

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ КОРРЕКЦИЯ АКТИВНОСТИ TH1- И TH2-ЛИМФОЦИТОВ И ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТАНОЛОМ

**П.Ф. Забродский, В.А. Гришин, А.А. Свистунов, В.Г. Лим,
А.В. Кузьмин, А.В.Смуров¹**

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что интоксикация этанолом (13 сут, суммарная доза – 2,6 DL₅₀) существенно снижает концентрацию в крови цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4 ИЛ-10, увеличивает содержание 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. Иммуномодулятор полиоксидоний в дозе 700 мкг/кг (ежедневно, в течение 4-х дней) приводит к восстановлению клеточного и гуморального иммунного ответа и синтеза цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4. Концентрация ИЛ-10 под влиянием полиоксидония увеличивались, но оставались ниже контрольных значений.

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

ВВЕДЕНИЕ

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. [1]. Анализ причин демографического кризиса в России свидетельствует о том, что к числу ведущих факторов, обуславливающих это явление, относится рост потребления алкоголя. Алкогольные отравления в течение многих лет занимают ведущее место среди бытовых отравлений по абсолютному числу смертельных исходов (в России более 60% всех смертельных отравлений обусловлены этанолом) [1,2,3]. В последние годы число больных с диагнозом острого отравления алкоголем составляет в среднем 20% и более от общего числа

¹ *Саратовский государственный медицинский университет, ул. Большая Казачья, 112, Саратов, 410710, Россия*

госпитализаций [1,2]. За последние 5 лет данная ситуация практически не изменилась, более того, поступление в медицинские учреждения лиц с интоксикацией этанолом имеет тенденцию к увеличению. Следует учитывать, что острое отравление алкоголем происходит, как правило, на фоне его употребления в течение нескольких суток или при сформировавшемся хроническом алкоголизме.

Смертность после острых, подострых и хронических интоксикаций Э может быть связана с инфекционными осложнениями и заболеваниями, обусловленными снижением показателей иммунного статуса [1]. Знание иммунопатогенеза действия Э необходимо для обоснования фармакологической коррекции постинтоксикационного нарушения иммунного гомеостаза с целью профилактики различных инфекционных осложнений и заболеваний.

От особенностей поражения антигенпредставляющих клеток, популяций Т-лимфоцитов, В-клеток Э зависит характер формирования вторичного иммунодефицитного состояния, и, следовательно, способы коррекции нарушений иммунного статуса [1,5]. Известно, что Т-лимфоциты хелперы неоднородны и состоят из лимфоцитов Th0-, Th1-, Th2-, Th3-типа [7]. 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 [5]. Th1-клетки продуцируют γ -интерферон (ИФН- γ), участвуя в реализации клеточных иммунных реакций [5,7,12], кроме того, они обеспечивают синтез В-лимфоцитами (плазмócитами) IgM и IgG2a [12]. 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 (IgG1-4, 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 [5,7,12].

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) [1,5,12]. От соотношения активности лимфоцитов Th1-, Th2-типа (парадигма двух видов хелперов - Th1/Th2 [14]) может зависеть вероятность возникновения соответственно вирусных или микробных инфекций [9], также формирование контактной или респираторной гиперчувствительности [11].

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), а также исследование эффективности иммуномодулятора полиоксидония (ПО) для коррекции нарушений иммунного гомеостаза при подострой интоксикации этанолом.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проводили на неинбредных белых крысах обоего пола массой 180-240 г. Этанол вводили ежедневно, однократно per os в 40% водном растворе в дозе 0,2 DL₅₀ в течение 13 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 [1,5]. При оценке эффективности иммуномодулятора ПО его вводили внутримышечно в течение 4 сут в дозе 700 мкг/кг (ежесуточно, однократно). Первую дозу ПО животные на 9 сут после первого введения Э. 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 9 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 внутрибрюшинной иммунизации на 9 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). При этом крыс иммунизировали внутрибрюшинно ЭБ в дозе $2 \cdot 10^8$ клеток одновременно с первого введением Э. Таким образом, при оценке всех иммунных реакций животные получали суммарную эквивалентную дозу Э, составляющую 2,6 DL₅₀.

Концентрацию цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10 исследовали в плазме крови крыс через 13 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 И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При воздействии Э в течение 13 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 2,19 раза ($p < 0,05$). При интоксикации Э отмечалась существенная супрессия реакции ГЗТ (функция Th1-клеток) в 2,11 раза ($p < 0,05$), а функция Th2-лимфоцитов (оцениваемая по числу АОК, синтезирующих IgG к ЭБ) – в 1,50 раза ($p < 0,05$).

