Д.В. Фоменко, Н.Н. Михайлова, А.С. Казницкая, Е.В. Уланова, Ю.А. Прокопьев

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ СПЕЦИФИЧНОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА ОРГАНИЗМА ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПРОФЗАБОЛЕВАНИЯХ

ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (Новокузнецк)

На экспериментальных моделях антракосиликоза (АС) и фтористой интоксикации (ФИ) показано, что вдыхание угольно-породной пыли (УПП) вызывает раннюю цитокиновую противовоспалительную реакцию (IL-4, IL-10) и активацию гуморального звена иммунитета на фоне снижения уровня провоспалительных цитокинов. Поздние сроки действия УПП характеризуются наличием воспалительного процесса и иммунодефицитным состоянием. Начало ФИ сопровождается повышением провоспалительных цитокинов (IL-8, TNF- α). Противовоспалительная защита проявляется на поздних сроках (IL-10), уровень иммуноглобулинов не меняется на протяжении 6 недель ФИ. Даны рекомендации по профилактике антракосиликоза и фтористой интоксикации.

Ключевые слова: антракосиликоз, фтористая интоксикация, цитокины, иммуноглобулины

EXPERIMENTAL STUDIES OF THE SPECIFICITY OF IMMUNE RESPONSE IN VARIOUS OCCUPATIONAL DISEASES

D.V. Fomenko, N.N. Mikhailova, A.S. Kazitskaya, E.V. Ulanova, Y.A. Prokopyev

Research Institute of Complex Problems of Hygiene and Occupational Diseases SB RAMS, Novokuznetsk

Experimental models of anthracosilicosis (AS) and fluoride intoxication (FI) show that the inhalation of coal and rock dust (CRD) results in an early anti-inflammatory cytokine response (IL-4, IL-10) and activation of humoral immunity on the background of lower level of proinflammatory cytokines. Later stages of the CRD activity are characterized by inflammation and immunodeficiency. FI start is accompanied by an increase of proinflammatory cytokines (IL-8, TNF- α). Anti-inflammatory protection is seen on the later stages (IL-10), immunoglobulin levels did not change during 6 weeks of FI. Recommendations for the prevention of the anthracosilicosis and fluoride intoxication given.

Key words: anthracosilicosis, fluoride intoxication, cytokines, immunoglobulins

Профессиональные заболевания обусловлены воздействием на организм работающих совокупности вредных факторов, среди которых, в зависимости от производства, выделяют ведущие: в угледобыче – вдыхание угольно-породной пыли (УПП), в производстве алюминия – токсическое действие фтора и его соединений. Длительное вдыхание УПП приводит к развитию антракосиликоза (АС), а действие высоких концентраций фтора на организм к развитию хронической фтористой интоксикации (ХФИ).

Состояние иммунной системы – наиболее чувствительный показатель реакции организма на действие производственных ксенобиотиков, обусловленный наличием множественных коррелятивных связей между отдельными компонентами системы, при которых изменение в одном звене отражается на функционировании иммунитета в целом. Изменения иммунологической реактивности служат предпосылкой формирования целого ряда тяжелых соматических заболеваний и профессиональных патологий [4, 5]. Исследования, посвященные оценке ранних иммунологических изменений при развитии АС и ХФИ, немногочисленны и противоречивы [2, 3], что существенно осложняет понимание патогенеза этих профзаболеваний и, как следствие, их своевременную профилактику, диагностику

и лечение. Исходя из выше изложенного, целью работы явилась оценка состояния иммунной реактивности при длительном воздействии на организм высоких концентраций УПП и фтора на экспериментальных моделях, приближенных к производственным условиям.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперименты проведены на 280 белых крысах-самцах массой 200–250 г. Для затравки УПП крыс помещали в ингаляционно-затравочную камеру цилиндрической объемом 130 л. Крысы вдыхали УПП угля марки газово-жирный по 4 часа ежедневно в течение 6 недель (средняя концентрация пыли – 50 мг/м³). ХФИ моделировали путем пассивного запаивания среднетоксичной дозой фторида натрия в течение 6 недель ежедневно с питьевой водой в концентрации 10 мг/л. Забор материала производили на 1-е, 3-и сутки и через 1, 3 и 6 недель затравки.

