

Влияние этанола *in vitro* на функциональный потенциал клеток крови человека

УЛЬЯНОВА Л.И.^{1,2} к.б.н., ведущий научный сотрудник
ГАМАЛЕЯ Н.Б.¹ д.м.н., профессор, зав. лабораторией иммунохимии
АЛЕКСЕЕВ Л.П.² д.м.н., профессор, зав. отделом иммуногенетики

¹ Лаборатория иммунохимии, Национальный научный центр наркологии Минздравсоцразвития России, 119002, Москва, Мал. Могильцевский пер., 3; факс 8 (499) 2419961, e-mail: nrca@mail.ru

² ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, 115478, Москва, Каширское ш., 24, к. 2; факс 8 (499) 6171027, e-mail: instimmune@yandex.ru

Исследовано влияние этанола *in vitro* на способность Т-лимфоцитов человека пролиферировать в ответ на стимуляцию митогенными лектинами, а также на цитолитическую активность НК-клеток, активность нейтрофильных гранулоцитов и экспрессию активационных CD-молекул, молекул адгезии и молекул HLA I класса. Объектом исследования служила периферическая кровь здоровых добровольцев. Для проведения исследования был выбран широкий диапазон доз этанола от 6 до 6×10^6 мг/мл. Обнаружено, что этанол не обладает собственным митогенным действием, однако существенно усиливает последующую индукцию делений цитолитических Т-лимфоцитов ($CD8^+$) митогеном Con A в культурах цельной крови человека *in vitro*. Этанол повышает экспрессию активационных молекул HLADR, CD25 и молекулы адгезии CD38 на $CD8^+$ -лимфоцитах, а также молекул HLADR и CD38 на $CD19^+$ В-лимфоцитах, но не влияет на экспрессию этих молекул на $CD4^+$ Т-лимфоцитах и НК-клетках. Этанол повышает экспрессию молекул HLA I класса на цитолитических $CD8^+$ Т-лимфоцитах, усиливая их способность лизировать структурно измененные под действием биологических агентов или токсических факторов клетки тканей и органов.

Ключевые слова: этанол *in vitro*, Т-лимфоциты, НК-клетки, нейтрофилы, активационные молекулы

Введение

Проблема хронической алкогольной интоксикации приобрела в нашей стране за последние годы драматический характер по всем важнейшим показателям: по количеству потребляемого алкоголя, заболеваемости алкоголизмом и алкогольными психозами, травматизму, смертности, преступлениям на почве алкоголизма, негативному воздействию на трудовую деятельность и семью. С 2000 г. Россия по темпам роста алкоголизма обогнала большинство развитых стран мира. Алкогольная зависимость все чаще поражает людей в расцвете физических, творческих и духовных сил, в связи с чем решение этой проблемы имеет большую значимость не только для медицины, но также для социальной и демографической сферы в нашей стране.

Согласно результатам многочисленных эпидемиологических исследований отечественных и зарубежных авторов, хроническая алкогольная интоксикация является причиной возникновения большого числа соматических заболеваний, таких, как патология печени (алкогольный стеатоз, гепатит и цирроз печени) [28], патология почек (алкогольный гематурический нефрит и уратная нефропатия) [7, 8], патология сердечно-сосудистой системы (алкогольная кардиомиопатия, алкогольная артериальная гипертензия) [19, 20],

патология эндокринной системы (сахарный диабет) [23, 31]. Лица, злоупотребляющие алкоголем, входят в группу повышенного риска возникновения таких серьезных заболеваний, как туберкулез [13, 14, 25, 30], вирусные гепатиты В, С [16, 22, 25, 32], ВИЧ-инфекция [10, 11, 13] и онкологические заболевания [10, 12]. И, наконец, они чаще, чем кто-либо, подвержены простудным заболеваниям, включая легочные инфекции [18, 21, 22].

К настоящему времени накоплен достаточно большой объем сведений об отрицательном влиянии алкогольной интоксикации на иммунную систему лиц, злоупотребляющих алкоголем. В этих данных много разночтений и противоречий [24, 26—28], но одно для них является общим: при хронической алкогольной интоксикации нарушаются функции иммунной системы, что приводит в конечном итоге к иммунодефицитному состоянию. В литературе, однако, не освещены вопросы влияния этанола на способность Т-лимфоцитов человека отвечать пролиферацией в ответ на воздействие митогенов, на функциональную активность НК-клеток и нейтрофильных гранулоцитов крови человека. Практически отсутствуют данные о влиянии этанола на экспрессию активационных молекул и молекул HLA I класса на иммунокомпетентных клетках в системе *in vitro*. Известно, что этанол

не является чужеродным агентом для иммунной системы, вырабатывается эндогенно в организме каждого человека в количестве 0,05 промилле, что составляет 0,83 мг на организм, и принимает участие в поддержании гомеостаза.

В связи с этим целью работы было исследование механизмов влияния различных доз этанола *in vitro* на пролиферативную активность Т-лимфоцитов человека в ответ на стимуляцию митогенными лектинами, а также на активность НК-клеток крови и нейтрофильных гранулоцитов человека и на экспрессию активационных CD-молекул, молекул адгезии и молекулы HLA I класса. Объектом исследования служила периферическая кровь здоровых добровольцев. Для проведения исследования был выбран широкий спектр доз этанола, который включил: критические дозы этанола, приводящие к гибели человека, дозы, вызывающие сильное или слабое опьянение, и дозы, практически не влияющие на организм человека.

