

НАСЛІДКИ ВПЛИВУ ТЕХНОГЕННОГО ЗАБРУДНЕННЯ НА МУКОЗАЛЬНИЙ ІМУНІТЕТ

©О. В. Войтович, О. М. Камишний

Запорізький державний медичний університет

РЕЗЮМЕ. В роботі досліджено можливий вплив техногенного забруднення на показники мукозального імунітету мешканців м. Запоріжжя. Досліджувались зразки біологічних матеріалів, отриманих зі слизової оболонки дистального відділу нижньої носової раковини 90 практично здорових мешканців м. Запоріжжя, юнацького віку. Аналізували показники риноцитограми, а також функціонального мукозального імунітету носа на основі даних імуноцитофлуоресцентного виявлення антигенних маркерів TLR-2 і TLR-4, LMP-2, Nf-κB та sIgA методом імуноферментного аналізу. Встановлено, що в умовах дії більш інтенсивного техногенного забруднення відбувається посилення цитологічних ознак запалення у вигляді збільшення вмісту гранулоцитів слизової оболонки носа та посилення деструкції епітеліальних клітин. Виявлено напруження мукозального імунітету з ознаками дисбалансу імунорегуляторних механізмів.
КЛЮЧОВІ СЛОВА: мукозальний імунітет, спадковий імунітет, імуноглобулін А, техногене забруднення.

Вступ. Постійний контакт слизової оболонки (СО) носа людини з величезною кількістю різноманітних антигенів свідчить про її важливе фізіологічне значення як бар'єра на шляху інфекційних чинників. При цьому особливість місцевого імунітету СО полягає у здатності диференціювати такі антигени відповідно до їх потенційної патогенності. Здатність ця забезпечується складовими мукозального імунітету, до яких належать епітелій, структурована і дифузна лімфоїдна тканина, дендритні клітини, макрофаги і гранулоцити. Відомо, що нормальне співіснування індигенної мікробіоти у складі біоценозу макроорганізму можливе лише за умови ареакивності імунної системи макроорганізму. Відкриття тол-подібних рецепторів (TLR) на епітеліальних клітинах внесло певну ясність до розуміння їх ролі у механізмах локальної толерантності [1]. Центральне місце у регуляції імунної відповіді посідають імунні протеасоми і фактори транскрипції (NF-κB). Зазначається, що функціональна особливість мукозального імунітету полягає у пригніченні імунної відповіді в межах СО за участю трьох механізмів: імунологічної толерантності, фізіологічного запалення та дії секреторної форми імуноглобуліну А (sIgA) [2, 5, 9]. Однак, окрім мікробних антигенів, складові мукозального імунітету піддаються негативній дії різноманітних ксенобіотиків, тиск яких щороку збільшується. Тож у зазначених вище механізмах регуляції імунної відповіді може спостерігатися певний дисбаланс [3–6].

Мета дослідження. Вивчити можливий вплив техногенного забруднення на показники мукозального імунітету мешканців м. Запоріжжя.

Матеріали і методи дослідження. Матеріалом дослідження були зразки біологічних матеріалів, отриманих зі СО дистального відділу нижньої носової раковини 90 практично здорових мешканців м. Запоріжжя юнацького віку. У дослі-

дженні було виділено дві групи: перша – матеріал, отриманий від 33 мешканців умовно чистих районів, друга – матеріал, отриманий від 57 мешканців умовно брудних районів м. Запоріжжя.

