

ФУЛЛЕРЕНЫ C₆₀ УСИЛИВАЮТ ТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОЛУОЛА НА ИММУННЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА

Л.М. ПАЛИЦА, М.М. КОРДА

Тернопольский Государственный медицинский университет им. И.Я. Горбачевского,
Украина, г. Тернополь**ОРГАНІЗМ ІММУН ХОЛАТИГА ФУЛЛЕРЕН C₆₀ ВА ТОЛУОЛНИНГ ТОКСИК ТАЪСИРИ**

Л.М. ПАЛИЦА, М.М. КОРДА

И.Я. Горбачевский номидаги Тернополь Давлат медицина университети, Украина, Тернополь

FULLERENES C₆₀ ENHANCE THE TOLUENE TOXICITY ON THE IMMUNE STATUS OF ORGANISM

L.M. PALYTSIA, M.M. KORDA

I.Ya. Horbachevsky Ternopil State Medical University

Охирги ўн йилда нанотехнологияларнинг шиддат билан ривожланиб бориши ҳисобига кимёвий воситалар билан организмга наноқисмларнинг токсикологик хусусиятларини фундаментал тушиниш кераклиги муҳим аҳамиятга эга. Ушбу тадқиқотдан мақсад тажрибада фуллерен C₆₀ ва толуол кимёвий токсикантини иммун тизим гуморал занжири ва цитокинларда ўзгариш чақиришини текшириш. Толуол интраперитонеал юборилган каламушлар қон зардобиди G синфидаги иммуноглобулинлар, циркуляциядаги иммун комплекслар, TNF-α, IL-1β, IL-6 яллигланишига қарши цитокинлар миқдорининг ошиши ва IL-4, IL-10 яллигланишига қарши цитокинлар миқдорининг камайганлиги аниқланди. Гуморал звено кўрсаткичларининг ўзгаришлари ва яллигланишига қарши ва қарши бўлмаган цитокинлар ўртасидаги дисбаланс толуолни фуллерен билан юборилган ҳайвонларда яққол ривожланган бўлди. Демак, фуллерен C₆₀ карбонли наноқисмлар толуолнинг кимёвий токсиклигини гуморал иммунитет ва цитокинларга оширади.

Калим сўзлар: фуллеренлар, толуол, иммуноглобулинлар, цитокинлар.

Due to the rapid development of nanotechnology in the last decade, it is now an urgent need to understand the toxicological properties of nanoparticles ingested together with chemicals. The aim of this study was to investigate the ability of fullerenes C₆₀ and chemical toxicant toluene to cause changes in the state of humoral immune system and cytokine profile. A significant increase in the concentration of immunoglobulin G, circulating immune complexes, pro-inflammatory cytokines TNF-α, IL-1β, IL-6 as well as a decrease in anti-inflammatory IL-4 and IL-10 in the serum of rats which were injected intraperitoneally with toluene were found. Changes in humoral immunity and imbalance between pro- and anti-inflammatory cytokines were significantly more pronounced in animals treated with toluene together with fullerenes. It has been concluded that that carbon nanoparticles fullerenes C₆₀ potentiate toxic effects of chemical toxicant toluene on the humoral immunity and cytokine profile.

Key words: fullerenes, toluene, immunoglobulins, cytokines.

Актуальность. Развитие нанотехнологий способствует появлению новых ультравысокодисперсных форм веществ (наноматериалов), многие свойства которых, в том числе действие на живые системы, отличаются от свойств соединений макроскопических размеров [1]. Среди разнообразных видов продукции наноиндустрии особое место занимают фуллерены, представляющие собой новую аллотропическую форму углерода [2]. Сравнительная простота производства фуллеренов, возможность их получения в высокоочищенной (99% чистоты и выше) форме делает их одним из наиболее популярных современных нанопродуктов. Однако, это приводит к постепенному превращению фуллеренов в значимые для окружающей среды контаминанты, а также к постоянному возрастанию рисков экспозиции человека этими наночастицами [3, 4]. Более того, предыдущие исследования показали, что для наночастиц и, в частности, для фуллеренов харак-

терна способность проникать через биологические мембраны и физиологические барьеры организма и служить «проводниками» в организм тяжелых металлов, пестицидов, соединений галогенов и тому подобное. Поэтому возникает вопрос о необходимости фундаментального понимания токсикологических свойств наночастиц при их попадании в организм вместе с «классическими» химическими токсикантами.

Целью данной работы было исследование особенностей влияния комбинации фуллеренов C₆₀ с известным химическим токсикантом толуолом на состояние гуморального иммунитета и цитокинового профиля белых крыс.

