

ИЗУЧЕНИЕ МЕТАЛЛИНДУЦИРОВАННОЙ ИММУНОДЕПРЕССИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Балабекова М.К.

Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, e-mail: balabekovamarina@mail.ru

В работе исследовано содержание сывороточных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, TGF- β , ИЛ-10) у крыс, в течение двух недель получавших соли ванадия и хрома. Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 180–240 г., содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Животных случайным образом разделили на 5 групп по 30 особей в каждой. Проведены 5 серий экспериментов: 1 серия – контроль; 2 серия – крысы, получавшие ванадат аммония (ВА) и бихромат калия (БК); 3 серия - ВА+БК+Полиоксидоний (ПО); 4 серия – ВА+БК+Оксифосфонат (ОФ); 5 серия – ВА+БК+Рувимин (Р). ВА и БК вводили перорально в течение двух недель в дозе по 5 мг/кг м.т. Контрольная группа животных получала равнозначный объем физиологического раствора для имитации тех же условий, как и у экспериментальных крыс. Через 1, 7 и 14 суток после окончания двухнедельной затравки животных ВА и БК у животных под хлороформовым наркозом проводили забор крови. Определение сывороточных цитокинов проводили в лаборатории молекулярной иммунологии и иммунобиотехнологии Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина. Установлено, что цитокиновый дисбаланс, выявленный у экспериментальных крыс, соответствовал картине иммуносупрессии, развившейся в результате цитотоксического действия солей ванадия и хрома, что нарушило взаимодействие между макрофагами и лимфоцитами. Все препараты модулируют провоспалительную активность ИЛ-6. Вместе с тем рувимин модулирует противовоспалительную активность TGF- β на ранних этапах эксперимента, ОФ модулирует активность ИЛ-10 на поздних.

Ключевые слова: крысы, тяжелые металлы, ванадий, хром, цитокины, эксперимент, иммунодепрессия.

STUDY OF METALLY-INDUCED IMMUNODEPRESSION IN EXPERIMENT

Balabekova M.K.

Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, e-mail: balabekovamarina@mail.ru

The content of serum cytokines (IL-1, IL-6, TGF- β , IL-10) was studied in rats treated with vanadium and chromium salts for two weeks. The experiments were performed on white, non-native male rats weighing 180–240 grams, kept in standard vivarium conditions on a normal diet. The animals were randomly divided into 5 groups of 30 individuals each. 5 series of experiments were conducted: 1 series-control; 2 series-rats that received ammonium vanadate (AV) and potassium dichromate (PD); 3 series-AV+PD+Polyoxidonium (PO); 4 series - AV+PD+Oxyphosphonate (OP); 5 series-AV+PD+Ruvimin (R). AV and PD were administered orally for two weeks at a dose of 5 mg / kg bw. The control group of the animals received an equivalent volume of physiological solution to simulate the same conditions as in experimental rats. 1, 7 and 14 days after the end of a two-week priming of animals BA and BC in animals under chloroform anesthesia, blood was collected. Determination of serum cytokines was carried out in the laboratory of molecular immunology and immunobiotechnology of the Institute of Molecular Biology and Biochemistry. It was found that the cytokine imbalance found in experimental rats corresponded to the pattern of immunosuppression that developed as a result of the cytotoxic action of vanadium and chromium salts, which violated the interaction between macrophages and lymphocytes. All drugs modulate the pro-inflammatory activity of IL-6. At the same time, Ruvimin modulates the anti-inflammatory activity of TGF- β in the early stages of the experiment, RP modulates the activity of IL-10 in the late stages.

Keywords: rats, heavy metals, vanadium, chromium, cytokines, experiment, immunosuppression.