Збір матеріалу для риноцитограми здійснювали стерильною пластиковою кюреткою із заднього відділу нижньої носової раковини. За ступенем зрілості епітеліальні клітини поділяли на незрілі неспеціалізовані базальні, парабазальні та зрілі високоспеціалізовані циліндричні війчасті. Окрім вивчення якісних характеристик епітеліоцитів ми виявляли деякі ознаки помірної дисплазії циліндричного війчастого епітелію, такі як ушкодження війок, гіпертрофовані ядра, гіперхромний хроматин, базофільна цитоплазма. Розраховували середній показник деструкції епітеліоцитів (СПД), а також співвідношення кількості епітеліальних клітин до кількості гранулоцитів (Еп /L), як показник розвитку запальних процесів. Функціональну активність клітин слизової оболонки носа характеризували на основі даних імуноцитофлуоресцентного виявлення антигенних маркерів TLR-2 і TLR-4, LMP-2 і Nf-κB. Клітини фарбували моноклональними антитілами до TLR-2 або TLR-4 людини (HycultBiotech, Нідерланди), вже кон'югованими з флуоресцеїнаізотіоціанатом (FITC), або з первинними кролячими моноклональними антитілами до субодиноці p50 та її прекурсора p105 Nf-κB або імунної субодиноці протеасоми LMP-2 (SantaCruzBiotechnology, США). Після відмивання надлишку первинних антитіл в 0,1 М фосфатному буфері, зіскоби інкубували 60 хвилин (T = 37 °C) з вторинними антитілами до повної молекули IgG кролика, кон'югованими з FITC. Імунопозитивні клітини вивчали з допомогою комп'ютерної програми ImageJ (NIH, США). Зображення, отримане на мікроскопі PrimoStar (ZEISS, Німеччина) в ультрафіолетовому спектрі збудження 390 нм (FITC) негайно вводилося в комп'ютер за допомогою високочутливої камери AxioCam 5c (ZEISS,

Німеччина) і пакета програм для отримання, архівування та підготовки зображень до публікації AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Німеччина). При цьому в автоматичному режимі визначалися області зі статистично значущою флуоресценцією, характерною для клітин, які експресують TLR-2, TLR-4, LMP-2 і Nf-κB. Обчислювалися морфометричні і денситометричні характеристики імунопозитивних клітин.

У змивах з носової порожнини виявляли вміст секреторного IgA (sIgA) методом імуноферментного аналізу (Хема-Медика, Россія).

Статистичну обробку отриманих даних проводили із застосуванням програми "Statistica-6,1". Розраховували середньоарифметичне значення вибірки M і помилки середнього $\pm m_x$, проводили

попарне порівняння у контрольних і дослідних групах за допомогою Т-критерію Стюдента, приймаючи відмінності як статистично значимі при рівні $p \leq 0,05$.

Результати й обговорення. Отримані нами дані щодо морфофункціонального стану слизової оболонки носа представлено в таблиці 1. Видно, що відносний вміст гранулоцитів у складі слизової оболонки мешканців м. Запоріжжя був більше 10 %, при цьому у 2 групі вміст їх був достовірно у 1,3 раза більшим ніж у 1 групі. Такий показник, як СПД, у 2 групі мав недостовірну тенденцію до збільшення, а співвідношення Еп/Л у 2 групі було достовірно у 1,8 раза меншим, порівняно з 1 групою.

Таблиця 1. Показники риноцитограми залежно від району проживання практично здорових осіб ($M \pm m_x$)

| Показники | Виділені групи | |
|----------------------|----------------|-----------|
| | 1 група | 2 група |
| Гранулоцити, % | 13,1±2,2 | 16,9±2,4* |
| СПД епітелію, ум.од. | 0,27±0,02 | 0,31±0,02 |
| Еп/Л | 15,6±2,7 | 8,5±2,0** |

Примітка: * – різниця з 1 групою достовірна при $p < 0,05$; ** – різниця з 1 групою достовірна при $p < 0,01$.

Відмінності у імунологічних показниках СО носа мешканців «чистих» і «брудних» районів м. Запоріжжя представлені в таблиці 2. Вміст sIgA мав недостовірну тенденцію до збільшення у 2 групі. Гранулоцити СО носа не відрізнялись за рівнем експресії всіх досліджених нами маркерів у 1 та 2 групах. Найбільшим був відсоток TLR-2⁺ гранулоцитів, найнижчим – відсоток Nf-κB⁺ гранулоцитів.

Щільність експресії гранулоцитами TLR-2, TLR-4, LMP-2 і Nf-κB був однаковим.

