

СОЛОХА Н.В., ЯВОРОВСЬКИЙ О.П., КАРЛОВА О.О., КУРЧЕНКО А.І., САВЧЕНКО В.С.

**ФУНКЦІОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ МОНОНУКЛЕАРНИХ КЛІТИН КРОВІ
ЗА ПРОДУКЦІЄЮ ЦИТОКІНІВ ПІД ДІЄЮ НАНОКОМПЗИТНИХ МАТЕРІАЛІВ
В УМОВАХ *IN VITRO***

SOLOKHA N., YAVOROVSKY O., KARLOVA O., KURCHENKO A., SAVCHENKO V.

**FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONONUCLEAR BLOOD CELLS FOR CYTOKINE
PRODUCTION BY NANOCOMPOSITE MATERIALS UNDER *IN VITRO***

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, ДУ «Інститут урології НАМН України»
National Medical University named after O.O. Bogomolets
State Institution «Institute of Urology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine»

У останні два десятиліття прогрес імунології як фундаментальної медико-біологічної науки відзначився явним підвищенням знань про роль імунної системи в життєзабезпеченні організму. Була доведена провідна роль імунної системи в підтримці гомеостазу організму, в протипухлинному захисті, у розвитку запальних, алергічних, аутоімунних та імунодефіцитних захворювань. З'ясовано, що функції імунної системи можуть істотно змінюватися у бік посилення або пригнічення під дією багатьох ендогенних і екзогенних факторів навколишнього середовища, які здатні впливати на різні ланки імунної системи і змінювати силу, характер і напрям імунних реакцій.

У зв'язку з цим, для клінічного прогнозу виникнення і перебігу професійних захворювань у відповідної групи працівників важливим стає визначення чутливої ланки імунітету при впливі сучасних наноккомпозитних матеріалів, для яких, у порівнянні з їх традиційними об'ємними матеріалами, характерна низка фізико-хімічних особливостей, що впливають на механізм їх біологічної дії. При виготовленні нанопорошків мають місце ручні операції і тому є ризик вдихання внаслідок забруднення повітря робочої зони пиловими частками як ультрамікроскопічного, так і нанодіапазону, а також потрапляння їх на одяг, шкіру та слизові оболонки працівника. З сучасних даних літератури відомо, що вони здатні долати біологічний бар'єр, розповсюджуватися по всьому організму та викликати відповідні реакції з боку різних органів і систем, в тому числі імунної.

Також стає цікавим вивчення імуномодуючих властивостей нових вітчизняних нанопорошків безкисневих сполук металів з метою з'ясування потенційної здатності їхнього впливу на процеси міжклітинної кооперації в умовах *in vitro*.

Мета роботи. Вивчити *in vitro* динаміку продукції цитокінів моноклеарними клітинами периферичної у донорів, що контактують з наноккомпозитними матеріалами.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

У дослідженні брали участь 10 операторів (донорів-добровольців) Інституту проблем матеріалознавства імені Францевича, що мають виробничий контакт з нанопорошками безкисневих сполук металів, які після надання інформованої згоди проходили комплексне медичне обстеження. Уніфікованими біохімічними методами в сироватці крові працівників визначали концентрацію глюкози, загального білку та холестерину, а також активність ферментів аланінамінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) (за В.В. Меньшиковим, 1987). Структурно-функціональні зміни внутрішніх органів у працівників, експонованих нанопорошками, вивчали методом ультразвукової графії за допомогою ультразвукового сканера «Алока-3500» (Японія) з лінійним датчиком 7,5 мГц та конвексним датчиком 5 мГц в В-режимі та режимі кольорового доплерівського картування. При ультразвуковому дослідженні брахіоцефальних судин визначали товщину комплексу інтима-медіа загальної сонної артерії (КІМ ЗСА) та внутрішньої сонної артерії (КІМ ВСА) за методом В.Г. Лелюк. (2003).

