

П.Ф. ЗАБРОДСКИЙ, А.А. СВИСТУНОВ, В.Г. ЛИМ, В.А. ГРИШИН

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИИ TH1- И TH2- ЛИМФОЦИТОВ И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что хроническая интоксикация этанолом (30 сут, суммарная доза – 6,0 DL₅₀) существенно снижает концентрацию в крови цитокинов ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, увеличивает содержание в крови ИЛ-6, супрессирует иммунные реакции, уменьшает соотношение ИФН-γ/ИЛ-4 по сравнению с контролем, что свидетельствует о большем поражении Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами.

Ключевые слова: этанол, иммунотоксичность, цитокины, Th1, Th2-лимфоциты.

CHANGE IN FUNCTION OF TH1- AND TH2-LYMPHOCYTES AND CYTOKINE PROFILE AT CHRONIC INTOXICATION OF ETHANOL

It was established in experiments on noninbred rats, that chronic intoxication of ethanol (30 days, total dose - 6,0 LD₅₀) significantly reduces concentration in a blood of cytokines IFNγ, IL-2, IL-4, IL-10, increase concentration in a blood of IL-6, reduces an interrelation IFNγ/IL-4 in comparison with the control, suppresses of immune responses, that testifies to the greater lesion of Th1-cells in comparison with Th2-lymphocytes.

Keywords: ethanol, immunotoxicity, cytokines, Th1, Th2- lymphocytes.

Этанол (Э, этиловый спирт) в медицинской практике применяется как антисептик и консервант, употребляется при приготовлении настоек и экстрактов в фармацевтической промышленности и в быту. С техническими целями Э используется как антиобледенитель в авиации, растворитель для морилок, политур, клея и т.п. Анализ причин демографического кризиса в России свидетельствует о том, что к числу ведущих факторов, обуславливающих это явление, относится рост потребления алкоголя, которое за последние 5 лет увеличилось на 32-38%, при этом смертность от случайных отравлений этанолом возросла на 255% и за последние годы неуклонно прогрессирует. Летальность после интоксикаций Э может быть связана с инфекционными осложнениями и заболеваниями, обусловленными снижением показателей иммунного статуса. Знание иммунопатогенеза действия Э необходимо для обоснования фармакологической

коррекции постинтоксикационного нарушения иммунного гомеостаза с целью профилактики различных инфекционных осложнений и заболеваний [1,2].

От особенностей поражения антигенпредставляющих клеток, популяций Т-лимфоцитов, В-клеток Э зависит характер формирования вторичного иммунодефицитного состояния, и, следовательно, способы коррекции нарушений иммунного статуса [1,3]. Известно, что Т-лимфоциты хелперы неоднородны и состоят из лимфоцитов Th0-, Th1-, Th2-, Th3-типа [2]. Лимфоциты Th0- типа синтезируют ИЛ-2, который стимулируют пролиферацию В-клеток. Кроме того, они выделяют многочисленные цитокины, продуцируемые Th1-, Th2-клетками (и другими клетками), за исключением ИЛ-12, который выделяют только Th2-лимфоциты [3]. Th1-клетки продуцируют γ -интерферон (ИФН- γ), участвуя в реализации клеточных иммунных реакций [2,3,4], кроме того, они обеспечивают синтез В-лимфоцитами (плазмócитами) IgM и IgG2a [4]. Th2-лимфоциты, синтезируя ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-13, способствуют активации, пролиферации и дифференцировке В-клеток, синтезу плазмócитами основных классов и подклассов иммуноглобулинов (IgG1, IgA1, IgA2 IgE и IgD). Кроме того, ИЛ-4 и ИЛ-13 ингибируют продукцию провоспалительных цитокинов макрофагами, а ИЛ-10, продуцируемый Th0-, Th2- клетками и макрофагами, снижает синтез цитокинов Th1-лимфоцитами [2,3,4].

В формировании аллергических и анафилактических реакций также участвуют лимфоциты Th1-и Th2-типа. Контактные (кожные) аллергические реакции связаны с функцией Th1-лимфоцитов, а респираторные аллергические реакции – с активностью Th2-лимфоцитов (синтез IgE) [1,3,4]. От соотношения активности лимфоцитов Th1-, Th2-типа (парадигма двух видов хелперов - Th1/Th2 [5]) может зависеть вероятность возникновения соответственно вирусных или микробных инфекций [6], также формирование контактной или респираторной гиперчувствительности [7].

