

ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ИНТЕНСИВНОСТИ ИНДУКЦИИ АРИЛГЛЕВОДОРОДНОГО РЕЦЕПТОРА ЛИМФОЦИТОВ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ 2,3,7,8-ТЕТРАХЛОРДИБЕНЗО-П-ДИОКСИНА

А. В. Горшенин

*Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии
Федерального медико-биологического агентства*

Показана возможность прогноза уровня индукции Ah-рецептора в лимфоцитах человека при воздействии 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксина на основе изучения спонтанной и индуцированной активности Ah-рецептора лимфоцитов человека и лабораторных животных в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Ключевые слова: Ah-рецептор, лимфоцит, 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксин, токсичность.

PROGNOSTICATING THE INTENSITY OF INDUCING AH-RECEPTOR OF HUMAN LYMPHOCYTES WHEN EXPOSED TO 2,3,7,8-TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN

A. V. Gorshenin

The possibility of prognosticating the level of induction of Ah-receptor in human lymphocytes when exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin was demonstrated by studying the spontaneous and induced activity of Ah-receptor in human and animals lymphocytes *in vitro* and *in vivo*.

Key words: Ah-receptor, lymphocyte, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, toxicity.

Анализ механизмов действия токсикантов показывает, что существенное место в реализации их токсических эффектов занимает модуляция активности специфических для данных веществ ферментных и рецепторных систем иммунокомпетентных клеток [1, 5, 7]. Известно, что в механизме токсического действия 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-п-диоксина (2,3,7,8-ТХДД, диоксин) важнейшее место занимает активация арилгледородного рецептора (Ah-рецептора) [1, 4, 8]. При воздействии на организм диоксинов наибольший уровень Ah-рецептора отмечается в гепатоцитах, однако индукция происходит и в ряде других органов и тканей, в том числе в клетках иммунной системы [1, 6].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Оценка возможности прогнозирования уровня индукции Ah-рецептора в лимфоцитах человека при воздействии 2,3,7,8-ТХДД.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использован 2,3,7,8-тетрахлордibenзо-пара-диоксин, содержащий не менее 95 % основного вещества.

Эксперименты проведены на мышах линий C57Bl/6, CBA, AKR, F1 (C57Bl/6×DBA/2), нелинейных крысах, крысах линий Awgust, Wistar, морских свинок. При работе с экспериментальными животными руководствовались требованиями приказа Минздрава СССР №755 от 12.08.1977 г. Животных выводили из эксперимента передозировкой диэтилового эфира. Помимо этого для исследования активности Ah-рецептора в лимфоцитах человека использовалась кровь здоровых доноров, отобранная в асептических условиях.

Активность Ah-рецептора определяли в условиях *in vivo* на 3-и сутки после внутрибрюшинного введения LD₅₀ ксенобиотика и *in vitro* — после 24 часов инкубации лимфоцитов с 5·10⁻⁴ мг/мл 2,3,7,8-ТХДД.

При исследовании уровня Ah-рецептора в моделях *in vitro* и *in vivo* селезенку экспериментальных животных выделяли в стерильных условиях, клеточную суспензию получали в гомогенизаторе Поттера. Лимфоциты из периферической крови и селезенки выделяли в градиенте плотности по Boyum [2]. Рабочая концентрация лимфоцитов крови человека и спленоцитов экспериментальных животных составила 2·10⁶ клеток в 1 мл. Количество жизнеспособных клеток — не менее 95 %. Культивирование клеток проводили в 96-луночных планшетах в среде RPMI 1640 с добавлением 10 % фетальной сыворотки, 2мМ L-глутамина, 100 мкг/мл гентамицина и 2·10⁻⁵ М 2-меркаптоэтанол в течение 72 часов для модели *in vivo* или 48 часов для модели *in vitro* в атмосфере, содержащей 5 % CO₂ при 100 % влажности. Затем для модели *in vitro* в культуре добавляли 2,3,7,8-ТХДД в концентрации 5·10⁻⁴ мг/мл. Инкубация культур клеток с диоксином составляла 24 часа. За 4 часа до конца инкубации в каждую лунку планшета добавляли по 2 мкКи [³H]-бенз(а)пирена (молярная активность 40...60 Ки/моль). По окончании инкубации клетки осадились на стекловолоконные фильтры, подсчет активности проб производился жидкостно-сцинтилляционным методом [3]. Контрольные пробы, не содержащие диоксина, анализировали аналогично опытным. Рассчитывали индекс индукции, равный отношению активности Ah-рецептора при воздействии диоксина к аналогичному показателю у интактных животных того же вида и линии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенные исследования показали, что активность Ah-рецептора у человека и интактных животных варьирует в широких пределах (табл.). Минимальный исходный уровень рецептора в лимфоцитах наблюдается у человека и мышей линии C57Bl/6, максимальный — у крыс линии Wistar. При воздействии 2,3,7,8-ТХДД индекс индукции колеблется от 1,2 раз (крысы линии Wistar) до 5 раз (крысы линии Awgust).