Животные содержались в стандартных условиях вивария, без ограничения потребления воды, на обычном пищевом рационе, согласно нормативам Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (Совет Европы, Страсбург, 2004), а также в соответствии с международными правилами «Guide for the Care and Use of Laboratory

Animals». Декапитация проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (приказ МЗ СССР №755 от 12.08.1977).

Уровень цитокинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10) определяли в сыворотке крови на анализаторе Multiskan EX методом иммуноферментного анализа с использованием наборов «Вектор Бест»; содержание гаптоглобина и церулоплазмينا – иммунотурбидиметрическим методом на фотометре 5010 (Германия), с помощью наборов «Haptoglobin» и «Ceruloplasmin» производства «Sprinreact» (Испания). Содержание сывороточных иммуноглобулинов А, G, М (Ig A, Ig G, Ig M) – с помощью соответствующих наборов фирмы PLIVA – Lachema (Чехия). Уровень глюкокортикоидной активности определяли иммуноферментным методом на анализаторе Мультискан (Финляндия) при помощи наборов «Алкор-био».

Статистическую обработку результатов проводили, вычисляя среднее арифметическое (M), ошибку среднего арифметического значения (m) и представляли в виде $M \pm m$. Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, достоверными считались различия при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Изменения в продукции цитокинов являются маркером воздействия неблагоприятных факторов на иммунную систему, поскольку цитокины включены в патогенетические звенья многих заболеваний [11]. Такие медиаторы воспаления, как TNF- α и ИЛ-1, ИЛ-8, ИЛ-6, рассматриваются как факторы, инициирующие развитие заболеваний при воздействии на организм человека фиброгенных соединений [12]. Анализ иммунного статуса экспериментальных животных показал специфичность реакции организма на отдельные антигены, которая зависела от характера и длительности воздействия их на организм.

Начало затравки УПП для животных явилось стрессорирующим фактором, о чём свидетельствует повышение уровня глюкокортикоидной активности с $12,2 \pm 1,7$ пг/мл в контроле,

до $17,2 \pm 2,4$ пг/мл, $p \leq 0,05$ на 1-й неделе и $30,3 \pm 2,9$ пг/мл, $p \leq 0,01$ на второй неделе затравки. Такой гормональный ответ в начальный период ингаляционного воздействия УПП запускает адаптационные механизмы, направленные на активизацию метаболических процессов организма, позволяющих противостоять патологическому воздействию.

На этом фоне через сутки после начала эксперимента в крови наблюдался повышенный уровень противовоспалительных интерлейкинов ИЛ-4 и ИЛ-10 и сниженный – провоспалительных TNF α , ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ИЛ-8 (табл. 1).

Трехнедельная затравка явилась фактором инициации воспалительного процесса, о чем свидетельствовало достоверное повышение белков острой фазы – гаптоглобина и церулоплазмينا (табл. 2). Белки острой фазы являются, прежде всего, ингибиторами и дезактиваторами ферментов, высвобождающихся при деструкции клеток, и могут приводить к вторичному повреждению ткани [10]. На этом фоне была выявлена активация гуморального звена иммунитета: в 2 раза повысился уровень сывороточного IgA, выступающего в качестве первой линии защиты на слизистых поверхностях и предупреждающего дальнейшие события по распространению инфекционного процесса. Двукратно повышенный уровень ИЛ-4 так же является признаком активного участия гуморального иммунного ответа, влияя на продукцию IgA [6]. Однако ИЛ-4 и ИЛ-10 продолжают держать противовоспалительный пул на достаточном для блокирования провоспалительных цитокинов уровне. Повышенный уровень содержания IgG и тенденция к повышению IgM, обладающего свойством связывания микроорганизмов, так же свидетельствуют о готовности к быстрому иммунному ответу.