Целью исследования являлась оценка иммунных реакций, отражающих функцию Th1-и Th2-лимфоцитов, и цитокинового профиля (содержание в крови ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10) при хронической интоксикации этанолом.

Материал и методы исследования. Опыты проводили на неинбредных белых крысах обоего пола массой 180-240 г. Этанол вводили per os в 40% водном растворе в дозе 0,2 DL₅₀ в течение 30 сут (DL₅₀ этанола составляла 12,3 $\pm$ 1,3 г/кг). Контрольная группа животных получала перорально соответствующий объем воды. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии и иммунологии [1,3]. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому антигену (эритроцитам барана - ЭБ), характеризующую способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции плазматическими клетками IgM, определяли по

числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке через 4 сут после иммунизации (пик продукции IgM), которую проводили внутрибрюшинно в дозе $2 \cdot 10^8$ на 26 сут после первого введения Э. Функцию Th1-лимфоцитов оценивали по реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Формирование ГЗТ, исследовали у животных по приросту массы стопы задней лапы в %. Разрешающую дозу ЭБ ($5 \cdot 10^8$) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут после иммунизации, которую проводили внутрибрюшинно на 26 сут после первого введения Э. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч. Функцию Th2-лимфоцитов исследовали по числу АОК, синтезирующие IgG к ЭБ, в селезенке на пике продукции данного иммуноглобулина (через 14 сут после иммунизации) методом непрямого локального гемолиза в геле [3]. При этом крыс иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток на 17 сут после первого введения Э. Таким образом, при оценке всех иммунных реакций животные получали суммарную эквивалентную дозу Э, составляющую 6,0 DL₅₀.

Концентрацию цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 исследовали в плазме крови крыс через 30 сут после первой инъекции Э методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int. Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента.

Результаты исследования. При воздействии Э в течение 30 сут (табл. 1) отмечалось уменьшение гуморального иммунного ответа к Т-зависимому антигену (по числу АОК в селезенке), характеризующему синтез IgM В-клетками и функцию Th1-лимфоцитов, по сравнению с контрольным уровнем в 3,04 раза ($p < 0,05$). При хронической интоксикации Э отмечалась существенная супрессия реакции ГЗТ (функция Th1-клеток) в 2,96 раза ($p < 0,05$), а функция Th2-лимфоцитов (оцениваемая по числу АОК, синтезирующих IgG к ЭБ) – в 2,10 раза ($p < 0,05$).

Таблица 1

Влияние хронической интоксикации этанолом на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов у крыс ($M \pm m$, $n = 9-11$)

Вещества	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10^3	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10^3
Контроль	43,5 $\pm$ 3,1	38,8 $\pm$ 3,3	52,8 $\pm$ 5,4
Э	14,3 $\pm$ 1,5*	13,1 $\pm$ 1,4*	25,1 $\pm$ 2,4*

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

Характеризующие иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1-лимфоцитов параметры при действии Э в среднем снижались в 3,00 раза, а показатели, связанные с функцией Th2-клеток, – в 2,10 раза. Установлена значительно меньшая редукция иммунного ответа, который обеспечивается функцией Th2-лимфоцитов (и В-клеток), при отравлении Э (соответствующее уменьшение числа АОК, синтезирующих IgG). Полученные данные свидетельствуют о том, что функция Th1-лимфоцитов под влиянием хронической интоксикации Э снижается в большей степени по сравнению с супрессией активности Th2-лимфоцитов.

Снижение активности Th1-клеток Э может быть обусловлена увеличением в крови концентрации кортикостерона вследствие хронической интоксикации Э [1], к которому в большей степени чувствительны лимфоциты Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [3].

При исследовании концентрации цитокинов в плазме крови крыс (табл. 2) установлено уменьшение содержания ИФН- γ и ИЛ-4 через 30 сут при хроническом действии Э соответственно в 3,82 и 2,85 раза ($p < 0,05$). Очевидно, что снижение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 под влиянием Э (5,6) по сравнению с контролем (7,5) свидетельствует о большей супрессии ($p < 0,05$) активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [1].

Концентрации ИЛ-2, ИЛ-10 после хронической интоксикации Э снижались соответственно в 3,1 и 2,05 ($p < 0,05$), а ИЛ-6 повышалась в 1,53 раза ($p < 0,05$).

