

МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

П.Ф. Забродский, В.Г. Лим, В.А. Гришин, А.В. Кузьмин

Саратовский государственный медицинский университет

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что хроническая интоксикация этанолом (20 сут, суммарная доза – 5 DL₅₀) вызывает снижение иммунных реакций, связанных преимущественно с функцией Th1-клеток, увеличение концентрации кортикостерона в крови, уменьшение активности ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, концентрации цитокинов ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 в крови и повышение содержания ИЛ-6.

Ключевые слова: этанол, цитокины, Th1, Th2-лимфоциты, кортикостерон, ацетилхолинэстераза

Потребление этилового спирта в России постоянно увеличивается [1,2,9]. К факторам, определяющим тяжесть и уникальность алкогольной ситуации в России, относится высокий уровень потребления алкоголя, потребление алкоголя в виде крепких напитков, прежде всего водки в высоких разовых дозах, фальсифицированной продукции и суррогатов алкоголя, отличающихся повышенной токсичностью [3]. Рост потребления алкоголя относится к числу ведущих факторов, обуславливающих демографический кризис в России. Интоксикации алкоголем по числу летальных исходов занимают первое место среди отравлений другими химическими веществами, они характеризуются значительной тяжестью и высокой смертностью [1,2,3]. Острое отравление алкоголем происходит, как правило, на фоне его употребления в течение нескольких суток или при сформировавшемся хроническом алкоголизме. Смертность после острых и хронических интоксикаций этанолом может быть связана с инфекционными осложнениями и заболеваниями, обусловленными снижением показателей иммунного статуса [2]. При этом действие этанола на систему иммунитета изучено недостаточно [10,13,14,15]. Знание иммунопатогенеза действия этанола при хронических интоксикациях необходимо для

обоснования фармакологической коррекции постинтоксикационного нарушения иммунного статуса с целью профилактики различных инфекционных осложнений и заболеваний [2,11]. Целью исследования являлось изучение функции Th1- и Th2-лимфоцитов, содержания в крови кортикостерона (КС), цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ) Т-лимфоцитов при хронической интоксикации этанолом.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на неинбредных белых крысах обоего пола массой 180-240 г. Этанол вводили ежедневно, однократно *per os* в 40% водном растворе в дозе 0,25 DL₅₀ в течение 20 сут (суммарная доза – 5 DL₅₀). 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 [2,4]. Гуморальную иммунную реакцию к тимусзависимому антигену (эритроцитам барана - ЭБ), характеризующую способность Th1-лимфоцитов участвовать в продукции плазматическими клетками IgM [8], определяли по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке через 4 сут после иммунизации (пик продукции IgM), которую проводили внутрибрюшинно в дозе 2 $\cdot$ 10⁸ на 16 сут после первого введения этанола. 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 $\cdot$ 10⁸) вводили под апоневроз стопы задней лапы через 4 сут после внутрибрюшинной иммунизации на 16 сут после первого введения этанола. Реакцию ГЗТ оценивали через 1 сут. Функцию Th2-лимфоцитов исследовали по числу АОК, синтезирующие IgG к ЭБ, в селезенке через 7 сут после иммунизации методом непрямого локального гемолиза в геле [4]. При этом крыс иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе 2 $\cdot$ 10⁸ клеток на 14 сут после первого введения спирта.

Концентрацию цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10 исследовали в плазме крови крыс через 20 сут после первой инъекции этанола методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int.

Активность ацетилхолинэстеразы (АХЭ) в Т-лимфоцитах и содержание КС в крови определяли через 20 сут после интоксикации по описанным методам [2]. За единицу активности АХЭ (ЕД) принимали мкмоль ацетилхолина, гидролизованного за 1 мин в мл суспензии, содержащей 10⁹ Т-лимфоцитов.

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

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хроническая интоксикация этанолом в течение 20 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 3,17 раза ($p < 0,05$). При хронической интоксикации алкоголем отмечалась редукция формирования ГЗТ (функция Th1-клеток) в 2,39 раза ($p < 0,05$), а функция Th2-лимфоцитов (оцениваемая по числу АОК, синтезирующих IgG к ЭБ) – в 1,96 раза ($p < 0,05$).