Объект и методы исследования

Для изучения влияния этанола на клетки крови у здоровых добровольцев кровь из локтевой вены забирала утром натощак в пробирки «Vacutainer» с гепарином натрия и ЭДТА. Кровь исследовали в сроки не позднее 6 ч после забора.

Пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов определяли на модели реакции бластной трансформации (РБТЛ) в культурах мононуклеаров цельной крови без и с применением митогенных лектинов. В каждую лунку 96-луночного плоскодонного планшета («Nunc», Denmark) вносили: в первом варианте (кровь 10 добровольцев) по 150 мкл полной питательной среды (ППС), после чего добавляли этанол (6×10^6 мг/мл) и затем вносили по 50 мкл цельной крови, контролем служили культуры без добавления этанола, т.е. определяли спонтанную пролиферацию (СП).

Во втором варианте (кровь 10 добровольцев) в суспензию клеток с этанолом вносили в объеме 150 мкл ППС митоген РНА («Sigma», USA) с конечной концентрацией 5 мкг/мл или митоген Con A («Sigma», USA) с конечной концентрацией 5 мкг/мл. Контролем служили культуры без добавления митогенных стимуляторов и этанола. Клетки инкубировали в течение 72 ч при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂.

В третьем варианте выделенные лимфоциты (10 добровольцев) сначала инкубировали 3 ч при 37°C с 5% CO₂ в присутствии митогенных лектинов, т.е. оценивали влияние этанола на индуцибельную фазу иммунного ответа, после чего вносили этанол. Контролем также служили культуры без добавления митогенных стимуляторов и этанола.

Интенсивность пролиферативной реакции иммунокомпетентных клеток оценивали по активности син-

теза ДНК, измеренной по скорости включения метил-³H₁-тимидина во вновь синтезируемую ДНК. Для этого за 16 ч до окончания инкубации в планшеты вносили изотоп в конечной концентрации 1 мкК/мл. По завершении инкубации клетки осаждали на стекловолокнистых фильтрах («Flow Lab», USA) с помощью полуавтоматического сборщика клеток («Cell Harvester», «Flow Lab», USA). Фильтры помещали в стеклянные флаконы со сцинтилляционной жидкостью (3,5 г РРО и 0,05 г РРОР в 1 л толуола). Радиоактивность образцов измеряли на β-счетчике «Wallac 1409 DSA» (Finland). Результаты измерения выражались имп/мин (СРМ) в расчете на каждую культуру, каждая экспериментальная группа состояла из трёх идентичных культур.

Функциональную активность НК-клеток оценивали по их мембранотоксическому действию на клетки-мишени опухолевой линии К-562 [4, 6]. Клетки-мишени (2×10^6 кл/мл) помещали в 24-луночные планшеты («Nunc», Denmark), метили метил-³H₁-уридином, инкубировали в термостате при 37°C в атмосфере влажности с 5% CO₂ в течение одного часа. Затем клетки отмывали дважды питательной средой 199 с 2% фетальной телячьей сывороткой, доводили концентрацию клеток до 1×10^5 в 1 мл ППС. Концентрацию мононуклеаров (клетки-эффекторы), выделенных из периферической крови на градиенте плотности фиколл-верографин ($1,077$ г/см³), доводили до 5×10^6 в 1 мл ППС. Постановку цитотоксического теста проводили в 96-луночных круглодонных планшетах («Nunc», Denmark). В 3 лунки вносили клетки-мишени в количестве 1×10^4 в 0,2 мл ППС. В следующие лунки вносили клетки-мишени в количестве 1×10^4 в 0,1 мл ППС и к ним добавляли по 5×10^5 клеток-эффекторов в 0,1 мл ППС (в соотношении клетка-мишень к эффекторным клеткам 1:50) и вносили этанол (6×10^6 мг/мл), контролем служили культуры без добавления этанола. Культуры инкубировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в течение 14 ч. По завершении инкубации клетки осаждали на стекловолокнистых фильтрах, которые помещали в стеклянные флаконы со сцинтилляционной жидкостью, и измеряли радиоактивность образцов на β-счетчике, как описано выше. Результаты измерения выражали индексом цитотоксичности (ИЦ), который вычисляли по формуле: ИЦ = (1 — средние значения в опытных культурах : средние значения в контрольных культурах) × 100%. Каждая экспериментальная группа состояла из трёх идентичных культур.

Экспрессию активационных CD молекул на Т- и В-лимфоцитах и НК-клетках периферической крови *in vitro* (антигенные маркеры CD4⁺25⁺, CD4⁺DR⁺, CD4⁺38⁺, CD8⁺25⁺, CD8⁺DR⁺, CD8⁺38⁺, CD19⁺DR⁺, CD19⁺38⁺, CD16⁺38⁺, CD56⁺DR⁺)

