

УДК 571.27 :615.099:615.917

ВЛИЯНИЕ ПОДОСТРОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ЭТИЛЕНХЛОРГИДРИНОМ НА ИММУННЫЕ РЕАКЦИИ, ФУНКЦИЮ Th1- И Th2- ЛИМФОЦИТОВ И СОДЕРЖАНИЕ В КРОВИ КРЫС ЦИТОКИНОВ

П.Ф. Забродский,
В.В. Масляков,
М.С. Громов

Филиал НОУ ВПО «Саратовский
медицинский университет
«РЕАВИЗ», 410011, г. Саратов,
Российская Федерация

В экспериментах на неинбредных белых крысах установлено, что подострое отравление этиленхлоргидрином (0,2 DL₅₀ ежедневно в течение 4 сут) вызывает снижение функции Th1- и Th2-лимфоцитов в равной степени, уменьшение показателей гуморальных и клеточных иммунных реакций, содержания иммунорегуляторных цитокинов ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4 в крови и повышение концентраций провоспалительного цитокина ИЛ-6 и противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

Ключевые слова: этиленхлоргидрин; Th1-, Th2-лимфоциты; иммунотоксичность; цитокины.

Введение. Этиленхлоргидрин (ЭХГ, (2-хлорэтанол, хлорэтиловый спирт, хлоргидрин этиленгликоля) – бесцветная вязкая жидкость со слабым эфирным запахом, хорошо растворяется в воде, этаноле, ацетоне, 1,2-дихлорэтаноле, хлороформе. Применяется как растворитель неорганических солей, в органическом синтезе (растворяет ацетилцеллюлозу). Используется для получения этиленоксида, тиодигликоля, некоторых красителей, пестицидов и фармацевтических препаратов [1,2]. При аварийных ситуациях, нарушении техники безопасности ЭХГ может вызывать ингаляционные, пероральные отравления, легко проникает через кожу. При отравлении ЭХГ поражаются центральная нервная, сердечно-сосудистая системы, почки, печень и другие органы [1,2,3,4]. Учитывая, что при биотрансформации ЭХГ образуются метаболиты, в основном, такие же, как и при отравлении широко применяющимся в химической промышленности винилхлоридом, возможна при интоксикации ЭХГ реализация мутагенного, канцерогенного, тератогенного и иммунотоксического действия [5,6]. Нарушения функции иммунной системы, синтеза лимфоцитами и другими клетками крови цитокинов при отравлении ЭХГ с целью целенаправленной кор-

рекции иммунного гомеостаза для профилактики инфекционных осложнений и заболевания, а также снижения смертности больных не изучено [1-4,7-9].

Целью исследования являлась оценка подострого действия ЭХГ (0,2 DL₅₀ ежедневно в течение 4 сут) на иммунные реакции, функцию Th1- и Th2-лимфоцитов, а также на содержание в крови иммунорегуляторных, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (γ-интерферона – ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6 и ИЛ-10).

Материалы и методы исследования. Эксперименты проводили на 112 нелинейных белых крысах обоего пола массой 180-240 г в соответствии с «Правилами лабораторной практики» (Приказ МЗ РФ №708н от 23.08.2010) ЭХГ (Sigma-Aldrich) вводили внутривенно в дозе 0,2 DL₅₀ в водном растворе (1,0 мл) в течение 4-х сут. DL₅₀ ЭХГ при пероральном введении составляла 53±4 мг/кг. Контрольные животные получали внутрь равный объем воды. Показатели системы иммунитета оценивали общепринятыми методами в экспериментальной иммунотоксикологии и иммунологии [10-13]. Гуморальный иммунный ответ к Т-зависимому антигену (эритроцитам барана – ЭБ), характеризующую способность Th1-клеток участво-