Далі у обстежуваних осіб брали кров для імунологічного дослідження на кафедрі клінічної імунології та алергології з секцією медичної генетики НМУ імені О.О. Богомольця (зав. кафедри д.мед.н., професор Курченко А.І.) та лабораторії імунології (зав. відділом д.мед.н., професор Г.М. Драннік) ДУ «Інститут урології НАМН України». Моноклеарні клітини периферичної крові виділяли із застосуванням градієнта щільності фіколл-верографіну (1,076-1,078) і поміщали в культуральне середовище RPMI-1640, що містить, 10% ембріональної телячої сироватки, 40 мкг/мл гентаміцину, 5x10M 2-меркаптоетанол і 3% L-глутаміну. Клітинну суспензію в концентрації $1,5 \times 10^6$ кл/мл інкубували 24 годин в CO₂-інкубаторі при 37°C без стимулюючого агента, при стимуляції мітогеном ФГА, в концентрації

30 мкг/мл, а також при стимуляції нанокompозитним матеріалом, в концентрації 10 мкг/мл. Для досліджуваного нанокompозитного матеріалу використовувалася концентрація, що відповідала добовій дозі в перерахунку на кількість клітин лімфоцитарно-моноцитарного ряду в 1 мл культурального середовища - $1,5 \times 10^6$ кл/мл.

Імуноферментним методом (ELISA) в супернатантах мононуклеарних клітин вимірювали концентрацію цитокінів (IL-1, IL-6, IL-4, TNF- α) із застосуванням тест-систем ЗАТ «Вектор Бест» (Росія). Тестування проводилося за допомогою імуноферментного аналізатора «Stat Fax-303 Plus».

Статистична обробка інформації проведена за допомогою пакету програм «SPSS for Windows. Версія 11 «Математична обробка отриманих результатів проводилася з урахуванням перевірки показників на нормальний розподіл за тестом Колмогорова-Смирнова. Для статистичної обробки використовувалися параметричні критерії статистики - тест Стьюдента, а також критерій Манна-Уїтні з поправкою Бонфероні. Обробка даних проводилася за допомогою програми Excel. Для порівняння двох залежних вибірок використовували традиційний непараметричний тест Уїлкоксона. Достовірною вважали різницю при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Оцінка функціональної активності клітин моноцитарно-макрофагального ряду по продукції IL-1 під впливом нанокompозитного матеріалу у донорів в умовах in vitro.

IL-1 - один з важливих цитокінів, який продукується активованими макрофагами, а також може продукуватися й іншими клітинами: епітеліальними, ендотеліальними, гліальними, фібробластами, кератиноцитами. Роль IL-1 в імунній відповіді надзвичайно важлива. Під його впливом у момент презентації макрофагами антигенного пептиду Т-лімфоцитам хелперам 1 типу останні починають продукувати IL-2. Крім того, одночасно під впливом IL-1 на Т-лімфоцитах експресуються рецептори до IL-2. Таким шляхом, створюються умови для подальшої проліферації лімфоцитів і дозрівання клону специфічно активованих клітин. IL-1 підсилює експресію молекул клітинної адгезії, що призводить до підвищення продукції інших прозапальних цитокінів - IFN- α , TNF- α , IL-6, IL-8 і активує гранулоцити, фібробласти, остеокласти, кератиноцити, ЕК-клітини.

У зв'язку з цим, вкрай важливим представилося вивчення можливого впливу різних нанокompозитних матеріалів на продукцію IL-1 клітинами донорів при впливі на них в умовах in vitro. Отримані результати представлені на рисунку 1.

Як з'ясувалося (Рис. 1) в процесі дослідження, спонтанна продукція IL-1 мононуклеарними

клітинами периферичної крові в системі in vitro склала $31,9 \pm 8,9$ пкг/мл. При додаванні мітогена ФГА продукція клітинами IL-1 підвищувалася до $100,5 \pm 9,8$ пкг/мл. При стимуляції мононуклеарних клітин нанокompозитним матеріалом, продукція IL-1 склала $73,8 \pm 15,9$ пкг/мл.

Оцінка функціональної активності клітин моноцитарно-макрофагального ряду по продукції IL-6 під впливом нанокompозитних матеріалів у донорів в умовах in vitro.

Результати дослідження продукції in vitro IL-6 під впливом нанокompозитних матеріалів представлені на рисунку 2.

