

615.7/623.459.46/-099:547.1:118.5:577.153.9.014

INVESTIGATIONS INTO THE INFLUENCE OF MULTIPLE DOSES OF A POTENT CHOLINESTERASE INHIBITOR ON THE HOST RESISTANCE AND HUMORAL MEDIATED IMMUNITY IN RATS

Ivan Samnaliev, Konstantin Mladenov, Plamen Padechky
Military Medical Academy, Sofia, Bulgaria

The intoxication with organophosphorus compounds causes inhibition of cholinesterase with subsequent elevation of blood and tissue levels of acetylcholine that is reason for manifestation of typical symptoms. The main symptoms are results of disturbance of the central and peripheral nervous, cardiovascular, gastrointestinal and endocrine systems. The effects of organophosphorus compounds are not limited on this systems only, especially in cases of subacute or chronic intoxications. There are investigations that direct attention on the influence of this class of chemicals of the immune system too (1). Recently assumption is that the immunotoxic effects of organophosphorus compounds are most likely mediated by noncholinergic mechanisms. The observed alternations in immune system could be described mainly as immunosuppression or immunostimulation, i. g. hypersensitivity. The type of immune reaction is depending on chemical structure, dose, duration and route of application of the examined compound.

The purpose of this article is to describe the results obtained under conditions of an experiment in vivo using irreversible cholinesterase inhibitor applied at subacute doses. In the course of the investigations, host resistance and some parameters of humoral immunity were observed.

Materials and Methods

Toxic agent and antidotal drugs: 1,1,2-trimethylpropyl methylphosphonofluoridate (TMPhF) was used as an irreversible inhibitor of cholinesterase; (4-hydroxy-iminomethyl-pyridinium-1-methyl) - (3-carboxy-amido-pyridinium-1-methyl) ether dichloride, (HJ-1) as a reactivator of cholinesterase and N-ethyl-3piperidyl ester of diphenylhydroxy acetic acid as a cholinolytic (MC-2) synthesized in MMA were used for treatment of the intoxicated rats.

Animals: 60 out bred „Wistar“ male rats, 8 weeks of age were kept under conventional conditions: up to 10 rats per cage, $T = 20 \pm 2^\circ\text{C}$, 12 h. light/dark cycle.

Bacterial strains: *Pseudomonas aeruginosa* 5875 and *Listeria monocytogenes* serovar 4B (National Center for Infectious and Parasitic Diseases, Sofia, Bulgaria) were used for assessment of the local nonspecific mechanisms of defence and

615.7/623.459.46/-099:547.1:118.5:577.153.9.014

SLEDOVÁNÍ VLIVU OPAKOVANÝCH DÁVEK ÚČINNÉHO INHIBITORU CHOLINESTERÁZY NA REZISTENCI HOSTITELE A HUMORÁLNĚ ZPROSTŘEDKOVANOU IMUNITU U POTKANŮ

Ivan Samnaliev, Konstantin Mladenov, Plamen Padechky
Vojenská lékařská akademie, Sofie, Bulharsko

Intoxikace organofosfáty způsobuje inhibici cholinesteráz s následným zvýšením hladiny acetylcholinu v krvi a tkáních spojeným s manifestací typických příznaků. Hlavní symptomy jsou výsledkem poruchy funkcí centrálního a periferního nervového, kardiovaskulárního, gastrointestinálního a endokrinního systému. Vliv organofosfátů se neomezuje pouze na tyto systémy zvláště v případech subakutních nebo chronických intoxikací. Existují studie, které se zabývají vlivem chemických látek této třídy také na imunitní systém (1). V současnosti existuje domněnka, že imunotoxické účinky organofosfátů jsou s největší pravděpodobností zprostředkovány necholinergními mechanismy. Sledované změny imunitního systému by mohly být popsány především jako imunosuprese nebo imunostimulace, tj. hypersenzitivita. Druh imunitní reakce závisí na chemickém složení, dávce, trvání a způsobu podání testované sloučeniny.

Cílem tohoto článku je popsat výsledky získané v podmínkách experimentu in vivo při použití ireverzibilního inhibitoru cholinesterázy aplikovaného v subakutních dávkách. Během studie byla sledována rezistence hostitele a některé parametry humorální imunity.