На рис. представлена зависимость между интенсивностью индукции Ah-рецептора *in vivo* и *in vitro* у различных видов и линий экспериментальных животных после воздействия 2,3,7,8-ТХДД.

Приведенные на рис. данные свидетельствуют об имеющейся связи степени индукции Ah-рецептора *in vitro* и *in vivo* (коэффициент корреляции Пирсона, равный 0,807) и, в связи с этим, о возможности использования данных показателей для прогноза состояния метаболизма 2,3,7,8-ТХДД при случайных отравлениях данным ксенобиотиком или профессиональном контакте с ним.

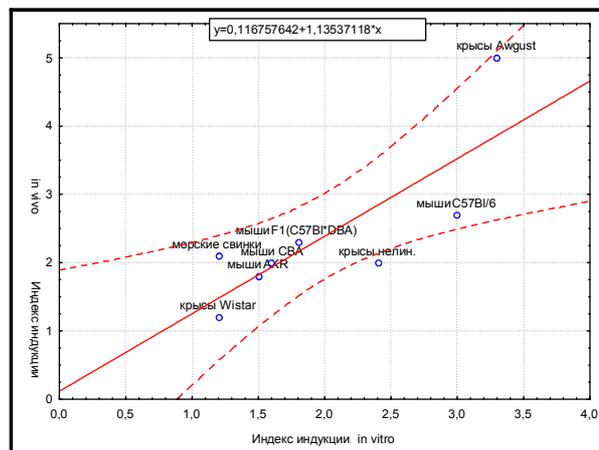


Рис. Интенсивность индукции Ah-рецептора *in vivo* и *in vitro* у различных видов и линий экспериментальных животных при воздействии 2,3,7,8-ТХДД

Исходя из известного уровня индукции *in vitro* для лимфоцитов человека (2,2) и базовых значений уровня Ah-рецептора, при поражении диоксином в дозе, равной LD₅₀, активность Ah-рецептора должна возрасти в 2,6 раза.

Показатели активности Ah-рецептора в лимфоцитах лабораторных животных и человека в норме и при воздействии 2,3,7,8-ТХДД в моделях *in vivo* и *in vitro*

| Вид, линия | Активность Ah-рецептора лимфоцитов при индукции <i>in vivo</i> , пМ/мин/10 ⁶ клеток (n) | | | Активность Ah-рецептора лимфоцитов при индукции <i>in vitro</i> , пМ/мин/10 ⁶ клеток (n) | | |
|------------------------|--|-----------------|-----------------|---|------------------|-----------------|
| | норма | индукция | индекс индукции | норма | индукция | индекс индукции |
| Мыши C57Bl/6 | 0,19 ± 0,03 (6) | 0,51 ± 0,05 (5) | 2,7 | 0,14 ± 0,01 (7) | 0,42 ± 0,03 (7) | 3,0 |
| Мыши F1(C57Bl/6*DBA/2) | 0,23 ± 0,02 (6) | 0,52 ± 0,06 (5) | 2,3 | 0,26 ± 0,01 (7) | 0,47 ± 0,03 (7) | 1,8 |
| Мыши АКР | 0,25 ± 0,04 (4) | 0,44 ± 0,05 (8) | 1,8 | 0,38 ± 0,13 (4) | 0,58 ± 0,23 (4) | 1,5 |
| Мыши СВА | 0,23 ± 0,02 (6) | 0,45 ± 0,07 (6) | 2,0 | 0,23 ± 0,03 (5) | 0,37 ± 0,02 (5) | 1,6 |
| Крысы нелинейные | 0,39 ± 0,08 (8) | 0,79 ± 0,12 (8) | 2,0 | 0,23 ± 0,03 (11) | 0,54 ± 0,07 (11) | 2,4 |
| Крысы Wistar | 2,10 ± 0,30 (5) | 2,47 ± 1,28 (5) | 1,2 | 3,76 ± 0,47 (5) | 4,59 ± 0,86 (5) | 1,2 |
| Крысы Awgust | 0,35 ± 0,10 (2) | 1,75 ± 0,76 (3) | 5,0 | 0,32 ± 0,09 (3) | 1,05 ± 0,10 (3) | 3,3 |
| Морские свинки | 0,71 ± 0,51 (4) | 1,49 ± 0,44 (4) | 2,1 | 0,75 ± 0,13 (3) | 0,89 ± 0,13 (3) | 1,2 |
| Человек | 0,15 ± 0,02 (8) | — | — | 0,12 ± 0,01 (9) | 0,26 ± 0,03 (9) | 2,2 |