Таблица 2

Влияние хронической интоксикации этанолом на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ($M \pm m$, $n = 7$)

Цитокины	Контроль	Этанол
ИФН- γ	1032 $\pm$ 98	270 $\pm$ 25*
ИЛ-4	137 $\pm$ 14	48 $\pm$ 5*
ИФН- γ /ИЛ-4	7,5 $\pm$ 0,7	5,6 $\pm$ 0,6
ИЛ-2	1369 $\pm$ 98	442 $\pm$ 32*
ИЛ-6	58 $\pm$ 7	89 $\pm$ 8*
ИЛ-10	383 $\pm$ 39	205 $\pm$ 19*

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

Обсуждение полученных результатов. Снижение в плазме крови под влиянием этанола ИЛ-2 свидетельствует о супрессии его продукции Т-лимфоцитами (как CD4⁺, относящимися к

лимфоцитам Th0- типа), так и некоторыми CD8⁺, редукции пролиферации Т- и В-клеток (синтеза J-цепи молекулы иммуноглобулина), активности естественных клеток-киллеров (ЕКК) [2,3].

Увеличение в крови ИЛ-6 (провоспалительного цитокина) характеризует увеличение его продукции макрофагами и лимфоидными дендритными клетками в печени вследствие ее поражения алкоголем [2,3,4].

Концентрация ИЛ-10 (антивоспалительный цитокин), продуцируемого Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками и снижающего секрецию ИФН- γ Th1-лимфоцитами [4,8] уменьшалась при хронической интоксикации Э. Этот эффект характерен для тяжелых металлов [9], динитрохлорбензола, формальдегида и других токсикантов [10]. Снижение синтеза ИЛ-10 в меньшей степени, чем ИФН- γ , подтверждает установленный нами больший поражающий эффект Э в отношении Th1-лимфоцитов. Относительно небольшая редукция ИЛ-10, вероятно, обусловлена значительным снижением синтеза ИФН- γ этанолом, что, вероятно, исключает регулирующего повышения Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками продукции ИЛ-10, который способен усилить супрессию функции Th1-лимфоцитов в еще большей степени.

Заключение.

1. Хроническое действие этанола вызывает большее поражение Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами и уменьшает соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 по сравнению с контролем.
2. Хроническая интоксикация этанолом существенно снижает концентрацию в крови цитокинов ИФН- γ , в меньшей степени - ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, а содержание в крови ИЛ-6 повышает.

Библиографический список:

1. Забродский, П.Ф. Иммунотоксикология ксенобиотиков: Монография / П.Ф. Забродский, В.Г.Мандыч – Саратов: СВИБХБ, 2007. – 420 с.
2. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. – 2-е изд., перераб. и доп./ Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович -М.: Медицина, 2002.- 536 с.
3. Ройт, А. Иммунология. Пер. с англ. / А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл - М.: Мир, 2000. – 582 с.
4. Georgiev, V.St. Cytokines / V.St. Georgiev, J.E. Albright // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. – 1993. - Vol. 685. – P.284-602.
5. Romagnani, S. The Th1/Th2 paradigm / S. Romagnani // Immunol. Today. –1997.- Vol. 18, №6.- P. 263-266.

6. Asquith, B. In vivo T lymphocyte dynamics in humans and the impact of human T-lymphotropic virus 1 infection / B. Asquith, Y. Zhang, A.J. Mosley // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.-2007.- Vol. 104, № 19. – P. 8035-8040.
7. Corsini, E. Factors governing susceptibility to chemical allergy / E. Corsini, I. Kimber // Toxicol. Lett. –2007.- Vol.168, №3.-P.255-299.
8. Kim, H.S. Evaluation of immunotoxicity induced by pirimiphos-methyl in male Balb/c mice following exposure to for 28 days / H.S. Kim, J.H. Eom, H.Y. Cho // J. Toxicol. Environ. Health.- 2007.- Vol. 70, №15-16.- P. 1278-1287.
9. Chen, G. J. Changes in T lymphocyte subsets and plasma Th1/Th2 cytokine levels in patients with occupational chronic lead poisoning / G. J. Chen, D. S. Huang, B. Watzl // Life Sci. – 2007. - Vol. 52, № 3.- P. 1319–1326.
10. Ulrich, P. Cytokine expression profiles during murine contact allergy: T helper 2 cytokines are expressed irrespective of the type of contact allergen / P. Ulrich, O. Grenet, J. Bluemel // Arch. Toxicol..- 2001.- Vol. 75, № 8.- P. 470-479.