определяли по интенсивности флуоресценции позитивных $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$ Т-лимфоцитов, $CD19^+$ В-лимфоцитов, $CD16^+$ и 56^+ NK-клеток и моноцитов. Суммарную экспрессию молекулы *HLA I* класса на всех клетках крови определяли по интенсивности флуоресценции позитивных клеток крови. В каждую лунку 24-луночного планшета («Nunc», Denmark) вносили по 1 мл ППС, после чего добавляли этанол (6×10^2 — 6×10^6 мг/мл) и затем вносили по 500 мкл цельной крови, контролем служили культуры без добавления этанола. Культуры инкубировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 в течение 18 ч. По завершении инкубации обработку крови проводили согласно протоколу фирмы «Becton Dickinson» (USA) с помощью моноклональных антител к *HLA I* классу фирмы «Сорбент» (Филатов А.В.). Цельную кровь (10 мкл) инкубировали с флуоресцентно-мечеными двухцветными моноклональными антителами (2 мкл) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем добавляли 2 мл лизирующего раствора (NH_4Cl 8,26 г/л и NaHCO_3 1,0 г/л, pH 7,2), инкубировали 10 мин при комнатной температуре и центрифугировали 5 мин при 300 g. Осадок отмывали раствором Cell Wash (USA) и центрифугировали 5 мин при 300 g, осадок фиксировали раствором Cell Fix (USA). Анализ образцов осуществляли с помощью проточного лазерного цитофлуориметра FACS Calibur фирмы «Becton Dickinson» (USA) [29].

Функциональную активность фагоцитов определяли методом хемилюминесценции нейтрофилов с использованием зимозана (действует через Fc рецепторы на клетку) и форбол-миристан-ацетата (ФМА, проникает внутрь клетки) [3]. В каждую лунку 24-луночного планшета («Nunc», Denmark) вносили по 1 мл ППС, после чего добавляли этанол (6×10^2 — 6×10^6 мг/мл) и затем вносили по 500 мкл цельной крови, контролем служили культуры без добавления этанола. Культуры инкубировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO_2 в течение 18 ч. Результаты выражали в виде средних арифметических значений хемилюминесценции нейтрофилов (имп/с на 100 мкл крови) и индексом стимуляции (ИС), который вычисляли по формуле: $\text{ИС} = \frac{\text{средние значения хемилюминесценции нейтрофилов с зимозаном либо с ФМА (имп/мин на 100 мкл крови)}}{\text{средние значения спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов (имп/мин на 100 мкл крови)}}$.

Обработку результатов проводили методом вариационной статистики с использованием пакетов прикладных программ Excel 2000 и «Статистика 6,0» с учетом характера распределения признаков. Поскольку распределение значений показателей в обследованных выборках приближалось к нормальному, достоверность различий оценивали с помощью критерия Стьюдента *t*. Результаты представлены в виде $M \pm \sigma$ [5].

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследовали способность этанола стимулировать *in vitro* клеточное деление лимфоцитов цельной крови. Результаты первого и второго вариантов исследования (см. Объект и методы исследования) представлены в табл. 1. Как видно из таблицы, этанол в концентрациях 6—1,5 мг/мл (критические концентрации этанола, приводящие к гибели лиц, злоупотребляющих алкоголем) обладает цитостатическим эффектом и полностью подавляет спонтанную (не индуцированную митогенами) пролиферацию лимфоцитов. Дозы этанола 0,6—0,15 мг/мл (дозы, вызывающие сильное опьянение) подавляют спонтанный пролиферативный ответ лимфоцитов в 2 раза, дозы этанола от 0,06 мг/мл (вызывающие слабое опьянение) и ниже не влияют на спонтанную пролиферацию лимфоцитов *in vitro*. Полученные результаты свидетельствуют о том, что этанол в такой постановке экспериментов не оказывает митогенного влияния на лимфоциты, в то же время этанол в высоких дозах (6—0,15 мг/мл) обладает ярко выраженным цитостатическим эффектом, причем этанол в этих дозах вызывает гибель клеток крови.

Таким образом, можно констатировать, что этанол не обладает митогенным эффектом, т.е. не стимулирует пролиферацию лимфоцитов крови человека *in vitro*.

Во втором варианте исследований в течение всего периода культивирования лимфоцитов цельной крови в инкубационную среду вносили этанол в концентрациях 0,6— 6×10^6 мг/мл вместе с митогенными лектинами РНА, Con A, контролем служили соответствующие культуры клеток без этанола (табл. 1). Как видно из таблицы, этанол в дозах 0,6—0,15 мг/мл подавляет пролиферативный ответ лимфоцитов на митогены РНА и Con A по абсолютным значениям (СРМ имп/мин). Обнаружено, что этанол в концентрациях 6×10^2 — 6×10^6 мг/мл не влияет на пролиферацию Т-лимфоцитов, индуцированную РНА, в то же время, этанол в концентрациях от 0,06 мг/мл и ниже усиливает пролиферацию Т-лимфоцитов, индуцированную Con A. Результаты, полученные в этом варианте исследований, свидетельствуют о том, что этанол обладает комитогенным эффектом и усиливает пролиферацию $CD8^+$ Т-лимфоцитов, индуцированную Т-клеточным митогеном Con A, который, как известно, в культурах лимфоцитов *in vitro* стимулирует к пролиферации в основном популяцию $CD8^+$ Т-лимфоцитов [1, 2]. Итак, установлено, что этанол в такой постановке эксперимента достоверно усиливает последующую индукцию деления $CD8^+$ Т-лимфоцитов, индуцированную поликлональным митогеном Con A *in vitro*, т.е. обладает комитогенным эффектом относительно этих клеток.