Materiál a metodika

Toxická látka a antidota: 1,1,2-trimethylpropyl methylfluorofosfonát (TMPhF) byl použit jako ireverzibilní inhibitor cholinesterázy; (4-hydroxy-iminomethyl-pyridinium-1-methyl) - (3-karboxy-amido-pyridinium-1-methyl) dichloridéter, (HJ-1) jako reaktivátor cholinesterázy a N-etyl-3piperidyl ester difenylhydroxyl kyseliny octové jako cholinolytikum (MC-2) syntetizované v MMA byly použity k léčbě intoxikovaných potkanů.

Zvířata: 60 potkanů (samců) kmene Wistar ve stáří 8 týdnů bylo chováno ve standardních podmínkách: v jedné kleci až 10 potkanů, teplota $20 \pm 2^\circ\text{C}$, světlo/tma v intervalu 12 hodin.

Bakteriální kmeny: *Pseudomonas aeruginosa* 5875 a *Listeria monocytogenes* serovar 4B (Národní centrum infekčních a parazitárních nemocí, Sofie, Bulharsko) byly použity pro hodnocení místních nespecifických mechanismů obranyschopnos-

cellular immunity. *Ps. aeruginosa* was applicated subcutaneous in concentrations 1.10^8 and 1.10^9 cells and *L. monocytogenes* intraperitoneally in concentration 1.10^9 cells.

SRBC (sheep red blood cells) were received from whole blood after three times centrifugation and washing with PBS (phosphate buffer saline) before use. SRBC and bacterial nutritious media were purchased from NCIPD, Sofia, Bulgaria.

The acute i.m. LD_{50} of TMPHF determined by the method of Litchfield and Wilcoxon (2) was 50.4 (46.7-56.7) mg/kg.

Experimental groups and observed parameters: The experimental animals were derived as follow: 20 rats were intoxicated i.m. with $1/10 LD_{50}$ (5 mg/kg) of TMPHF, 5 days (the 1st group); 20 rats were intoxicated with $1/10 LD_{50}$ of TMPHF and 1 min. latter were treated with HJ-1 (20 mg/kg) and MC-2 (10 mg/kg) i.m., 5 days (the 2nd group); other 20 rats were treated i.m. with 0.9 % solution of NaCl, 5 days (the 3rd group).

Skin necrotic reaction after s.c. inoculation of *Ps. aeruginosa* (1.10^8 and 1.10^9 cells) one day after the last treatment in all three groups was measured on the 1st, 2nd, 4th and 7th day.

The bacterial clearance of *L. monocytogenes* from the spleen and peritoneal lavage after i.p. inoculation (1.10^9 cells) one day after the last treatment of the rats was determined in three terms - the 1st, 3rd and 4th day. The peritoneal lavage was separated by centrifugation and count of colony forming units of sediment and supernatant were enumerated.

The number of splenic plaque forming cells (IgM-antibody anti-SRBC forming cells) was determined according to the method of Cunningham and Szenberg (3). The immunization with SRBC was performed three days after last treatment of the experimental animals with TMPHF, TMPHF and antidotes and NaCl solution only. Five days later the reaction was made.

The number of peritoneal cells received from non-infectious rats was enumerated on the 3rd and 10th day for all groups.

Results and Discussion

The animals from the 1st and 2nd groups did not show physiological disturbance during the treatment with TMPHF only or TMPHF and antidote drugs.

The data from SNR are shown on Fig. 1. The initial inflammatory necrotic reaction (d1) is strongest in the rats from TMPHF intoxicated and antidote treated group. In the following terms, significant differences between experimental and control groups are not observed. However the degree of

ti a buněčné imunity. *Ps. aeruginosa* byla aplikována subkutánně v koncentracích 1.10^8 a 1.10^9 buněk a *L. monocytogenes* intraperitoneálně v koncentraci 1.10^9 buněk.

SRBC (ovčí erytrocyty) byly získány z plné krve trojnásobnou centrifugací a před použitím byly promývány PBS (fyziologický roztok tlumený fosfátem). SRBC a bakteriální nutriční média byly zakoupeny v Národním centru pro infekční a parazitární nemoci v Sofii, Bulharsko.