Характеризующие иммунные реакции и связанную с ними функцию Th1-лимфоцитов параметры при действии Э в среднем снижались в 2,15 раза,

а показатели, связанные с функцией Th2-клеток, – в 1,50 раза. Полученные данные свидетельствуют о том, что функция Th1-лимфоцитов под влиянием интоксикации Э снижается в большей степени по сравнению с супрессией активности Th2-лимфоцитов.

Таблица 1. Влияние интоксикации этанолом в течение 13 сут (суммарная доза – 2,6 DL₅₀) на функцию Th1- и Th2- лимфоцитов у крыс (M $\pm$ m, n = 9-11)

Серия опытов	Функция Th1-лимфоцитов		Функция Th2-лимфоцитов
	АОК к ЭБ (IgM), 10 ³	ГЗТ, %	АОК к ЭБ (IgG), 10 ³
Контроль	44,0 $\pm$ 4,0	37,9 $\pm$ 3,5	52,8 $\pm$ 5,4
Этанол	20,1 $\pm$ 2,1*	18,0 $\pm$ 1,7*	35,2 $\pm$ 3,1*
Этанол+ПО	36,7 $\pm$ 3,5	32,8 $\pm$ 3,2	45,1 $\pm$ 4,6

Примечание. ПО- полиоксидоний; * - p<0,05 по сравнению с контролем.

Снижение активности Th1-клеток может быть обусловлено увеличением в крови концентрации кортикостерона вследствие интоксикации Э [1], к которому при данной экспозиции в большей степени чувствительны лимфоциты Th1-типа по сравнению с Th2-лимфоцитами [5]. Поражение Т-лимфоцитов и других клеток этанолом, видимо, обусловлено нарушением их функции в результате взаимодействия с сульфгидрильными и аминокгруппами ферментов относительно высокотоксичного продукта биотрансформации этанола ацетальдегида, мембранотоксического действия Э и его метаболита, инициацией перекисного окисления липидов, ингибированием тканевого дыхания и окислительного фосфорилирования [1].

Применение ПО практически полностью восстанавливало функцию Т-лимфоцитов (табл. 1).

При исследовании концентрации цитокинов в плазме крови крыс (табл. 2) установлено уменьшение содержания ИФН- γ и ИЛ-4 через 13 сут соответственно в 2,01 и 1,46 раза (p<0,05). Очевидно, что снижение соотношения ИФН- γ /ИЛ-4 под влиянием Э (5,5) по сравнению с контролем

(7,5) свидетельствует о большей супрессии ($p < 0,05$) активности лимфоцитов Th1-типа по сравнению с функцией Th2-клеток [6].

Концентрации в крови ИЛ-2 и ИЛ-10 после интоксикации Э снижались соответственно в 1,67 и 1,53, а содержание ИЛ-6 незначительно увеличивалась в 1,26 раза ($p > 0,05$).

Таблица 2

Влияние интоксикации этанолом в течение 13 сут (суммарная доза – 2,6 DL₅₀) на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл (M±m, n = 7)

Цитокины	Контроль	Этанол	Этанол + ПО
ИФН-γ	1032±98	513±52*	912±92
ИЛ-4	137±14	94±9*	115±10
ИФН-γ /ИЛ-4	7,5±0,7	5,5±0,5*	7,9±0,7
ИЛ-2	1369±98	820±80*	1119±97
ИЛ-6	58±5	73±7	65±6
ИЛ-10	383±39	239±24*	278±23*

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

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 [5,7].

Увеличение в крови ИЛ-6 (провоспалительного цитокина), вероятно, характеризует увеличение его продукции макрофагами и лимфоидными дендритными клетками в печени вследствие ее поражения алкоголем (реализация воспалительного процесса) [1,5,7,12].

Редукция концентрации ИЛ-10 (антивоспалительного цитокина) при воздействии Э свидетельствует о снижении функции Th0-, Th2-лимфоцитов, моноцитов, макрофагов и В-клеток. Данный цитокин способен уменьшать секрецию ИФН-γ Th1-лимфоцитами [12,13]. Этот эффект характерен для тяжелых металлов [10], динитрохлорбензола, формальдегида и других токсикантов [15]. Снижение синтеза ИЛ-10 в меньшей степени, чем ИФН-γ,

подтверждает установленный нами большой поражающий эффект Э в отношении Th1-лимфоцитов.