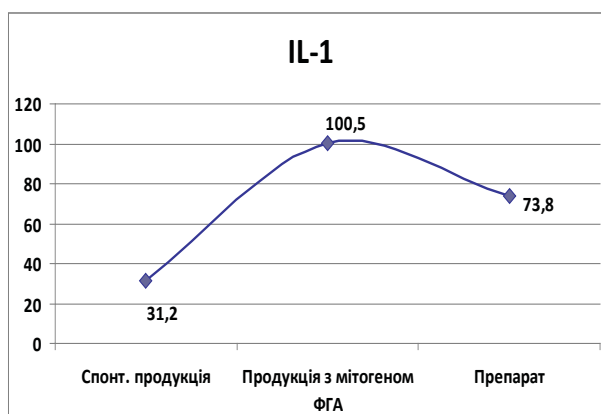


Рис. 1. Продукція IL-1 мононуклеарними клітинами in vitro у донорів, що контактують з нанокompозитним матеріалом

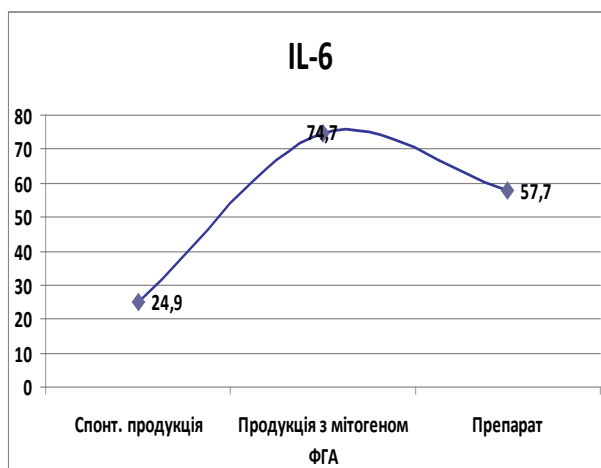


Рис. 2. Продукція IL-6 мононуклеарними клітинами in vitro у донорів, що контактують з нанокompозитним матеріалом

Як видно з рис. 2 спонтанна продукція IL-6 клітинами моноцитарно-макрофагального ряду характеризувалася рівнем $24,9 \pm 9,8$ пкг/мл. Під впливом мітогену ФГА спостерігалось підвищення продукції IL-6 до рівня $74,7 \pm 24,5$ пкг/мл. При додаванні до мононуклеарних клітин наноматеріалу, продукція IL-6 склала $57,7 \pm 14,9$ пкг/мл. ($p < 0,01$).

Оцінка функціональної активності клітин моноцитарно-макрофагального ряду по продукції TNF- α під впливом нанокompозитних матеріалів у донорів в умовах in vitro.

Фактор некрозу пухлин (TNF- α) продукується різними типами клітин, включаючи моноцити-макрофаги, Т і В-лімфоцити. TNF- α відноситься до класичних прозапальних цитокінів, який здатний активувати респіраторний вибух у нейтрофільних лейкоцитах та призводить до посилення кілінгової активності фагоцитуючих клітин. Крім того, TNF- α посилює синтез лімфокінів хелперними Т-лімфоцитами і стимулює ріст В-клітин. У високій концентрації він є важливим медіатором, що викликає розвиток ендотоксин-індукованого септичного шоку. TNF- α сприяє проліферації Т- і В-лімфоцитів, активації ЕК-клітин і макрофагів, підсилює продукцію простагландинів, за посередництва яких реалізуються багато токсичних ефектів.

Отримані результати впливу різних нанокompatитних матеріалів на продукцію TNF- α в умовах *in vitro* представлені на рис.3.

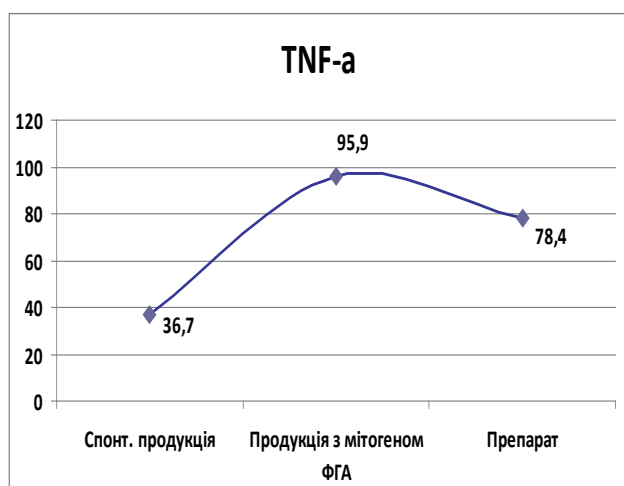


Рис. 3. Продукція TNF- α мононуклеарними клітинами *in vitro* у донорів, що контактують з нанокompatитним матеріалом

Як видно з рис. 3, рівень спонтанної продукції TNF- α в середньому становив $36,7 \pm 10,9$ пкг/мл. Під впливом мітогену ФГА виявлено підвищення продукції TNF- α до $95,9 \pm 10,7$ пкг/мл. При стимуляції мононуклеарних клітин нанокompatитним матеріалом, продукція TNF- α складала $78,4 \pm 9,8$ пкг/мл ($p < 0,01$).

