ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

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

П. Ф. Забродский, А. А. Свистунов, В. Г. Лим, В. А. Гришин, А. В. Кузьмин, А. В. Смуров[1]

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что интоксикация этанолом (13 сут, суммарная доза — 2,6 DL_{50}) 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 (700 мкг/кг, ежедневно, в течение 4 дней) приводит к восстановлению клеточного и гуморального иммунного ответа и синтеза цитокинов ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4. Концентрация ИЛ-10 под влиянием полиоксидония увеличивалась, но оставалась ниже контрольных значений.

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

ВВЕДЕНИЕ

Этанол (Э, спирт этиловый) 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, обусловливающих 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 – 3]. В последние годы число пострадавших с диагнозом острого отравления алкоголем составляет в среднем 20% и более от общего числа госпитализаций [1, 2]. За последние 5 лет 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.

Смерть 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 этанолом 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 стимулирует 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 (плазмоцитами) IgM и IgG2a [12]. Th2-лимфоциты, синтезируя ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-13, способствуют активации, пролиферации и дифференцировке В-клеток, синтезу плазмоцитами 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

[1] Саратовский государственный медицинский университет, 410710, Саратов, ул. Большая Казачья, 112.

© 2010 Коллектив авторов

[9], а 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 виде 40 % водного раствора в дозе 0,2 DL_{50} в течение 13 сут (DL_{50} этанола составляла 12,3 ± 1,3 г/кг). Контрольная группа животных получала внутрь 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 получали на 9-е сутки 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-е сутки 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-е сутки после первого введения Э. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч. Функцию Th2-лимфоцитов исследовали по числу АОК, синтезирующих 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 первым введением Э. Таким образом, при оценке всех иммунных реакций животные получали суммарную эквилетальную дозу Э, составляющую 2,6 DL_{50}.

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 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), характеризующего 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 1,5 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 1,5 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.

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 аминогруппами 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).

Таблица 1. **Влияние интоксикации этанолом в течение 13 сут (суммарная доза — 2,6 DL_{50}) 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 ± 4,0	37,9 ± 3,5	52,8 ± 5,4
Этанол	20,1 ± 2,1*	18,0 ± 1,7*	35,2 ± 3,1*
Этанол + ПО	36,7 ± 3,5	32,8 ± 3,2	45,1 ± 4,6

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

Таблица 2. **Влияние интоксикации этанолом в течение 13 сут (суммарная доза — 2,6 DL_{50}) на содержание цитокинов в плазме крови крыс, пг/мл ($M \pm m$, $n = 7$)**

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.

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 увеличивалось в 1,26 раза ($p > 0,05$).

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, обусловлено увеличением 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 больший 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 увеличивалась, 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 DL_{50}, 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 DL_{50}) 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 DL_{50}) практически полностью восстанавливает сниженные иммунные реакции и синтез цитокинов ИФН-γ, ИЛ-4, ИЛ-2. Содержание ИЛ-10 полиоксидоний восстанавливает 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, *Аллергол. и иммунол.*, **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. эксп. 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. Urlich, O. Grenet, *J. Blueme*, *Arch. Toxicol.*, **75**(8), 470 – 479 (2001).

Поступила 14.04.10

PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF TH1 AND TH2 LYMPHOCYTE ACTIVITY AND CYTOKINE PROFILE IN ETHANOL INTOXICATED RATS

P. F. Zabrodskii, A. A. Svistunov, V. G. Lim, V. A. Grichin, A. V. Kuz'min, and 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 their ethanol intoxication (13 days; total dose, 2.6 LD_{50}) significantly reduces the concentration of blood cytokines IFNγ, IL-2, IL-4, IL-10, increases the concentration of IL-6, suppresses the immune responses, and reduces the interrelation IFNγ/IL-4 in comparison to the control, which testifies to the greater damage of Th1 cells in comparison to Th2 lymphocytes. The immunomodulator polyoxidonium administered for four days at a daily dose of 700 μg/kg fully restores the cellular and humoral immune responses and the synthesis of cytokines IFNγ, IL-2, and IL-4 and partly restores the production of IL-10.

Key words: Ethanol, immunotoxicity, cytokines, TH1 and TH2 lymphocytes