Материалы и методы. Эксперименты выполнены на 104 крысах-самцах массой 150-180 г. Всех животных разделили на 4 группы: 1-я контроль (интактные крысы). Этой группе животных интраперитонеально вводили физиологический раствор в дозе 0,5 мл/кг; 2-я – животные, которым

интраперитонеально вводили 0,5 мл/кг суспензии фуллеренов C₆₀ в дозе 60 мг/кг; 3-я – животные, которые получали интраперитонеально толуол в дозе 0,5 мл/кг; 4-я – животные, которым вводили фуллерены (60 мг/кг), разведенные в толуоле (0,5 мл/кг). Животных выводили из эксперимента под тиопенталовым наркозом через 3, 6, 24 и 72 часа от начала эксперимента. Для исследований использовали сыворотку крови. Все эксперименты проводились в соответствии с правилами «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях».

Определение количества иммуноглобулинов классов А, М и G и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови проводили согласно методикам [5, 6].

Определения уровня цитокинов TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-4, IL-10 в сыворотке крови крыс проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих наборов "Bioscience" производства "Bender MedSystems GmbH", Австрия. Абсорбцию проб измеряли на аппарате "StatFax 303 Plus" в соответствии с протоколом производителя.

Статистическую обработку результатов выполняли в отделе системных статистических исследований Тернопольского государственного медицинского университета имени И. Я. Горбачевского в программном пакете Statsoft STATISTICA. Результаты выражали как среднее ± SEM с 8 экспериментов. Сравнивали полученные величины с использованием непараметричного критерия Манна-Уитни. Изменения считали статистически достоверными при p<0,05.

Результаты исследования и обсуждение.

Введение животным 60 мг/кг фуллеренов C₆₀ не вызывало изменений со стороны гуморальной си-

стемы иммунитета и уровня цитокинов в сыворотке крови во все сроки эксперимента (таблица 1).

Как видно из результатов исследований, приведенных в таблице 2, при интоксикации толуолом гуморальное звено иммунной системы испытывало определенные изменения. В частности, через 3 часа после введения токсиканта концентрация Ig G в сыворотке крови увеличивалась в 1,8 раза по сравнению с интактными животными. Еще в большей степени (в 1,9 раза) этот показатель поднялся через 6 часов после начала эксперимента. Через 24 и 72 часа после интоксикации уровень Ig G в сыворотке крови несколько уменьшался и составлял соответственно 163 и 144 % от уровня контроля.

Что касается других иммунологических показателей (Ig A и Ig M), то они, при введении животным толуола, достоверно не отличались от аналогичных показателей интактных крыс во все сроки исследования.

Поскольку именно Ig G являются основным представителем антител, повышение их содержания при химической интоксикации, вероятно, является следствием активации эффекторного звена иммунной системы в ответ на воспалительные или деструктивные изменения тканей организма [7]. Известно, что при интоксикации толуолом происходит перекисная деградация макромолекул белковой природы и усиление протеолитических процессов в клетках, что создает предпосылки для возникновения аутоиммунных реакций и появления противоорганных антител. Активации аутоиммунных реакций будут способствовать и нарушения со стороны функционального состояния микросомальной монооксигеназной системы, которые неизбежно развиваются при воздействии химических веществ на печень.

Таблица 1.

Влияние фуллерена C₆₀ на показатели гуморального иммунитета и на уровень цитокинов в сыворотке крови крыс (M±m, n=8)

Показатель	Группы животных				
	Интактные	Толуол			
		Время после введения (ч)			
		3	6	24	72
Ig A, г/л	0,17±0,02	0,18±0,04	0,19±0,03	0,20±0,02	0,15±0,03
Ig M, г/л	0,79±0,06	0,84±0,07	0,81±0,06	0,78±0,05	0,74±0,05
Ig G, г/л	10,18±1,03	18,50±1,32*	19,84±1,46*	16,65±1,18*	14,71±1,25*
ЦИК, ум.од.	59,07±3,75	94,72±5,80*	89,67±5,06*	124,04±6,03*	82,69±4,90*
TNF-α, пг/мл	6,08±0,59	15,28±1,22*	25,53±1,80*	21,28±1,34*	18,30±1,02*
IL-1β, пг/мл	7,44±1,07	37,95±2,44*	31,29±1,86*	29,76±1,50*	24,18±1,20*
IL-4, пг/мл	17,76±2,30	13,25±1,62*	10,66±1,02*	11,84±1,34*	15,22±2,20
IL-6, пг/мл	5,25±0,37	8,76±0,54*	16,80±1,23*	8,13±0,72*	6,98±0,35*
IL-10, пг/мл	13,87±1,20	9,20±0,90*	7,70±0,68*	5,82±1,02*	6,93±1,50*
Примечание. * - изменения достоверны по сравнению с показателями интактных животных (p<0,05).					