Забродский Павел Францевич (Zabrodskii Pavel Franzevich), д.м.н., проф., заслуженный деятель науки Российской Федерации, профессор кафедры медико-биологических дисциплин Саратовского филиала НОУ ВПО «Самарский медицинский институт «РЕАВИЗ» (Саратовский филиал Самарского медицинского института «РЕАВИЗ»), 410076, г. Саратов, pfabrodsky@gmail.com

Масляков Владимир Владимирович (Maslyakov Vladimir Vladimirovich), до.м.н., проф., проректор по научной работе Саратовского филиала НОУ ВПО «Самарский медицинский институт «РЕАВИЗ», заведующий кафедрой клинической медицины, 410076, г. Саратов, maslyakov@inbox.ru

Громов Михаил Сергеевич (Gromov Mihail Sergeevich), д.м.н., проф., ректор Саратовского филиала НОУ ВПО «Самарский медицинский институт «РЕАВИЗ» (Саратовский филиал Самарского медицинского института «РЕАВИЗ»), 410076, г. Саратов, saratov@reaviz.ru

вать в продукции плазматическими клетками IgM, определяли по числу антителообразующих клеток (АОК) в селезенке через 4 сут после иммунизации (пик продукции IgM), которую проводили внутривнутрибрюшинно в дозе $2 \cdot 10^8$ ЭБ. Аналогично оценивали гуморальную иммунную реакцию к Т-независимому брюшнотифозному Vi-антигену (Vi-Ag), отражающую синтез IgM В-клетками (плазмоцитами) селезенки крыс. При этом проводили иммунизацию крыс Vi-Ag в дозе 8 мкг/кг. Функцию Th1-лимфоцитов оценивали также 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. Реакцию ГЗТ оценивали через 24 ч. Функцию Th2-лимфоцитов исследовали по числу АОК, синтезирующие IgG к ЭБ, в селезенке на 8 сут после иммунизации методом непрямого локального гемолиза в геле [10,11,13].

Оценку активности естественных клеток-киллеров (ЕКК) – естественной цитотоксичности (ЕЦ) – и антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), характеризующую функцию К-клеток, осуществляли спектрофотометрическим методом через 4 сут после первого введения ЭХГ [10,11]. В контроле и в опытной группе при оценке АЗКЦ крыс иммунизировали внутривнутрибрюшинно через 15-30 мин после первого введения токсиканта.

Концентрацию цитокинов иммунорегуляторных цитокинов (ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4), провоспалительного цитокина (ИЛ-6) и противовоспалительного цитокина (ИЛ-10) [10,11] исследовали в плазме крови крыс через 4 сут после инъекции ЭХГ (и иммунизации ЭБ) методом ферментного иммуносорбентного анализа (ELISA), используя наборы (ELISA Kits) фирмы BioSource Int. в соответствии с инструкциями изготовителя.

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием t-критерия достоверности Стьюдента. Различия между параметрами считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. После подострой интоксикации ЭХГ через 4 сут показатели Т-зависимой гуморальной иммунной реакции – АОК к ЭБ; IgM (функция Th1- и В-лимфоцитов), АОК к ЭБ (IgG) (функция Th2- и В-лимфоцитов), а также Т-независимого гуморального иммунного ответа (функция В-лимфоцитов) – АОК к Vi-Ag (IgM) – снижались соответственно в 1,63; 1,59 и 1,54 раза ($p < 0,05$) [табл. 1].

Показатели клеточных иммунных реакций после подострой интоксикации ЭХГ – активность ЕКК, АЗКЦ, функция лимфоцитов

Th1-типа (реакция ГЗТ) – уменьшались соответственно в 1,71; 1,90 и 1,68 раза ($p < 0,05$).

Полученные данные показывают, что гуморальные и клеточные иммунные реакции при подостром отравлении ЭХГ снижались практически в равной степени (соответственно, в среднем в $1,59 \pm 0,14$ и в $1,76 \pm 0,13$ раза; $p > 0,05$).

