

ВЛИЯНИЕ ПЫЛЕЙ ХРИЗОТИЛ-АСБЕСТА И ЦЕОЛИТОВ НА ГЕНЕРАЦИЮ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА АЛЬВЕОЛЯРНЫМИ МАКРОФАГАМИ И ГРАНУЛОЦИТАМИ

В.А.ГУСЕВ, О.С.ЛОМОНОСОВА, Б.Т.ВЕЛИЧКОВСКИЙ

НИИ медицины труда РАМН, Москва

Выявленные разнообразные характеристики влияния пылей асбеста, морденита, клиноптилолита и эрионита на суммарную генерацию активных форм кислорода альвеолярными макрофагами и генерацию O_2^- и H_2O_2 гранулоцитами позволяют связать ряд из них с особенностями биологического действия этих пылей. Установлено, что наиболее сильными активирующими свойствами обладает пыль хризотил-асбеста, а наиболее цитотоксичной является пыль клиноптилолита.

Ключевые слова: альвеолярные макрофаги, гранулоциты, асбест, цеолиты, супероксидные радикалы, перекись водорода.

Введение. Альвеолярные макрофаги и гранулоциты играют важнейшую роль в развитии пылевой патологии легких [1, 2]. Исследованиями последних лет доказано, что фагоцитоз фиброгенных минеральных пылей сопровождается активацией кислородозависимой бактерицидной системы макрофагов и гранулоцитов, связанной с генерацией высокореакционноспособных и токсичных активных форм кислорода [1-3]. Изучение роли конкретных форм активного кислорода в механизмах цитотоксического действия минеральных пылей на фагоциты может стать основой для разработки новых методов гигиенической оценки минеральных пылей и поиска средств патогенетической терапии заболеваний легких пылевой этиологии. В настоящей работе изучено влияние пыли минералов хризотил-асбеста и цеолитов [4] на генерацию активных форм кислорода альвеолярными макрофагами кроликов и генерацию супероксидных радикалов и перекиси водорода гранулоцитами человека.

Методика. В экспериментах использовали 22 кролика-самца породы Шиншила и кровь 25 доноров. Альвеолярные макрофаги выделяли при эндобронхеальной промывке легкого кролика раствором Хенкса [5]. Клетки пятикратно промывали 40 мл того же раствора. Гранулоциты из крови человека выделяли методом [6]. Чистоту клеточных фракций контролировали при морфологическом изучении мазка суспензии клеток в плазме, после его окраски по Папенгейму. Исследование суммарной генерации активных форм кислорода проводили по бессубстратному восстановлению нитросинего тетразолиевого до формазана [7]. Альвеолярные макрофаги в количестве 3×10^6 инкубировали 15 минут при 37°C в 1 мл раствора Кребс-Рингера, содержащего 0,5 мМ CaCl_2 , 10 мМ глюкозы и 0,49 мМ нитросинего тетразолиевого. В пробы добавляли исследуемую пыль. Реакцию останавливали добавлением 5 мл 0,5 N HCl. Образовавшийся формазан экстрагировали из осадка 4 мл пиридина при нагревании в течение 15 минут в кипящей водяной бане и измеряли в супернатанте интенсивность поглощения при 515 нм. Интенсивность генерации супероксидных радикалов гранулоцитами оценивали по количеству ингибируемого супероксиддисмутазой восстановленного цитохрома C [8]. Инкубационная среда содержала раствор Хенкса, 50 мкМ цитохром C ("Sigma"), 10 мМ

глюкозы и бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл). Гранулоциты ($1,5 \times 10^6$ клеток инкубировали в 1,5 мл среды) в течение 15 мин при 37°C. Реакцию останавливали в ледяной бане. Оптическую плотность супернатанта измеряли при 550 нм. Генерацию перекиси водорода определяли по опосредованному пероксидазой окислению фенолового красного [9]. Инкубационная среда содержала раствор Хенкса, 0,28 мМ фенолового красного ("Sigma"), пероксидазу хрена (50 мкг/мл) и 1 мМ азид натрия. Гранулоциты ($1,5 \times 10^6$ клеток в 1,5 мл среды) инкубировали при 37°C в течение 15 минут. Реакцию останавливали добавлением 15 мкл 1 н NaOH. Оптическую плотность измеряли при 610 нм.

