

УДК: 615.9: 612. 112.91

Комбинированное влияние диоксида серы и аллергенного продукта микробиологического синтеза грибов рода кандиды на нейтрофилы морских свинок (диоксид серы, сенсibilизация и метаболизм нейтрофилов)

¹М.В. Долгушин, ²Л.М. Соседова

¹НИИ биофизики ФГБОУ Ангарской государственной технической академии Министерства образования и науки РФ, г. Ангарск, Россия

²Ангарский филиал ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека СО РАМН», г. Ангарск, Россия

Combined influence of sulfur dioxide and allergenic products of microbiological synthesis of mycotic genus candida on neutrophils of guinea-pigs (sulfur dioxide, sensibilisation and neutrophil metabolism)

¹M.V. Dolgushin, ²L.M. Sosedova

¹Research Institute of Biophysics, State Technical Academy, Angarsk, Russia

²Angarsk Branch of East-Siberian Scientific Centre of Human Ecology, Siberian Division of the Russian Academy of Medical Sciences, Angarsk, Russia

Аннотация

Цель: Изучить функционально-метаболические особенности нейтрофилов периферической крови у морских свинок, подвергнутых изолированному и сочетанному воздействиюм сенсibilизирующего фактора (белкодержащей пыли – БСП) и диоксида серы (SO₂).

Методы: Определяли процент нейтрофилов, способных к поглощению частиц латекса, а также среднее число частиц латекса, захваченных фагоцитирующими нейтрофилами (фагоцитарный индекс, ФИ). Параллельно учитывали внутриклеточные уровни щелочной фосфатазы (ЩФ), кислой фосфатазы (КФ) и содержание гликогена, представляя результаты в условных единицах по L. Kaplow. Состояние сенсibilизации оценивали при помощи реакции пассивной кожной анафилактики и внутрикожных аллергических проб с полисахаридным антигеном, выделенным из продукта микробиологического синтеза дрожжеподобных грибов рода Candida.

Результаты: Выявлены дифференцированные изменения в нейтрофилах крови в зависимости от специфики воздействия и от степени выраженности параметров гиперчувствительности (ГЧ). Значения внутриклеточных параметров в группе интактных животных составляли в среднем 1,91±0,05 (ЩФ), 2,06±0,02 (гликоген), 0,35±0,04 (КФ) и 5,66±0,40 (ФИ). Изолированное введение БСП приводило к снижению, а изолированное введение SO₂ – к воз-

Summary

Purpose: To study the functional-metabolic features of the blood neutrophils in the guinea-pigs undergoing to the isolated and the combined exposure to the sensibilizing factor (proteincontaining dust – PCD) and sulfur dioxide (SO₂).

Methods: The neutrophile percent capable to uptake the latex particles as well as average number of the latex particles captured by the phagocytar neutrophils (phagocytar index – PhI) were determined. The intracellular levels of the alkaline phosphatase (AlP), acid phosphatase (AcP) and the glycogen content were parallel taken into account and the results were expressed as the conventional units according to L. Kaplow. The sensibilisation state was assessed using the responsiveness of the passive cutaneous anaphylaxis and the intracutaneous allergic samples with the polysaccharide antigen, isolated from the product of the microbiological synthesis yeast-like fungi of the genus Candida.

Results: The differentiated changes have been revealed in the blood neutrophils in dependence on the exposure specific character and on the expression degree of the hypersensitivity (HS) responses. The values of the intracellular parameters in the group of the intact animals were found to amount on the average 1,91±0,05 (AlP), 2,06±0,02 (glycogen), 0,35±0,04 (AcP) and 5,66±0,40 (PhI). Isolated administration of the PCD was observed to lead to the decrease and the isolated administration of SO₂ – to the increase in the levels of AlP (up-

растанию уровней ЩФ (до $1,68 \pm 0,05$ и $2,42 \pm 0,08$) и гликогена (до $1,89 \pm 0,03$ и $2,47 \pm 0,06$). При комбинированном воздействии БСП и SO_2 данные показатели реагировали лишь в случае отсутствия стимуляции ГЧ, возрастая (ЩФ) или снижаясь (гликоген), и не изменялись по отношению к контролю в случае повышения уровней аллергостов. Активация КФ, напротив, проявлялась в наибольшей степени после сочетанного введения БСП и SO_2 , сопровождаясь уменьшением ФИ. При этом в условиях прогрессирующего ГЧ уровень КФ был максимальным ($1,16 \pm 0,03$), а уровень ФИ – минимальным ($2,94 \pm 0,17$). Предполагается участие компенсаторных механизмов в модификации метаболического статуса нейтрофилов в связи с нарастанием признаков сенсибилизации к биологическому аллергену.

