Биомедицинская химия, 2005, том 51, вып. 6, с. 643-648.

УДК 615.9: 576.344 + 616 – 056.3

ВЛИЯНИЕ НИЗКОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ СЕРНИСТОГО АНГИДРИДА НА МЕТАБОЛИЧЕСКИЙ СТАТУС ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ МОРСКИХ СВИНОК, СЕНСИБИЛИЗИРОВАННЫХ АЛЛЕРГЕНОМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ПРИРОДЫ

М.В. Долгушин, Л.М. Соседова

НИИ медицины труда и экологии человека – Филиал Научного центра медицинской экологии ВСНЦ СО РАМН, 665827, Иркутская обл., г. Ангарск, а/я 1170, тел.: (8-395-1) 55-90-70, факс: (8-395-1) 55-40-75, эл. почта: imt@angarsk.ru

Изучали влияние сернистого ангидрида (в концентрации 2-4 мг/м^3) на метаболический статус лимфоцитов периферической крови сенсибилизированных морских свинок при различной последовательности биологического (аллергенного) и химического воздействий. С этой целью оценивали активность сукцинатдегидрогеназы, лактатдегидрогеназы и состояние лизосом до введения разрешающей дозы аллергена. Показано, что при сочетанном влиянии факторов различной природы изменения активности дегидрогеназ (в отличие от характера ответной реакции со стороны лизосом) обнаруживают определённую взаимосвязь со степенью выраженности специфических реакций гиперчувствительности.

Ключевые слова: лимфоциты, метаболический статус, сенсибилизация, сернистый ангидрид.

ВВЕДЕНИЕ. Как известно, специфические реакции замедленной и немедленной гиперчувствительности, обусловленные воздействием биологических аллергенов, могут быть усилены в результате дополнительной химической нагрузки, даже при относительно низкой интенсивности последней [1-3]. Учитывая тот факт, что возникновение функциональных нарушений, как на уровне иммунной системы, так и организма в целом во многих случаях сопровождается изменениями характера обменных процессов в лимфоцитах периферической крови [4,5], оценка метаболического статуса этих клеток при сочетанном влиянии биологического и химического факторов представляется весьма актуальной.

В настоящее время детально изучены закономерности ответной реакции со стороны гидролаз и оксидоредуктаз в лимфоцитах периферической крови после воздействия аллергенов биологической природы [5]. Однако влияние последних на уровень активности указанных ферментов в иммунокомпетентных клетках в случае дополнительной химической экспозиции ранее практически не изучалось, что и определило направленность нашей работы. При этом цель исследования состояла в оценке характера обменных сдвигов в зависимости от степени выраженности иммунопатологического процесса. Определение ферментативной активности проводилось нами до введения разрешающей дозы аллергена, что может дать информацию о прогностической значимости выявленных метаболических изменений.

МЕТОДИКА. Постановка эксперимента осуществлялась по разработанной нами схеме, позволяющей моделировать степень выраженности реакций гиперчувствительности в зависимости от последовательности поступления биологического и химического факторов [3].

В опыте использовано 60 морских свинок, массой 250–350 г, предоставленных ГНЦ ВБ “Вектор”. Все животные были разделены на 6 групп (по 10 особей в каждой). Особи 1-й группы подвергались изолированному сенсибилизирующему воздействию, 2-й группы - изолированному химическому, а 3-й, 4-й и 5-й групп – сочетанному влиянию биологического и химического факторов, 6-я группа была контрольной. В качестве сенсибилизирующего агента использовали белоксодержащую пыль (БСП), приготовленную из готового продукта микробиологического производства кормовых дрожжей, а в качестве химического – сернистый ангидрид (SO_2).

Сенсибилизацию морских свинок осуществляли однократным введением 500 мкг БСП в смеси с неполным адъювантом Фрейнда под апоневроз задней лапки. Ингаляционное воздействие сернистым ангидридом проводили в течение 10 дней (в концентрации 2-4 мг/м^3), по 4 часа ежедневно. В случае сочетанного поступления факторов различной природы ингаляционную экспозицию диоксидом серы начинали проводить за 14 дней до введения БСП (3-я группа), в день введения БСП (4-я группа) или через 14 дней после введения БСП (5-я группа).

Метаболический статус лимфоцитов опытных животных оценивали после прекращения ингаляции сернистым ангидридом (2-я и 5-я группы) или через 14 дней после введения БСП (1-я, 3-я и 4-я группы). При этом на мазках периферической крови цитохимическими методами выявляли активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) [6], лактатдегидрогеназы (ЛДГ) [7] и кислой фосфатазы (КФ) [8]. Результаты выражали в единицах цитохимического индекса. Реакцию на КФ использовали для определения состояния лизосомальных мембран, выявляя уровень “свободной”, “общей” и “связанной” активности фермента [9].