Результаты и обсуждение. При инкубации альвеолярных макрофагов с пылью хризотил-асбеста наблюдается высокая интенсивность восстановления нитросинего тетразолиевого (рис. 1). Полученные значения превышают аналогичные наши данные для кварцевой пыли [10]. Влияние пылей цеолитов на генерацию активных форм кислорода пока трудно прямо связать с особенностями их патологического влияния на организм [4]. Обращают внимание высокие стимулирующие свойства пыли морденита, сопоставимые с таковыми для пыли хризотил-асбеста. Еще интереснее своеобразный вид графика, отражающего взаимодействие альвеолярных макрофагов с пылью клиноптилолита. Резкое увеличение уровня суммарной генерации активных форм кислорода при инкубации небольших количеств этой пыли с клетками быстро сменяется падением при инкубации с более значительными дозами пыли. Это указывает, по нашему мнению, на гибель большей части макрофагов в суспензии клеток. Очевидно, даже очень резкая активация оставшегося малого числа еще жизнеспособных альвеолярных макрофагов оказалась недостаточной и суммарный эффект восстановления нитросинего тетразолиевого понизился. По-видимому, при определении цитотоксичности пыли по параметрам, величина которых зависит не только от активации макрофагов, но и от доли поврежденных клеток, следует ступенчато увеличивать дозу исследуемых пылевых образцов до тех пор, пока для каждого из них не наступит снижение регистрируемого эффекта. Тогда судить о степени цитотоксичности пылевых образцов можно будет по двум величинам. Во-первых, по величине восстановления нитросинего

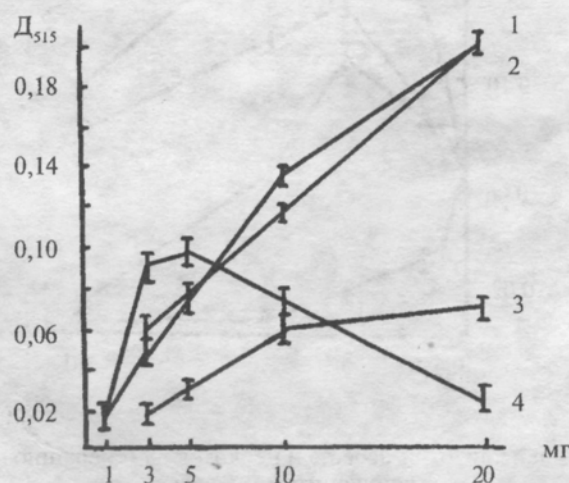


Рис. 1. Влияние пылей хризотил-асбеста и цеолитов на восстановление нитросинего тетразолиевого до формазана альвеолярными макрофагами кроликов.

По оси абсцисс — количество пыли (в мг); по оси ординат — оптическая плотность (в ед.). 1. — пыль морденита; 2. — пыль хризотил-асбеста; 3. — пыль эрионита; 4. — пыль клиноптилолита.

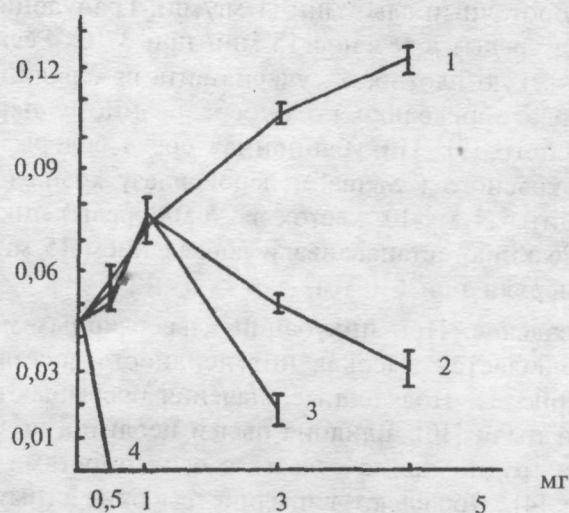


Рис. 2. Влияние пылей хризотил-асбеста и цеолитов на генерацию супероксидных радикалов гранулоцитами человека.

По оси абсцисс — количество пыли (мг); по оси ординат — содержание O_2^- (в нмолях на 10^6 клеток за 1 мин). 1. — пыль хризотил-асбеста; 2. — пыль эрионита; 3. — пыль морденита; 4. — пыль клиноптилолита.