Средние показатели активности Th1-клеток (АОК к ЭБ – IgM, реакция ГЗТ) и Th2-лимфоцитов (АОК к ЭБ – IgG) [10,11] при интоксикации ЭХГ уменьшались практически одинаково – соответственно в 1,66 и 1,59 раза.

Существуют основания полагать, что редукция в результате подострого отравления ЭХГ функции лимфоцитов (параметров системы иммунитета) связана с действием на них как молекулы токсиканта, так его более токсичных метаболитов, которые образуются в результате окисления ЭХГ алкогольдегидрогеназой и альдегиддегидрогеназой соответственно до хлорацетальдегида и хлоруксусной кислоты [2,3,4,6,7,8,14]. Метаболиты ЭХГ ингибируют цикл трикарбоновых кислот в митохондриях лимфоцитов и других клеток [7,8].

Воздействие ЭХГ (табл. 2) приводило к уменьшению концентрации в крови иммунорегуляторных цитокинов ИФН- γ , ИЛ-2, ИЛ-4 соответственно в 3,13; 2,73 и 2,89 раза ($p < 0,05$). Концентрация в крови провоспалительного цитокина ИЛ-6 увеличивалась в 1,62 раза ($p < 0,05$), а содержание противовоспалительного цитокина ИЛ-10 возрастало в 1,43 раза ($p > 0,05$).

После подострого воздействия ЭХГ соотношение ИФН γ /ИЛ-4 в контроле составляло $6,8 \pm 0,7$, а после действия токсиканта – $6,2 \pm 0,7$. Это подтверждает полученные данные, свидетельствующие о том, что под влиянием ЭХГ Th1- и Th2-лимфоциты поражаются в равной степени [10,11].

Полученные данные позволяют предполагать, что снижение концентрации в крови иммунорегуляторного цитокина ИФН- γ обусловлено поражением ЭХГ Th1-лимфоцитов, а также ЕКК, К-клеток, осуществляющих АЗКЦ, цитотоксических Т-лимфоцитов [15]. Уменьшение в крови после интоксикации ЭХГ ИЛ-2, вероятно, свидетельствует о супрессии его продукции Т-клетками, в том числе, и лимфоцитами Th0- и Th1-типа, редукции пролиферации Т- и В-клеток, активности ЕКК и АЗКЦ [16]. Снижение в крови ИЛ-4, по-видимому, происходит вследствие поражения ЭХГ и продуктами его метаболизма [6,7,8,14] преимущественно Th2- лимфоцитов [10,11,15,17], а увеличение провоспалительного цитокина ИЛ-6 характеризует активацию его синтеза макрофагами, моноцитами и лимфоидными дендритными клетками [13,18], связанную с воспалительными изменениями в печени и почках

Таблица 1

Влияние подострой интоксикации ЭХГ (0,2 DL₅₀ ежедневно в течение 4 сут) на показатели системы иммунитета белых крыс (M±m, n=9-10)

Функция лимфоцитов	Параметры	Контроль	ЭХГ
Th1-типа и В-клетки	АОК к ЭБ (IgM), 10 ³	39,3±4,2	24,1±2,5*
Th1-типа	ГЗТ, %	36,0±3,8	21,4±2,3*
Th2-типа и В-клетки	ЭБ (IgG), 10 ³	25,5±2,6	16,0±1,8*
В-клетки (плазмоциты)	Vi-Ag (IgM), 10 ³	26,8±2,9	17,4±1,7*
ЕКК	ЕЦ, %	18,0±1,7	10,5±1,2*
К-клетки	АЗКЦ, %	13,3±1,4	7,0±0,9*

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

Таблица 2

Влияние подострой интоксикации ЭХГ (0,2 DL₅₀ ежедневно в течение 4 сут) на содержание цитокинов в крови белых крыс, пг/мл (M±m, n=7-8)

Цитокины	Контроль	ЭХГ
ИФН-γ	1266±133	405±41 *
ИЛ-2	1050±110	384±68*
ИЛ-4	185±18	65±8 *
ИФНγ/ИЛ-4	6,8±0,7	6,2±0,7
ИЛ-6	71±9	115±12 ^a
ИЛ-10	398±45	570±60*

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

вследствие поражения их ЭХГ и продуктами его метаболизма [2,3,4,6,7,8,14].