Ключевые слова

Нейтрофилы, функционально-метаболический статус, фагоцитоз, сенсибилизация, диоксид серы

В настоящее время диоксид серы (SO_2) относится к наиболее распространенным загрязнителям атмосферы. Определенный интерес представляют его адьювантные свойства, ответственные за стимуляцию замедленной и немедленной гиперчувствительности (ГЧ) при воздействии на сенсибилизированный организм [1, 2]. Очевидно, на развитие аллергических расстройств могут реагировать и нейтрофильные гранулоциты, способные взаимодействовать с чужеродными антигенами и с антигениндуцированными гуморальными факторами, и тем самым показывать зависимость от характера течения патологического процесса [3, 4, 5, 6]. В условиях воздействия сенсибилизирующих агентов на организм функциональные и обменные сдвиги в нейтрофилах обнаруживаются как при клинически выраженных, так и латентных формах ответа на аллерген [7, 8, 9, 10]. Исходя из вышеизложенных обстоятельств, нами была поставлена цель: изучить функционально-метаболические особенности нейтрофилов крови в тех случаях, когда сенсибилизация биологическим аллергеном осложняется ингаляцией диоксидом серы, сопровождаясь различиями в интенсивности проявлений реакций ГЧ.

Материалы и методы

Работа выполнялась на морских свинках ($n=50$), согласно ранее использованной модели [1]. Все морские свинки были разделены на 5 групп, при этом группа 1 была контрольной. Животные из группы 2 подвергались воздей-

to $1,68 \pm 0,05$ and $2,42 \pm 0,08$) and glycogen (up to $1,89 \pm 0,03$ and $2,47 \pm 0,06$). In the combined exposure to PCD and SO_2 the indices above may response only in the case of absence of the HS stimulation, increasing in (AIP) and reducing in (glycogen) and were without changes compared with the control in increasing in the allergotest levels. On the contrary, the activation of AcP was noted to express in the larger degree after the combined administration of PCD and SO_2 followed by the decrease in PhI. Thereby, under condition of progressing the HS the AcP level was maximal ($1,16 \pm 0,03$), the level of PhI – minimal ($2,94 \pm 0,17$). The participation of the compensatory mechanisms is suggested to be in the modification of the metabolic neutrophile status in association with the increase in the sensibilization signs to the biological allergen.

Key words

Neutrophils, functional-metabolic status, phagocytosis, sensibilisation, sulfur dioxide.

ствию диоксида серы (SO_2), а из группы 3 – воздействию биологического аллергена – белоксодержащей пыли (БСП), которая была получена из продукта микробиологического синтеза дрожжеподобных грибов р. *Candida*. Введение БСП происходило однократно (по 500 мкг аллергена в смеси с неполным адьювантом Фрейнда под апоневроз задней лапки). Ингаляции SO_2 проводили в течение двух недель (по 5 дней в неделю), в концентрации 24 мг/м^3 , по 4 часа ежедневно. При моделировании комбинированного воздействия факторов различной природы ингаляцию SO_2 начинали в день введения БСП (группа 4) или через 14 дней после введения БСП (группа 5).