Влияние этанола на пролиферацию лимфоцитов крови здоровых добровольцев *in vitro* (n=10)

Концентрация этанола (мг/мл)	Пролиферативный ответ лимфоцитов (СРМ, имп/мин)		
	Вариант 1	Вариант 2	
	СП	РНА (5 мкг/мл)	Соп А (5 мкг/мл)
СП — контроль (без этанола и митогенов)	264±89	244±70	261±80
Контроль (с митогенами, без этанола)		12187±2038	1723±185
6	0	0	0
3	0	0	0
1,5	0	0	0
0,6	45±8	5000±1272	802±65,3
0,3	60±8,5	7083±1484	1083±138
0,15	100±9,6	9139±1722	1578±160
6x10 ⁻²	243±77,2	12000±1939	4001±315**
3x10 ⁻²	230±72	12200±2020	3978±342**
1,5x10 ⁻²	258±80,4	12300±2100	3350±287**
6x10 ⁻³	259±82,3	12159±2000	3372±246**
3x10 ⁻³	260±81,9	12250±2040	3699±257**
1,5x10 ⁻³	270±89,5	12100±2050	3203±220**
6x10 ⁻⁴	262±88,8	12090±2005	3190±218**
3x10 ⁻⁴	264±89,1	12000±2000	3211±225**
1,5x10 ⁻⁴	266±89,3	12178±2030	3159±220**
6x10 ⁻⁵	261±88,9	12180±2029	3021±207*
3x10 ⁻⁵	265±89,0	12184±2035	2973±194*
1,5x10 ⁻⁵	263±90,1	12200±1995	2770±179*
6x10 ⁻⁶	266±89,3	12183±2010	1966±170

Примечание. В таблице представлены достоверности отличий (* — $p<0,05$; ** — $p<0,001$) показателей клеточных культур с добавлением этанола от показателей контрольных культур (без этанола); t-критерий Стьюдента

В третьем варианте исследований выделенные лимфоциты в присутствии митогенных лектинов (РНА, Соп А) и без них инкубировали 3 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, после чего вносили этанол в соответствующих концентрациях (6x10⁻² — 6x10⁻⁶ мг/мл) и инкубировали 72 ч при 37°C с 5% CO₂, за 16 ч до окончания эксперимента в культуры вносили метил-³H₁-тимидин. Установлено, что в этом варианте экспериментов этанол не оказывал влияния на фазу индуцибельного периода иммунного ответа и не усиливал последующую индукцию делений Т-лимфоцитов митогенами РНА и Соп А (табл. 2). Таким образом, установлено, что этанол в концентрациях 6x10⁻² — 6x10⁻⁶ мг/мл не влияет на фазу индуцибельного периода иммунного ответа *in vitro* в культурах лимфоцитов крови.

На втором этапе изучали влияние этанола на цитолитическую активность НК-клеток *in vitro*. Материалом для исследования служили лимфоциты, выделенные из венозной крови здоровых добровольцев. На весь период культивирования клеток-мишеней (клеточная линия К-562, меченая метил-³H₁-уридином) и выделенных лимфоцитов вносили этанол в концентрациях

1,5x10⁻² — 6x10⁻⁶ мг/мл и инкубировали 16 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Контролем служили соответствующие культуры клеток без этанола. Результаты исследований представлены в табл. 3. Как видно из таблицы, этанол в достаточно широком диапазоне доз (1,5x10⁻² — 1,5x10⁻⁴ мг/мл) снижает цитолитическую активность НК-клеток. Так, концентрации этанола 0,15 и 0,06 мг/мл вызывают *in vitro* высоко достоверное снижение цитолитической активности этих клеток по сравнению с контролем без добавления этанола (29,2±2,85 при дозе 0,15, $p<0,001$ и 29,4±2,85 при дозе 0,06, $p<0,001$ в сравнении с 50,0±6,2 в контроле без добавления этанола). При концентрациях этанола 3x10⁻² — 3x10⁻⁴ мг/мл снижение было также достоверным относительно контрольных значений. Эффект подавления цитолитической активности НК-клеток этанолом, хотя и слабо выраженный, прослеживался в концентрациях этанола от 1,5x10⁻⁴ до 1,5x10⁻⁵ мг/мл.

Приведенные выше данные позволяют сделать вывод, что этанол *in vitro* в широком диапазоне доз подавляет способность НК-клеток лизировать клетки-мишени.

Таблица 2

**Влияние этанола *in vitro*
на фазу индуцибельного периода иммунного ответа лимфоцитов крови здоровых добровольцев (n=10)**

Концентрация этанола мг/мл	Пролиферативный ответ лимфоцитов (СРМ) имп/мин		
	СП	РНА (5 мкг/мл)	Соп А (5 мкг/мл)
Контроль (без этанола)	544±77	24593±4380	18483±4503
6x10 ⁻²	529±70,1	21726±4333	18647±4352
3x10 ⁻²	530±79,9	23860±4477	18933±4427
1,5x10 ⁻²	500±78,5	23900±4366	18203±4459
6x10 ⁻³	538±75,6	24829±4488	18275±4658
3x10 ⁻³	540±76,0	24456±4995	19000±4413
1,5x10 ⁻³	534±78,8	25129±4600	18766±4523
6x10 ⁻⁴	539±80,0	24393±4303	18450±4474
3x10 ⁻⁴	543±77,3	24429±4298	18464±4388
1,5x10 ⁻⁴	545±76,0	24546±4304	18471±4400
6x10 ⁻⁵	544±76,9	24508±4351	18457±4398
3x10 ⁻⁵	546±75,89	24563±4333	18428±4548
1,5x10 ⁻⁵	544±77,1	24548±4350	18397±4550
6x10 ⁻⁶	543±77,3	24583±4371	18382±4449