Повышение концентрации противовоспалительного цитокина ИЛ-10 обусловлено увеличением его синтеза Th2-лимфоцитами, макрофагами и В-лимфоцитами [19] и реализацией компенсаторной реакцией CD4+CD25+Foxp3+ регуляторных Т-клеток, на поражение ЭХГ лимфоцитов, моноцитов и макрофагов [20,21]. Следует отметить, что повышение продукции ИЛ-10 направлено на снижение синтеза провоспалительных цитокинов [11, 19].

Таким образом, иммунотоксическое действие ЭХГ сопровождается супрессией гуморального и клеточного иммунного ответа, нарушением продукции цитокинов лимфоцитами и другими клетками крови. Эти изменения обусловлены, в основном, более токсичными, чем ЭХГ, продуктами его биотрансформации хлораце-

тальдегидом и хлоруксусной кислотой [6,7,8,14]. Механизмами нарушения функции лимфоцитов и других клеток системы иммунитета под влиянием ЭХГ являются ингибирование цикла трикарбоновых кислот в митохондриях клеток иммунной системы [8], инициация перекисного окисления липидов мембран клеток и др. [7,8,9,10,12].

Выводы.

1. Подострая интоксикация ЭХГ в ежедневной дозе 0,2 DL₅₀ в течение четырех суток вызывает снижение функции Th1- и Th2-лимфоцитов в равной степени, уменьшение показателей гуморальных и клеточных иммунных реакций.

