

Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г., Лыхина Т.С.

Гидроксильированные ароматические углеводороды и цитокиновая регуляция апоптоза

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения» Роспотребнадзора, г. Пермь

Zaitseva N.V., Dolgikh O.V., Dianova D.G., Lykhina T.S.

Hydroxylated aromatic hydrocarbons and the cytokine regulation of apoptosis

Резюме

Органические соединения в превышающих референтные значения концентрациях могут модулировать продукцию физиологических регуляторов клеточного цикла. Цель работы - оценить влияние гидроксильированных ароматических углеводородов на цитокиновую регуляцию апоптоза у изолированных химического производства. Определение органических соединений (фенол, о-крезол, м-крезол, п-крезол) в биосредах выполнялось методом капиллярной газовой хроматографии. Идентификацию медиаторов межклеточной иммунной регуляции – маркеров цитокинового профиля (IL6, TNF α , INF γ) осуществляли методом иммуноферментного анализа, для определения уровня экспрессии рецептора TNFR1 использовали цитофлюориметрический метод. Оценка цитокинового статуса зафиксировала, что у обследуемых работающих в условиях повышенной экспозиции фенолсодержащих соединений достоверно снижена продукция проапоптотических медиаторов клеточной регуляции (TNF α , INF γ) ($p < 0,05$) и статистически значимо понижена экспрессия рецептора к фактору некроза опухоли на лимфоцитах ($p < 0,05$). Результаты исследований подтверждают существующий вклад фенолов в модификацию цитокинового статуса работающих. Учитывая специфическое влияние гидроксильированных ароматических углеводородов на экспрессию физиологических регуляторов клеточного цикла, воздействие фенолов может стать пусковым механизмом дисфункции иммунной системы в условиях химического производства.

Ключевые слова: ароматические углеводороды, цитокиновая регуляция

Summary

Organic compounds, at concentrations exceeding their reference ranges, may influence the production of physiological regulators of the cell cycle. The aim of the study was to assess the influence of hydroxylated aromatic hydrocarbons on the cytokine regulation of apoptosis in insulation workers of a chemical enterprise. The organic compounds (phenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol) were determined in biological media using capillary gas chromatography. The mediators of intercellular immune regulation – cytokine profile markers (IL6, TNF α , INF γ) – were identified by ELISA testing, the level of TNFR1 expression was measured using cytofluorometry analysis. The assessment of the cytokine status shows that the examined workers, when exposed to high levels of phenol-containing compounds, demonstrated a credible decrease in the production of the proapoptotic mediators of cellular regulation (TNF α , INF γ) ($p < 0.05$) and a statistically significant reduction in TNFR1 expression on lymphocytes ($p < 0.05$). The findings prove the contribution of phenols in the modification of the cytokine status in the workers. Taking into account the specific aromatic hydrocarbons influence on the expression of the physiological regulators of the cell cycle, the impact of phenols may cause immune dysfunction in chemical enterprise workers.

Keywords: aromatic hydrocarbons, cytokine regulation

Введение

Поступление в организм загрязняющих веществ запускает последовательность иммунопосредованных событий, в частности изменение цитокиновой регуляции апоптоза. Существует необходимость в проведении исследований механизмов влияния техногенных химических веществ на экспрессию физиологических регуляторов, отражающих причинно-следственную связь «здоровье работающих – химический фактор» в условиях про-

изводства. Определение цитокинового профиля в ответ на контакт с органическими соединениями позволит уточнить особенности иммуотропного действия ароматических углеводородов для дальнейшего планирования профилактических мероприятий [1].

Цель работы – оценить влияние ароматических углеводородов на цитокиновую регуляцию апоптоза у работающих в условиях химического производства.

Всего, включая группу контроля, обследовано 128

Таблица 1. Содержание низкомолекулярных химических соединений в крови обследуемых

Показатели	Контрольная группа (n=39), M ± m	Основная группа (n=58), M ± m
фенол, мг/л	0,0531±0,002	0,0740±0,005
о-крезол, мг/л	0±0	0,0005±0,0003
м-крезол, мг/л	0±0	0,0062±0,002*
п-крезол, мг/л	0 ± 0	0,0010 ± 0,0007

Примечание. * - различия достоверны в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$).

Таблица 2. Характеристика цитокиновой регуляции иммунной системы обследуемых

Показатели	Контрольная группа (n=39), M ± m	Основная группа (n=85), M ± m
IL6, пкг/мл	1,70±0,18	2,65±0,43
IFN γ , пкг/мл	5,64±0,52	4,09±0,54*
TNF α , пкг/мл	1,56±0,15	1,20±0,15*
TNFR1, %	3,31±0,27	1,39±0,11*

Примечание. * - различия достоверны в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$).