Akutní i.m. LD_{50} aplikované látky TMPHF byla stanovena metodou Litchfielda a Wilcoxon (2) a činila 50,4 (46,7-56,7) mg/kg.

Experimentální skupiny a sledované parametry: Laboratorní zvířata byla použita následovně: 20 potkanů bylo intoxikováno i.m. aplikovaným TMPHF v dávce $1/10 LD_{50}$ (5 mg/kg) po dobu 5 dnů (1. skupina); 20 potkanů bylo intoxikováno $1/10 LD_{50}$ látky TMPHF a o minutu později léčeno i.m. podanou látkou HJ-1 (20 mg/kg) a MC-2 (10 mg/kg) po dobu 5 dnů (2. skupina); ostatním 20 potkanům byl podáván i.m. 0,9% roztok NaCl po dobu 5 dní (3. skupina).

Nekrotická reakce kůže po subkutánní inokulaci *Ps. aeruginosa* (1.10^8 a 1.10^9 buněk) provedené 1 den po poslední aplikaci noxy byla měřena 1., 2., 4. a 7. den.

Bakteriální clearance *L. monocytogenes* ze sleziny a peritoneální laváže po i.p. inokulaci (1.10^9 buněk) jeden den po poslední aplikaci toxické látky potkanům byla stanovována ve 3 intervalech - 1., 3. a 4. den. Peritoneální laváž byla separována centrifugací a bylo stanoveno množství CFU v sedimentu a supernatantu.

Počet slezinných buněk tvořících plaky (buňky tvořící IgM protilátky proti ovčím erytrocytům) byl určován metodou Cunninghama a Szenberga (3). Imunizace ovčími erytrocyty byla prováděna 3 dny po posledním podání TMPHF, TMPHF a antidot či samotného roztoku NaCl laboratorním zvířatům.

Počet peritoneálních buněk získaných od neinfikovaných potkanů byl stanoven ve všech skupinách 3. a 10. den.

Výsledky a diskuse

U zvířat 1. a 2. skupiny se během podání samotného TMPHF nebo TMPHF a antidot neprojevovaly fyziologické poruchy.

Údaje o nekrotické reakci na kůži jsou uvedeny na obr. 1. Počáteční zánětlivě nekrotická reakce (d1) je nejsilnější u potkanů ze skupiny intoxikované TMPHF a léčené antidoty. Mezi experimentální a kontrolní skupinou nebyly shledány významné rozdíly. Velikost reakce u kontrolních potkanů však

the reaction in the control rats on the 7th day suggests that local mechanisms of defence in this group are more effective.

Total number of peritoneal cells received from non-infected rats did not show significant differences between groups (Fig. 2), but could be noted their increase in TMPHF group especially on the 3rd day.

Persistence of *L. monocytogenes* in spleen and peritoneal lavage after i.p. inoculation of $1 \cdot 10^9$ microbe cells is given on Fig. 3 and Fig. 4a,b,c. The elimination of the infectious agent is the most rapid from rats intoxicated with TMPHF without antidote treatment. Number of colony forming units in sediment is an indicator phagocytated bacteria and vice versa. The results suggest that phagocytic activity in TMPHF-group is strongest although there is not significant difference between this and control groups. The antidote treatment with HJ-1 and MC-2 seems to retard the elimination of *L. monocytogenes* in regard to dynamic of bacterial clearance in this group. This assumption is in good correlation with the number of peritoneal cells enumerated at the 1st and 3rd days after i.p. inoculation of *L. monocytogenes* (Fig. 5).

Significant difference was found between the number of plaque forming cells determined 8 days after the last chemical exposure of the rats. PFC were decreased in TMPHF intoxicated rats ($p < 0.05$) and twofold increase of PFC was observed in group with antidote treatment after intoxication, in comparison with control rats (Fig. 6).

