

О.А. ОВСЯННИКОВА

Астраханский государственный медицинский университет

СОДЕРЖАНИЕ ФНО – А И ИЛ-10 НА РАЗЛИЧНЫХ ЭТАПАХ ПОСТНАТАЛЬНОГО ОНТОГЕНЕЗА КРЫС В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ ГАЗООБРАЗНЫХ СЕРОСОДЕРЖАЩИХ ПОЛЛЮТАНТОВ И ПРИМЕНЕНИЯ ПРОТЕКТОРА

В работе проведено исследования уровня цитокинов: фактора некроза опухоли (ФНО)-А и интерлейкина (ИЛ)-10 в периферической крови крыс на этапе молодого, I и II зрелого, предстарческого онтогенеза в условиях воздействия газообразных серосодержащих поллютантов. Выявлено смещение в системе «провоспалительные – противовоспалительные» цитокины в сторону первых, особенно в группах молодых животных и предстарческого возраста. Полученные результаты на фоне применения протектора свидетельствуют о возможности повышения резистентности организма к токсическим компонентам газа с помощью отечественного препарата «Этоксидол». Использование этого препарата, обладающего антигипоксическим и антиоксидантным действием, помогает раскрыть механизмы и пути повышения неспецифической защиты при хроническом воздействии вредных и опасных факторов внешней среды на различных этапах постнатального онтогенеза.

Ключевые слова: цитокины, серосодержащий газ, этап постнатального онтогенеза крыс, протектор, препарат «Этоксидол», крысы

Овсянникова Ольга Александровна - кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии Астраханского государственного медицинского университета. E-mail: OvsyanO123@mail.ru

O. A. OVSYANNIKOVA

Astrakhan State Medical University

THE CONTENTS OF CYTOKINES TNF – A AND IL-10 IN THE CONDITION OF SULFUR DIOXIDES IMPACT ON THE DIFFERENT STAGES OF ONTOGENY AND THE USE OF PROTECTOR

The article studies cytokines: tumor necrosis factor (TNF) -A and interleukin (IL) -10 in the peripheral blood of young rats, I and II levels of maturity and presenility under the influence of sulfur-containing gaseous pollutants. The shift to in the system «proinflammatory - anti-inflammatory» cytokines was revealed in the direction of the first factor, it is more pronounced in groups of young and presenile animals. The obtained results indicate the possibility of increasing the body's resistance to the toxic gas components due to the use of domestic «Etoksidol». Having anti-hypoxic and anti-oxidant action the drug helps to reveal the mechanisms and ways to increase non-specific protection in case of chronic exposure to hazardous environmental factors at different stages of postnatal ontogenesis.

Keywords: cytokines, sulfur dioxide, stress, the stage of rats ontogenesis, protector, the preparation «Etoxydol», rats

Olga Alexandrovna Ovsyannikova – Candidate of Medicine, Associate Professor of Pathological Physiology Chair, Astrakhan State Medical University. E-mail: OvsyanO123@mail.ru

Основной патогенетический механизм повреждающего воздействия сероводорода на организм — необратимое ингибирование железосодержащих цитохромов — а, а₃ (цитохромоксидазы), связывание с железом в их молекулах и, как следствие, нарушение усвоения тканями кислорода с развитием тканевой гипоксии. Для сероводорода установлено иммунодепрессивное влияние, в основе которого лежит иммунотоксический эффект, проявляющийся стойким

и длительным нарушением способности Т- и В-лимфоцитов к пролиферации [5,1]. Хроническое действие сероводородсодержащего газа вызывает широкий спектр нарушений в системе центрального и периферического звеньев кровотока, участвующих в регуляции процесса выработки индукторов и ингибиторов созревания различных классов клеток крови – цитокинов, которым так же отводится ведущая роль в патогенезе воспалительного процесса.

Исследование спонтанной и индуцированной продукции цитокинов клетками крови может показать, во-первых, нарушается ли способность клеток-эффекторов к адекватному ответу на дополнительный стимул, что будет свидетельствовать об истощении их резервных возможностей; во-вторых, поможет выявить дисбаланс в системе про- и противовоспалительных цитокинов.