Применение полиоксидония восстанавливало функцию лимфоцитов Th1- и Th2- типа, оцениваемую по продукции ими соответственно ИФН- γ и ИЛ-4, соотношение ИФН- γ /ИЛ-4, а также содержание в крови ИЛ-2 практически до контрольного уровня. Концентрация ИЛ-10 под влиянием ПО увеличивались, но оставалась ниже контрольных значений. На содержание ИЛ-6 ПО практически не влиял. Эффект ПО обусловлен его иммуностимулирующим действием в отношении Т-лимфоцитов [4] и других клеток иммунной системы [8], а также его антиоксидантными, детоксикационными и мембраностабилизирующими свойствами [8].

ВЫВОДЫ

1. Интоксикация этанолом в течение 13 сут (0,2 DL₅₀, ежедневно, однократно) вызывает большее поражение Th1-клеток по сравнению с Th2-лимфоцитами и уменьшает соотношение ИФН- γ /ИЛ-4 по сравнению с контролем.

2. Под влиянием ежедневной интоксикации этанолом (0,2 DL₅₀) через 13 сут существенно снижается концентрация в крови цитокина ИФН- γ , в меньшей степени - ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-10, содержание ИЛ-6 несущественно увеличивается.

3. Применение полиоксидония (ежедневно, однократно, в течение 4 сут в дозе 700 мкг/кг) при отравлении этанолом (в суммарной дозе 2,6 DL₅₀) практически полностью восстанавливало сниженные иммунные реакции и синтез цитокинов ИФН- γ , ИЛ-4, ИЛ-2. Полиоксидоний содержание ИЛ-10 восстанавливал частично.

ЛИТЕРАТУРА

1. П.Ф. Забродский, В.Г. Мандыч, *Иммунотоксикология ксенобиотиков*. - СВИБХБ Саратов, (2007).
2. Ю.Ю. Бонитенко, С.А. Куценко, *Токсикол. Вестник*, №4, 2– 11. 2004.

3. Е.А. Лужников, Л.Г. Костомарова, *Острые отравления: Руководство для врачей (2-е изд., перераб и доп.)*, Медицина, Москва (2000).
4. И.В. Нестерова. *Аллергология и иммунология*, **6** (2), 139– 140 (2005).
5. А. Ройт, Дж. Бростофф, Д. Мейл, *Иммунология* (Пер. с англ.), Мир, Москва, (2000).
6. Г.Т. Сухих, Н.М. Касабулатов, Л.В. Ванько и др, *Бюл. exper. биол.*, **140** (12), 622– 624 (2005).
7. Р.М. Хаитов, Г.А. Игнатьева, И.Г. Сидорович, *Иммунология (2-е изд., перераб. и доп)*, Медицина, Москва (2002).
8. Р.М. Хаитов, Б.В. Пинегин, *Иммунология*, **26**(4), 197 (2005).
9. B. Asquith, Y. Zhang, A.J. Mosley, C.M. de Lara, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**(19), 8035– 8040 (2007).
10. J.Y. Chen, W. Yu, W.W. Liu, Y. Luo, *Zhonghua Lao Doyg Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, **52**,(3), 279–281 (2007).
11. E. Corsini, I. Kimber, *Toxicol. Lett.*, **168**,(3), 255– 299 (2007).
12. V.St. Georgiev, J.E. Albright, *Immunomodulation drugs*, *Ann. of the N.-Y. Acad. Sci.*, 685, 284– 602 (1993).
13. H.S. Kim, J.H. Eom, H.Y. Cho et al., *J. Toxicol. Environ. Health*, **70**(15-16), 1278– 1287 (2007).
14. S. Romagnani, *Immunol. Today*, **18**(6), 263–266 (1997).
15. P. Ulrich, O. Grenet, J. Blueme, *Arch. Toxicol.*, **75**(8), 470–479 (2001).

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF ACTIVITY TH1 - AND TH2 - LYMPHOCYTES AND OF CYTOKINE PROFILE AT INTOXICATION OF ETHANOL

**P.F.Zabrodskii, A.A. Svistunov, V.G.Lim, V.A. Grichin, A.V.Kuzmin,
A.V. Smurov**

Saratov State Medical University, ul. Bol'shaya Kazach'ya 112, Saratov, 410710, Russia

It was established in experiments on noninbred rats, that intoxication of ethanol (13 days, total dose - 2,6 LD₅₀) significantly reduces concentration in blood of cytokines IFN γ , IL-2, IL-4, IL-10, increase concentration in blood of IL-6, suppresses of immune responses, reduces an interrelation IFN γ /IL-4 in comparison with the control, that testifies to the greater lesion of Th1-cells in comparison with Th2-lymphocytes. The immunomodulator polyoxidonium in dose 700 μ g/kg by daily administration during of four days invokes restore of cellular and humoral immune responses and synthesis of cytokines IFN γ , IL-2, IL-4. The production of ИЛ-10 under influence polyoxidonium was recovered particulate.

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