From experiments carried out with *Ps. aeruginosa* and *L. monocytogenes*, it could be assumed that multiple subacute dose ($1/10 \text{ LD}_{50}$ i.m.) of TMPHF does not suppress nonspecific mechanisms of bacterial defence and cell mediated immunity as far as they are responsible to the resistance to both infectious agents. Contrary effect of TMPHF on the IgM response to T-dependent antigen is available. Suppression of IgM response to SRBC in mice after acute intoxication with malathion and parathion were described (4). Alternation of humoral-mediated immunity in vivo and in vitro investigations caused with O,O,S-trimethyl phosphorothioate (O,O,S-TMP) were also observed (5). There are different hypotheses for the possible mechanisms by which organophosphorus compounds alter immune response (6). It is very difficult to explain the effects of this class of chemicals on the immune system with anticholinesterase activity only because of the fact that alteration of immune functions are established in cases when used doses do not cause symptoms of intoxication. On the other hand, the type of chemical structure, mode of application and metabolic properties of the concrete compound are very important conditions for its immunotoxic effects.

Previous investigations have reviewed that soman causes relatively rapid release of histamine in

7. den ukazuje, že místní obranné mechanismy jsou v této skupině účinnější.

Celkový počet peritoneálních buněk získaných od neinfikovaných potkanů neukázal významný rozdíl mezi skupinami (obr. 2), ale mohlo být zaznamenáno jeho zvýšení ve skupině TMPHF hlavně 3. den.

Perzistence *L. monocytogenes* ve slezině a peritoneální laváži po intraperitoneální inokulaci $1 \cdot 10^9$ buněk mikrobů je uvedena na obr. 3 a obr. 4a,b,c. Eliminace infekčního agens je nejrychlejší u potkanů intoxikovaných TMPHF bez léčby antidoty. Počet CFU v sedimentu je ukazatelem fagocytovaných bakterií a naopak. Výsledky ukazují, že fagocytární aktivita ve skupině TMPHF je nejsilnější, ačkoli není významný rozdíl mezi touto a kontrolní skupinou. Zdá se, že léčba antidoty HJ-1 a MC-2 zpomaluje eliminaci *L. monocytogenes* s ohledem na dynamiku bakteriální clearance v této skupině. Tato domněnka koreluje s počtem peritoneálních buněk stanovených 1. a 3. den po i.p. inokulaci *L. monocytogenes* (obr. 5).

8. den po posledním podání noxy potkanům byl zjištěn významný rozdíl mezi počtem buněk tvořících plaky. Počet buněk tvořících plaky klesl u potkanů intoxikovaných TMPHF ($p < 0,05$) a zdvojnásobil se ve skupině léčené antidoty po intoxikaci ve srovnání s kontrolními potkany (obr. 6).

Z experimentů prováděných s *Ps. aeruginosa* a *L. monocytogenes* by se dalo shrnout, že vícenásobná subakutní dávka ($1/10 \text{ LD}_{50}$ i.m.) TMPHF nepotlačuje nespecifické mechanismy bakteriální obranyschopnosti ani imunitní odpověď zprostředkovanou buňkami, pokud odpovídají za rezistenci na obě infekční agens. Opačný vliv TMPHF na IgM odpověď na T-dependentní antigen je evidentní. Bylo popsáno potlačení reakce IgM na ovčí erythrocyty u myši po akutní intoxikaci malathionem a parathionem (4). Byla také sledována změna humorálně zprostředkované imunitní odpovědi v experimentech in vivo a in vitro způsobené O,O,S-trimethyl thiofosfátem (O,O,S-TMP) (5). Existuje několik hypotéz o možných mechanismech, kterými organofosfáty mění imunitní odpověď (6). Je složité vysvětlit vliv chemických látek této třídy na imunitní systém pouze anticholinesterázovou aktivitou. Důvodem je fakt, že změna imunitních funkcí se objevuje v případech, kdy použité dávky noxy nevyvolají příznaky intoxikace. Na druhé straně typ chemické struktury, způsob aplikace a metabolické vlastnosti konkrétní sloučeniny jsou velmi důležité podmínky jejich imunotoxických účinků.