Целью работы явилось изучение содержания цитокинов – ФНО-А и ИЛ-10 в сыворотке крови крыс в условиях воздействием газообразных серосодержащих поллютантов у экспериментальных животных на различных этапах постнатального онтогенеза и при использовании препарата «Этоксидол» в качестве протектора.

Материалы и методы исследований

Эксперимент проведен на 100 белых беспородных крысах-самцах. Были сформированы группы трех видов: I. контрольные; II. подвергающиеся воздействию серосодержащих поллютантов; III. подвергающиеся воздействию серосодержащих поллютантов и получающие протекторное воздействие. Каждый вид состоял из четырех групп по 10 особей в каждой, животные в которых находились на тех же этапах индивидуального развития, что и люди на протяжении постнатального онтогенеза (таблица 1). Группы II и III видов подвергались воздействию газообразных серосодержащих поллютантов в тот момент, когда животные в них имели возраст: неполовозрелые (молодые) – от 6 до 36 суток, зрелые I – от 368 до 398 суток, зрелые II – от 472 до 502 суток и предстарческого возраста – от 700 до 730 суток.

Токсикантом являлся природный пластовый дегидратированный газ Астраханского газоконденсатного месторождения, полученный из установки “У-121”, на которую он поступал из скважины № 17.

В экспериментах использовалась концентрация природного газа в газовой воздушной смеси камеры, составляющая 90 ± 3 мг/м³ при измерении по сероводороду, что в 30 раз больше предельно допустимой концентрации сероводорода для рабочих зон при одновременном присутствии углеводородов. Затравка серосодержащим газом проводилась 4 часа в осенне-зимние сезоны статическим методом с одновременным нахождением в камере 5 особей ежедневно в течение 30 дней, за исключением воскресных дней, строго с 10 до 14 часов, температура в камере составляла $+22 \pm 2^\circ\text{C}$. Относительная влажность в ходе эксперимента повышалась с $53 \pm 4\%$ до $66 \pm 6\%$.

Концентрация газа и условия эксперимента полностью соответствуют требованиям, изложенным в издании ВОЗ “Принципы и методы оценки токсичности химических веществ” [6].

Препарат, который был выбран в качестве протектора – «Этоксидол», международное непатентованное название: этилдиметилгидроксипиридина малат. Препарат синтезирован специалистами Всероссийского научного центра по безопасности биологически активных веществ под руководством лауреата Государственной премии РФ, доктора химических наук, профессора С.Я. Скачиловой (ВНИЦ БАВ, Старая Купавна, Россия), запатентован под названием «Этоксидол» [4]. «Этоксидол» является ингибитором свободнорадикальных процессов, оказывает мембранопротекторное, антигипоксическое, ноотропное, противосудорожное, анксиолитическое действие, повышает устойчивость организма к стрессу.

Таблица 1 построена по данным, приведенным в работах [2,3].

Концентрация газа и условия эксперимента полностью соответствуют требованиям, изложенным в издании ВОЗ [6] и МЗ РФ №267 от 19.06.2003.

Таблица 1
Соответствие сроков развития экспериментальных животных в соответствии с периодами постнатального онтогенеза человека

Человек	Лабораторные крысы	
Период	Период	Возраст воздействия газа (сутки онтогенеза)
Детский возраст	Неполовозрелый (молодой)	6-36
Взрослый возраст, I период	Зрелый I	368 - 398
Взрослый возраст, II период	Зрелый II	472-502
Пожилой возраст	Предстарческий	700-730

В качестве контрольных исследовались крысы аналогичных экспериментальных возрастных групп, которые по 5 особей в течение 30 дней находились в герметически закрытой затравочной камере такое же время и в тех же условиях, что и опытные, но без присутствия серосодержащего газа.

Среди большого количества методов определения цитокинов нами был выбран иммуноферментный, как наибо-

лее доступный и с высокой чувствительностью [7]. Для выявления изменений спонтанной и индуцированной продукции цитокина были использованы крысиние моноклональные антитела фирмы BIOSUORCE, Бельгия к ФНО-А и ИЛ-10. Расчеты количества цитокинов проводили путем построения калибровочной кривой с помощью компьютерной программы. Количество выражали в пг/мл.

