

длительности мониторинга здоровья экспонированного персонала и лиц, проживающих в зоне защитных мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Положение о социально-гигиеническом мониторинге (утв. постановлением Правительства Российской Федерации от 1 июня 2000 г. № 426).

2. Концепция единой системы медицинского мониторинга при хранении, перевозке и уничтожении химического оружия. М., 2005 г.
3. Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. М., ФГУП «НИЦ ИТЭП» ФМБА, 2005 г.
4. Bralley J. J. Appl. Nutrition, 1994, v. 46, № 3, p. 74–78.
5. Берзин И.А., Василенко О.А., Сороколетов В.А. Проблемы уничтожения и утилизации ОМП, 2005, № 1, с. 24–31.

УДК 623.459:547.241:612.017.1.

Нарушение функции субпопуляций Т-лимфоцитов при подостром отравлении токсичными химикатами

П. Ф. Забродский, В. Г. Германчук, А. Ю. Ковалёв, А.М. Кадушкин

Саратовский военный институт радиационной, химической и биологической защиты

В настоящее время активно ведутся поиски высокоэффективных терапевтических (антидотных) средств, устраняющих поражающее действие фосфорорганических отравляющих веществ нервно-паралитического действия (зарина, вещества Vx) [1–3], исследуются биомаркеры для дифференциальной диагностики поражения кожи сернистым ипритом и люизитом [4], изучаются отдаленные эффекты поражения ипритом [5] и заринном [6].

Отравления токсичными химикатами могут сопровождаться инфекционными осложнениями и заболеваниями, связанными с развитием постинтоксикационного иммунодефицитного состояния [7, 8]. Разработка наряду с антидотными средствами способов снижения поражения иммунной системы токсичными химикатами предполагает дальнейшее изучение их иммунотропных эффектов [7, 9].

Известно, что в реализации иммунного ответа принимают участие антигенпредставляющие клетки (дендритные клетки, клетки кожи Лангерганса, макрофаги), Т-лимфоциты хелперы (помощники) и В-лимфоциты, которые продуцируют иммуноглобулины различных классов [7,10]. Токсиканты в зависимости от их физико-химических свойств, особенностей токсикокинетики и токсикодинамики поражают клетки, участвующие в формировании иммунного ответа, в разной степени. От характера поражения Т- или В-звена иммунитета (или преимущественно антигенпредставляющих клеток) зависят особенности постинтоксикационного иммунодефицитного состояния и, следовательно, способы коррекции нарушений иммунного статуса [7, 9].

Т-лимфоциты хелперы неоднородны и состоят из лимфоцитов Th1-, Th2-, Th3-типа. Th1-лимфоциты участвуют в обеспечении преимущественно клеточного иммунитета, они участвуют, в частности, в синтезе интерлейкина-2. Th2-лимфоциты способствуют реализации гуморальных иммунных реакций, т. е. «помогают» В-лимфоцитам, синтезируя интерлейкин-4, продуцировать иммуноглобулины основных классов (IgG₁, IgA, IgE и IgD). В формировании аллергических и анафилактических реакций (варианты «неадекватного» иммунного ответа, называемые «гиперчувствительностью», ведущей к серьезным повреждениям тканей

организма) также участвуют лимфоциты Th1-, Th2-типа. Лимфоциты Th3-типа играют регуляторную роль при реализации иммунного ответа (иммунных реакций). Снижение функции лимфоцитов Th1- и Th2-типа вызывает редукцию преимущественно клеточных или гуморальных иммунных реакций, соответственно, кроме того от соотношения этих субпопуляций лимфоцитов (их функции) может зависеть вероятность формирования контактной или респираторной гиперчувствительности.

Целью представленного в статье исследования является оценка особенностей снижения функции Th1- и Th2-лимфоцитов по уровню продуцируемых ими интерлейкинов и характеру супрессии (подавления) гуморальных и клеточных иммунных реакций при подостром отравлении токсичными химикатами.

Эксперименты проводились на крысах Wistar обоего пола массой 180–240 г. Отравляющие вещества вводили подкожно в дозе 1/7 DL₅₀ ежедневно в течение 6 сут (DL₅₀ зарина, Vx, сернистого иприта и люизита при подкожном введении составляет соответственно 0,21±0,02, 0,018±0,004, 5,5±0,3 и 2,8±0,3 мг/кг; для инъекции иприта и люизита готовили их растворы в диметилсульфоксиде).