человек. Все обследованные – лица трудоспособного возраста, жители Пермского края. В основную группу вошли 90 человек, имеющие специальность изолировщика. Концентрация фенола в воздухе рабочей зоны производственных помещений составили 1,4 мг/м³, что превышает ПДК (0,3 мг/м³). В соответствии с Р 2.2.2006-05 класс условий труда изолировщиков (по фактору – фенол в воздухе рабочей зоны) относится к классу 3.2.

Возраст обследуемых основной группы - от 21 до 56 лет (средний возраст 39,1±5,2 года), мужчин – 59 человек (69,5%), женщин – 31 человек (30,5%). Исследование проведено с учетом рабочего стажа на производстве (средний стаж 7,8±1,8 года). Контрольную группу составили 39 человек в возрасте от 20 до 54 лет (средний возраст 39,8±2,9 года), мужчин – 20 (51%), женщин – 19 человек (49%), не имеющих контакта с производственными вредностями. Основная и контрольная группы были сопоставимы по соматической заболеваемости. Выборка обследуемых была достаточна для достоверного определения межгрупповых различий.

Определение органических соединений (фенол, о-крезол, м-крезол, п-крезол) в биосредах (кровь) выполнялось методом капиллярной газовой хроматографии.

Цитокины (IL6, IFN γ , TNF α) определяли с помощью иммуноферментного анализа (тест-системы фирмы «Вектор-Бест», г. Новосибирск) на анализаторе «E1x808IU».

Для определения уровня экспрессии рецептора к фактору некроза опухоли - α 1-го типа (ФНО α , TNFR1 - tumor necrosis factor receptor 1) использовали цитофлюориметрический метод, основанный на взаимодействии соответствующих моноклональных антител с мембранным рецептором к TNF α на лимфоцитах. Клетки (1x10⁶ клеток/мл) отмывали фосфатно-солевым буфером (рН=7,2) (PBS) и окрашивали стандартными моноклональными антителами (МКАТ) к рецептору TNFR1, меченными FITC (Fluorescein Isothiocyanate) («BD», USA)

согласно протоколу фирмы-производителя. После 30 мин инкубации анализировали содержание лимфоцитов, флуоресцирующих на FL1-канале (530 нм) проточного цитофлюориметра («BD», USA), при этом регистрировали суммарно не менее 10.000 событий.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Office и дополнительной программы статистического анализа Statistica 6.0. Достоверность различий между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты. Оценка уровня контаминации биосред обследуемых позволила установить, что в крови работающих статистически значимо увеличено содержание м-крезола в сравнении с результатами, полученными в контрольной группе ($p < 0,05$) (табл. 1). Установлена прямая корреляционная зависимость повышения уровня м-крезола в крови обследуемых основной группы от продолжительности производственного стажа ($r=0,34$; $p < 0,05$).

Изучение цитокинового профиля показало, что в сыворотке крови работающих достоверно снижен уровень IFN γ и TNF α относительно значений, зафиксированных в группе контроля ($p < 0,05$) (табл. 2). Сывороточная концентрация IL6 у обследуемых основной группы имеет тенденцию к повышению.

Анализ корреляционных взаимосвязей выявил достоверную отрицательную зависимость экспрессии TNF α ($r=-0,25$; $p < 0,05$) от уровня о-крезола, а также положительную зависимость концентрации IL4 от содержания фенола ($r=0,31$; $p < 0,05$) в крови работающих на химическом производстве.

Одновременно у работающих наблюдается достоверное снижение относительного содержания TNFR1 (1,39±0,11%) ($p < 0,05$) в популяции CD3+ в сравнении с показателями, зафиксированными в контрольной группе (3,31±0,27%).

Отмечена статистически значимая отрицатель-

ная зависимость экспрессии TNFR1+-маркера ($r=-0,57$; $p<0,05$) от уровня фенола в биосредах обследуемых основной группы.