Таблица 1. Влияние хронической интоксикации этанолом на функцию Th1- и Th2-лимфоцитов у крыс ($M \pm m$, $n = 10-12$)

Серия опытов	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10^3	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10^3
Контроль	40,3 $\pm$ 3,8	35,9 $\pm$ 3,5	22,4 $\pm$ 2,3
Этанол	12,7 $\pm$ 1,4*	15,0 $\pm$ 1,6*	11,4 $\pm$ 1,4*

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

Хроническая интоксикация этанолом в среднем снижала параметры, характеризующие иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1-лимфоцитов, в 2,78 раза, а показатель, характеризующие функцию Th2-клеток, – в 1,96 раза соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что хроническая интоксикация этанолом уменьшает функцию Th1-лимфоцитов в большей степени по сравнению с редукцией активности Th2-клеток.

Под влиянием хронической интоксикации алкоголем содержание КС в плазме крови крыс увеличивалось в 2,58 раза ($p < 0,05$). В Т-лимфоцитах, выделенных из селезенки крыс, после хронической интоксикации этанолом снижалась активность АХЭ в 1,30 раза ($p < 0,05$) [табл. 2]. Снижение АХЭ в Т-клетках обусловлена, вероятно, редукцией этанолом и его метаболитом ацетальдегидом активности холинацетилазы [7]

Таблица 2. Влияние хронической интоксикации этанолом на активность ацетилхолинэстеразы в Т-лимфоцитах спленоцитов и концентрацию кортикостерона в плазме крови крыс через 20 сут ($M \pm m$, $n = 12$)

Серия опытов	Кортикостерон, нг/мл	Активность АХЭ, мЕД / 10^9 Т-клеток
Контроль	19,5 $\pm$ 2,0	57,1 $\pm$ 4,8
Этанол	50,3 $\pm$ 5,6*	44,0 $\pm$ 4,0*

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

Полученные результаты свидетельствуют, что активность АХЭ в Т-клетках при действии этанола была прямо связана с показателями иммунных реакций, а связь этих реакций с концентрацией КС в крови носила обратный характер.

Увеличение КС в крови под влиянием этанола обусловлено реализацией общего адаптационного синдрома (увеличение продукции адрено-кортикотропного гормона гипофизом и возрастание в крови концентрации кортикостероидов в стадии резистентности) [12]. Более выраженное снижение активности Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами при хронической интоксикации этанолом, вероятно, обусловлено длительным увеличением в крови концентрации КС, к которому при действии этанола в течение 20 сут в большей степени чувствительны лимфоциты Th1-типа [4].

Известно, что ингибирование АХЭ Т-клеток различными токсикантами и увеличение концентрации в крови КС являются факторами, обуславливающими редукцию иммунных реакций [2].

Поражение Т-лимфоцитов и других клеток, участвующих в иммунном ответе, этанолом, видимо, происходит также в результате нарушения их функции вследствие взаимодействия с сульфгидрильными и аминокетогруппами ферментов высокотоксичного продукта биотрансформации этанола ацетальдегида, мембранотоксического действия этилового спирта и его метаболита, инициацией перекисного окисления липидов, ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [2,7].

Установлено уменьшение содержания ИФН- γ и ИЛ-4 в плазме крови крыс при интоксикации алкоголем в 3,51 и 2,46 раза соответственно ($p<0,05$) (табл. 3). Снижение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 при интоксикации этанолом (5,4) по сравнению с контролем (7,7) свидетельствует о большей супрессии активности Th1- лимфоцитов по сравнению с функцией Th2-клеток ($p<0,05$) [5], что подтверждает данные, полученные при исследовании иммунных реакций (табл.1) .

Таблица 3. Влияние хронической интоксикации этанолом на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ($M\pm m$, $n = 7$)

Цитокины	Контроль	Этанол
ИФН- γ	931 $\pm$ 94	265 $\pm$ 27*
ИЛ-4	121 $\pm$ 13	49 $\pm$ 6*
ИФН- γ /ИЛ-4	7,7 $\pm$ 0,8	5,4 $\pm$ 0,6*
ИЛ-2	1267 $\pm$ 118	431 $\pm$ 44*
ИЛ-6	52 $\pm$ 6	85 $\pm$ 9*
ИЛ-10	342 $\pm$ 37	183 $\pm$ 20*

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

Содержание в плазме крови ИЛ-2 и ИЛ-10 при интоксикации алкоголем снижались в 2,94 и 1,87 соответственно ($p < 0,05$). Концентрация ИЛ-6 при хроническом отравлении этанолом возрастала в 1,64 раза ($p < 0,05$).

Редукция в плазме крови под влиянием этанола ИЛ-2 свидетельствует о супрессии его продукции Т-лимфоцитами (Th0-типа, цитотоксическими Т-клетками), редукции пролиферации Т- и В-клеток, активности естественных клеток-киллеров [4,6,8].