Předchozí sledování uváděla, že soman způsobuje relativně rychlé uvolňování histaminu v expe-

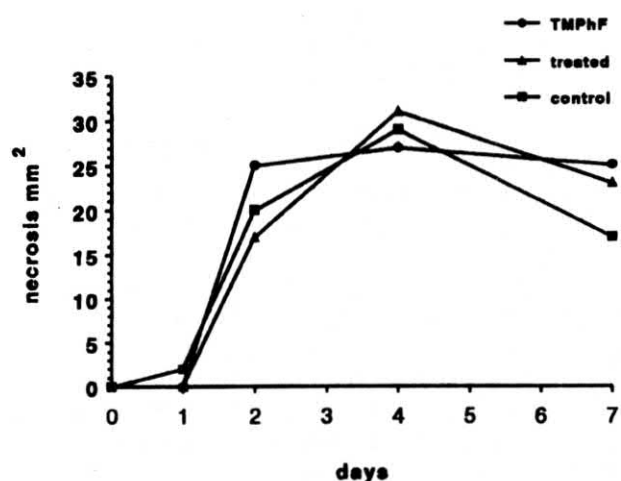


Fig. 1 Skin necrotic reaction after s.c. inoculation of *P. aeruginosa* ($1 \cdot 10^9$ cells)

Obr. 1 Nekrotická reakce kůže po podkožní inokulaci *P. aeruginosa* ($1 \cdot 10^9$ buněk)

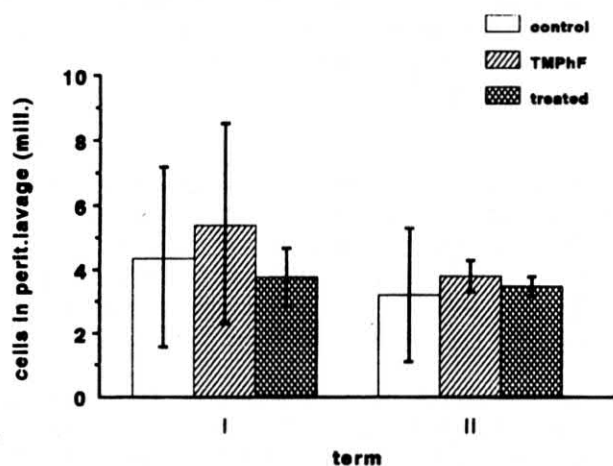


Fig. 2 Number of peritoneal cells received from noninfectious with *L. monocytogenes* rats

Obr. 2 Počet peritoneálních buněk získaných z neinfekčních potkanů s *L. monocytogenes*

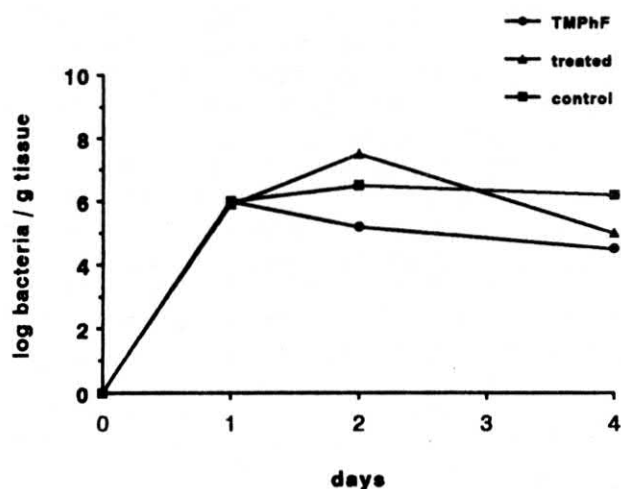


Fig. 3 Clearance of *L. monocytogenes* from spleen

Obr. 3 Odstranění *L. monocytogenes* ze sleziny

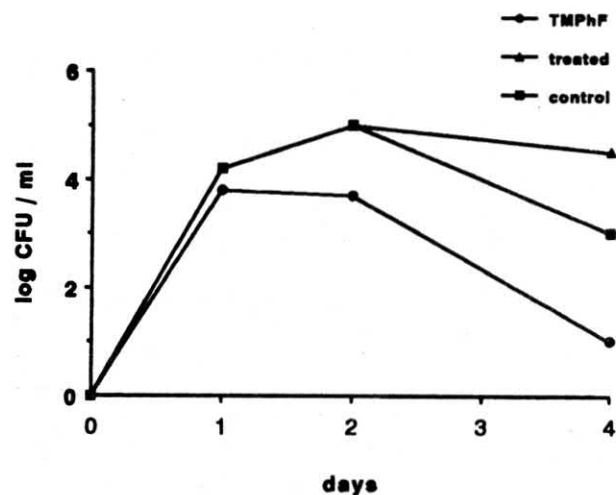


Fig. 4a Colony forming cells in total peritoneal lavage after i.p. inoculation of *L. monocytogenes* in rats