Результаты исследования и их обсуждение

После ингаляции природного газа наблюдался рост как спонтанной продукции цитокинов, так и индуцированной, за исключением предстарческого периода онтогенеза (таблица 2).

мл. Во II зрелом и предстарческом периодах онтогенеза показатель спонтанной продукции ФНО-А в контрольных группах составил $32,4 \pm 1,7$ и $36,2 \pm 2,3$ пг/мл, а индуцированной – $784,0 \pm 29,7$ и $807,1 \pm 38,3$ пг/мл соответственно. После воздействия серосодержащего газа были выявлены следующие изменения: показатель спонтанной продукции стал равен $148,7 \pm 18,2$ и $234,5 \pm 31,4$ пг/мл, а индуцированной $818,3 \pm 42,5$ и $682,6 \pm 27,4$ пг/мл соответственно.

Если резюмировать вышеизложенное, то можно заключить, что в молодом, I зрелом и II зрелом этапах онтогенеза экспериментальных животных воздействие токсиканта вызывало повышение продук-

Таблица 2

Показатели продукции ФНО-А при воздействии серосодержащего газа и влиянии протектора (M ± m)

Группа животных		Контроль	Газ	Газ+протектор
Неполовозрелый	С	$28,6 \pm 1,6$	$185,0 \pm 22,3^*$	$58,4 \pm 4,8^*$
	И	$716,3 \pm 26,6$	$728,7 \pm 29,3$	$721,2 \pm 27,4$
Зрелый I	С	$31,6 \pm 1,8$	$135,8 \pm 14,3^*$	$74,8 \pm 6,4^*$
	И	$739,7 \pm 31,7$	$824,6 \pm 38,4$	$756,4 \pm 34,8$
Зрелый II	С	$32,4 \pm 1,7$	$148,7 \pm 18,2^*$	$76,3 \pm 4,1^*$
	И	$784,0 \pm 29,7$	$818,3 \pm 32,5$	$798,7 \pm 30,4$
Предстарческий	С	$36,2 \pm 2,3$	$234,5 \pm 31,4^*$	$73,2 \pm 3,8^*$
	И	$807,1 \pm 38,3$	$682,6 \pm 27,4^*$	$724,2 \pm 28,6^*$

Примечание: * - разница с контролем достоверна при $p < 0,05$
 С - спонтанная продукция, в пг/мл
 И - индуцированная продукция, в пг/мл

У молодых животных в контрольной группе содержание ФНО-А (фактор некроза опухоли - А) в периферической крови составило $28,6 \pm 1,6$ пг/мл, а при стимуляции мононуклеаров периферической крови - $716,3 \pm 26,6$ пг/мл., что явилось наименьшими значениями за всё время наблюдения.

В I зрелом периоде онтогенеза изменения спонтанной и индуцированной продукции цитокина соотносились с таковыми в молодом возрасте. Показатель спонтанной продукции в контрольной группе равен $31,6 \pm 1,8$ пг/мл, стимулированного синтеза – $739,7 \pm 31,7$ пг/мл.

После воздействия газообразного серосодержащего поллюганта в I зрелом этапе онтогенеза показатель спонтанной продукции ФНО-А составил $135,8 \pm 14,3$ пг/мл, а индуцированной – $824,6 \pm 38,4$ пг/

мл. Оно было статистически достоверным ($P < 0,05$) для спонтанной продукции и имело характер тенденции для индуцированной.

Для предстарческого этапа данная динамика носила иной характер – воздействие серосодержащего токсиканта вызывало резкий подъем спонтанной продукции, но, в то же время, статистически достоверный спад индуцированной продукции цитокина. Данный феномен можно объяснить значительным истощением функциональных возможностей образования данного цитокина.

Воздействие серосодержащего газа на фоне протектора – препарата «Этоксидол» вызывало нормализацию как спонтанной, так и индуцированной продукции цитокина ФНО-А в молодом, I зрелом и II зрелом этапах онтогенеза. Но, если,

для индуцированной продукции она носила статистически достоверный характер для молодого возраста, то для спонтанной имела лишь характер тенденции на всех этапах онтогенеза.