Увеличение в крови ИЛ-6 (провоспалительного цитокина), вероятно, характеризует увеличение его продукции макрофагами, моноцитами и лимфоидными дендритными клетками в печени вследствие ее поражения алкоголем (реализация воспалительного процесса) [2,4,6,8,10].

Снижение в плазме крови концентрации ИЛ-10 (антивоспалительного цитокина) свидетельствует о редукции этанолом функции Th0-, Th2-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и В-клеток. Этот цитокин способен уменьшать секрецию ИФН- γ Th1-лимфоцитами [4,8]. Уменьшение синтеза ИЛ-10 при хронической интоксикации этанолом в меньшей степени, чем ИФН- γ , подтверждает установленный нами больший поражающий эффект этанола при его действии в течение 20 сут в отношении Th1-лимфоцитов. Относительно небольшая редукция ИЛ-10 при хронической интоксикации этанолом, вероятно, связана со значительным снижением синтеза ИФН- γ алкоголем, что, по-видимому, исключает регулирующее повышение Th0-, Th2-лимфоцитами, моноцитами, макрофагами и В-клетками продукции ИЛ-10, который способен усилить супрессию функции Th1-лимфоцитов в еще большей степени.

Таким образом, хроническая интоксикация этанолом (0,25 DL₅₀, однократно, ежедневно в течение 20 сут) вызывает супрессию активности Th1-лимфоцитов в большей степени по сравнению с редукцией функции Th2-клеток, повышает в крови концентрацию кортикостерона, вызывает редукцию активности ацетилхолинэстеразы Т-лимфоцитов, снижение концентрации цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10 и увеличение в крови содержания ИЛ-6.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бонитенко Ю.Ю., Куценко С.А. // Токсиколог. вестник. 2004. №4. С. 2–11.
2. Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков: Монография. Саратов, 2007. 420 с.
3. Нужный В.П., Савчук С.А., Тюрин И.А., Белов С.К. // Токсикол. вестник. 2004. №3. С. 7-13.
4. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. М.: Мир, 2000. 582 с.

5. Сухих Г.Т., Касабулатов Н.М., Ванько Л.В. и др. // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2005. Т. 140, № 12 С. 622 –624.
6. Хаитов Р.М., Игнатьева Г.А., Сидорович И.Г. Иммунология. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2002. 536 с.
7. Шабанов П.Д., Калишевич С.Ю. Биология алкоголизма. СПб.: Лань, 1998. 272 с.
8. Georgiev V.St., Albright J.E. // Immunomodulation drugs / Ann. of the N.-Y. Acad. Sci. 1993. Vol. 685. P.284 –602.
9. Bobrova N., West R., Malutina D., Koshkina E. // Subst. Use Misuse. 2009. Vol. 44, N 13. P. 1821-1832.
10. Brown S.D., Gauthier T.W., Brown L.A. // Alcohol. Clin. Exp. Res. 2009. Vol. 33, N 10. P. 1782-1793.
11. McGill J., Meyerholz D.K., Edsen-Moore M. et.al. // J. Immunol. 2009. Vol. 182, N 12. P. 7803-7808.
12. Stephen B.P. Ruping F., Qiang Z. // Toxicol. Sci., 2003. Vol. 75, N 10. P. 343-354.
13. Szabo G., Mandrekar P. // Alcohol Clin. Exp. Res. 2009. Vol. 33, N 2. P. 220-232.
14. Waldschmidt T.J., Cook R.T., Kovacs E.J. // Alcohol. 2008. Vol. 42, N 2. P. 137-142.
15. Waszkiewicz N., Szajda S.D., Jankowska A., Zwierz P. // Alcohol Clin. Exp. Res. 2008. Vol. 32, N 4. P. 652-656.

THE MECHANISMS OF INFLUENCE OF THE IMMUNE STATUS AT THE CHRONIC INTOXICATION OF ETHANOL

P.F.Zabrodskii, V.G. Lim, V.A. Grishin, A.V.Kuzmin

Saratov State Medical University

It was established in experiments on noninbred rats, that the chronic intoxication of ethanol (20 days, the total dose - 5 LD₅₀) invokes depression of the immune responses bound mainly with function of Th1-cells, increase of concentration of corticosteronum in blood, reduction of activity of acetylcholinesterase of T-lymphocytes, decrease of concentrations of cytokines IFN- γ , IL -2, IL-4, IL-10 in blood and rise of concentration of IL -6.

Keywords: ethanol, cytokines, Th1-, Th2- lymphocytes, corticosteronum, acetylcholinesterase