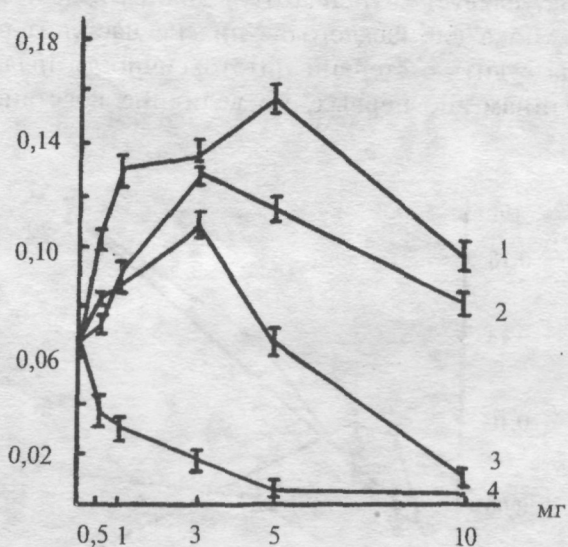


Рис. 3. Влияние пылей хризотил-асбеста и цеолитов на генерацию перекиси водорода гранулоцитами человека.

По оси абсцисс — количество пыли (мг); по оси ординат — содержание H_2O_2 (в нмолях на 10^6 клеток за 1 мин). 1. — пыль морденита; 2. — пыль эрионита; 3. — пыль клиноптилолита; 4. — пыль хризотил-асбеста.

тетразолиевого в том диапазоне пылевых доз, в котором ни для одного из образцов еще не наблюдается эффекта. В нашем случае эта доза 3 мг. При этой дозе интенсивность восстановления нитросинего тетразолиевого клиноптилолитом в 2 раза выше, чем хризотил-асбестом. Во-вторых, о степени цитотоксичности пыли можно судить по той “критической” концентрации исследуемого образца, за которой выявляется отчетливое снижение определяемого эффекта. В нашем случае “критическая” концентрация была достигнута только для клиноптилолита. Она равнялась 5 мг. Таким образом, и в том, и в другом случаях выявляется особо высокая степень цитотоксичности исследованного образца клиноптилолита. Пыль эрионита оказывает сравнительно слабое влияние на суммарную генерацию активных форм кислорода альвеолярными макрофагами.

Из данных, представленных на рис. 2, видно, что сильное стимулирующее влияние на экстрацеллюлярную генерацию супероксидных радикалов гранулоцитами оказывает пыль хризотил-асбеста. Оно также значительно превышает наши данные для кварцевой пыли [10]. Это подтверждает вывод о том, что пыль хризотил-асбеста является более сильным активатором респираторного взрыва фагоцитов, чем кварцевая пыль. С этим хорошо согласуются результаты работы [11], в которой показано, что величина хемилюминесцентного ответа при стимуляции гранулоцитов различными пылями убывает в следующей последовательности: хризотил-асбест, кварц, крокидолит, антофилит. Примечательным является результат, свидетельствующий о практически полном подавлении спонтанной генерации супероксидных радикалов гранулоцитами пылью клиноптилолита уже в минимальной концентрации. Это является, по-видимому, следствием гибели большей части клеток под влиянием уже минимальной дозы пыли, что указывает, в частности, на большую чувствительность к кислородным радикалам гранулоцитов человека, чем альвеолярных макрофагов кролика. Относительно невысокий фиброгенный потенциал пыли клиноптилолита [12], возможно, указывает на то, что высокая степень цитотоксичности в большей мере обуславливает развитие воспаления (альвеолита), чем фиброза [4]. Пыли морденита и эрионита стимулировали генерацию супероксидных радикалов лишь в небольших концентрациях. Усиление хемилюминесцентного ответа при взаимодействии пыли эрионита с гранулоцитами и моноцитами человека зарегистрировано также в работе [13]. Еще сложнее интерпретация результатов исследования влияния пыли на образование пероксида водорода, так как при этом следует учитывать не только выживание клеточных элементов, но и химические превращения активных форм кислорода на каталитических центрах пограничного слоя пылевых частиц [14-15].