Таблица 3

**Влияние этанола *in vitro*
на цитолитическую активность НК-клеток крови здоровых добровольцев (n=10)**

Концентрация этанола, мг/мл	Индекс цитотоксичности НК-клеток (ИЦ %)
Контроль (без этанола)	50,0±6,2
1,5x10 ⁻²	29,2±3,25**
6x10 ⁻²	29,4±3,45**
3x10 ⁻²	35,4±4,2*
1,5x10 ⁻²	35,5±4,24*
6x10 ⁻³	36,0±4,3*
3x10 ⁻³	35,9±4,24*
1,5x10 ⁻³	36,0±4,25*
6x10 ⁻⁴	37,5±4,34*
3x10 ⁻⁴	38,8±4,4*
1,5x10 ⁻⁴	43,8±5,74
6x10 ⁻⁵	44,5±5,78
3x10 ⁻⁵	46,7±5,92
1,5x10 ⁻⁵	47,5±5,85
6x10 ⁻⁶	50,0±6,2

Примечание. В таблице представлены достоверности отличий (* — p<0,05; ** — p<0,001) показателей индексов цитотоксичности НК-клеток с добавлением этанола от показателей контроля (без этанола) *in vitro*; t-критерий Стьюдента

На *третьем этапе* изучали влияние этанола *in vitro* на экспрессию активационных CD молекул на Т- и В-лимфоцитах и NK-клетках: CD4⁺25⁺, CD4⁺DR⁺, CD4⁺38⁺, CD8⁺25⁺, CD8⁺DR⁺, CD8⁺38⁺, CD19⁺DR⁺, CD19⁺38⁺, CD16⁺38⁺, CD56⁺ DR⁺. На весь период культивирования лимфоцитов цельной крови здоровых добровольцев в инкубационную среду вносили этанол в концентрациях 6х10⁻², 6х10⁻³, 6х10⁻⁴ и 6х10⁻⁵ мг/мл и инкубировали 18 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Контролем служили соответствующие культуры клеток без этанола. Результаты экспериментов представлены в табл. 4. Как видно из таблицы, концентрации этанола, которые обладали наиболее выраженным комитогенным эффектом *in vitro*, приводили к достоверному снижению экспрессии HLADR молекул на CD4⁺ Т-лимфоцитах. Причем, наиболее выраженный эффект снижения экспрессии HLADR молекул на CD4⁺ Т-лимфоцитах наблюдался при дозе этанола 6х10⁻³ мг/мл. В то же время, как видно из табл. 4, этанол в исследованных концентрациях достоверно повышал экспрессию этих молекул на CD8⁺ Т-клетках в сравнении с показателями культур без добавления этанола. Кроме того, этанол в указанных концентрациях достоверно повышал экспрессию HLADR молекул на CD19⁺ В-лимфоцитах.

Нами было установлено также, что этанол усиливает экспрессию молекулы адгезии CD38 как на CD8⁺ Т-клетках, так и на клетках с маркером

CD16⁺, причем, как видно из табл. 4, это усиление было достоверным на CD8⁺ Т-клетках и CD19⁺ В-лимфоцитах.

На CD8⁺ Т-лимфоцитах под влиянием этанола повышалась экспрессия CD25 молекулы, усиление которой в 20 раз превышало значения контрольных культур, без добавления этанола (табл. 4). Изменений в экспрессии CD25⁺ молекулы на CD4⁺ Т-лимфоцитах обнаружено не было.

Таким образом, установлено, что этанол обладает способностью усиливать экспрессию активационных молекул и молекулы адгезии CD38 на CD8⁺ Т-клетках и CD19⁺ В-лимфоцитах в культуре клеток крови *in vitro*.

На *четвертом этапе* изучали влияние этанола на экспрессию молекулы HLA I класса на клетках крови *in vitro*. На весь период культивирования лимфоцитов цельной крови здоровых доноров в инкубационную смесь вносили этанол в концентрациях 6; 0,6; 6х10⁻²; 6х10⁻³; 6х10⁻⁴; 6х10⁻⁵ и 6х10⁻⁶ мг/мл и проводили инкубацию в течение 18 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Контролем служили соответствующие культуры клеток без этанола (табл. 5). Как видно из таблицы, этанол в дозе 6 мг/мл снижал экспрессию молекул HLA класса I на клетках иммунной системы. Дозы этанола 0,6—6х10⁻⁵ мг/мл, напротив, достоверно усиливали экспрессию этих молекул на клетках иммунной системы *in vitro*.