Влияние толуола на показатели гуморального иммунитета и на уровень цитокинов в сыворотке крови крыс ($M \pm m$, $n=8$)

Показатель	Группы животных				
	Интактные	C_{60} Время после введения (ч)			
		3	6	24	72
Ig A, г/л	0,17 $\pm$ 0,02	0,14 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,03	0,19 $\pm$ 0,02	0,15 $\pm$ 0,04
Ig M, г/л	0,79 $\pm$ 0,06	0,76 $\pm$ 0,05	0,82 $\pm$ 0,06	0,75 $\pm$ 0,05	0,73 $\pm$ 0,06
Ig G, г/л	10,18 $\pm$ 1,03	9,78 $\pm$ 1,12	10,08 $\pm$ 1,09	10,21 $\pm$ 1,18	9,37 $\pm$ 1,02
ЦИК, ум.од.	59,07 $\pm$ 3,75	56,73 $\pm$ 3,99	58,33 $\pm$ 3,57	61,67 $\pm$ 4,05	60,18 $\pm$ 3,82
TNF- α , пг/мл	6,08 $\pm$ 0,59	6,68 $\pm$ 0,40	7,02 $\pm$ 0,61	7,15 $\pm$ 0,68	45,01 $\pm$ 5,94
IL-1 β , пг/мл	7,44 $\pm$ 1,07	8,09 $\pm$ 1,20	7,90 $\pm$ 0,78	8,40 $\pm$ 0,95	9,03 $\pm$ 0,87
IL-4, пг/мл	17,76 $\pm$ 2,30	14,70 $\pm$ 2,59	15,84 $\pm$ 2,10	13,76 $\pm$ 1,92	13,90 $\pm$ 2,40
IL-6, пг/мл	5,25 $\pm$ 0,37	5,70 $\pm$ 0,46	5,69 $\pm$ 0,30	6,08 $\pm$ 0,43	5,99 $\pm$ 0,39
IL-10, пг/мл	13,87 $\pm$ 1,20	14,70 $\pm$ 2,49	15,84 $\pm$ 2,10	13,76 $\pm$ 1,92	13,90 $\pm$ 2,33

В норме данная система способна трансформировать эндогенные продукты с антигенными свойствами. Подавление монооксигеназной системы приведет к длительной персистенции сенсибилизирующих агентов в организме. Очевидно, что вышеназванные причины и обусловили зарегистрировано нами достоверное повышение в сыворотке крыс, которым вводили толуол, содержания иммуноглобулинов класса G. В пользу такого предположения свидетельствует и зафиксированное нами увеличение концентрации циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови животных, которым вводили толуол. Так, через 3 часа после начала эксперимента содержание ЦИК в сыворотке крыс составило 159% от уровня интактных животных, через 6 часов – 152%, через 24 часа – 210% и через 72 часа – 140% (табл. 2). Известно, что перед тем как элиминировать из организма, ЦИК оказывают определенное патогенное влияние на ткани.

Интересно, что в отличие от животных 3-й группы, при введении крысам толуола вместе с наночастицами фуллеренов C_{60} в сыворотке крови достоверно увеличивался уровень Ig A и Ig M через 6 и 24 часа. Уровень иммуноглобулинов класса G при комбинированном воздействии химического токсиканта и наночастиц повышался в большей степени по сравнению с группой крыс, которым вводили толуол отдельно. Более того, в сыворотке крови животных IV группы содержание Ig G было достоверно выше (в 1,3 раза) такового у животных III группы через 3 и 6 часов от начала эксперимента.

Содержание циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови животных, которым вводили толуол и фуллерены, также повышалось во все сроки эксперимента в большей степени по сравнению с аналогичным показателем у крыс, которым вводили только толуол (табл. 3).

О том, что фуллерены усугубляют эффект химического токсиканта свидетельствует тот факт, что концентрация ЦИК при комбинированной интоксикации через 6 и 24 часа после начала эксперимента была в 1,4 раза выше ($P < 0,05$), чем при поражении самим толуолом.