Второй исследуемый цитокин – это ИЛ-10, который обладает противовоспалительной активностью (таблица 3). Противовоспалительные цитокины, в частности ИЛ-10, принимают участие в ограничении воспалительного ответа, подавляя секрецию провоспалительных цитокинов и регулируя, таким образом, тяжесть повреждения тканей.

На фоне воздействия природным газом спонтанная продукция достигла значения $80,7 \pm 8,4$ пг/мл, а показатель индуцированного синтеза ИЛ-10 изменился до $63,1 \pm 7,7$ пг/мл, причем произошла инверсия показателя – он оказался меньше контрольных значений.

В четвертой предстарческой группе у контрольных животных показатель спонтанной продукции был равен $13,7 \pm 2,5$ пг/мл, а индуцированной – $59,7 \pm 3,6$ пг/мл. После проведения эксперимента были выявлены следующие изменения спонтанной продукции - $57,5 \pm 6,8$ пг/мл; ин-

Таблица 3

Показатели продукции ИЛ-10 при воздействии серосодержащего газа и влиянии протектора ($M \pm m$)

Группа животных	Контроль		Газ	Газ+протектор
	С	И		
Неполовозрелый	С	$14,2 \pm 3,8$	$64,2 \pm 3,6$	$20,8 \pm 3,1$
	И	$61,2 \pm 3,2$	$62,8 \pm 6,3$	$61,6 \pm 3,8$
Зрелый I	С	$17,6 \pm 4,2$	$83,2 \pm 8,4$	$24,6 \pm 5,2$
	И	$63,0 \pm 4,4$	$67,2 \pm 7,2$	$64,2 \pm 5,4$
Зрелый II	С	$18,1 \pm 2,7$	$80,7 \pm 8,4$	$38,7 \pm 6,2^*$
	И	$64,2 \pm 5,2$	$63,1 \pm 7,7$	$63,8 \pm 6,2$
Предстарческий	С	$13,7 \pm 2,5$	$57,5 \pm 6,8$	$41,8 \pm 4,8^*$
	И	$59,7 \pm 3,6$	$52,4 \pm 5,4$	$54,8 \pm 4,8$

Примечание: * - разница с контролем достоверна при $p < 0,05$
 С - спонтанная продукция, в пг/мл
 И - индуцированная продукция, в пг/мл

Необходимо сразу отметить, что динамика содержания этого цитокина при индуцированной продукции на всех изучаемых периодах онтогенеза как при воздействии газообразного серосодержащего поллютанта, так и в сочетании его с протектором имела небольшую статистически недостоверную амплитуду.

В контрольной группе содержание этого цитокина в периферической крови молодых крыс составило $14,2 \pm 3,8$ пг/мл, при стимуляции – $61,2 \pm 3,2$ пг/мл. После воздействия природного газа содержание изучаемого цитокина в молодой группе при спонтанной продукции составило $64,2 \pm 3,6$ пг/мл, при индуцированной – $62,8 \pm 6,3$.

В первый зрелый период онтогенеза показатель спонтанной продукции составил $17,6 \pm 4,2$ пг/мл, а индуцированной до $63,0 \pm 4,4$ пг/мл. После воздействия токсиканта были выявлены следующие изменения спонтанной продукции - $83,2 \pm 8,8$ пг/мл; индуцированной - $67,2 \pm 7,2$ пг/мл.

Во второй зрелой группе показатель спонтанной продукции составил $18,1 \pm 2,7$ пг/мл. Показатель индуцированной продукции мононуклеарами крови оказался равен $64,2 \pm 5,2$ пг/мл.

дуцированной - $52,4 \pm 5,4$ пг/мл, причем этот показатель оказался как и на предыдущем этапе онтогенеза экспериментальных животных меньше контрольных значений, но статистически недостоверно.

Воздействие газообразного серосодержащего поллютанта на фоне действия протектора приводило к статистически достоверной нормализации спонтанной продукции исследуемого цитокина на неполовозрелом и I взрослом этапах онтогенеза экспериментальных животных. На последующих этапах в этом случае спонтанная продукция хотя и стремится к возрастной норме, но, всё же является статистически недостоверной.