Епітеліальні клітини мали достовірно у 1,4 раза більший відсоток TLR-2⁺ у 2 групі, у 1,6 раза меншу кількість TLR-4⁺, порівняно з 1 групою. Кількість LMP-2⁺ і Nf-κB⁺ епітеліоцитів у 2 групі була достовірно у 1,3 раза більшою. Щільність експресії епітеліальними клітинами всіх досліджених

Таблиця 2. Імунологічні показники слизової оболонки носа залежно від району проживання практично здорових осіб ($M \pm m_x$)

| Показники | Виділені групи | |
|----------------------|------------------|-------------|
| | 1 група | 2 група |
| sIgA, мкг/мг білка | 608,6±96,8 | 712,6±179,0 |
| TLR-2 –гранулоцити | % | 91,4±1,6 |
| | Щільність, ум.од | 0,14±0,01 |
| TLR-2 –епітеліоцити | % | 63,6±2,7 |
| | Щільність, ум.од | 1,18±0,05 |
| TLR-4 –гранулоцити | % | 87,6±2,8 |
| | Щільність, ум.од | 0,17±0,01 |
| TLR-4 –епітеліоцити | % | 66,3±3,2 |
| | Щільність, ум.од | 1,12±0,09 |
| LMP-2 – гранулоцити | % | 57,2±2,0 |
| | Щільність, ум.од | 0,11±0,09 |
| LMP-2 – епітеліоцити | % | 43,7±1,8 |
| | Щільність, ум.од | 1,07±0,07 |
| Nf-κB –гранулоцити | % | 53,8±2,2 |
| | Щільність, ум.од | 0,12±0,01 |
| Nf-κB –епітеліоцити | % | 55,9±2,7 |
| | Щільність, ум.од | 1,11±0,09 |

Примітка: * – різниця з контролем достовірна при $p < 0,05$.

маркерів достовірно не відрізнялась у групах порівняння.

Відомо, що транскрипційний фактор NF-κB контролює експресію більш ніж 500 генів, зокрема генів імунної відповіді, апоптозу і клітинного циклу, а порушення його регуляції викликають розвиток запалення, автоімунних і онкологічних захворювань [10].

Цей фактор є основним стимулятором продукції прозапальних цитокінів IL-1β, IL-6, IL-18, TNFα та важливим регулятором диференціювання клітин адаптивної імунної відповіді, зокрема субпопуляцій супресорних Т-регуляторних та прозапальних Th17- і Th1-клітин. Тому збільшення кількості Nf-κB⁺-епітеліоцитів в умовах техногенного забруднення може бути одним з чинників розвитку запальних процесів, зокрема назофарингіту. Крім цього, важливими регуляторами процесингу антигенів у епітеліальних клітинах є імунні протеасоми. Заміна конститутивних субодиниць протеасом на імунні відбувається за певних умов, наприклад, під впливом IFNγ [8]. Конститутивні каталітичні субодиниці X(β5, Y(β1) та Z(β2) при цьому заміщуються на імунні субодиниці LMP7 (β5i), LMP2 (β1i) і LMP10 (β2i), при гідролізі білків якими в кілька разів зростає вихід олігопептидів довжиною 8-11 амінокислотних залишків [8]. Оліго-

пептиди такої довжини відповідають розмірам антигенних епітопів і у комплексі з молекулами МНС I класу вони виносяться на поверхню епітеліальних клітини та більш ефективно презентуються клітинам адаптивної імунної системи. При цьому зміни експресії LMP2 здатні впливати на рівень Nf-κB через можливість здійснювати деградацію його інгібітора. Це, в свою чергу, впливає на рівень продукції цитокінів, зокрема і IFNγ, що призводить до формування "порочного кола" (IFNγ-LMP2-Nf-κB-IFNγ) [7-9].

Висновок. Аналіз показників мукозального імунітету носа практично здорових людей показав, що в умовах дії більш інтенсивного техногенного забруднення відбувається посилення цитологічних ознак запалення у вигляді збільшення вмісту гранулоцитів СО носа та посилення деструкції епітеліальних клітин. Виявлено напруження мукозального імунітету з ознаками дисбалансу імунорегуляторних механізмів.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на дослідження можливого впливу на мукозальний імунітет всіх компонентів мікробіоценозу СО носа і зокрема вплив індигенної мікробіоти СО носа, розробку методів корекції дисбіозів та мукозального імунітету.