Проблема загрязнения окружающей среды тяжелыми металлами остается актуальной и в настоящее время. Экономический кризис последних лет поставил в жесткие условия техногенную и производственную деятельность человека, что отрицательно отражается на его здоровье [3,6]. Регуляторная роль иммунной системы, находящейся в эволюционной связи с нервной и эндокринной системами, в поддержании внутреннего гомеостаза

организма неопределима. Между тем последствием тяжелой антропогенной нагрузки на организм человека и животных может стать развитие иммунодепрессии [1,2,4,10]. Справедливости ради следует отметить, что механизмы токсического влияния многих ксенобиотиков, в том числе солей тяжелых металлов, достаточно изучены. Однако продолжающиеся воздействия перекрестных антропогенных вариаций могут вызывать изменения в организме, выходящие за рамки обычного понимания их патогенеза.

Хром и ванадий – два широко распространенных переходных металла-загрязнителя, вызывающие влияние на санитарное состояние окружающей среды в промышленно развитых и развивающихся странах. Люди могут подвергаться воздействию хрома и ванадия из различных источников: в результате антропогенной деятельности (промышленных выбросов, автомобильных выхлопных газов, сжигание ископаемого топлива, металлургии и загрязнения моря), курения, продуктов питания. Тяжелое воздействие металла является вредным из-за острого отравления, с одной стороны, и долгосрочной токсичности (за счет накопления), с другой стороны [5,8,9]. Тем не менее мало известно о влиянии подострого воздействия хрома и ванадия на жизнедеятельность организма. Поэтому мы попытались определить, являются ли эти два металла потенциальными факторами риска развития иммунодепрессии.

Известно, что тяжелые металлы могут вызывать окислительное повреждение иммунной системы [7]. Источниками генерации активных форм кислорода становятся нейтрофилы, моноциты, дендритные клетки – главные участники оборонительной реакции организма. Производство АФК в митохондриях фагоцитирующих клеток необходимо для реакции респираторного взрыва. Между тем повышение проницаемости мембран митохондрий, приводящее к высвобождению АФК, снижение концентрации K^+ в клетках, разрушение ядра, модифицированные липиды, кристаллы холестерина, вызываемые тяжелыми металлами, приводят к опасным для жизнедеятельности клеток повреждениям. Молекулы, высвобождаемые при повреждении клеток, называются DAMPs (damage-associated molecular patterns) – молекулярные структуры, ассоциированные с повреждением. Они активируют инфламасомы, выполняющие роль защиты организма-хозяина от вторжения патогенов. Важную роль в механизмах активации инфламасом отводят цитокинам [10].

В связи с вышеизложенным, целью настоящей работы явилось исследование сывороточных цитокинов у крыс, подвергавшихся двухнедельной интоксикации соединениями ванадия и хрома и поиск новых способов коррекции выявленных нарушений.

Материал и методы исследования

Работа выполнена в рамках проекта «Молекулярно-биологические особенности течения асептического воспаления, ассоциированного с экологической иммунодепрессией»

(сроки реализации: 2015–2017 гг.) при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Исследования проводились с соблюдением норм и правил проведения экспериментов с участием животных (заявка №166, решение ЛЭК КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, протокол № 3 от 01.04.2015).

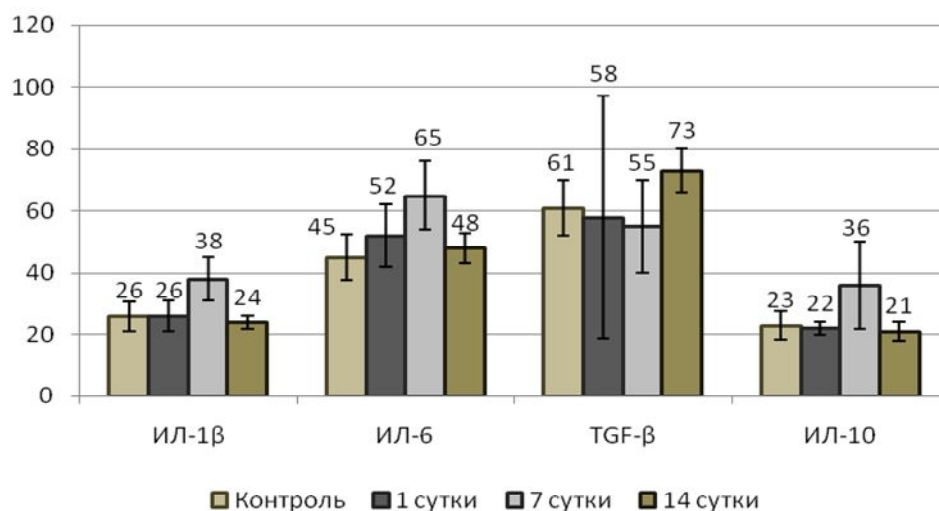
Эксперименты выполнены на белых беспородных крысах-самцах массой 180–240 г, содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Животных случайным образом разделили на 5 групп по 30 особей в каждой. Проведены 5 серий экспериментов: 1 серия – контроль; 2 серия – крысы, получавшие ванадат аммония (ВА) и бихромат калия (БК); 3 серия – ВА+БК+Полиоксидоний (ПО); 4 серия – ВА+БК+Оксифосфонат (ОФ); 5 серия – ВА+БК+Рувимин (Р). ВА и БК вводили перорально в течение двух недель в дозе по 5 мг/кг м.т. Контрольная группа животных получала равнозначный объем физиологического раствора для имитации тех же условий, как и у экспериментальных крыс. Через 1, 7 и 14 суток после окончания двухнедельной затравки животных ВА и БК у животных под хлороформовым наркозом проводили забор крови.