Як впливає з наведеного, експерименти в умовах *in vitro* показали, що нанокompatитний матеріал здатний підвищувати функціональну активність клітин моноцитарно-макрофагального ряду по продукції IL-1, IL-6 та TNF- α , які в нормі регулюють взаємодію клітин імунної системи, а при запаленні виконують функції активаторів запалення і тканинного пошкодження.

Визначення функціональної активності Т-хелперів II типу по продукції IL-4 під впливом нанокompatитних матеріалів у донорів в умовах in vitro.

Як відомо, IL-4 індукує диференціювання попередників В-лімфоцитів, викликає проліфе-

рацію вже активованих В-клітин та експресію клітинних рецепторів до IgE. Дія IL-4 на ріст і диференціювання В-лімфоцитів опосередковано зв'язуванням IL-4 зі специфічними рецепторами на їх поверхні.

Вважають, що IL-4, який індукує проліферацію В-лімфоцитів, посилює експресію рецепторів до Fc-фрагменту IgE і є антагоністом IFN- α , пригнічуючи продукцію IL-1, TNF- α , IL-6, IL-8 і цитотоксичну активність Т-лімфоцитів, відіграє важливу роль у формуванні алергічних реакцій негайного типу.

Отримані результати визначення функціональної активності Т-хелперів 2 типу по продукції IL-4 під впливом нанокompatитних матеріалів у донорів в умовах *in vitro* представлені на рисунку 4.

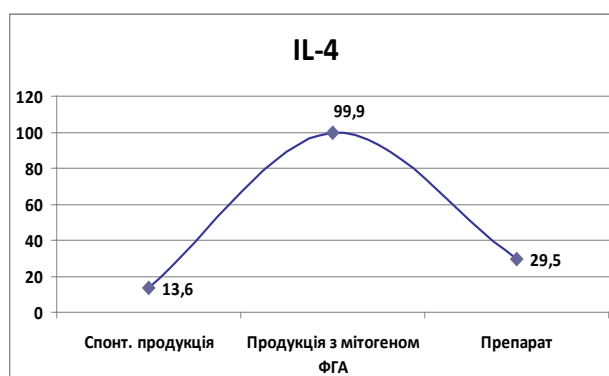


Рис. 4. Продукція IL-4 мононуклеарними клітинами *in vitro* у донорів, що контактують з нанокompatитним матеріалом

Як видно з рисунка 4, спонтанна продукція IL-4 складала – $13,6 \pm 2,0$ пкг/мл. Під впливом мітогену ФГА спостерігали підвищення продукції IL-4 клітинами до показників $99,9 \pm 44,9$ пкг/мл. Вплив *in vitro* продемонстрував, що нанокompatитний матеріал здатний підвищувати продукцію IL-4 в порівнянні зі спонтанною продукцією до $29,5 \pm 8,1$ пкг/мл.

Із зазначеного випливає, що вивчення *in vitro* впливу сучасних нанокompatитних матеріалів на імунокompatентні клітини є одним з ключових параметрів при визначенні їх імуноспецифічної активності і може слугувати основою для оптимізації подальших профілактичних заходів.

Насамперед, це стосується вивчення функціональної активності імунокompatентних клітин шляхом аналізу їх проліферативної здатності і особливо продукції цитокінів, які відіграють роль медіаторів, що забезпечують кооперативну міжклітинну взаємодію. Патогенетичним обґрунтуванням виникнення імунodefіцитного стану у людини, що контактує з нанокompatитними матеріалами може служити зниження якості міжклітинної взаємодії між мононуклеарними клітинами периферичної крові, що пов'язане з порушеннями регуляції синтезу цитокінів. В останні роки, завдяки розвитку методів кількісного визначення рівнів продукції цитокінів був

досягнутий значний прогрес у розумінні ролі цих речовин в нормі і при патології. Вивчення продукції цитокінів дозволяє отримати інформацію про функціональну активність різних типів імункомпетентних клітин; про тяжкість запального процесу, його перехід на системний рівень, прогноз та стадії розвитку ряду важких ускладнень.