Взятие крови проводили при помощи декапитации, после прекращения SO_2 -воздействия (группы 2, 4 и 5) или через 14 дней после введения БСП (группа 3). Из образцов крови готовили мазки, которые использовались для постановки цитохимических реакций на гликоген [11], щелочную фосфатазу (ЩФ) и кислую фосфатазу (КФ) [12], результаты представляли в условных единицах цитохимического индекса по L. Karłow [3, 11]. Параллельно оценивали фагоцитарную активность нейтрофилов, данные представляли в процентном числе клеток, способных к захвату частиц латекса, а также в единицах фагоцитарного индекса (ФИ), показывающего среднее число частиц, поглощенных клеткой [8]. (Результаты оценки фагоцитарной реакции были получены в лаборатории иммунологии Ангарского филиала ФГБУ «Восточно-

Сибирский научный центр экологии человека СО РАМН», зав. лабораторией – д.м.н., профессор Г.М. Бодиев. Кроме того, учитывая роль гипофизарно-надпочечниковой системы в патогенезе аллергических расстройств, определяли уровень кортизола в сыворотке крови методом радиоиммунного анализа, с использованием стандартного коммерческого набора реактивов. (Определение проводилось в лаборатории токсикологии Ангарского филиала ФГБУ «Восточно-Сибирский научный центр экологии человека СО РАМН» к.м.н. А.В. Лизаревым).

На животных, входивших в группы 3 – 5, перед взятием крови ставили тесты замедленной и немедленной ГЧ. Выявляли наличие кожно-сенсibiliзирующих антител при помощи реакции пассивной кожной анафилаксии (РПКА) по Z. Ovary [4], выраженность внутрикожных аллергических проб и реакции антигенспецифического розеткообразования (РАСРО) [13, 14]. Кожные пробы ставились с полисахаридным антигеном, который был выделен нами из БСП методом I-нафтольного гидролиза [15]. Уровень РАСРО оценивали в процентах антигенреактивных лимфоцитов, данные определения РПКА и внутрикожных аллергических проб – в сантиметрах по величине прокрашивания кожи или соответственно по величине отёка и эритемы.

Статистический анализ проводили с использованием пакета программ BIOSTAT. EXE FOR WINDOWS (Version 4.03). Выявляли средние значения определяемых параметров в каждой группе, а также величину стандартной ошибки. Достоверность межгрупповых различий полученных данных оценивали при помощи U-критерия (Манна – Уитни).

Результаты и обсуждение

Реакция функционально-метаболического статуса нейтрофилов на сочетанное введение БСП и SO₂ отличалась от таковой на изолированное воздействие факторов различной природы и зависела от периода начала ингаляции диоксидом серы (табл.1). На нейтрофилы животных, не контактировавших с БСП (группа 2), диоксид серы оказывал общее стимулирующее действие, тогда как в лейкоцитах крови морских свинок, подвергавшихся изолированному влиянию аллергена (группа 3), стимуляция затрагивала лишь процент фагоцитирующих клеток и активность КФ, а уровень ЩФ и гликогена, напротив, при этом снижался. Сочетанное введение БСП и SO₂ (группы 4 и 5) при-

водило к уменьшению значений ФИ (при сохранении повышенного числа клеток, способных к фагоцитозу) и к более выраженной активации КФ (последнее было достоверным не только относительно контроля, но и по отношению к животным, подвергавшимся изолированному влиянию БСП и SO₂, $p < 0,01$). При этом наименьшие значения для ФИ и наибольшие – для КФ были отмечены в нейтрофилах из группы 5. В то же время тенденция ответа со стороны ЩФ и гликогена нейтрофилов морских свинок на сочетанное воздействие БСП и SO₂ была иной. В случае начала экспозиции SO₂ в день введения БСП (группа 4) вышеуказанные параметры реагировали разнонаправлено, или как в группе 2 (ЩФ) или как в группе 3 (гликоген), тогда как в случае воздействия SO₂ после развития состояния сенсibiliзации (группа 5) показатели на ЩФ и гликоген не изменялись по отношению к контролю.

Согласно результатам оценки аллeрготестов, ареактивность цитохимических показателей на ЩФ и гликоген по отношению к SO₂ (группа 5) сопровождалась возрастанием всех определяемых нами показателей ГЧ, как замедленного (РАСРО, кожные пробы), так и немедленного (РПКА) типов (табл.2). Кроме того, именно у животных из группы 5 происходило возрастание уровня кортизола в сыворотке крови в среднем до $1581,20 \pm 114,71$ нмоль/л по сравнению с контролем ($1106,20 \pm 192,40$ нмоль/л, $p < 0,05$). В остальных опытных группах каких-либо статистически достоверных изменений в содержании кортизола относительно контроля не было выявлено (данные не представлены).