Исходя из полученных данных можно предположить, что при токсическом воздействии газообразных серосодержащих поллютантов отмечаются нарушения продукции изучаемых цитокинов. Повышение спонтанной продукции ФНО-А в этом случае наблюдается на всех изучаемых этапах постнатального онтогенеза экспериментальных животных, в разной степени. Наиболее значительным оно является в молодом и предстарческом возрастах. Что отражает, скорее всего, незре-

лость адаптационных механизмов в молодом и снижение их функциональной активности в предстарческом этапах онтогенеза.

Применение протектора вызывало стремление этого показателя вернуться к нормальным значениям, переходящее даже в статистически достоверный характер для индуцированной продукции ФНО-А в молодом возрасте.

Слабая динамика изменений спонтанной и индуцированной продукции ИЛ-10 свидетельствует о нарушении работы противовоспалительной системы, особенно в группах молодых животных и предстарческого возраста.

Применение протектора приводило к достоверной нормализации спонтанной продукции данного цитокина в молодом и I взрослом периодах постнатального онтогенеза экспериментальных животных. Анализ индуцированной продукции ИЛ-10 был низкоинформативен из-за небольшой амплитуды динамики и большого разброса значений её показателей.

Итак, исходя из полученных данных, можно сделать следующие **выводы**:

анализ цитокинового звена на фоне воздействия серосодержащего газа свидетельствует о нарушении работы противовоспалительной системы, а также смещение в системе «провоспалительные – противовоспалительные цитокины» в сторону первых, особенно в группах молодых животных и предстарческого возраста.

полученные результаты, на фоне применения протектора свидетельствуют о возможности повышения резистентности организма к токсическим компонентам газа с помощью отечественного препарата «Этоксидол».

использование препарата «Этоксидола», обладающего антигипоксическим, антиоксидантным действием, помогает раскрыть механизмы и пути повышения не-

специфической защиты при хроническом воздействии вредных и опасных факторов внешней среды на различных этапах постнатального онтогенеза.

Список литературы

1. Абдрашитова А.Т., Белолопенко И.А., Панова Т.Н. Особенности цитокинового статуса и процессов апоптоза под влиянием комбинированного действия производственных факторов газодобывающего предприятия // Успехи геронтологии. – 2011. – Т. 24, №1. – С. 147-153.
2. Гелашвили О.А. Вариант периодизации биологически сходных стадий онтогенеза человека и крысы // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2008. – т.22. - № 4. – С.125-126.
3. Западнюк И.П. Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. – Киев: «Вища школа», 1983. – 381 с.
4. Кочетков С. Ю. Исследование влияния комбинированного применения ацетилсалициловой кислоты и производных 3-гидрокси-пиридина и таурина на некоторые показатели гемостаза в эксперименте: автореферат дис. ... кан. мед. наук. – Саранск, 2015. – 20с.
5. Лазько А.Е., Овсянникова О.А., Карпеева Д.В. Гемомикроциркуляция в красном костном мозге в условиях воздействия серосодержащего газа // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 5 (часть 1) – С. 167-171.
6. Овсянникова О. А., Осипенко М.Д., Карпеева Д. В. Эффекты воздействия серосодержащих газов на эритропоэз на различных этапах онтогенеза // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 10-2. – С. 281-284.
7. Осипенко М. Д. Влияние газообразных серосодержащих поллютантов на эритропоэз в онтогенезе: автореферат дис. ... кан. биол. наук Астрахан. гос. мед. академия. – Астрахань, 2010.
8. Попков К. В. Влияние сероводородсодержащего газоконденсата на функциональную активность иммунной системы: автореферат дис. ... кан. мед. наук. – Оренбург, 1994.- 24 с.
9. Принципы и методы оценки токсичности химических веществ. – Ч.1. Женева, ВОЗ, 1981.- 312 с.
10. Сенников С.В., Силков А.Н. Методы определения цитокинов // Цитокины и воспаление. – 2005. –Т. 4, №1. – С.22-27.