Определение сывороточных цитокинов проводили в лаборатории молекулярной иммунологии и иммунобиотехнологии Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина.

Статистическая обработка данных. Все эксперименты проводили в 3-4-кратной повторности. При этом высчитывали среднее арифметическое значение (М) и стандартное отклонение (СО). Достоверность различия Р рассчитывали по Манну – Уитни, считали достоверным при уровне значимости $P \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В свете важности роли цитокиновых взаимодействий при интоксикациях солями тяжелых металлов нами были исследованы концентрации сывороточных цитокинов (рисунок). По результатам проведенных исследований статистически значимых колебаний концентрации цитокинов в сыворотке периферической крови опытных крыс по сравнению с контролем не установлено.



Содержание цитокинов в сыворотке периферической крови опытных крыс в сравнении с контролем

Отмечался лишь незначительный прирост на 7 сутки исследования концентрации ИЛ-6, ИЛ-1 β и ИЛ-10 на 44,4 %, 52 % и 56,5 % соответственно. Содержание TGF- β на 14 сутки превышало контрольный уровень лишь на 20 %.

По результатам наших собственных исследований, а также литературным данным [9] было сделано заключение, что подобная незначительная цитокиновая реакция, по-видимому, является следствием слабовыраженного лейкоцитарного реагирования на белковые и небелковые модификаторы иммунного ответа (соли тяжелых металлов, продукты повреждения тканей, АФК и т.д.) вследствие высокой подверженности лейкоцитов к апоптозу. Наши результаты исследований согласуются со сведениями Mounira T. et al, 2015, где было установлено, что вдыхание метаванадата аммония у крыс вызывало снижение экспрессии провоспалительных цитокинов ИЛ-1 α , TNF- α , что существенно уменьшало приток полиморфноядерных нейтрофилов и альвеолярных макрофагов [9].

Иммунотоксическое действие исследованных солей тяжелых металлов подтверждалось нарушением активности сывороточных цитокинов, уровни которых несущественно отличались от значений контрольных крыс.

Результаты исследований, представленные в таблице, показывают, что при использовании препаратов в качестве иммуномодуляторов последовали наибольшие сдвиги показателей некоторых сывороточных цитокинов при отравлении солями ванадия и хрома.

Через 1 сутки после начала лечения ПО и ОФ наибольший пик концентрации наблюдали у ИЛ-6, значения которых на 105,8 % ($p=0,0183$) и 73,6 % ($p=0,060$) превышали показатели опытных крыс соответственно. Через 7 суток концентрация ИЛ-6 под влиянием

этих препаратов продолжала нарастать, превышая аналогичные показатели нелеченных крыс на 154 % ($p=0,0107$) и 100,9 % ($p=0,0044$) соответственно.