Основная особенность, обнаруженная нами в метаболическом статусе нейтрофилов морских свинок в случае потенцирования ГЧ (группа 5), заключалась в блокаде совместной реакции гликогена и ЩФ на воздействие SO₂. Снижение уровня данных цитохимических параметров под влиянием БСП (группа 3), очевидно, было обусловлено стимуляцией секреторной функции нейтрофилов, что, как известно, реализуется при иммунизации белоксодержащими антигенами и может сопровождаться ростом фагоцитарной активности [10]. Начало контакта с диоксидом серы в момент введения БСП (группа 4), по-существу, несколько модифицирует цитохимические проявления усиленной секреторной функции. Вместе с тем отсутствие признаков активированного экзоцитоза в случае воздействия SO₂ после развития состояния ГЧ (группа 5), по всей видимости, связано с более длительным периодом, прошедшим после введения сенсibiliзи-

Таблица 1. Изменение функционально-метаболических показателей нейтрофилов периферической крови морских свинок, подвергавшихся воздействию белоксодержащей пыли (БСП) и диоксида серы (SO₂), M±m

группа	Щелочная фосфатаза (в условных единицах)	Гликоген (в условных единицах)	Кислая фосфатаза (в условных единицах)	Фагоцитоз (%)	Фагоцитарный индекс (число частиц латекса/клетку)
1	1,91 ± 0,05	2,06 ± 0,02	0,35 ± 0,04	27,5 ± 2,6	5,66 ± 0,40
2	2,42 ± 0,08**	2,47 ± 0,06**	0,74 ± 0,05**	52,6 ± 2,7**	4,64 ± 0,45
3	1,68 ± 0,05**	1,89 ± 0,03**	0,61 ± 0,05**	40,3 ± 3,5**	5,75 ± 0,47
4	2,15 ± 0,04**	1,86 ± 0,03**	1,03 ± 0,05**	42,5 ± 2,9**	4,20 ± 0,42*
5	1,90 ± 0,07	2,00 ± 0,04	1,16 ± 0,03**	38,2 ± 3,9*	2,94 ± 0,17**

Примечание: Показана достоверность изменений по отношению к контролю (*-p<0,05; **-p<0,01).

Группы: 1-ая – контроль; 2-ая – изолированное воздействие SO₂; 3-я – изолированное введение БСП; 4-ая – БСП вводили в день начала ингаляции SO₂; 5-ая – БСП вводили за 14 дней до начала ингаляции SO₂.

Таблица 2. Изменение показателей гиперчувствительности, вызванной введением белоксодержащей пыли (БСП), при дополнительной ингаляции диоксида серы (SO₂) у морских свинок, M±m

Группа	Характер воздействия	Реакция пассивной кожной анафилаксии(см)	Кожные пробы (см)	Реакция антиген-специфического розетко-образования(%)
3	Изолированное введение БСП	0,28 ± 0,02	0,38 ± 0,04	20,2 ± 1,8
4	Начало ингаляции SO ₂ – в день введения БСП	0,30 ± 0,03	0,64 ± 0,13	23,7 ± 2,2
5	Начало ингаляции SO ₂ – через 14 дней после введения БСП	0,41 ± 0,06*	0,97 ± 0,15**	26,6 ± 1,4*

Примечание: Показана достоверность различий по сравнению с группой 3 (*-p<0,05; **-p<0,01)

рующего агента (свыше 3-х недель), когда значения цитохимических показателей, отражающих дегрануляцию нейтрофилов, практически возвращаются к исходным уровням [10].