Обсуждение. Результаты клинических исследований показывают, что фенолы модифицируют иммунный ответ человека [2]. Отмечены следующие эффекты фенолсодержащих соединений: ингибирование NF- κ B (nuclear factor - κ B, ядерный фактор-каппа-B) активации, а также двухфазный эффект продукции ряда цитокинов CD4+- и CD8+-Т клетки, при этом наблюдается активация лимфоцитов при низких и супрессия при высоких дозах гидроксibenзола [2, 3]. Ряд исследователей утверждает, что в культуральной среде фенолы не изменяют экспрессию IL-6 и IFN γ [4, 5]. Однако в других экспериментах отмечено, что в системе *in vitro* фенолсодержащие соединения способны снижать синтез иммуошитами IFN γ [6]. Ароматические углеводороды ингибируют продукцию TNF α , причем существующий эффект является зависимым от времени и дозы воздействия галтена на клетки [7], а ключевая роль в данном процессе принадлежит блокированию NF- κ B активации, основного регулятора TNF α транскрипции в клетках иммунной системы [2]. Экспериментально выявлено, что обработка фенолом мышинных иммунокомпетентных клеток приводит к нарушению их функциональной активности, подавляя синтез проапоптотических цитокинов, в частности TNF α [5]. Фактор некроза опухоли играет важную физиологическую роль в иммуорегуляции, является основным медиатором (Th1) модифицирующим апоптотическую гибель клетки. Медиаторы Th1-лимфоцитов способствуют развитию апоптоза, а медиаторы Th2-лимфоцитов блокируют активационно - индуцированную гибель клетки.

В целом, следует полагать, что фенолы могут вызвать дисбаланс цитокиновой сети, снижая продукцию основных проапоптотических медиаторов IFN γ и TNF α [2, 3, 5, 7, 8], обладают способностью модулировать компоненты клеточных сигнальных путей, что также приводит к изменению синтеза физиоло-

гических регуляторов иммунокомпетентными клетками [9].

Следовательно, результаты собственных исследований, подтвержденные литературными данными, указывают на существующую модификацию гидроксibenзолами ароматическими углеводородами цитокиновой регуляции апоптоза.

Выводы

Таким образом, гидроксibenзолированные ароматические углеводороды модифицируют цитокиновый профиль работающих в условиях повышенной контаминации биосред фенолами. Фенолсодержащие вещества достоверно снижают синтез иммунокомпетентными клетками IFN γ и TNF α ($p<0,05$), вызывают смещение цитокинового баланса в сторону Th2 клеток, статистически значимо уменьшают экспрессию рецептора к фактору некроза опухоли- α 1-го типа на CD3+-лимфоцитах ($p<0,05$). Очевидно, в соответствии с представленными результатами исследования, можно полагать, что ароматические углеводороды способствуют ингибированию апоптоза Т-лимфоцитов, являясь одним из факторов инверсии иммунного ответа.■

Зайцева Н.В., д.м.н., профессор, чл. - корр. РАМН, директор ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», г. Пермь; Долгих О.В., д.м.н., профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», г. Пермь; Дианова Д.Г., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», г. Пермь; Лыхина Т.С., заведующий лабораторией иммунологии и аллергологии отдела иммунобиологических методов диагностики ФБУН «ФНЦ МПТ УРЗН», г. Пермь; Автор, ответственный за переписку – Долгих Олег Владимирович, 614045, г. Пермь, ул. Орджоникидзе, 82.; тел. 8-(342)-236-39-30, 8-(342)-237-25-34 E-mail: oleg@fcrisk.ru

Литература:

1. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г. и др. Регуляция цитокинового профиля у работающих в условиях вредного производства. Цитокины и воспаление. 2010; 9(9): 45-46.
2. Falchetti R., Fugetta M.P., Lanzilli G., et al. Effects of resveratrol on human immune cell function. Life Sci. 2001; 1: 81-96.
3. Залесский В.Н., Великая Н.В. Антиапоптотические, проапоптотические, антиоксидантные реакции молекул флавоноидов — растительных фенолов. Совр. проблемы токсикологии. 2003; 3: 64-72.
4. Kim H.J., Jeong K.S., Park S.J., Cho S.W. et al. Effects of benz[alpha]pyrene, 2-bromopropane, phenol and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on IL-6 production in mice after single or repeated exposure. In Vivo. 2003; 3: 269-275.
5. Ho-Jun K., Kang B.N., Cho S.W. et al. Effects of benzo[a]pyrene, 2-bromopropane, phenol and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on proinflammatory cytokines gene expression by mice spleen cells. J. Vet. Sci. 2002; 4: 247-254.
6. Gao X., Xu Y.X., Janakiraman N. et al. Immunomodulatory activity of resveratrol: suppression of lymphocyte proliferation, development of cell-mediated cytotoxicity, and cytokine production. Biochem. Pharmacol. 2001; 9: 1299-1308.
7. Ma Q., Kinneer K. Chemoprotection by phenolic antioxidants. Inhibition of tumor necrosis factor α induction in macrophages. The Journal of Biological Chemistry. 2002; 277: 2477-2484.
8. Francis J., Zhang Z-H., Weiss R.M., Felder R.B. Neural regulation of the proinflammatory cytokine response to acute myocardial infarction. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004; 2: 791-797.
9. Soobrattee M.A., Bahorun T., Aruoma O.I. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer. BioFactors. 2006; 27(1-4): 19-35.