Продолжение пылевого воздействия сроком до шести недель характеризовалось появлением элементов иммунодефицита: снижен уровень сывороточного IgA, что может свидетельствовать как об угнетении системы фагоцитоза, так и об увеличении на данной стадии процесса количества бактериальных антигенов и токсинов, с которыми IgA специфически связывается [1]. Достоверно

Таблица 1
Влияние угольно-породной пыли на динамику уровня цитокинов в плазме крови ($M \pm m$)

Показатели	Контроль	1-е сутки	3-и сутки	1 неделя	3 недели	6 недель
TNF α , пг/мл	$3,0 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,6$	$3,0 \pm 0,3$	$3,0 \pm 0,8$	$2,8 \pm 0,2$	$2,5 \pm 0,2$
ИЛ-1 β , пг/мл	$6,4 \pm 0,9$	$5,0 \pm 0,1$	$6,2 \pm 1,5$	$4,1 \pm 1,1$	$2,4 \pm 0,6^{**}$	$4,0 \pm 0,7^*$
ИЛ-6, пг/мл	$5,4 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,4$	$4,9 \pm 1,1$	$3,0 \pm 0,6^*$	$3,2 \pm 0,9^*$	$5,0 \pm 0,9$
ИЛ-8, пг/мл	$3,1 \pm 0,4$	$2,4 \pm 0,2$	$2,4 \pm 0,2$	$2,8 \pm 0,2$	$3,2 \pm 0,8$	$2,9 \pm 0,4$
ИЛ-4, пг/мл	$2,3 \pm 0,3$	$5,4 \pm 0,7^*$	$3,0 \pm 0,4$	$3,0 \pm 1,2$	$4,4 \pm 1,0^*$	$1,7 \pm 0,4^*$
ИЛ-10, пг/мл	$2,4 \pm 0,4$	$3,5 \pm 0,3^*$	$2,3 \pm 0,5$	$2,6 \pm 0,4$	$2,7 \pm 0,5$	$1,2 \pm 0,2^*$

Примечание: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$ – достоверные отличия по отношению к соответствующему показателю в группе контрольных животных.

Таблица 2

Динамика концентрации белков острой фазы и иммуноглобулинов в крови крыс в условиях вдыхания УПП ($M \pm m$)

Показатель	Продолжительность затравки		
	контроль	3 недели	6 недель
<i>Ср, мг/дл</i>	11,5 ± 0,9	16,8 ± 0,7*	9,6 ± 0,4
<i>Нр, мг/дл</i>	34,8 ± 2,2	53,8 ± 3,4**	56,9 ± 2,6**
<i>Ig A, г/л</i>	0,12 ± 0,01	0,25 ± 0,01*	0,07 ± 0,002*
<i>Ig G, г/л</i>	2,4 ± 0,06	3,0 ± 0,09*	2,7 ± 0,04
<i>Ig M, г/л</i>	0,36 ± 0,01	0,45 ± 0,01	0,5 ± 0,01*

Примечание: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$ – достоверные отличия по отношению к соответствующему показателю в группе контрольных животных.

Таблица 3

Влияние фтористой интоксикации на динамику уровня цитокинов в плазме крови ($M \pm m$)

Показатели	контроль	1-е сутки	3-и сутки	1 неделя	3 недели	6 недель
<i>TNFα, пг/мл</i>	3,0 ± 0,3	1,9 ± 0,24*	2,5 ± 0,36	4,9 ± 0,93*	4,0 ± 0,45	6,6 ± 1,10*
<i>IL-1β, пг/мл</i>	6,5 ± 1,2	5,6 ± 1,15	3,4 ± 0,5*	5,8 ± 0,70	2,7 ± 0,75**	3,4 ± 0,75**
<i>IL-6, пг/мл</i>	5,4 ± 0,5	5,6 ± 0,87	5,8 ± 0,87	6,1 ± 1,16	5,5 ± 1,18	7,6 ± 0,71*
<i>IL-8, пг/мл</i>	3,1 ± 0,4	4,6 ± 0,64*	4,3 ± 0,68	3,8 ± 0,25	4,3 ± 1,0	3,1 ± 0,37
<i>IL-4, пг/мл</i>	2,4 ± 0,3	2,0 ± 0,57	5,3 ± 1,1*	2,0 ± 0,15	1,0 ± 0,20**	1,4 ± 0,37*
<i>IL-10, пг/мл</i>	2,4 ± 0,5	2,3 ± 0,20	3,2 ± 0,62	1,6 ± 0,07*	3,6 ± 0,40*	3,8 ± 0,62*

Примечание: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$ – достоверные отличия по отношению к соответствующему показателю в группе контрольных животных.

