
5. G. Amitai, R. Adani, E. Fishbein, et al., *J. Appl. Toxicol.*, **26**(1), 81 – 87 (2006).
6. J. Bajgar, K. Kuca, D. Jun, et al., *Curr Drug Metab.*, **8**(8), 803 – 809 (2007).
7. V. St. Georgiev, J. E. Albright, *Immunomodulation drugs, Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.*, **685**, 284 – 602 (1993).
8. D. Jun, L. Musilova, K. Kuca, et al., *Chem Biol Interact.*, **175**(1 – 3), 421 – 424 (2008).
9. D. E. Lenz, D. M. Maxwell, I. Korlovich, et al., *Chem. Biol. Interact.*, 157 – 158, 205 – 210 (2005).
10. Q. Li, T. Kawada, *Cell Mol Immunol.*, **3**(3), 171 – 178 (2006).
11. D. Sharp, *Lancet*, **14**(367) (9505), 95 – 97 (2006).
12. T. M. Shin, R. K. Kan., J. H. McDonough, *Chem. Biol. Interact.*, 157 – 158, 293 – 303 (2005).
13. T. M. Shih, J. W. Skovira, J. C. O'Donnell and J. H. McDonough, *Toxicol Mech Methods.*, **19**(6 – 7), 386 – 400 (2009).
14. A. Tomoiu, A. Larbi, C. Fortin, et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1100**, 98 – 110 (2007).
15. N. J. Wardle, S. W. Bligh, H. R. Hudson, *Curr Med Chem.*, **15**(22), 2230-

Поступила 26.01.11

## EFFECT OF CHOLINESTERASE REACTIVATOR CARBOXIM ON T-LYMPHOCYTE ACETYLCHOLINESTERASE ACTIVITY AND IMMUNE RESPONSE UNDER CONDITIONS OF ACUTE INTOXICATION BY ORGANOPHOSPHORUS COMPOUNDS

P. F. Zabrodskii, E. V. Strel'tsova, and V. A. Grishin

Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410012, Russia

It has been established in experiments on non-inbred rats that the administration of cholinesterase reactivator carboxim in a single dose of 10 mg/kg significantly reduces the inactivation of acetylcholinesterase in T-lymphocytes caused by acute intoxication with organophosphorus compounds (sarin, metaphos) in a dose of 1.0 LD<sub>50</sub>. The drug administration leads to partial or almost complete recovery of the humoral and cellular immune responses. Carboxim does not influence the T-independent humoral immune response reduced due to suppression of B-cell (plasmocyte) function by organophosphorus compounds.

**Key words:** Cholinesterase reactivator, carboxim, organophosphorus compounds, acetylcholinesterase, T-lymphocytes