Таким образом, показано, что этанол обладает способностью усиливать экспрессию молекул HLA

Таблица 4

Влияние этанола *in vitro* на экспрессию активационных молекул CD25, HLADR и молекулы адгезии CD38 на клетках периферической крови здоровых добровольцев (n=10)

Показатель	Экспрессия CD молекул				
	Контроль (без этанола)	Концентрация этанола (мг/мл)			
		6х10 ⁻²	6х10 ⁻³	6х10 ⁻⁴	6х10 ⁻⁵
CD4+25+	18±2,77	19,3±2,93	18,3±2,77	18,3±2,7	18,4±2,8
CD4+DR+	231,6±8,4	98,6±4,54**	89,6±4,06**	125,2±6,67*	214,8±7,21 ↓
CD4+38+	91±5,6	103,4±3,1	105,3±3,42	91,0±5,5	90,95±5,68
CD8+25+	1,5±0,05	20±1,1***	23,5±1,8***	25,5±2,5***	14,0±2,1***
CD8+DR+	196±19,2	790±45,93***	1111±100,4***	1799±122,2***	516±35,85**
CD8+38+	138,7±7,94	203,33±8,46*	216,3±9,2**	174,4±5,78*	158,28±8,0
CD19+DR+	224,3±9,96	295,66±8,97*	359,4±7,46*	300,7±8,4*	269,4±10,15 ↑
CD19+38+	22,6±1,4	38,2±3,24*	39,5±3,5*	28,15±2,4 ↑	24,1±1,9
CD16+38+	92,3±2,33	113,3±3,42 ↑	117,4±3,6 ↑	100,6±3,7 ↑	95,0±3
CD56+DR+	160,7±20,6	173,66±23,1	179,25±25,1	170,4±24,6	165,3±20,8

Примечание. В таблице представлены достоверности отличий (* — p<0,05; ** — p<0,001; *** — p<0,0001) экспрессии CD25, HLADR, CD38 на лимфоцитах и NK-клетках опытных культур от показателей контроля (без внесения этанола); t-критерий Стьюдента; ↓ — тенденция к снижению и ↑ — тенденция к увеличению показателей

класса I на культуре клеток крови *in vitro* в широком диапазоне доз.

На *пятом этапе* исследовали влияние этанола на способность нейтрофильных гранулоцитов крови человека активироваться *in vitro* в ответ на зимозан и ФМА. На весь период культивирования клеток цельной крови от 10 здоровых добровольцев в инкубационную среду вносили этанол в концентрациях 6, 6×10^{-2} , 6×10^{-3} , 6×10^{-4} , 6×10^{-5} мг/мл и инкубировали 18 ч при 37°C в атмосфере с 5% CO₂, контролем служили соответствующие культуры клеток без этанола.

Результаты экспериментов представлены в табл. 6. Как видно из таблицы, этанол в концентрациях 6—0,06 мг/мл подавлял спонтанную, индуцированную зимозаном и ФМА хемилюминесценцию

нейтрофильных гранулоцитов. Причем, это подавление было высоко достоверным по сравнению со значениями в культурах без добавления этанола. Выявленные факты являются, по-видимому, следствием токсического эффекта высоких концентраций этанола. В то же время, этанол в концентрациях 6×10^{-3} — 6×10^{-5} мг/мл не индуцировал спонтанную хемилюминесценцию нейтрофильных гранулоцитов (табл. 6). Однако эти дозы этанола подавляли хемилюминесценцию, индуцированную зимозаном. При дозе этанола 6×10^{-5} мг/мл её снижение не было достоверным. В то же время, подавление этанолом хемилюминесценции, индуцированной ФМА, наблюдалось при всех дозах и было достоверным.

Таким образом, проведенные исследования с использованием этанола в широком диапазоне концен-

Таблица 5

Суммарная экспрессия молекул HLA класса I на клетках периферической крови здоровых добровольцев после воздействия широкого диапазона доз этанола *in vitro* (n=10)

Концентрации этанола мг/мл	Экспрессия HLA I
Контроль (без этанола)	438,±14,92
6,0	183,9±7,7 **
0,6	800,5±24,7 **
6×10^{-2}	735,1±24,0 *
6×10^{-3}	700,1±23,5 *
6×10^{-4}	690,4±23,0 *
6×10^{-5}	648,5±22,6 *
6×10^{-6}	534±21,4 ↑

Примечание. В таблице представлены достоверности отличий (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$) показателей экспрессии молекул HLA I класса на клетках крови с добавлением этанола от показателя контроля (без этанола); t-критерий Стьюдента; ↑ — тенденция к увеличению показателя

Таблица 6

Влияние этанола на хемилюминесценцию нейтрофилов после 18-часовой инкубации цельной крови *in vitro* (n=10)

Концентрация этанола, мг/мл	Хемилюминесценция нейтрофилов				
	Спонтанная	Индуцированная зимозаном		Индуцированная ФМА	
		имп/мин	ИС	имп/мин	ИС
Контроль (без этанола)	1642,3±492,3	13292±1118	8,48±2,3	8892±748	5,4±1,49
6	337±23,8***	308±7,2***	0,9±0,2***	360,3±21,4***	1,06±0,45***
6×10^{-2}	673±50,9**	2288±405***	3,5±0,71**	1952,6±398***	3,08±0,97*
6×10^{-3}	1645,6±500,0	10878±875,4	6,6±3,54	5081,3±305*	3,2±0,98*
6×10^{-4}	1654±500	11228±945	6,8±3,39	5326±327*	3,67±1,22*
6×10^{-5}	1643±486	12396±1052	7,5±2,8	6036±332*	4,95±1,23

Примечание. В таблице представлены достоверности отличий (* — $p < 0,05$; ** — $p < 0,001$; *** — $p < 0,0001$) показателей хемилюминесценции нейтрофилов после действия этанола от показателей хемилюминесценции нейтрофилов контрольных культур (без этанола); t-критерий Стьюдента

траций выявили его прямое влияние на нейтрофилы крови человека. Установлено, что этанол при 18-часовой инкубации с клетками крови человека подавлял индуцированную зимозаном и ФМА хемилюминесценцию в большом диапазоне доз, причем, в случае с ФМА этот эффект был более выражен и прослеживался при всех исследованных концентрациях этанола.