2. При подострой интоксикации ЭХГ снижается содержание иммунорегуляторных цитокинов ИФН-γ, ИЛ-2, ИЛ-4 в крови и увеличиваются концентрация провоспалительного цитокина ИЛ-6 и противовоспалительного цитокина ИЛ-10.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Liu G. Y. T., Richey W. F., Betso J.E., Hughes B., Klapacz J., Lindner J. Chlorohydrins. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim. 2014. Available at: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a06_565.pub2/abstract
- Chen Y.T., Liao J.W., Hung D.Z. Protective effects of fomepizole on 2-chloroethanol toxicity. Hum. Exp. Toxicol. 2010; 29(6):507-12.
- Chen Y.T., Hsu C.I., Hung D.Z., Matsuura I., Liao J.W. Effects of chloroacetaldehyde in 2-chloroethanol-induced cardiotoxicity. Food Chem Toxicol. 2011; 49(5): 1063-7.
- Hung D.Z., Lee H.P., Huang C.F. The Last Dinner: Fatality of 2-Chloroethanol Intoxication. J. Clin. Toxicol. 2016; 6:314. Available at: <https://www.omicsonline.org/open-access/the-last-dinner-fatality-of-2chloroethanol-intoxication-2161-0495-1000314.php?aid=79104>
- Могилёнок Л.А. Воздействие винилхлорида на состояние здоровья работающих в производственных условиях (Обзор). Биомедицинский журнал. Профилактическая медицина. 2011; 12: 558-71. Available at: http://www.medline.ru/public/pdf/12_047.pdf
- Liao J.W., Hsu C.I., Matsuura I., Chen Y.T. Chloroacetaldehyde Induces chromosome aberrations and micronucleus formation but not 2-chloroethanol. J. Health Sci. 2011; 57(3): 300-3.
- Chen C.H., Chen S.J., Su C.C., Yen C.C., Tseng T.J., Jinn T.R., et al. Chloroacetic acid induced neuronal cells death through oxidative stress-mediated p38-MAPK activation pathway regulated mitochondria-dependent apoptotic signals. Toxicology. 2013; 303: 72-82.
- Lu T.H., Su C.C., Tang F.C., Chen C.H., Yen C.C., Fang K.M. et al. Chloroacetic acid triggers apoptosis in neuronal cells via a reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum stress signaling pathway. Chem. Biol. Interact. 2015; 225: 1-12.
- Pourahmad J., Hosseini M.J., Eskandari M.R., Rahmani F. Involvement of four different intracellular sites in chloroacetaldehyde- induced oxidative stress cytotoxicity. Iran. J. Pharm. Res. 2012; 11: 265-76.
- Забродский П.Ф., Мандыч В.Г. Иммунотоксикология ксенобиотиков. Саратов: СВИБХБ; 2007.
- Забродский П.Ф. Иммунотоксикология фосфорорганических соединений Саратов: Саратовский источник; 2016.
- Курляндский Б.А., Филов В.А., ред. Общая токсикология. М.: Медицина; 2002.
- Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология. Пер. с англ. М.: Мир; 2000.
- Sakai A, Shimizu H, Kono K, Furuya E. Monochloroacetic acid inhibits liver gluconeogenesis by inactivating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Chem. Res. Toxicol. 2005; 18: 277-82.
- Schoenborn J.R., Wilson C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Adv. Immunol. 2007; 96: 41-101.
- Nelson B.H. Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. Curr. Dir. Autoimmun. 2002; 5: 92-112.
- Becker K.L., Nylen E.S., White J.C., Muller B., Snider R.H. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004; 89 (4):1512-25.
- Hashmi AM, Butt Z, Umair M. Is depression an inflammatory condition? A review of available evidence. J. Pak. Med. Assoc. 2013; 63 (7): 899-906.
- Mosser D.M., Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev. 2008 ;226:205-18.
- Said E.A., Trautmann L., Dupuy F., Zhang Y., Shi Y., El-Far M., Hill B.J. et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. Nat. Med. 2010; 16(4): 452-59.
- Smith A.J., Humphries S.E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. Cytokine Growth Factor Rev. 2009; 20 (1): 43-59.

REFERENCES:

- Liu G. Y. T., Richey W. F., Betso J.E., Hughes B., Klapacz J., Lindner J. Chlorohydrins. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry. Wiley-VCH, Weinheim. 2014. Available at: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14356007.a06_565.pub2/abstract
- Chen Y.T., Liao J.W., Hung D.Z. Protective effects of fomepizole on 2-chloroethanol toxicity. Hum. Exp. Toxicol. 2010; 29(6):507-12.
- Chen Y.T., Hsu C.I., Hung D.Z., Matsuura I., Liao J.W. Effects of chloroacetaldehyde in 2-chloroethanol-induced cardiotoxicity. Food Chem Toxicol. 2011; 49(5): 1063-7.
- Hung D.Z., Lee H.P., Huang C.F. The Last Dinner: Fatality of 2-Chloroethanol Intoxication. J. Clin. Toxicol. 2016; 6:314. Available at: <https://www.omicsonline.org/open-access/the-last-dinner-fatality-of-2chloroethanol-intoxication-2161-0495-1000314.php?aid=79104>
- Mogilenkova L.A. Vozdejstvie vinilkhlorida na sostojanie zdorov'ja rabotajushih v proizvodstvennyh uslovijah (Obzor). Biomedicinskij zhurnal. Profilakticheskaja medicina. 2011; 12: 558-71 (in Russian). Available at: http://www.medline.ru/public/pdf/12_047.pdf
- Liao J.W., Hsu C.I., Matsuura I., Chen Y.T. Chloroacetaldehyde Induces chromosome aberrations and micronucleus formation but not 2-chloroethanol. J. Health Sci. 2011; 57(3): 300-3.
- Chen C.H., Chen S.J., Su C.C., Yen C.C., Tseng T.J., Jinn T.R., et al. Chloroacetic acid induced neuronal cells death through oxidative stress-mediated p38-MAPK activation pathway regulated mitochondria-dependent apoptotic signals. Toxicology. 2013; 303: 72-82.
- Lu T.H., Su C.C., Tang F.C., Chen C.H., Yen C.C., Fang K.M. et al. Chloroacetic acid triggers apoptosis in neuronal cells via a reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum stress signaling pathway. Chem. Biol. Interact. 2015; 225: 1-12.
- Pourahmad J., Hosseini M.J., Eskandari M.R., Rahmani F. Involvement of four different intracellular sites in chloroacetaldehyde- induced oxidative stress cytotoxicity. Iran. J. Pharm. Res. 2012; 11: 265-76.
- Zabrodskij P.F., Mandych V.G. Immunotoksikologija ksenobiotikov. Saratov: SVIBHB; 2007 (in Russian).
- Zabrodskij P.F. Immunotoksikologija fosfororganicheskikh soedinenij Saratov: Saratovskij istochnik; 2016 (in Russian).
- Kurlyandskij B.A. Filov V.A., eds. General Toxicology. Moscow: Medicina; 2002 (in Russian).
- Roitt I., Brostoff J., Male D. Immunology. Moscow: Mir; 2000 (in Russian).
- Sakai A, Shimizu H, Kono K, Furuya E. Monochloroacetic acid inhibits liver gluconeogenesis by inactivating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Chem. Res. Toxicol. 2005; 18: 277-82.
- Schoenborn J.R., Wilson C.B. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. Adv. Immunol. 2007; 96: 41-101.
- Nelson B.H. Interleukin-2 signaling and the maintenance of self-tolerance. Curr. Dir. Autoimmun. 2002; 5: 92-112.
- Becker K.L., Nylen E.S., White J.C., Muller B., Snider R.H. Clinical review 167: Procalcitonin and the calcitonin gene family of peptides in inflammation, infection, and sepsis: a journey from calcitonin back to its precursors. J. Clin. Endocrinol. Metab. 2004; 89 (4):1512-25.
- Hashmi AM, Butt Z, Umair M. Is depression an inflammatory condition? A review of available evidence. J. Pak. Med. Assoc. 2013; 63 (7): 899-906.
- Mosser D.M., Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. Immunol Rev. 2008 ;226:205-18.
- Said E.A., Trautmann L., Dupuy F., Zhang Y., Shi Y., El-Far M., Hill B.J. et al. Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4+ T cell activation during HIV infection. Nat. Med. 2010; 16(4): 452-59.
- Smith A.J., Humphries S.E. Cytokine and cytokine receptor gene polymorphisms and their functionality. Cytokine Growth Factor Rev. 2009; 20 (1): 43-59.

P.F. Zabrodskii, V.V. Maslyakov, M.S. Gromov

THE EFFECT OF SUBACUTE INTOXICATION WITH ETHYLENE CHLOROXYDRIN ON IMMUNE RESPONSES, TH1 AND TH2 LYMPHOCYTE FUNCTION AND CYTOKINE LEVELS IN RATS BLOOD

Branch of the Private Educational Institution of Higher Education " Saratov Medical University "REVIZ", 410011 Saratov, Russian Federation

In experiments on outbred albino rats, it was established that subacute intoxication with ethylene chlorohydrin (0.2 LD₅₀ daily for 4 days) causes a decrease in Th1 and Th2 lymphocytes function to the same extent, diminishes parameters of humoral and cellular immune responses and the content of immunoregulatory cytokines IFN-γ, IL-2, IL-4 in blood, increases concentrations of pro-inflammatory cytokine IL-6 and anti-inflammatory cytokine IL-10.

Keywords: ethylene chlorohydrin, Th1-, Th2-lymphocytes, immunotoxicity; cytokines.

Материал поступил в редакцию 09.03.2017 г.