Показатели системы иммунитета оценивали методами, общепринятыми в экспериментальной иммунотоксикологии [8]. Гуморальную иммунную реакцию к тимус-зависимому антигену (эритроцитам барана) определяли на 5 сут по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке после первого введения токсиканта с одновременной внутрибрюшинной иммунизацией животных антигенами в дозе 2·10⁸ клеток. В использованном тесте гуморальная иммунная реакция на введение чужеродных эритроцитов характеризуется способностью Th1-лимфоцитов участвовать в продукции В-лимфоцитами иммуноглобулинов класса М — IgM [10]. При этом животные получали суммарную дозу токсиканта, составляющую 4/7 DL₅₀. Кроме того, АОК к введенным эритроцитам характеризуют также синтез иммуноглобулинов класса G — IgG, которые определяли в селезенке методом непрямого локального гемолиза в геле на 8 сут [10, 11]. Этот метод позволяет оценить функцию преимущественно Th2-лимфоцитов, так как Th1-лимфоциты обеспечи-

вают возможность образования в этот период антителогенеза, кроме IgM, также и IgG_{2a}, составляющих не более 20% от всех подклассов IgG [10, 12]. При этом животные получали суммарную дозу токсиканта, равную 6/7 DL₅₀.

Активность естественных клеток-киллеров определяли по показателю естественной цитотоксичности через 4 сут после первой инъекции токсичного вещества спектрофотометрическим методом.

Формирование гиперчувствительности замедленного типа, характеризующей функцию Th1-лимфоцитов [13], определяли по приросту у животных массы стопы задней лапы (в %). При этом крыс внутрибрюшинно иммунизировали эритроцитами барана через 30 мин после введения токсиканта. Разрешающую дозу эритроцитов ($5 \cdot 10^8$ клеток) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа оценивали через 24 ч.

Концентрацию цитокинов — интерлейкинов (ИЛ-2, ИЛ-4) — определяли в периферической крови крыс через 4 и 7 сут после первой инъекции токсичного вещества методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA) [10], используя реактивы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int.

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

Установлено, что под влиянием токсичных веществ происходит снижение гуморального иммунного ответа к тимус-зависимому антигену, характеризующему синтез IgM и функцию Th1-лимфоцитов, через 4 сут после введения вещества (табл. 1). Так, вещество типа Vx, зарин, иприт и люизит уменьшают данный параметр соответственно в 2,66; 2,32; 3,95 и 3,22 раза ($p < 0,05$). Через 7 сут отмечалась супрессия продукции IgG, отражающая преимущественно функцию Th2-лимфоцитов. При действии Vx и зарина число АОК, синтезирующих IgG, снижалось соответственно в 1,72 и 1,44 раза, при отравлении ипритом и люизитом — соответственно в 3,73 и 3,33 раза. При поражении веществом типа Vx, зарин, ипритом и люизитом отмечалась также существенная редукция активности естественных клеток-киллеров соответственно в 2,56; 2,23; 4,31 и 3,42 раза и реакции гиперчувствительности замедленного типа — соответственно в 2,24; 2,04; 3,64 и 3,05 раза. Установлено, что иммунные реакции на действие иприта и люизита по сравнению с действием вещества типа Vx и зарина уменьшаются в большей степени.

Как уже указывалось, число АОК к вводимым эритроцитам, регистрируемое через 4 сут после инъекции токсиканта, характеризует синтез IgM В-лимфоцитами и функцию Th1-клеток. Активность естественных клеток-киллеров и формирование гиперчувствительности замедленного типа также свидетельствует о способности Th1-лимфоцитов влиять на данные иммунные реакции, а число АОК к введенным эритроцитам, определяемое методом непрямого локального гемолиза в геле через 7 сут, отражает синтез IgG и функцию Th2-лимфоцитов [10—12]. Показатели, характеризующие различные иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, при подостром отравлении веществом типа Vx и зарин в среднем снижались соответственно в 2,34 и 1,58 раза, а при отравлении ипритом и люизитом — в 3,60 и 3,53 раза, соответственно. Это свидетельствует о том, что антихолинэстеразные токсиканты Vx и зарин в существенно большей степени поражают функцию Th1-лимфоцитов, а иприт и люизит нарушают в равной степени функцию Th1- и Th2-лимфоцитов.

Данное заключение подтверждается результатами измерения содержания цитокинов в периферической крови крыс после введения им подкожно токсичных веществ (табл. 2). При подострой интоксикации веществом типа Vx содержание интерлейкинов ИЛ-2 и ИЛ-4 уменьшается на 5 сут, соответственно, в 2,08 и 1,33 раза, а на 8 сут — в 2,24 и 1,49 раза, соответственно. В случае зарина наблюдается в целом такой же характер редукции исследованных параметров.