Як показали наші дослідження, тривала дія нанопорошків тугоплавких безкисневих сполук металів, як професійного фактора, негативно впливає на організм, викликає розвиток системної імунозапальної відповіді за участю цитокінів, які в свою чергу є патогенетичним фактором у виникненні та розвитку структурних судинних

змін, а також токсичних порушень гепатобілярної системи.

Вазотоксичний вплив нанопорошків тугоплавких безкисневих сполук металів викликає розвиток неспецифічної судинної реакції ендотелію та інших судинних шарів з топічною міграцією клітин і формуванням вогнища судинного запалення. Гепатотоксичний ефект нанопорошків реалізується порушенням антитоксичної, ферментоутворюючої, білковосинтезуючої, інших функцій печінки та розвитком дегенеративно-дистрофічних змін у гепатоцитах.

Дані визначених клініко-інструментальних методів наведені у таблиці 1.

Таблиця 1

Лабораторно – інструментальні показники у обстежених операторів

Показники крові	Одиниці виміру	Експериментальна група	Контрольна група
Чисельність групи	n	10	20
АлАТ	мкмоль/л	0,30±0,002*	0,16±0,012
АсАТ	мкмоль/л	0,26±0,017*	0,15±0,011
Коефіцієнт де Рітиса	у.о.	0,84	0,94
Холестерин загальний	мкмоль/л	6,64±0,52*	3,28±0,21
Глюкоза	ммоль/л	6,68± 0,82*	4,9± 0,28
Визначення товщини комплексу інтима – медіа (KIM) загальної (ЗСА) та внутрішньої сонної артерії (ВСА)			
Товщина KIM ЗСА	мм	0,69 ± 0,05*	0,59±0,01
Товщина KIM ВСА	мм	0,63± 0,03*	0,56± 0,02

Примітка: *вірогідні відмінності показників у хворих та групи контролю (P < 0,05).

Виявлений нами перевищений вміст трансаміназ АлАТ (0,30±0,002 мкмоль/л) і АсАТ (0,26±0,017 мкмоль/л) при встановленому зниженні показника де Рітиса вказує на формування цитолітичного синдрому та підкреслює токсичний генез ураження печінки у даного контингенту працівників. Відзначалось також зростання концентрації окремих показників ліпідного (холестерин) та вуглеводного обмінів (глюкози крові) – відповідно 6,64±0,52 мкмоль/л та 6,68± 0,82 ммоль/л.

Виявлені при дослідженні структурні зміни комплексу комплексу інтима-медіа (KIM) загальної (ЗСА) та внутрішньої сонної артерії (ВСА) у вигляді порушення тришарової її структури при товщині 0,69±0,05 мм та 0,63±0,03 мм відповідно, вказують на ранній розвиток атеросклеротичних змін досліджуваних судин за відсутністю потовщення в них комплексу інтима- медіа.

Отже, дані показники можуть слугувати критерієм ранньої діагностики змін з боку гепатобілярної системи та атеросклеротичного ураження судин у операторів, експонованих нанопорошками тугоплавких сполук металів.

ВИСНОВКИ

1. Експерименти в умовах *in vitro* показали, що нанокompatитний матеріал здатний підвищувати функціональну активність клітин моноцитарно-макрофагального ряду по продукції прозапальних цитокінів IL-1, IL-6, TNF-α та продукцію IL-4 у донорів, що свідчить про потенційний вплив на формування хронічного запалення та алергічних реакцій у відповідній категорії працівників.
2. Тривала дія нанопорошків тугоплавких безкисневих сполук металів викликає розвиток системної імунозапальної відповіді за участю цитокінів, які в свою чергу є патогенетичним чинником у виникненні та прогресуванні структурних судинних змін та токсичних порушень гепатобілярної системи.
3. Одержані нами результати будуть враховані при розробці профілактичних рекомендацій та призначенні лікувально-оздоровчих заходів для даної категорії працівників та дозволять запобігти розвитку ускладнень серцево-судинної та гепатобілярної системи у цієї категорії робітників.