Токсическое поражение тканей приводит к формированию медиаторов воспаления, основными из которых являются цитокины. Как видно из результатов, приведенных в таблице 2, в сыворотке крови животных, которым вводили толуол, концентрация TNF- α , участвующего в системном воспалении и являющегося членом группы цитокинов, которые стимулируют реакцию острой фазы, резко повышалась во все сроки эксперимента, достигая максимума (в 4,1 раза) через 6 часов от момента интоксикации. В этой же группе животных содержание других провоспалительных цитокинов (IL-1 β и IL-6) также существенно возрастало по сравнению с контролем, при этом уровень IL-1 β достигал максимума (в 5,1 раза) уже через 3 часа от начала эксперимента, а IL-6 – через 6 часов (в 3,2 раза). Концентрация противовоспалительных цитокинов при действии толуола, наоборот, снижалась по сравнению с контролем. Так, уровень IL-4 достиг своего минимума (в 1,6 раза) через 6 часов, а IL-10 через 24 часа (в 2,3 раза) от момента интоксикации.

У крыс, которым вводили толуол вместе с карбоновыми наночастицами, уровень провоспалительных цитокинов повышался в значительно большей степени по сравнению с контролем, чем у животных, которые подвергались воздействию только химического токсиканта (табл. 3). Более того, содержание TNF- α , IL-1 β и IL-6 во все сроки эксперимента в сыворотке животных 4-й группы было достоверно выше, чем в 3-й группе крыс. Концентрация противовоспалительных IL-4 и IL-10, наоборот, понижалась в сыворотке крови жи-

вотных, подвергшихся комбинированному воздействию чужеродных веществ, в большей степе-

ни, чем у крыс, которым вводили только толуол.

Таблица 3.

Влияние комбинированного применения C₆₀ и толуола на показатели гуморального иммунитета и на уровень цитокинов в сыворотке крови крыс (M±m, n=8)

Показатель	Группы животных				
	Интактные	Толуол + C ₆₀			
		Время после введения (ч)			
		3	6	24	72
Ig A, г/л	0,17±0,02	0,24±0,05	0,27±0,02*	0,25±0,01*	0,21±0,03
Ig M, г/л	0,79±0,06	0,86±0,07	1,12±0,09*	0,98±0,06*	0,85±0,05
Ig G, г/л	10,18±1,03	24,33±1,70*#	25,99±1,55*#	23,37±1,90*	19,52±1,73*
ЦИК, ум.од.	59,07±3,75	96,50±6,21*	121,68±7,24*#	177,21±7,44*#	135,86±6,46*
TNF-α, пг/мл	6,08±0,59	21,45±1,38*#	34,35±2,03*#	29,80±1,85*#	26,16±1,30*#
IL-1β, пг/мл	7,44±1,07	48,36±2,32*#	44,64±2,10*#	40,93±1,78*#	32,75±2,08*#
IL-4, пг/мл	17,76±2,30	9,65±1,28*#	5,92±1,10*#	6,20±1,08*#	9,85±2,06*
IL-6, пг/мл	5,25±0,37	12,08±0,94*#	22,11±1,26*#	14,19±0,80*#	9,97±1,05*
IL-10, пг/мл	13,87±1,20	6,09±0,54*#	4,91±0,62*#	4,07±0,90*	4,62±1,30*

Примечание. * - изменения достоверны по сравнению с показателями интактных животных; # - изменения достоверны по сравнению с группой животных, которым вводили толуол (p<0,05).

Таким образом, можна констатировать, что при попадании в организм химического токсиканта толуола имеют место нарушения гуморального иммунитета и возникает дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами. При введении толуола вместе с карбоновыми наночастицами фуллеренами C₆₀ изменения иммунного статуса проявляются у достоверно большей степени, чем при введении только химического токсиканта. Касательно механизма таких изменений, то, вероятно, что в ответ на воспалительные и деструктивные изменения в тканях, вызванных толуолом, активируется эффекторное звено иммунной системы и усиливается продукция провоспалительных цитокинов [8].

Вполне вероятно, что толуол вызывает угнетение микросомальной монооксигеназной системы, что способствует персистенции сенсибилизирующих антигенов в организме. Возможно, имеет также значение ингибирование под влиянием токсина функциональной активности Т-лимфоцитов, особенно Т-супрессоров и, как следствие, увеличение соотношения Т-хелперы/Т-супрессоры [9].