Иприт снижает содержание в периферической крови ИЛ-2 и ИЛ-4 на 5 сут в 3,12 и 2,97 раза, соответственно, а на 8 сут — в 4,25 и 4,14 раза. Концентрация в крови ИЛ-2 и ИЛ-4 на 5 сут после действия люизита уменьшается в 2,56 и 2,58 раза, соответственно, а на 8 сут — в 3,58 и 3,05 раза. Таким образом, снижение содержания интерлейкинов более выражено при отравлении ипритом и люизитом, чем при действии антихолинэстеразных токсикантов, причем при действии Vx и зарина концентрация ИЛ-2 по сравнению с ИЛ-4 в крови снижается в большей степени, а при интоксикации ипритом и люизитом содержание в крови ИЛ-2 и ИЛ-4 уменьшается в равной степени.

Известно, что ИЛ-2 продуцируют Th1-лимфоциты, а ИЛ-4 — Th2-лимфоциты [10, 12, 14]. Увеличение соотношения ИЛ-2/ИЛ-4 указывает на снижение функциональной активности лимфоцитов Th2-типа по

Таблица 1

Показатели системы иммунитета при подострой интоксикации.

Ежедневное подкожное введение в течение 6 сут крысам токсичных веществ в дозе 1/7 DL₅₀ ($x \pm Sx$, $n = 7-11$)

Токсикант	АОК (10^3) к эритроцитам барана, синтезирующим через 4 и 7 сут IgM и IgG		Естественная цитотоксичность, %	Гиперчувствительность замедленного типа, %
	IgM	IgG		
Контроль	38,3 ± 3,6	15,3 ± 1,6	31,5 ± 3,2	35,7 ± 2,5
Вещество типа Vx	14,4 ± 1,5*	8,9 ± 1,1*	12,3 ± 2,2*	15,9 ± 2,1*
Зарин	16,5 ± 1,7*	10,6 ± 1,0*	14,1 ± 2,0*	17,5 ± 1,9*
Иприт	9,7 ± 0,8**	4,1 ± 0,9**	7,3 ± 0,9*	9,8 ± 1,1*
Люизит	11,9 ± 1,2**	4,6 ± 0,8**	9,2 ± 1,1*	11,7 ± 1,3**

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ по сравнению с действием Vx и зарина; * $p < 0,05$ по сравнению с действием зарина.

Таблица 2

Содержание интерлейкинов (ИЛ-2 и ИЛ-4) в периферической крови при подострой интоксикации.

Ежедневное подкожное введение в течение 6 сут крысам токсичных веществ в дозе 1/7DL₅₀ ($x \pm Sx$, $n = 6$)

Токсикант	Измерение содержания ИЛ после иммунизации	Содержание интерлейкинов, пг/мл		ИЛ-2/ИЛ-4
		ИЛ-2	ИЛ-4	
Контроль		1321 ± 92	116 ± 12	11,4
Вещество типа Vx	5-е сут	635 ± 32*	87 ± 6*	7,3
	8-е сут	590 ± 30*	78 ± 5*	7,6
Зарин	5-е сут	556 ± 37*	80 ± 7*	7,0
	8-е сут	519 ± 28*	69 ± 5*	7,5
Иприт	5-е сут	423 ± 35*	39 ± 4*	10,8
	8-е сут	311 ± 31**	28 ± 3**	11,1
Люизит	5-е сут	517 ± 38*	45 ± 5*	11,5
	8-е сут	369 ± 40**	37 ± 4*	10,0

* $p < 0,05$ по сравнению с контролем; ** $p < 0,05$ по сравнению с показателем на 5 сут.