Показатели крови опытных крыс, затравленных ВА и БК на фоне лечения полиоксидонием, оксифосфонатом и рувимином, в сравнении с нелеченной группой животных, М (СО)

Показатель	N	ВА+БК (опыт),(n=10)	Опыт+ПО, (n=10)	Опыт+ОФ, (n=10)	Опыт+Р, (n=10)
Через 1 сутки					
ИЛ-6	10	52,0 (0)	107,0 (13,1) ^a	90,3 (17,0) ^a	76,3 (15,0) ^b
ИЛ-1 β	10	25,7 (7,4)	29,3 (2,3)	28,7 (8,6)	28,0 (1,7)
TGF- β	10	58,0 (11,0)	49,3 (13,1)	55,7 (10,0)	64,7 (24,7)
ИЛ-10	10	22,0 (5,2)	21,0 (2,6)	31,0 (6,1)	24,0 (9,5)
Через 7 суток					
ИЛ-6	10	64,7 (39,3)	164,3 (27,0) ^a	130,0 (9,2) ^a	104,7 (10,5) ^{a,b,c}
ИЛ-1 β	10	38,0 (8,9)	33,3 (10,0)	35,3 (8,5)	31,0 (9,0)
TGF- β	10	55,0 (14,8)	58,7 (12,0)	49,3 (18,6)	89,7 (10,1) ^{a,b,c}
ИЛ-10	10	36,0 (6,9)	28,3 (13,5)	36,3 (15,7)	20,0 (6,2) ^{a,c}
Через 14 суток					
ИЛ-6	10	48,0 (2,3)	82,0 (15,1) ^a	162,0 (29,5) ^{a,b}	117,3 (15,6) ^{a,b}
ИЛ-1 β	10	24,0 (4,6)	26,3 (4,7)	30,0 (1,0)	29,3 (0,6)
TGF- β	10	73,3 (14,3)	65,0 (16,1)	54,3 (9,5)	70,3 (21,5)
ИЛ-10	10	20,7 (2,9)	19,7 (1,2)	54,0 (13,1) ^{a,b}	23,3 (2,9)
Примечание: * – по Mann – Whitney U-test достигнутый уровень статистической значимости по отношению: а – к опыту; b – к ПО; c – к ОФ.					

Под влиянием рувимино концентрация ИЛ-6 к этому сроку исследования возрастала на 61,8 % ($p=0,0201$) по сравнению с показателями опыта без лечения, однако отставала от показателей «опыт+ПО» на 36,3 % ($p=0,0475$). Наряду с ИЛ-6 отмечалось двукратное статистически значимое увеличение противовоспалительного цитокина – TGF- β по сравнению с опытной группой и группой животных, леченных ПО и ОФ. Между тем концентрация ИЛ-10, также обладающего противовоспалительным действием, на столько же снижалась по сравнению с опытом и ОФ.

14 сутки исследования для ПО охарактеризовались снижением провоспалительной активности ИЛ-6 по сравнению с предыдущим сроком, уровень которого оставался выше уровня опытных крыс в 2 раза ($p=0,0581$).

Всплеск провоспалительной активности ИЛ-6 под влиянием ОФ и рувимино продолжался, превышая показатели опыта в 3,4 ($p=0,0212$) и 2,4 ($p=0,0155$) раза соответственно. Под влиянием ОФ к этому сроку исследования последовало трехкратное

статистически значимое повышение концентрации ИЛ-10 в сыворотке крови по сравнению с опытом и «опыт+ПО».

Изменение активности цитокинов сыворотки крови под влиянием солей тяжелых металлов может быть результатом их повреждающего действия на мембраносвязанные рецепторы, улавливающие и передающие сигналы через клеточные мембраны. Классически провоспалительная активность (повышение) ИЛ-6 связана с мембраносвязанным рецептором IL-6R, который служит как датчик, отражающий сигналы первоначального повреждения от нейтрофилов [11]. Поэтому повышение провоспалительной активности ИЛ-6 под влиянием препаратов, возможно, связано с восстановлением трансмембранной сигнализации.