Такой сдвиг клеточного иммунитета в сторону угнетения супрессорного звена приводит к интенсификации выработки аутоантител на аутоантигены, которые в повышенном количестве освобождаются в кровь в результате деструкции тканей. Определенную роль в повышении уровня иммуноглобулинов и иммунных комплексов при интоксикации может играть также изменение их

катаболизма. Нарушение выведения ЦИК с организма способствует их длительной циркуляции в кровяном русле, что создает условия для их повреждающего действия на ткани.

Потенцирующий токсичный эффект фуллеренов наиболее вероятно обусловлен способностью последних абсорбировать на своей поверхности большое количество токсинов и способствовать их транспорту к тканям и клеткам живых организмов. Возможно также, что фуллерены непосредственно проходят через мембраны в клетки и взаимодействуют с ДНК, РНК и другими биополимерами, что приводит к изменениям экспрессии генов, транскрипции и трансляции белка. В результате возможны изменения ряда ферментных систем, в том числе ферментов метаболизма ксенобиотиков, что приводит к аккумуляции большого количества химических токсикантов и продуктов их метаболизма, то есть имеет место так называемая токсификация ксенобиотиков химической природы.

Выводы. Карбоновые наночастицы фуллерены C₆₀ потенцируют токсическое воздействие химического токсиканта толуола на гуморальный иммунитет и цитокиновый профиль. Для безопасного использования нанотехнологий необходимы дальнейшие биохимические и иммунологические исследования, направленные на изучение механизмов синергического влияния наноматериалов и ксенобиотиков химической природы на организм.

Литература:

1. Онищенко Г.Г., Тутельян В.А. О концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов // Вопросы питания. – 2007. – Т.76, № 6. – С.4–8
2. Пиотровский Л.Б., Киселёв О.И. Фуллерены в биологии // СПб: ООО Издательство «Росток». – 2006. – 336 с.
3. Andrievsky G., Klochkov V., Derevyanchenko L. Is C₆₀ fullerenemolecule toxic? // Fullerenes, Nanotubes, Carbon Nanostruct. – 2005. – V.13. – P.363–376.
4. Хотимченко С.А., Гмошинский И.В., Тутельян В.А. Проблема обеспечения безопасности наноразмерных объектов для здоровья человека // Гигиена и санитария. – 2009. – № 5. – С.7–11.
5. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Иммунологические методы исследования в клинике. – К.: Здоров'я, 1978. – 159 с.
6. Гриневич Ю.А. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных/Ю.А. Гриневич, А.М. Алферов//Лабораторное дело. — 1981. — № 8. — С. 493—495.
7. Яхонтова О.И., Дуданова О.П. Роль иммунных комплексов при хронических заболеваниях печени и их динамика в процессе лечения // Тер. архив. - 1992. - № 2. - С. 10 - 15.
8. Ешану В.С. Цитокины и их биологические эффекты при некоторых болезнях печени // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2004. – № 5. – С. 11-16.
9. Klein A., Pappas S.C., Gordon P. The effect of nonviral liver damage on the T-lymphocyte helper/suppressor ratio // Clin. Immunol. and Immunopathol. - 1998. - 46, № 2. - P. 214-220.

**ФУЛЛЕРЕНЫ C₆₀ УСИЛИВАЮТ
ТОКСИЧЕСКИЙ ЭФФЕКТ ТОЛУОЛА НА
ИММУННЫЙ СТАТУС ОРГАНИЗМА**

Л.М. ПАЛИЦА, М.М. КОРДА

Тернопольский Государственный медицинский
университет им. И.Я. Горбачевского, Украина, г.
Тернополь

В связи с бурным развитием в последние десятилетия нанотехнологий, сейчас остро стоит вопрос о необходимости фундаментального понимания токсикологических свойств наночастиц при их попадании в организм вместе с химическими веществами. Целью настоящей работы было исследовать в эксперименте способность фуллеренов C₆₀ и химического токсиканта толуола вызывать изменения состояния гуморальной цепи иммунной системы и цитокинового профиля. В сыворотке крови крыс, которым интраперитонеально вводили толуол, установлено значительное увеличение концентрации иммуноглобулинов класса G, циркулирующих иммунных комплексов, провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-1β, IL-6 и снижение уровня противовоспалительных IL-4 и IL-10. Изменения показателей гуморального звена иммунитета и дисбаланс между про- и противовоспалительными цитокинами были значительно более выраженными у животных которым вводили толуол вместе с фуллеренами. Сделан вывод, что карбоновые наночастицы фуллерены C₆₀ потенцируют токсическое воздействие химического токсиканта толуола на гуморальный иммунитет и цитокиновый профиль.

Ключевые слова: фуллерены, толуол, иммуноглобулины, цитокины.