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Взаимосвязь показателей интенсивности индукции Ah-рецептора в лимфоцитах лабораторных животных при воздействии 2,3,7,8-ТХДД в условиях *in vivo* и *in vitro* дает возможность прогнозировать токсикометрические параметры диоксида на основании интенсивности его метаболизма в культурах лимфоцитов. Учитывая высокую доступность иммунокомпетентных клеток человека для анализа, указанный метод можно применять для прогнозирования выраженности токсических эффектов диоксида и других веществ с аналогичным механизмом действия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мартынов А. И., Пинегин Б. В., Ярилин А. А. Оценка иммунного статуса человека в условиях воздействия химического и биологического фактора. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. — 304 с.
2. Boyum A. // Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. — 1967. — Vol. 21 (97). — P. 77—89.
3. Hayes A. W. Principles and Methods of Toxicology. — CRC Press, 2008. — 2270 p.
4. Kerkvliet N. I. // Biochemical Pharmacology. — 2009. — Vol. 77, № 4. — P. 746—760.
5. Luebke R. W., House R. V., Kimber I. Immunotoxicology and Immunopharmacology. — Boca Raton: CRC Press, 2007. — 672 p.

6. *Mimura J., Fujii-Kuriyama Y.* // *Biochimica et Biophysica Acta.* — 2003. — Feb. — Vol. 1619, № 3. — P. 263—268.

7. *Nijkamp F. P., Parnham M. J.* *Principles of Immunopharmacology.* — Springer, 2011. — 760 p.

8. *Singh K. P., Casado F. L., Opanashuk L. A., et al.* // *Biochemical Pharmacology.* — 2009. — Vol. 77, № 4. — P. 577—587.

Контактная информация

Горшенин Андрей Вадимович — к. м. н., заведующий лабораторией иммунологии ФГУП «Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии» ФМБА России, e-mail: gorshenin@nihtop.r

УДК 616.982.27+616.982.27-039:616-07

КОНСТРУИРОВАНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ИММУНОФЕРМЕНТНОЙ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ 200 KDA ВОЗБУДИТЕЛЯ МЕЛИОИДОЗА

Т. В. Замарина, Н. П. Храпова, И. И. Корсакова, Е. В. Пименова

*Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт,
Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра молекулярной биологии и генетики*

Представлена развернутая характеристика панели моноклональных антител против различных эпитопов гликопротеина капсулы 200kDa возбудителя мелиоидоза, описаны критерии подбора компонентов экспериментальной тест-системы иммуноферментной и определены ее диагностические возможности.

Ключевые слова: мелиоидоз, диагностика, моноклональные антитела, твердофазный иммуноферментный метод.

DESIGNING AN EXPERIMENTAL ELISA KIT BASED ON MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST 200 KDA ANTIGEN OF THE MELIOIDOSIS AGENT

T. V. Zamarina, N. P. Khrapova, I. I. Korsakova, E. V. Pimenova

A detailed description of monoclonal antibodies against glycoprotein 200 kDaB pseudomallei was provided. The criteria for selecting the components of the experimental ELISA kit were described and its diagnostic potential was estimated.

Key words: melioidosis, monoclonal antibodies, identification of pathogenic burkholderia, ELISA.

Мелиоидоз — опасное и потенциально смертельное заболевание людей, распространенное в эндемичных регионах юго-восточной Азии и Северной территории Австралии. Этиологический агент мелиоидоза, *Burkholderia pseudomallei*, широко распространен в почве и воде эндемичных зон [10]. Летальность при несвоевременно начатой терапии у больных мелиоидозом может достигать 90 %, а при лечении самыми современными препаратами в условиях стационара составляет от 19 % (Австралия) и до 51 % (Таиланд) [9].

Согласно принятой в нашей стране классификации, возбудитель мелиоидоза является микроорганизмом II группы патогенности для человека. С 2005 г. мелиоидоз внесен в перечень инфекций, требующих постоянного надзора в связи с расширением зон эндемичного распространения этого патогена, отсутствием зарегистрированных средств специфической профилактики, а также эффективных схем лечения данного заболевания.

Для экспресс- и ускоренного обнаружения возбудителя мелиоидоза применяют ряд иммунодиагностических тестов: метод флуоресцирующих антител (МФА), твердофазный иммуноферментный анализ (ТИФМ), а также реакцию непрямой гемагглютинации (РНГА) [2].

В последние годы возрос интерес к созданию иммунодиагностических препаратов на основе моноклональных антител (МКА) к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei*. Установлено, что выявление вирулентных штаммов возбудителя мелиоидоза, их дифференциация от авирулентных штаммов, обусловлено присутствием в капсуле бактерий гликопротеина с м. м. 200 kDa [5].

В связи с этим, одним из актуальных направлений в совершенствовании лабораторной диагностики мелиоидоза является разработка средств дифференциации вирулентных и авирулентных штаммов *B. pseudomallei*, выделяемых из проб клинического материала и объектов внешней среды [4].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка экспериментальной тест-системы иммуноферментной на основе МКА к гликопротеину 200 kDa *B. pseudomallei* и оценка ее диагностических возможностей.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали различные антигены (АГ) буркхольдерий II и III групп патогенности и гетерологичных микроорганизмов. Все этапы работы с живыми куль-