Подводя итоги вышеизложенных результатов исследования, можно констатировать, что этанол *in vitro* в широком диапазоне концентраций не обладает собственным митогенным действием, однако существенно усиливает последующую индукцию делений цитолитических Т-лимфоцитов (CD8⁺) митогеном Con A в культурах цельной крови человека. Этанол приводит также к усилению экспрессии молекул HLA-DR, CD25 и CD38 на CD8⁺-лимфоцитах и CD19⁺ В-лимфоцитах, что свидетельствует об активации этих клеток. В то же время, на CD4⁺ Т-лимфоциты и NK-клетки этанол практически не влияет. Обнаружено также, что этанол усиливает экспрессию молекул HLA I класса на клетках крови *in vitro*. Эти молекулы играют важную роль в распознавании антигенов цитолитическими Т-лимфоцитами (CD8⁺). Видоизмененные клетки тканей и органов, подвергшиеся действию биологических агентов (вирусов, бактерий), а также различных токсических факторов, структурно отличаются от нормальных клеток и несут на своей поверхности видоизмененные молекулы HLA I класса. Как следствие цитолитические CD8⁺ Т-лимфоциты атакуют видоизмененные клетки организма, приводя к их лизису.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что этанол активизирует эффекторное звено иммунного ответа — CD8⁺ Т-лимфоциты, которые участвуют в защите организма человека от патогенов [1]. В результате такой активации может возникнуть алкогольное поражение различных органов и тканей: печени, сердца, почек, легких, поджелудочной железы и др.

Список литературы

1. Алексеев Л.П., Хаитов Р.М. Физиологическая роль главного комплекса гистосовместимости человека // Иммунология. — 2001. — №3. — С. 4—12.
2. Дейл М.М., Формен Д.К. Руководство по иммунофармакологии. — М.: Медицина, 1998. — 332 с.
3. Зыкин В.Ю., Годков М.А. Способ клинической оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов человека // Клини. Лаб. Диагност. — 2004. — №8. — С. 26.
4. Кондратьева И.А., Воробьева Н.В., Буракова О.В. и др. // Практикум по иммунологии. — Изд-во МГУ им. М.В. Ломоносова, 2001. — 224 с.
5. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. — М.: Медиасфера, 2003. — 312 с.
6. Рычкова М.П., Спиридонова И.В., Зедгенис М.С. и др. Новая высокочувствительная техника нормальных киллеров // Иммунология. — 1981. — №3. — С. 88—90.

7. Тарасова Н.С. Иммунологические факторы в повреждении почек при хроническом алкоголизме // Клини. Мед. — 2001. — Т. 79, №5. — С. 45—47.
8. Тарасова Н.С., Белобородова Э.И. Иммунологическая характеристика циркулирующих иммунных комплексов при заболевании почек у больных хроническим алкоголизмом // Тер. Архив. — 1998. — Т. 70, №12. — С. 61—63.
9. Ярилин А.А. Иммунология. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. — 747 с.
10. Anderson L.M. Modulation of nitrosamine metabolism by ethanol: Implications of cancer risk. // Alcohol and Cancer / R.R. Watson, ed. — Boca Raton, FL: CRC Press, 1992. — P. 17—54.
11. Baum M.K., Rafie C., Lai S. et al. Alcohol use accelerates HIV disease progression // AIDS Res. Hum. Retroviruses. — 2010. — Vol. 26. — P. 511—518.
12. Ben-Eliyahu S., Page G.G., Yirmiya R., Taylor A.N. Acute alcohol intoxication suppresses natural killer cell activity and promotes tumour metastasis // Nat. Med. — 1996. — Vol. 2. — P. 457—460.
13. Cook R.T. Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system — A review // Alcohol. Clin. Exp. Res. — 1998. — Vol. 22. — P. 1927—1942.
14. Fiske C.T., Hamilton C.D., Stout J.E. Alcohol use and clinical anifestations of tuberculosis // J. Infect. — 2008. — 57. — P. 385—391.
15. Gillin J.C., Smith T.L. et al. EEG sleep studies in «pure» primary alcoholism during subacute withdrawal: relationships to normal controls, age, and other clinical variables // Biol. Psychiatry. — 1990. — Vol. 27. — P. 477—488.
16. Gitto S., Micco L., Conti F. et al. Alcohol and viral hepatitis: a mini-review // Dig. Liver Dis. — 2009. — Vol. 41. — P. 67—70.
17. Hahn J.A., Samet J.H. Alcohol and HIV disease progression: weighing the evidence // Curr. HIV/AIDS Rep. — 2010. — Vol. 7. — P. 226—233.
18. Happel K.I., Nelson S. Alcohol, immunosuppression, and the lung // Proc. Am. Thorac. Soc. — 2005. — Vol. 2. — P. 428—432.
19. Hillbom M., Saloheimo P., Juvela S. Alcohol consumption, blood pressure, and the risk of stroke // Curr. Hypertens. Rep. — 2011. — Vol. 13. — P. 208—213.
20. Imhof A., Koenig W. Alcohol inflammation and coronary heart disease // Addict. Biol. — 2003. — Vol. 8. — P. 271—277.
21. Joshi P.C., Guidot D.M. The alcoholic lung: epidemiology, pathophysiology, and potential therapies // Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. — 2007. — Vol. 292. — L.813—823.
22. Jung K.I., Ju A., Lee H.M. et al. Chronic ethanol ingestion, type 2 diabetes mellitus, and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in rats // Neurosci. Lett. — 2011. — Vol. 487. — P. 149—152.
23. Kim J., Y., Song E.H., Lee H.J. et al. Chronic ethanol consumption-induced pancreatic {beta}-cell dysfunction and apoptosis through glucokinase nitration and its down-regulation // J. Biol. Chem. — 2010. — Vol. 285. — P. 37251—37262.
24. Kronfol Z., Nair M. et al. Immune function in alcoholism: a controlled study // Alcohol. Clin. Exp. Res. — 1993. — Vol. 17. — P. 279—283.
25. Krupitsky E.M., Zvartau E.E., Lioznov D.A. et al. Co-morbidity of infectious and addictive diseases in St. Petersburg and Leningrad Region, Russia // Eur. Addict. Res. — 2006. — Vol. 12. — P. 12—19.
26. Laso F.J., Madruga J.I., Giron J.A. et al. Decreased natural killer cytotoxic activity in chronic alcoholism is associated with alcohol liver disease but not active ethanol consumption // Hepatology. — 1997. — Vol. 25. — P. 1096—1000.
27. Lazaro del Nogal M., Fernandez Perez C., Figueredo Delgado M.A. et al. Basal immunological parameters in a group of