Таблица 4

Динамика концентрации белков острой фазы в крови крыс в условиях фтористой интоксикации ($M \pm m$)

Показатель	Продолжительность затравки			
	контроль	1 неделя	3 недели	6 недель
<i>Ср, мг/дл</i>	16,7 ± 0,5	20,3 ± 1,5*	18,5 ± 1,9	14,3 ± 0,5
<i>Нр, мг/дл</i>	33,7 ± 12,5	35,2 ± 2,4	28,2 ± 3,2	28,2 ± 3,1

Примечание: * – $p \leq 0,05$ – достоверные отличия по отношению к соответствующему показателю в группе контрольных животных.

сниженный уровень IL-4 и IL-10, являющихся эффективными ингибиторами воспаления, и высокое содержание гаптоглобина свидетельствует о том, что организм не в состоянии справиться с продолжающим поступлением УПП в легкие. Выше изложенная метаболическая картина позволяет говорить о начале хронизации воспалительного процесса после шестой недели затравки, которая, по нашим данным, является ключевой в переходе организма к состоянию истощения и морфологически подтверждается образованием гранулем в легочной ткани у экспериментальных животных [7, 9].

На начальных этапах воздействия фторида натрия на организм наблюдалась экспрессия провоспалительных цитокинов, которые продуцируются, секретируются и запускают иммунный ответ организма через специфические рецепторы иммунокомпетентных клеток. Через сутки после начала запаивания фторидом натрия в плазме крови экспериментальных животных наблюдалось полуторакратное повышение уровня провоспали-

тельного интерлейкина – IL-8 (табл. 3). Уровень другого провоспалительного интерлейкина – IL-6 находился в пределах контрольных значений, а уровень TNF- α снижался в полтора раза по сравнению с контролем. По мнению ряда авторов, определение TNF- α в крови, секретах или тканях, имеет ограниченную диагностическую ценность при ряде патологий, так как цитокин имеет возможность очень быстрого, в течение нескольких часов, связывания с тканями-мишенями [7]. На третьи сутки эксперимента в крови крыс отмечено повышение противовоспалительного IL-4 почти в 2,5 раза.

При продолжении воздействия фторида натрия к концу первой недели интоксикации в плазме крови экспериментальных животных увеличилась концентрация церулоплазмينا при сохранении в пределах физиологической нормы гаптоглобина. Содержание ключевого медиатора иммунного ответа – TNF- α – достоверно повысилось в 1,7 раза, коррелируя со снижением уровня противовоспалительного IL-10 в плазме крови животных.

По сравнению с первой неделей интоксикации, к 3-й наблюдалось снижение уровня церулоплазмينا, которое поступательно продолжалось до 6-й недели эксперимента (табл. 4). Концентрация IL-1 β к концу 3-й недели ФИ достоверно снижалась в 2,5 раза и сохранялась стабильно низкой до конца эксперимента. Данный факт может быть объяснен тем, что третья неделя воздействия фтора сопровождалась увеличением содержания в крови IL-10, являющегося самым мощным ингибитором IL-1 β .

Шестая неделя воздействия фторида натрия характеризовалась достоверно высокими значениями в крови IL-6 и IL-10, между которыми прослеживалась статистически достоверная корреляционная связь ($r = 0,79$, $p = 0,02$); TNF- α , на фоне низких концентраций IL-1 β и IL-4 и не отличающимися от фоновых значений концентрациями иммуноглобулинов.

Таким образом, на начальных сроках ФИ основным противовоспалительным цитокином выступает IL-4, уровень которого к третьим суткам затравки увеличился почти в 2,5 раза. Через неделю интоксикации наблюдалось достоверное увеличение в плазме крови белка острофазового ответа — церулоплазмينا, в дальнейшем отмечено поступательное вовлечение в процесс противовоспалительного интерлейкина — IL-10. Исходя из стадийности ответа организма на ФИ, показанного в ранее проведенных нами исследованиях [8], шестая неделя интоксикации является сроком, на котором еще сохраняется эффективность ключевых механизмов регуляции метаболизма, в частности, иммунных. На протяжении шести недель фтористой затравки уровень изученных иммуноглобулинов сохранялся в пределах физиологической нормы.