Некоторое сходство в реакции нейтрофилов животных в группах 4 и 5, в виде резкой активации КФ и снижении уровня ФИ, позволяет говорить о системном характере регуляторных эффектов, индуцированных различными способами сочетанного воздействия БСП и SO₂. Установлено, что SO₂ при аналогичных условиях экспозиции (дозе и суммарной продолжительности воздействия) приводит к выраженной стимуляции антиоксидантных ферментов в клетках крови и внутренних органов [16, 17]. Вероятно, в ходе ингаляции диоксидом серы уже на фоне сформировавшегося состояния ГЧ (группа 5), или в динамике развития после-

дней (группа 4) степень напряжения в механизмах антиоксидантной защиты могла усиливаться, учитывая то обстоятельство, что иммунизация организма сама по себе способна быть источником гуморальных изменений, присутствующих в виде стрессорных воздействий [18, 19]. В нашем случае само возникновение реакции в виде снижения ФИ и резкой активации КФ, отражая повышенное напряжение на уровне гомеостатических механизмов при сочетанном воздействии факторов различной природы, не было однозначно связано со стимуляцией ГЧ. В то же время наиболее интенсивное проявление данного разнонаправленного сдвига в показателях ФИ и КФ в ходе прогрессирования ГЧ можно рассматривать как вторичное преобразование, обусловленное параллельным повышением содержания кортизола в периферической

крови. Усиление секреции глюкокортикоидов (ГК) и, как следствие, некоторое возрастание их концентрации в крови, фиксируется различными авторами в ходе стресс-индуцированной иммуностимуляции, затрагивающей реакции замедленной ГЧ и синтеза антител [20, 21]. При этом обратная тенденция, в виде ГК-недостаточности, закономерна для развивающегося аллергического процесса с выраженной клинической симптоматикой, сопутствующей положительным аллерготестам [22].

Повышение содержания кортизола в периферической крови при кожных проявлениях сенсибилизации предложено рассматривать в качестве своеобразного компенсаторного механизма, обусловленного активацией гипоталамо-надпочечниковой системы и направленного на снижение чувствительности к аллергенам [23]. Не исключено, что именно данный физиологический сдвиг был причастен и к отмеченному нами нарушению функциональной мобилизации ЩФ-содержащих (вторичных) гранул. Как известно, активация ЩФ в нейтрофилах является одним из маркеров усиленного регуляторного влияния провоспалительных цитокинов [3, 24, 25].

Литература

1. Соседова Л.М., Бенеманский В.В. Сочетанное действие белоксодержащей пыли и диоксида серы. Медицина труда и пром. экол. 2000; 8: 21-24.
2. D'Amato G., Liccardi G., Cazzola M. Environment and development of respiratory allergy. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 1994; 49: 406-411.
3. Алексеев Н.А. Клинические аспекты лейкопений, нейтропений и функциональных нарушений нейтрофилов. СПб.: Фолиант; 2002.
4. Бережная Н.М., Бобкова Л.П., Петровская И.А., Ялкуп С.И. Аллергология: словарь-справочник. Киев: Наукова думка; 1986.
5. Yang D., Chen Q., Chertov O., Oppenheim J.J. Human neutrophil defensins selectively chemoattract naive T and immature dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 68: 9-14.
6. Saffar A.S., Alphose M.P., Shan L., Hayglass K.T., Simons F.E., Gounni A.S. Ig E modulates neutrophil survival in asthma: role of mitochondrial pathway. *J. Immunol.* 2007; 178: 2535-2541.
7. Казначеева Л.Ф., Рычкова Н.А., Маянская Н.Н., Вохинцева Л.В. Динамика изменения лизосомальных факторов при atopическом дерматите у детей. Аллергология. 1999; 3: 12-16.
8. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: ВНИРО; 1995.
9. Яровинский Б.Г., Зурочка А.В., Эберт Л.Я. Состояние регуляторной функции у больных с atopическим дерматитом. Бюл. Экспер. биол. 1995; 120: 318-319.
10. Godlewski A. Cytochemical studies on the secretory activity of guinea pig heterophils during sensitization. *Folia Histochem. Cytobiol.* 1985; 23: 61-70.
11. Лабораторные методы исследования в клинике / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина; 1987.
12. Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д. Гематологическая цитохимия. М.: Медицина; 1983.
13. Методические рекомендации по изучению аллергенного действия при обосновании предельно – допустимых концентраций кормового белка в атмосферном воздухе. М.; 1983.
14. Требования к постановке экспериментальных исследований по обоснованию предельно-допустимых концентраций промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы. М.; 1996.
15. Елинов Н.П. Патогенные дрожжеподобные организмы. М.: Медицина, 1964.
16. Гьмь_ль S., Akba_ H., Alicigьzel Y., Aar A., Кьзькатау V., Yargizolu P. Effects of sulfur dioxide inhalation on antioxidant enzyme activities in rat erythrocytes. 1998; *Ind. Health.* 36: 70-73.
17. Гьмь_ль S., Bilmen S., Korgun D.K., Yargizolu P., Aar A. Age-related changes in antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in lungs of control and sulfur dioxide exposed rats. *Free Radic. Res.* 2001; 34: 621-627.
18. Давтян Т.К., Аванесян Л.А. О взаимоотношении иммунного и адаптивного ответов. Успехи соврем. биол. 2001; 121: 275-286.