ЛІТЕРАТУРА

1. Абатуров А. Е. Роль Toll-подобных рецепторов в рекогниции патоген-ассоциированных молекулярных структур инфекционных патогенных агентов и развитии воспаления. Часть 1. Семейство TLR / А. Е. Абатуров, А. П. Волосовец, Е. И. Юлиш // Здоровье ребёнка. – 2012. – № 5. – С. 116–121.
2. Зеленов П. В. Секреторный иммуноглобулин А как фактор местной защиты слизистой дыхательных путей и причины его снижения [Електронний ресурс]: <http://aspirans.com/sekretorny-immunoglobulin-kak-faktor-mestnoi-zashchity-slizistoi-dykhatelnykh-putei-i-prichiny-ego>.
3. Кірсанова О. В. Вплив забруднення атмосферного повітря на стан здоров'я дітей в умовах промислового міста (на прикладі м. Запоріжжя) / О. В. Кірсанова // Гігієна населених місць. – Київ, 2004. – Вип.43. – С.374–379.
4. Матвійчук В. В. Імунокорекція негативних впливів мікрофлори носоглотки на імунорезистентність здорових дітей молодшого віку / В. В. Матвійчук, Л. В. Квашніна, В. П. Родіонов // Перинатология и педиатрия. – 2009. – № 3 (39). – С. 74–77.

5. Салтикова Г. В. Значення системи місцевого імунітету для пацієнтів, які часто та тривалий час хворіють на респіраторні інфекції / Г. В. Салтикова // Therapia. – 2008. – № 2. – С. 33–34.
6. Стельмахівська В. П. Здоров'я дітей та підлітків і навколишнє середовище / В. П. Стельмахівська, В. І. Березань // Проблеми екології та медицини. – 2008. – № 1–2. – С. 33–36.
7. Сківка Л. М. Реакції за участю Toll_like рецепторів у протективному імунітеті та за патологічних станів / Л. М. Сківка, В. В. Позур // Укр. біохім. журн. – 2008. – Т. 80, № 3. – С. 5–20.
8. Цимоха А. С. Протеасоми: участие в клеточных процессах // Цитология.-2010. – № 4. – С. 277–300.
9. Захисна роль місцевого імунітету у профілактиці захворювань верхніх дихальних шляхів у дітей / Л. І. Чернишова, С. А. Якимович, Б. В. Донской, Л. В. Галазюк // Современная педиатрия. – 2012. – № 4. – С. 104–107.
10. Hayden M. S. NF-κB in immunobiology / M. S. Hayden, S. Ghosh // Cell Res. – 2011. – Vol. 21(2). – P. 223–244.

EFFECTS OF ANTHROPOGENIC POLLUTION ON MUCOSAL IMMUNITY

©O. V. Voytovych, O. M. Kamyshnyi

Zaporizhzhia State Medical University

SUMMARY. In this work investigates the possible impact of anthropogenic pollution on performance mucosal immunity of nose residents of Zaporizhzhia. Investigated samples of biological material obtained from the mucosa of the distal inferior turbinate 90 healthy young men residents of Zaporizhzhia. The study identified two groups: the first - material received from 33 residents conditionally clean areas, the second - the material received from 57 residents conditionally dirty areas Zaporizhzhia. Analyzed performance rhinocytogram and functional mucosal immunity of nose based on antigen detection immune fluorescence markers TLR-2 and TLR-4, LMP-2, Nf-KB and sIgA by ELISA.

Found that in terms of more intensive anthropogenic pollution is increased cytological signs of inflammation in the form of increased granulocyte content of the nasal mucosa and increased destruction of epithelial cells. Revealed tensions mucosal immunity of nose grounds imbalance immune regulatory mechanisms.

KEY WORDS: mucosal immunity, hereditary immunity, immunoglobulin A, anthropogenic pollution.