После забора крови осуществляли постановку тестов немедленной и замедленной гиперчувствительности. Оценивали наличие кожно-сенсибилизирующих антител, выявляемых при помощи реакции пассивной кожной анафилаксии по Овери (РПКА) [10], характер положительных внутрикожных аллергических проб [11] и уровень реакции антигенспецифического розеткообразования (РАСРО) [12]. Результаты определения РПКА и внутрикожных аллергических проб выражали в сантиметрах по величине прокрашивания кожи или соответственно по величине отёка и эритемы, а уровень РАСРО – в процентном числе антигенреактивных лимфоцитов (образующих розетки).

Достоверность полученных данных оценивали при помощи непараметрического критерия Вилкоксона – Манна – Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Метаболические сдвиги в лимфоцитах периферической крови по отношению к контролю отмечались у животных во всех опытных группах (табл. 1). При этом характер изменения уровня СДГ и ЛДГ зависел от специфики экзогенного воздействия. Возникновение состояния сенсибилизации в связи с введением БСП (группа 1) сопровождалось достоверным снижением активности этих ферментов, тогда как изолированное воздействие сернистого ангидрида (группа 2) приводило к стимуляции СДГ при параллельном уменьшении интенсивности гликолиза. Влияние химического фактора на уровень дегидрогеназ лимфоцитов сенсибилизированных морских свинок обнаруживалось в случае начала ингаляции SO_2 в момент введения БСП (4-я группа) или через 14 дней после сенсибилизации данным аллергеном (5-я группа). При этом были выявлены различия в направленности ответной реакции со стороны СДГ и ЛДГ: в лимфоцитах животных 4-й группы блокировался эффект ингибирования этих ферментов (отмеченный при изолированном введении БСП); а у морских свинок 5-й группы, изменение активности дегидрогеназ указывало на снижение интенсивности митохондриального окисления при параллельной стимуляции гликолиза. Возрастание уровня КФ по отношению к контролю происходило в лимфоцитах всех подопытных животных. Однако в случае сочетанного поступления факторов различной природы увеличение активности “свободной” КФ сопровождалось снижением “связанной”, что указывало на возникновение дестабилизации лизосомальных мембран, не зависящей от характера изменения активности дегидрогеназ.

Таблица 1. Характер изменения активности ферментов в лимфоцитах периферической крови морских свинок при изолированном и сочетанном воздействиях белоксодержащей пыли (БСП) и сернистого ангидрида (SO_2).

Группа	СДГ	ЛДГ	КФ "свободная"	КФ "общая"	КФ "связанная"
1-я	0,17 ± 0,07*	0,38 ± 0,05*	1,13 ± 0,08*	1,75 ± 0,12*	0,61 ± 0,08
2-я	0,89 ± 0,06*	0,55 ± 0,05*	0,76 ± 0,03*	1,17 ± 0,06	0,42 ± 0,05
3-я	0,19 ± 0,04*	0,25 ± 0,04*	1,05 ± 0,05*	1,36 ± 0,08*	0,30 ± 0,06*
4-я	0,65 ± 0,03	0,82 ± 0,03	1,05 ± 0,06*	1,41 ± 0,08*	0,40 ± 0,07
5-я	0,34 ± 0,03*	0,96 ± 0,05*	0,90 ± 0,05*	1,20 ± 0,07	0,27 ± 0,04*
6-я	0,65 ± 0,06	0,77 ± 0,05	0,56 ± 0,04	1,10 ± 0,04	0,55 ± 0,06

Примечания: Показана достоверность различий по сравнению с контролем (6-я группа),*- $p < 0,01$. 1-я группа – изолированное введение БСП; 2-я группа – изолированное воздействие SO_2; 3-я группа – БСП вводили после воздействия SO_2; 4-я группа – БСП вводили в день начала ингаляции SO_2; 5-я группа – БСП вводили за 14 дней до начала воздействия SO_2. Результаты представлены в единицах цитохимического индекса.

Анализ полученных результатов в сопоставлении с литературными данными позволяет говорить о том, что статистически значимые отклонения в активности СДГ, ЛДГ и КФ, выявленные нами при изолированном воздействии БСП (1-я группа), по существу имеют закономерный характер, отражая заключительную фазу ответной реакции на первичное введение антигена [4,5,13,14]. В то же время метаболические сдвиги, отмеченные у животных 2-й группы (изолированное воздействие SO_2), оцениваются как компенсаторные, направленные на более рациональное расходование субстратов окисления [15]. На отсутствие токсического повреждения клеток, контактирующих с сернистым ангидридом в аналогичной концентрации, указывали и другие авторы [16]. Что касается характера ответной реакции со стороны КФ при сенсибилизации аллергенами биологической природы, то в данном случае возрастание фосфатазной активности в лейкоцитах периферической крови не обнаруживает взаимосвязи с дестабилизацией мембран лизосом, независимо от воздействующей дозы [13].