Выводы

1. Функционально-метаболический статус нейтрофилов морских свинок, подвергавшихся изолированным и сочетанным влияниям белоксодержащей пыли и диоксида серы, показывал различия в зависимости от специфики воздействия и от тяжести аллергического процесса.
2. Наиболее выраженные проявления гиперчувствительности к белоксодержащей пыли наблюдались при последовательном воздействии биологического и химического факторов, сопровождаясь максимальной активацией кислой фосфатазы, тогда как уровень фагоцитарного индекса был при этом минимальным.
3. Стимулирующий эффект диоксида серы на внутриклеточные уровни щелочной фосфатазы и гликогена был блокирован при прогрессировании реакций гиперчувствительности, однако сохранялся по отношению к щелочной фосфатазе в том случае, если сочетанное воздействие факторов различной природы не приводило к возрастанию выраженности аллерготестов.

19. Goble K.H., Bain Z.A., Padow V.A., Lui P., Klein Z.A., Romeo R.D. Pubertal-related changes in hypothalamic – pituitary – adrenal axis reactivity and cytokine secretion in response to an immunological stressor. *J. Neuroendocrinol.* 2011; 23: 129-135.
20. Bowers S.L., Bilbo S.D., Dhabhar F.S., Nelson R.L. Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain. Behav. Immunol.* 2008; 22: 105-113.
21. Silberman D.M., Wald M.R., Genaro A.M. Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress-hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *J. Neuroimmunol.* 2003; 144: 53-60.
22. Пыцкий В.И. Кортикостероиды и аллергические процессы. М.: Медицина; 1976.
23. Чистяков Н.Д. Некоторые вопросы патогенеза профессионального дерматита. Профессиональная патология от воздействия производственных факторов физической и химической природы. М. 1989; С. 118-124.
24. Swain S.D., Siemsen D.W., Hanson A.J., Quinn M.T. Activation-induced mobilization of secretory vesicles in bovine neutrophils. *Am. J. Vet. Res.* 2001; 62: 1776-1781.
25. Xu S., Huglund M., Venge P. The effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the degranulation of secondary granule proteins from human neutrophils in vivo may be in direct. *Brit. J. Haematol.* 1996; 93: 558-568.

Сведения об авторах

1. Долгушин Максим Валерьевич

Служебный адрес: 665830, Иркутская обл., г. Ангарск, ул. Партизанская, д. 2, а/я 4380, НИИ биофизики

Домашний адрес: 665808, Иркутская обл., г. Ангарск, квл. 95, д. 16, кв. 38

Тел.: (8-395-5) 95-70-68 (служ.); (8-395-5) 56-16-07 (дом.)

тел/факс: (8-395-5) 95-70-62 (служ.).

E-mail: maxdolg2008@yandex.ru

2. Соседова Лариса Михайловна

Служебный адрес: 665827, Иркутская обл., г. Ангарск-27, мкр. 12а, д. 3., а/я 1170,

АФ ВСНЦ ЭЧ СО РАМН.

Тел.: (8-395-5) 54-23-47 (дом.); (8-395-5) 55-40-79 (служ.),

E-mail: imt@irmail.ru

Поступила 16.05.2012 г.