retirees // Rev. Clin. Esp. — 2003. — Vol. 203. — №9. — P. 417—422.

28. Leevy C.B., Elbesheshy H.A. Immunology of alcoholic liver disease // Clin. Liver Dis. — 2005. — Vol. 9. — №1. — P. 55—66.

29. Loken M.R. Immunofluorescence Techniques in Flow Cytometry and Sorting, Wiley, 1990. — 2nd ed. — P. 341—353.

30. Mason C.M., Dobard E., Zhang P., Nelson S. Alcohol exacerbates murine pulmonary tuberculosis // Infect. Immun. — 2004. — Vol. 72. — P. 2556—2563.

31. Pietraszek A., Gregersen S., Hermansen K. Alcohol and type 2 diabetes. A review // Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis. — 2010. — Vol. 20. — P. 366—375.

32. Schiff E.R., Ozden N. Hepatitis C and alcohol // Alcohol Res. Health. — 2003. — Vol. 27. — P. 232—239.

33. Thomson G.S. Significance levels in genome scans // Adv. Genet. — 2001. — Vol. 42. — P. 475—486.

34. Zhang P., Bagby G.J., Happel K.I. et al. Alcohol abuse, immunosuppression, and pulmonary infection // Curr. Drug Abuse Rev. — 2008. — P. 56—67.

ETHANOL INFLUENCE ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF THE HUMAN BLOOD CELLS *IN VITRO*

UL'YANOVA L.I.^{1,2}

Cand. Biol. Sci., leading researcher, State Research Center «Institute of Immunology»;

National Research Center of Addiction (NRCA), Moscow

GAMALEYA N.B.¹

MD, Doct. Med. Sci., Prof., Head, Laboratory of Immunochemistry, NRCA, Moscow

ALEKSEEV L.P.²

MD, Doct. Med. Sci., Prof., Head, Department of Immunogenetics, «Institute of Immunology», Moscow

¹ National Research Center of Addiction,

Malyi Mogilcevskii per. 3, Moscow 119002, Russia, Fax 007 495 2419961, e-mail: nrca@mail.ru

² State Research Center «Institute of Immunology» ,

Kashirskoe shosse 24, suite 2, Moscow 115478, Russia, Fax факс 007 499 617-10-27, e-mail: instimmune@yandex.ru

The *in vitro* influence of ethanol on the ability of the human T-lymphocytes to proliferate in response to the mitogenic lectin stimulation was studied along with its influence on the cytolytic activity of the NK-cells, activity of neutrophilic granulocytes, and the expression of the activation CD molecules, adhesion molecules, and the HLA I class molecules. The peripheral blood of healthy volunteers was the object for investigation. Ethanol effect was studied in a broad range of concentrations from 6 to 6x10⁶ мг/мл. Ethanol was found to lack its own mitogenic activity. However, it augmented significantly further induction of the cytolytic T-lymphocyte (CD8⁺) division by the Con A mitogen in cell cultures of the human whole blood *in vitro*. Ethanol increased expression of the activation molecules HLADR, CD25, and the adhesion molecule CD38 on the CD8⁺ lymphocytes and the HLADR and CD38 molecules on the CD19⁺ B cells. However, it did not change the expression of these molecules on the CD4⁺ T cells and NK cells. Ethanol enhanced expression of the HLA I class molecules on the cytolytic CD8⁺ T lymphocytes, thus increasing their ability to lyse cells in tissues and organs that were changed by the biological agents or toxic factors.

Key words: ethanol *in vitro*, T-lymphocytes, NK-cells, neutrophils