сравнению с функцией Th1-клеток [14]. Как нами установлено, соотношение ИЛ-2/ИЛ-4 при отравлении веществом типа Vx составляло на 5 и 8 сут соответственно 7,3 и 7,6 при контрольном значении 11,4. Аналогичные данные получены в случае воздействия зарина. При подостром отравлении ипритом и люизитом соотношение ИЛ-2/ИЛ-4 находится в пределах от 10,0 до 11,5. Эти результаты свидетельствуют о более выраженной супрессии антихолинэстеразными токсикантами функции Th1-лимфоцитов и приблизительно равной степени редукции функции Th1- и Th2-клеток при интоксикации отравляющими веществами кожно-нервного действия. Вероятно, супрессирующий эффект антихолинэстеразных токсикантов в отношении преимущественно Th1-лимфоцитов обусловлен способностью этих токсикантов ингибировать в большей степени ацетилхолинэстеразу на клеточной мембране лимфоцитов Th1-типа и α -нафтил-AS-ацетатэстеразу и α -нафтилбутиратэстеразу в их цитозоле [7, 9, 15], а также большей ролью эстераз в реализации функций данной субпопуляции T-лимфоцитов. Кроме того, антихолинэстеразные токсиканты вызывают большую активацию гипоталамо-гипофизарно-адреналовой системы (стресс-реакция), что приводит к значительному увеличению концентрации в крови кортикостерона, чем при поражении ипритом и люизитом [7, 9]. При этом данный гормон в большей степени снижает функцию лимфоцитов Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [10].

Редукция активности естественных клеток-киллеров под влиянием токсичных химикатов, видимо, связана со снижением продукции ИЛ-2 Th1-клетками. Известно, что данный цитокин активируют естественные клетки-киллеры [10, 12].

Итак, проведенные исследования привели к следующим основным выводам.

Подострое действие зарина и вещества типа Vx 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. В случае подострой интоксикации ипритом и люизитом иммунные реакции, связанные с функцией Th1- и Th2-лимфоцитов, снижаются в равной степени. При этом супрессия биологических параметров более выражена, чем при действии зарина и Vx.

Особенности поражения лимфоцитов Th1 и Th2 заринном, веществом Vx, подтверждаются результатами исследований, свидетельствующими о том, что в периферической крови концентрация интерлейкина-2 по сравнению с интерлейкином-4 уменьшается в большей степени. При действии иприта и люизита содержание ИЛ-2 и ИЛ-4 в крови снижается в равной степени, при этом редукция показателей системы иммунитета более выражена, чем при поражении антихолинэстеразными токсикантами.

Полученные данные могут быть использованы для разработки способов снижения поражения системы иммунитета токсичными веществами путем введения цитокинов, в частности ИЛ-2 и ИЛ-4, в оптимальных дозах в зависимости от особенностей нарушений иммунного гомеостаза. Кроме того, поражение веществом типа Vx и заринном Th1-лимфоцитов в большей степени, чем лимфоцитов Th2-типа, свидетельствует о возможности реализации респираторных аллергических реакций при действии данных токсичных химикатов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Amitai G., Adani R., Fishbein E. e. a. J. Appl. Toxicol., 2006, v. 26, № 1, p. 81–87.
2. Lenz D.E., Maxwell D.M., Korlovich I. e. a. Chem. Biol. Interact., 2005, v. 157–158, p. 205–210.
3. Shin T.M., Kan R.K., McDonough J.H. Chem. Biol. Interact., 2005, v. 157–158, p. 293–303.
4. Arroyo C.M., Burman D.L., Kahler D.L. e. a. Cell Biol. Toxicol., 2004, v. 20, № 6, p. 345–359.
5. Saladi R.N., Smith E., Persaud A.N. Clin. Exp. Dermatol., 2006, v. 1, № 6, p. 1–5.
6. Sharp D. Lancet, 2006, v. 14, № 367 (9505), p. 95–97.
7. Забродский П. Ф. В кн.: Общая токсикология. Под ред. Б.А. Курляндского, В.А. Филова. М.: Медицина, 2002, с. 352–384.
8. Забродский П. Ф., Германчук В.Г., Киричук В.Ф. и др. Бюл. эксперим. биол. и мед., 2003, т. 136, № 8, с. 202–204.
9. Забродский П.Ф., Лим В.Г., Мальцева Г.М., Молотков А.О. Иммунотропные свойства холинэргических веществ. Под ред. П.Ф.Забродского. Саратов: Научная книга, 2005, 251 с.
10. Roitt A., Бростофф Дж., Меил Д. Иммунология. Пер. с англ. М.: Мир, 2000, 582 с.
11. Smialowicz R.J., Luebke R.W., Riddle M.M. Toxicology, 1992, v. 75, № 5, p. 235–247.
12. Georgiev V.St., Albright J.E. Ann. N.Y. Acad. Sci., 1993, v. 685, p. 284–602.
13. Петров А.П., Софронов Г.А., Нечипоренко С.П., Сомин И.Н. Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им Д.И. Менделеева), 2004, т. 48, № 2, с. 110–116.
14. Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др. Бюл. эксперим. биол. и мед., 2005, т. 140, № 12, с. 622–624.
15. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Иммунологическая цитохимия. М.: Медицина, 1983, 319 с.