Obr. 4a Buňky tvořící kolonie v celkové peritoneální laváži po i.p. inokulaci *L. monocytogenes* potkanům

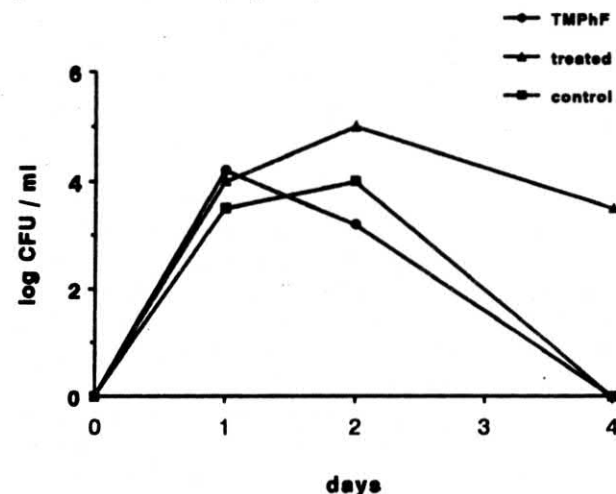


Fig. 4b Colony forming cells from supernatant after i.p. inoculation of *L. monocytogenes* in rats

Obr. 4b Buňky tvořící kolonie ze supernatantu po i.p. inokulaci *L. monocytogenes* potkanům

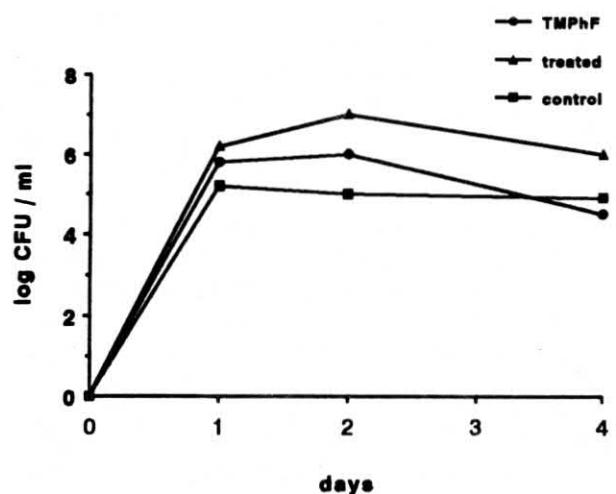


Fig. 4c Colony forming cells from sediment of peritoneal lavage after i.p. inoculation of *L. monocytogenes* in rats

Obr. 4c Buňky tvořící kolonie ze sedimentu peritoneální laváže po i.p. inokulaci *L. monocytogenes* potkanům

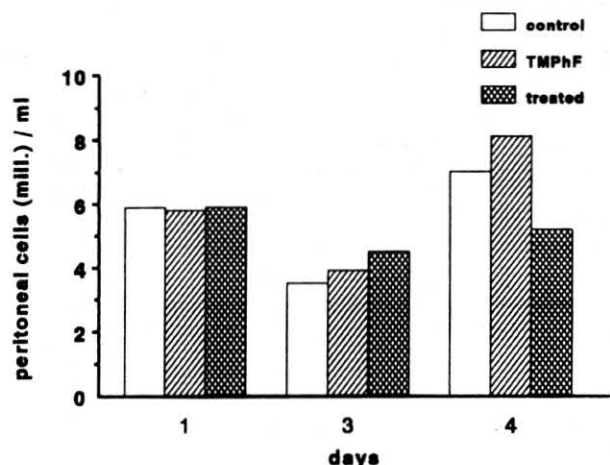


Fig. 5 Number of peritoneal cells after i.p. inoculation of *L. monocytogenes* in rats
Obr. 5 Počet peritoneálních buněk po i.p. inokulaci *L. monocytogenes* potkanům