Заключение

На основании приведенных экспериментальных данных можно заключить, что выявленные нарушения у крыс, подвергавшихся двухнедельному воздействию ВА и БК, соответствовали картине иммуносупрессии, развившейся в результате цитотоксического действия солей ванадия и хрома, что нарушило взаимодействие между макрофагами и лимфоцитами. Предполагаемой молекулярной мишенью подобного рода нарушений является срыв сигнальных цитокиновых каскадов. Оценка иммунологической реактивности по исследованным показателям неспецифической резистентности позволила сделать вывод о развитии вторичного иммунодефицитного состояния у крыс, подвергавшихся двухнедельному воздействию ВА и БК.

Все препараты модулируют провоспалительную активность ИЛ-6. Вместе с тем рувимин модулирует противовоспалительную активность TGF- β на ранних этапах эксперимента, ОФ модулирует активность ИЛ-10 на поздних.

Список литературы

1. Балабекова М.К. Изучение в эксперименте влияния ванадия и хрома на некоторые показатели клеточного звена иммунитета крыс /М.К. Балабекова // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 10-4. – С.624-628.
2. Нурмухамбетов А.Н., Балабекова М.К., Аскарова А.Е., Жукешева М.К., Тухватшин Р.Р., Аканов А.А. Коррекция гематоксического влияния тяжелых металлов при помощи адаптации организма к прерывистой гипоксии /А.Н. Нурмухамбетов [и др.] // *Современные наукоемкие технологии*. – 2014. – № 10. – С.68-71.

3. Arif Tasleem Jan, Mudsser Azam, Kehkashan Siddiqui et.al. Heavy Metals and Human Health: Mechanistic Insight into Toxicity and Counter Defense System of Antioxidants // *Int. J. Mol Sci.* 2015. Dec. 16(12): 29592–29630. doi: 10.3390/ijms161226183.
4. Bin Wan, James T. Fleming, Terry W. Schultz, Gary S. Saylor. In Vitro Immune Toxicity of Depleted Uranium: Effects on Murine Macrophages, CD4⁺ T Cells, and Gene Expression Profiles // *Environ Health Perspect.* 2006. Jan. 114(1). P. 85–91.
5. Dianne M. Walters, Kevin M. White, Ushma Patel et.al. Genetic susceptibility to interstitial pulmonary fibrosis in mice induced by vanadium pentoxide (V₂O₅) // *FASEB J.* 2014. Mar. 28(3): 1098–1112. doi: 10.1096/fj.13-235044.
6. Keyuna S. Cameron, Virginia Buchner, Paul B. Tchounwou. Exploring the Molecular Mechanisms of Nickel-Induced Genotoxicity and Carcinogenicity: A Literature Review // *Rev Environ Health.* 2011. 26(2).P. 81–92.
7. Manish M., Mohammad R.S., Khiem T., Sekhar P. R., Asrar B. M. Reactive Oxygen Species in Inflammation and Tissue Injury // *Antioxid Redox Signal.* – 2014. – № 20(7), pp. 1126–1167.
8. Mitchell D. Cohen, Maureen Sisco, Colette Prophete et al. Effects of Metal Compounds With Distinct Physicochemical Properties on Iron Homeostasis and Anti-Bacterial Activity in the Lungs: Cr and V. *Inhal Toxicol.* 2010. Feb. 22(2): 169–178. doi: 10.3109/08958370903161232.
9. Mounira Tlili, Sonia Rouatbi, Badreddine Sriha, Khémair Ben Rhouma et al. Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Reverses Ammonium Metavanadate-Induced Airway Hyperresponsiveness in Rats // *Oxid Med. Cell Longev.* – 2015. – № 22. – P. 257-269.
10. Patti C., Zeidler-Erdely, Aaron Erdely, James M. Antonini. Immunotoxicology of arc welding fume: Worker and experimental animal studies // *J. Immunotoxicol.* – 2012. – № 9 (4). – P.411-425.
11. Stefan Rose-John. IL-6 Trans-Signaling via the Soluble IL-6 Receptor: Importance for the Pro-Inflammatory Activities of IL-6 // *Int. J. Biol. Sci.* – 2012. – 8(9). – P. 1237–1247.