В ходе оценки метаболических изменений, выявленных в лимфоцитах периферической крови морских свинок при сочетанном воздействии БСП и SO_2, принимались во внимание результаты параллельного определения интенсивности аллерготестов (табл. 2). При этом в случае начала ингаляции сернистым ангидридом после введения БСП, то есть, у животных 5-ой группы, была отмечена наибольшая степень выраженности средних значений параметров как немедленной, так и замедленной гиперчувствительности (реакций пассивной кожной анафилаксии, торможения миграции лейкоцитов и кожных аллергических проб). Сочетанное влияние БСП и SO_2 в иной последовательности (на морских свинок 3-й и 4-й групп) не приводило к достоверному увеличению вышеуказанных показателей гиперчувствительности (ГЧ) по отношению к животным, подвергавшимся изолированному воздействию аллергена.

Таблица 2. Изменение показателей аллерготестов у морских свинок при сочетанном воздействии белоксодержащей пыли (БСП) и сернистого ангидрида (по отношению к животным, сенсибилизированным БСП).

Характер воздействия	Кожные пробы с аллергеном (см)	РПКА (см)	РАСРО (%)
Изолированное введение БСП (1-я группа)	0,38 ± 0,04	0,28 ± 0,02	20,2 ± 1,8
Введение БСП – после воздействия SO_2 (3-я группа)	0,35 ± 0,07	0,29 ± 0,04	21,4 ± 1,7
Начало воздействия SO_2 – в день введения БСП (4-я группа)	0,64 ± 0,13	0,30 ± 0,03	23,7 ± 2,2
Начало воздействия SO_2 – через 14 дней после введения БСП (5-я группа)	0,97 ± 0,15**	0,41 ± 0,06*	26,6 ± 1,4**

Примечание: Показана достоверность различий по сравнению с 1-й группой (* - $p < 0,05$; **- $p < 0,01$).

Учитывая результаты определения параметров аллергореактивности, можно сделать вывод о том, что обнаруженные до момента повторного (разрешающего) введения БСП изменения активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови определённым образом зависят от уровня развития иммунопатологического процесса. В том случае, когда сочетанное действие биологического и химического факторов приводит к прогрессированию выраженности аллергических реакций, для лимфоцитов периферической крови характерно уменьшение активности СДГ на фоне стимуляции гликолиза. Напротив, в группах животных с незначительным развитием гиперчувствительности (3-я и 4-ая), подобного изменения в состоянии дегидрогеназ не наблюдается. Отмечается сохранение активности СДГ и ЛДГ либо на уровне контроля (4-я группа), либо на уровне, характерном для сенсибилизации, не отягощённой химическим воздействием (3-я группа). Таким образом, есть основание говорить о прогностической значимости определения активности СДГ и ЛДГ в лимфоцитах периферической крови при сочетанном влиянии биологического и химического факторов, поскольку отмеченные в данном случае дифференцированные изменения уровня этих ферментов предшествуют проявлению специфических реакций ГЧ, то есть имеют место до введения разрешающей дозы аллергена.

Согласно результатам исследований, проведенных ранее, снижение уровня СДГ в лимфоцитах периферической крови при параллельном возрастании активности ЛДГ и КФ может отражать усиление аллергических расстройств при осложнении силикоза туберкулёзной интоксикацией и рассматриваться в качестве проявления токсического влияния на субклеточные структуры [17-19]. Однако, оценивая факт возрастания активности КФ в случае последовательного введения БСП и SO_2 как повреждающий эффект, не следует однозначно трактовать происходящее параллельно снижение уровня СДГ как результат непосредственного токсического влияния на митохондрии, а стимуляцию ЛДГ – как имеющую исключительно компенсаторное значение. В частности, одной из причин вышеуказанного разнонаправленного изменения активности дегидрогеназ при воздействии химических факторов может быть наличие в периферической крови менее дифференцированных (незрелых) форм лейкоцитов, поскольку сочетание низкого уровня СДГ с высокой интенсивностью гликолиза является характерным для лимфобластов [4,7].

Таким образом, оценка уровня активности окислительных ферментов и состояния лизосом позволяет зафиксировать дифференцированное влияние сернистого ангидрида в низкой концентрации на метаболический статус лимфоцитов морских свинок, сенсибилизированных белоксодержащей пылью.