Таким образом, дыхание УПП в течение шести недель привело к развитию стадийного иммунного ответа: на начальных сроках проявлялись элементы срочной адаптации; к шестой неделе наблюдалась хронизация воспалительного процесса. Избыток фтора, в силу его большей реакционной способности, оказывает, прежде всего, токсическое действие, раннюю экспрессию провоспалительных цитокинов и отсроченный противовоспалительный иммунный ответ, по сравнению с реакцией на воздействие УПП на организм.

Полученные результаты позволяют рекомендовать различную стратегию профилактических мероприятий: при ФИ необходимость проведения профилактических мероприятий с первых дней воздействия фтора на организм: сначала детоксикационных, затем иммуномодуляторных. При риске развития АС реабилитационные мероприятия следует назначать на более поздних сроках, с преобладанием иммуномодуляторной и противовоспалительной терапии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бабанов С.А. Клинико-иммунологические особенности, факторы риска и прогнозирование течения хронической обструктивной болезни легких в крупном промышленном центре Среднего Поволжья: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Самара, 2008. — 42 с.
2. Еселевич С.А., Разумов В.В. Пылевая патология органов дыхания, цитокиновый профиль лаважной жидкости и сыворотки крови // Медицина в Кузбассе. — 2006. — № 5. — С. 25—26.
3. Захаренков В.В., Казлицкая А.С., Ядыкина Т.Г., Фоменко Д.В. и др. Специфичность иммунного ответа на действие различных производственных факторов // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. — 2010. — № 4. — С. 24—27.
4. Киселев В.В., Коржов Л.Н. Мониторинг степени воздействия производственных факторов вредности на состояние здоровья персонала и населения // Медицинские аспекты радиационной и химической безопасности. — СПб., 2001. — С. 215—216.
5. Коленчукова О.А. Особенности реагирования иммунной системы в условиях проживания в районах с различной техногенной нагрузкой // Фундаментальные исследования. — 2004. — № 5. — С. 112.
6. Косов А.И. Клинические и иммунологические проявления хронической обструктивной болезни легких и пылевых заболеваний органов дыхания: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Самара, 2008. — 43 с.
7. Уланова Е.В., Фоменко Д.В., Бондарев О.И., Золоева П.В. Морфологические изменения тканей при экспериментальном антракосиликозе // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. — 2009. — № 4. — С. 24—26.
8. Уланова Е.В., Фоменко Д.В., Кизиченко Н.В., Ядыкина Т.К. и др. Токсическое действие фторида натрия при экспериментальном флюорозе // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. — 2009. — № 1. — С. 275—278.
9. Фоменко Д.В., Горохова Л.Г., Панев Н.И., Казлицкая А.С. и др. Клинико-экспериментальные исследования метаболического ответа организма на хроническое воздействие угольно-породной пыли // Мед. труда и пром. экология. — 2012. — № 2. — С. 15—21.
10. Чукаева И.И., Богова О.Т., Корочкин И.М. Инфаркт миокарда и воспаление // Медицина неотложных состояний. — 2007. — № 4 (11). — С. 19—23.
11. De Waal Malefyt R., Abrams J. et al. Interleukin-10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: An autoregulatory role IL-10 produced by monocytes // J. Exp. Med. — 1991. — Vol. 174. — P. 1209—1220.
12. Driscoll K.E., Maurer J.K. Cytokine and growth factor release by alveolar macrophages: potential biomarkers of pulmonary toxicity // Toxicol Pathol. — 1991. — Vol. 19 (4). — P. 398—405.

Сведения об авторах

Фоменко Диана Валерьевна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных гигиенических исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН (654041, г. Новокузнецк, ул. Кутузова, 23; тел.: 8 (3843) 71-63-75; e-mail: fiskaf@mail.ru)

Михайлова Надежда Николаевна – доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией экспериментальных гигиенических исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН

Казицкая Анастасия Сергеевна – биолог лаборатории популяционной генетики ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН

Уланова Евгения Викторовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальных гигиенических исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН

Прокопьев Юрий Александрович – аспирант лаборатории экспериментальных гигиенических исследований ФГБУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем гигиены и профессиональных заболеваний» СО РАМН