ЛІТЕРАТУРА

1. Г.Н. Дранник. Клиническая иммунология и аллергология. – К.: ООО «Полиграф плюс», 2010. – 552 с.
2. Петров Р.В. Иммунология. – М.: Медицина, 1982. – 368 с.
3. Роит А. Основы иммунологии. – М.: Мир, 1991. – 327 с.
4. М. Якобисяк. Імунологія. – Вінниця, Нова книга, 2004.- 660 с.
5. А.А. Ярилин. Основы иммунологии. – М.: Медицина, 1999. – 650 с.

РЕЗЮМЕ

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТОК КРОВИ ПО ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ПОД ДЕЙСТВИЕМ НАНОКОМПОЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ В УСЛОВИЯХ IN VITRO

*Солоха Н.В., Яворовский А.П., Карлова Е.А.,
Курченко А.И., Савченко В.С.*

Национальный медицинский университет
имени А.А. Богомольца.
ГУ «Институт урологии НАМН Украины»

В работе представлено изучение *in vitro* продукции цитокинов мононуклеарными клетками периферической крови доноров, которые контактируют с наноккомпозитными материалами.

В результате исследования было показано, что наноккомпозитный материал может повышать функциональную активность клеток моноцитарно-макрофагального ряда по продукции IL-1, IL-6, TNF- α и IL-4.

Полученные результаты будут использованы для профилактических рекомендаций и назначении лечебно-оздоровительных процедур для пациентов, чтобы предотвратить развитие осложнений сердечно-сосудистой и гепатобиллианой системы.

Ключевые слова: наноккомпозитные материалы, цитокины, сердечно-сосудистая и гепатобиллиарной системы.

SUMMARY

FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONONUCLEAR BLOOD CELLS FOR CYTOKINE PRODUCTION BY NANOCOMPOSITE MATERIALS UNDER IN VITRO

*Solokha N., Yavorovsky O., Karlova O.,
Kurchenko A., Savchenko V.*

National Medical University named after O.O. Bogomolets.
State Institution «Institute of Urology of the National Academy of
Medical Sciences of Ukraine»

In our work presented the “*in vitro*” study of cytokine production by peripheral blood mononuclear cells of the donor’s blood which contacted with nanocomposite materials.

The study showed that the composite material can improve the functional activity of the cells of the monocyte-macrophage series on production of IL-1, IL-6, TNF- α and IL-4.

The obtained results will be used for preventive recommendations and appointment in medical treatment for patients, to prevent complications of cardiovascular and hepatobiliary system.

Key words: nanocomposite materials, cytokine, cardiovascular and hepatobiliary system.

© Зубченко С.О., Юр’єв С.Д., 2015

УДК 616-056.3:576.895.4]-07-08-039.78

ЗУБЧЕНКО С.О., ЮР’ЄВ С.Д.

ОЦІНКА ДІАГНОСТИЧНИХ КРИТЕРІЇВ У ПАЦІЄНТІВ З РІЗНИМИ КЛІНІКО- ЛАБОРАТОРНИМИ ПРОЯВАМИ СЕНСИБІЛІЗАЦІЇ ДО КЛІЩІВ ДОМАШНЬО- ГО ПИЛУ ТА ПРОГНОЗУВАННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ АЛЕРГЕНСПЕЦИФІЧНОЇ ІМУНОТЕРАПІЇ НА ПІДСТАВІ АЛЕРГОКОМПОНЕНТНОЇ ДІАГНОСТИКИ

S.O. ZUBCHENKO, S.D. YURYEV

ASSESSMENT DIAGNOSTIC CRITERIA IN PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL AND LABORATORY MANIFESTATIONS OF SENSITIZATION TO HOUS DUST MITES EFFICIENCY AND FORECASTING ALLERGEN SPECIFIC IMMUNOTHERAPY BASED ON ALLERGIES COMPONENT DIAGNOSTIC

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, Українська школа
молекулярної алергології та імунології

Department of Clinical Immunology and Allergology, Danylo Halytsky Lviv National Medical University
(Lviv, Ukraine), Ukrainian School of Molecular Allergology and Immunology (Kyiv, Ukraine)

Алергічні хвороби в останні роки вражають людство епідеміологічними масштабами. Причому, проблема полягає не лише в поширеності алергопатології, а й в прогресуючому збільшенні тяжких випадків алергічних реакцій, ранньому

початку хвороби, асоціації АХ з супутньою патологією, погіршенні якості життя як самого пацієнта, так і його сім’ї [14]. Впродовж останніх десятиліть активно вивчаються механізми цих імунопатологічних реакцій, розробляються діа-