При этом отмеченные до введения разрешающей дозы аллергена изменения со стороны дегидрогеназ сукцината и лактата (в отличие от направленности ответной реакции со стороны лизосом) обнаруживают определённую взаимосвязь с уровнем специфических реакций замедленной и немедленной гиперчувствительности. Полученные данные указывают на то, что снижение активности СДГ при параллельной стимуляции ЛДГ свидетельствует о предрасположенности к прогрессированию иммунопатологического процесса. В связи с этим обоснованно говорить о перспективе использования цитохимического теста на СДГ и ЛДГ в лимфоцитах при обследовании лиц, подверженных риску развития аллергопатологии в результате сочетанного влияния биологического и химического факторов.

ЛИТЕРАТУРА.

1. *Немыря В.И., Стомахина Н.В., Рябова М.А.* (1993) Гигиена и санитария, №11, 10-12.
2. *Соседова Л.М., Бенеманский В.В.* (2000) Медицина труда, № 8, 21-24.
3. *Соседова Л.М., Хамуев Г.Д., Будяк Е.В., Долгушин М.В.* (1998) В сб. материалов конф.: Гигиенические и профпатологические проблемы регионов Сибири. Новокузнецк, с. 151-154.
4. *Робинсон М.В.* (1994) Морфоцитохимические особенности лимфоцитов в норме, при дестабилизирующих воздействиях и при аутоиммунных процессах и заболеваниях. Дисс. докт. наук, Новосиб. мед. ин-т, Новосибирск.
5. *Робинсон М.В., Топоркова Л.Б., Труфакин В*.А. (1986) Морфология и метаболизм лимфоцитов, Наука, Новосибирск.
6. *Меньшиков В.В.* (ред.) (1987) Лабораторные методы исследования в клинике. Медицина, М.
7. *Хейхоу Ф.Г.Дж., Кваглино Д.* (1983) Гематологическая цитохимия (пер. с англ), Медицина, М.
8. *Алиев В.А., Андреева В.П.* (1988) Лаб. дело, №9, 27-30.
9. *Михайлов Г.Т.* (1984) Лаб. дело, №8, 468-471.
10. *Ovary Z.* (1952) Int. Arch. Allergy, **3**, 393-396.
11. Методические рекомендации по изучению аллергенного действия при обосновании предельно – допустимых концентраций кормового белка в атмосферном воздухе (1983), М.
12. *Литовская А.В.* (1986) Лаб. дело, №2, 105-107.
13. *Долгушин М.В.* (2000) В сб. материалов конф. к 70-летию медико-профилактического факультета Иркутского гос. мед. ун-та. Иркутск, с. 102-104.
14. *Смирнов В.С., Мерецков В.В., Лебединский В.А., Гарин Н.С.* (1983) Иммунология, №3, 43-46.
15. *Сейц И.Ф., Луганова И.С.* (1967) Биохимия клеток крови в норме и при лейкозах, Медицина, М.
16. *Mirle Ch., Fenske G.* (1980) Monatsh. Veterinärmedizin, **35** (22), 846-849.
17. *Соколов В.В., Нарциссов Р.П., Иванова Л*.А. (1975) Цитохимия ферментов в профпатологии, Медицина, М.
18. *Соколов В.В., Иванова Л.А.* (1976) В кн.: Профессиональные аллергозы, Рига, 142-149.
19. *Иванова Л.А.* (1991) Цитохимия ферментов клеток крови в диагностике, оценке характера течения и эффективности терапии некоторых профессиональных заболеваний. Автореф. дисс. докт. наук, НИИ гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР, Москва.

Поступила: 08. 04. 2003

INFLUENCE OF LOW CONCETRATION OF SULPHURIC ANHYDRIDE ON METABOLIC STATUS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES IN GUINEA PIGS SENSIBILISED WITH A BIOLOGICAL ALLERGEN

M.V. Dolgushin, L.M. Sosyedova

Research Institute of Industrial Medicine and Human Ecology,
Branch of Scientific Centre of Medical Ecology, Eastern – Siberian Scientific Centre of RAMS,
Angarsk, Irkutsk region, 665827 Russia; tel.: (8-395-1) 55-90-70;
fax: (8-395-1) 55-40-75; e-mail: imt@angarsk.ru

The influence of sulphuric anhydride (2–4 mg/m^3) on the metabolic status of peripheral blood lymphocytes of sensibilised guinea pigs with different sequence of biological (allergenic) and chemical exposure has been studied. The metabolic state was evaluated by histochemical assay of succinate and lactate dehydrogenases and acid phosphatase. The changes in activities of dehydrogenases were found to indicate a definite relationship with specific responses of combined effects of different factors.

Key words: lymphocytes, metabolic status, hypersensitivity, sulphuric anhydride.