При рассмотрении данных по влиянию исследованных пылей на экзогенную генерацию перекиси водорода гранулоцитами (рис. 3) обращает внимание снижение регистрируемого ее уровня по сравнению с интактными клетками, при инкубации их с пылью хризотил-асбеста. Это объясняется, вероятно, каталитическим распадом перекиси водорода на поверхности указываемого минерала [14, 15]. Пыли всех цеолитов в небольших концентрациях оказывают заметный стимулирующий эффект на генерацию перекиси водорода гранулоцитами. Снижение генерации перекиси водорода под влиянием морденита наблюдается при дозе 5 мг, эрионита и клиноптилолита при дозе 3 мг. В наибольшей мере оно выражено для клиноптилолита, характеризующегося самой высокой цитотоксичностью. Смещение “критической” концентрации пыли цеолитов в экспериментах, отраженных на рис. 3, по сравнению с рис. 2 остается пока неясным. Скорее всего, этот сдвиг обусловлен различной устойчивостью гранулоцитов, взятых у разных доноров.

Таким образом, выявленные разнообразные характеристики влияния пылей хризотил-асбеста, морденита, клиноптилолита и эрионита на суммарную генерацию активных форм кислорода альвеолярными макрофагами кроликов и генерацию O_2^- и H_2O_2 гранулоцитами человека позволяют связать ряд из них с особенностями биологического действия этих пылей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Величковский Б.Т. // Медицина труда и профессиональная экология. — 1994. — N 5-6. — С. 1-8.
2. Гусев В.А. Роль мононуклеарных и полиморфонуклеарных фагоцитов в патогенезе пылевой патологии легких. — Дисс. докт. — Москва, 1994.
3. Гусев В.А., Даниловская Е.В. // Вопр. мед. химии. — 1987. т. 33 — N 5. — С. 9-15.
4. Махонько М.И., Наумов Д.Б., Адамов О.А. // Гигиена и санитария. — 1994. — N 7. — С. 26-30.
5. Myrvic Q.N., Leake E.S., Faris B. // J. Immunol. — 1961. — V. 86. — P. 128-132.
6. Boyum A. // Scand. J. Clin. lab. Invest. — 1968. — V. 21 (Suppl. 97). — P. 77-89.
7. Baehner R.L., Nathan D.G. // New Engl. J. Med. — 1968. — V. 278. — P. 971-976.
8. Babior B.M., Kipnes R.S., Curnutte J.T. // J. Clin. Invest. — 1973. — V. 52. — P. 741-744.
9. Pick F., Keissary J. // J. Immunol. Meth. — 1980. — V. 38. — P. 161-170.
10. Gusev V.A., Danilovskaya Ye.V., Vitolkina O.Ye., Lomonosova O.S., Velichkovsky B.T. // Brit. J. Ind. Med. — 1993. — V. 50. — P. 732-735.
11. Kloskars M., Hedenborg M., Vanhala M. // Arch. environ health. — 1990. — V. 45. — P. 8-14.
12. Tatrai E., Wjnorovits I., Ungvary Gy. // Exp. patol. — 1991. — V. 43. — P. 41-46.
13. Urano N., Yano E., Evans P.H. // Environ. Res. — 1991. — V. 54. — P. 74-81.
14. Величковский Б.Т., Черемисина З.П., Суслова Т.Б. и др. // Гигиена труда и профессиональные заболевания. — 1986. — N 9. — С. 5-9.
15. Weitsman S.A., Graceffa P. // Arch. Biochem. — 1984. — V. 228. — P. 373-376.

EFFECT OF CHRYSOTILE-ASBESTOS AND ZEOLITES DUST ON GENERATION OF ACTIVE OXYGEN SPECIES BY ALVEOLAR MACROPHAGES AND GRANULOCYTES

Gusev V.A., Lomonosova O.S., Velichkovsky B.T.

Institute of Occupational Health RAMS, Moscow, Russia

Different characteristics of the influence of dusts of chrysotile — asbestos, mordenite, erionite and clinoptilolite on the total generation of the active forms of oxygen by the alveolar macrophages and the generation of O_2^- and H_2O_2 by the granulocytes give the possibility to connect some of these characteristics with the peculiarity of biological action these dusts. It is discovered the most strong activating properties has the dust of chrysotile — asbestos, and the most cytotoxic effect has the dust of clinoptilolite.

Key words: alveolar macrophage, granulocyte, asbestosis, zeolites, superoxide radical, hydrogen peroxide.