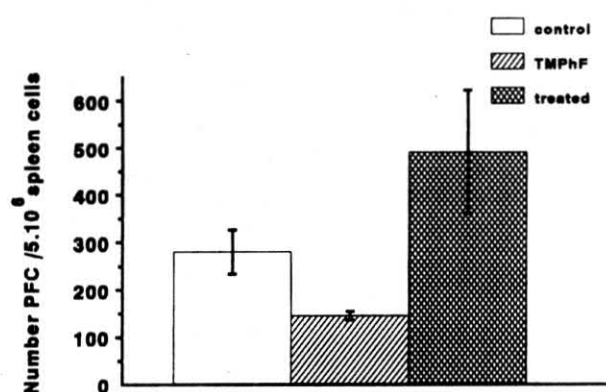


Fig. 6 IgM antibody response against sheep red blood cells in rats
Obr. 6 Produkce IgM protilátek proti ovčím červeným krvinkám u potkanů

in vivo and in vitro experiments (7). Authors concluded that histamine is an important mediator of soman-induced pathophysiological responses in the rat. The role of histamine release induced by organophosphorus compounds may contribute to hypersensitivity responses observed with this class of chemicals.

It is difficult to discuss the data obtained from rats that were intoxicated and then treated with HJ-1 and MC-2 because of the lack of control antidote group in this investigation. The reactivator of cholinesterase and cholinolytic were applied 1 min. after intoxication, thus, it could be assumed that results from SNR, bacterial clearance of *L. monocytogenes* from spleen and peritoneal lavage and number of plaque forming cells are related to the effects of the used antidotes. The presence of three different compounds with specific interaction between them is a complicated phenomenon and explanation of the altered immune function observed in this case requires more profound investigation.

In conclusion, it could be that multiple subacute doses of TMPhF used under conditions of this investigation do not alter host resistance to infectious agents - *Ps. aeruginosa* and *L. monocytogenes* but decrease in the number of plaque forming cells when sheep red blood cells as an antigen are used.

rimentech in vivo a in vitro (7). Autoři došli k závěru, že histamin je důležitým mediátorem patofyziologické reakce potkanů vyvolané somanem. Organofosfáty vyvolané uvolňování histaminu může přispět k hypersenzitivní reakci zjištěné u chemických sloučenin této skupiny.

Je obtížné hovořit o údajích získaných od potkanů, kteří byli intoxikováni a poté léčeni HJ-1 a MC-2, protože v tomto výzkumu chybí kontrolní skupina s antidoty. Reaktivátor cholinesterázy a cholinolytikum byly aplikovány 1 min po intoxikaci, z čehož vyplývá, že výsledky nekrotické reakce kůže, bakteriální clearance *L. monocytogenes* ze sleziny a peritoneální laváže a počet buněk tvořících plaky souvisejí s účinky použitých antidot. Existence tří různých sloučenin se specifickou vzájemnou interakcí je složitým jevem a vysvětlení změny imunitní funkce zjištěné v tomto případě vyžaduje podrobnější studii.

V závěru lze říci, že opakované subakutní dávky TMPhF použité v podmínkách této studie nemění rezistenci hostitele na infekční agens - *Ps. aeruginosa* a *L. monocytogenes*, ale snižuje počet buněk tvořících plaky, jsou-li použity ovčí erytrocyty jako antigen.

References

1. NEWCOMBE, D. - ROSE, N. - BLOOM, J.: Clinical Immunotoxicology. New York, Raven Press 1992.
2. LITCHFIELD, J. - WILCOXON, F.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 140, 1963, 405.
3. CUNNINGHAM, A. - SZENBERG, A.: Immunology, 14, 1968, 599.
4. CASALE, G. - COHEN, S. - CAPUA, R. di: Arch. Toxicol. (Suppl.), 23, 1984, s. 239-247.
5. RODGERS, K. - IMAMURA, T. - DEVENS, B.: Immunopharmacology, 12, 1986, s. 193-202.
6. RODGERS, K. - IMAMURA, T. - DEVENS, B.: Toxicol. Appl. Pharmacol., 88, 1987, s. 270-281.
7. NEWBALL, H. et al.: J. Pharmacol. Exp. Ther., 238, 1986, s. 839-845.