

ОСОБЕННОСТИ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ *EX VIVO* У ДЕТЕЙ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ СТРОНЦИЕМ

© 2019 г. К. Г. Старкова*, Е. А. Отавина

*E-mail: skg@fcrisk.ru

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия

Поступила: 23.05.2019. Принята: 30.06.2019

Проведен анализ особенностей спонтанной и индуцированной продукции цитокинов *ex vivo* у детей в условиях экспозиции стронцием. Определяли уровни спонтанной, индуцированной митогеном (фитогемагглютинин 4 мкг/мл, конкавалин А 4 мкг/мл, липополисахарид 2 мкг/мл) и стронцием (0,01 мг/мл) продукции цитокинов в супернатантах цельной периферической крови детей, проживающих в эндемичной зоне экспозиции стабильным стронцием, методом иммуноферментного анализа. При сравнении спонтанной продукции цитокинов клетками периферической крови детей группы наблюдения показано достоверное снижение уровня IL-12 в 3,1 раза, TNF- α в 5,6 раза относительно группы сравнения и отсутствие различий по спонтанному синтезу IL-6, IL-10, IL-17, GM-CSF. В условиях индуцирующего воздействия стронция выявлено снижение продукции TNF- α , IL-6, IL-12, IL-17, GM-CSF в 5,0, 1,7, 2,4, 1,6, 5,0 раз соответственно при общем стимулирующем влиянии металла на показатели группы наблюдения, IL-6 в 133,1 раза, IL-12 в 1,4 раза, GM-CSF в 2,2 раза, TNF- α в 1,8 раза. Полученные данные указывают на модулирующее влияние стронция в отношении продукции цитокинов в культурах цельной крови с преимущественно активирующим воздействием на медиаторы провоспалительного действия IL-6, IL-12, GM-CSF, TNF- α и одновременным угнетением экспрессии Th1-цитокинов.

Ключевые слова: иммунная регуляция, цитокины, стронций

DOI: 10.31857/S102872210007272-4

Адрес: 614045, Пермь, ул. Монастырская, 82, ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Старкова Ксения Геннадьевна. Тел.: +7(342)2363930.

E-mail: skg@fcrisk.ru

Авторы:

Старкова К. Г., к.б.н., зав. лабораторией иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия;

Отавина Е. А., младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и аллергологии ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, Россия.

ВВЕДЕНИЕ

Необходимость изучения особенностей изменения состояния здоровья детского населения и закономерностей формирования иммуноопосредованных нарушений, связанных с воздействием факторов внешнесредового окружения, определяются повышенной чувствительностью

к измененным условиям среды обитания, которые способны инициировать патологические процессы, затрагивающие структурную и функциональную целостность иммунной системы [1, 2].

В районах стронциевых геохимических провинций, отличающихся повышенным содержанием солей стабильного стронция в подземных источниках водоснабжения, у населения выявляются в первую очередь нарушения минерального обмена и патология костной системы. В то же время иммунная система принимает активное участие в регуляции физиологических функций и посредством цитокиновых медиаторов может оказывать существенное воздействие на развитие патологических процессов, в том числе и в костной системе [3, 4].

Цель исследования — анализ особенностей спонтанного и индуцированного синтеза цитокинов *ex vivo* у детей в условиях экспозиции стронцием.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Группу наблюдения составили 15 детей в возрасте от 6 до 11 лет, проживающие в эндемичной зоне Пермского края с повышенным содержанием стабильного стронция в подземных водах. Группа сравнения представлена 16 детьми с условно чистой территории. Группы были сопоставимы по полу, возрасту и соматической заболеваемости.

Исследование содержания стронция в пробах крови выполняли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой на масс-спектрометре Agilent 7500сх (Agilent Technologies Inc., США) в соответствии с МУК 4.1.3230–14.

Для исследования непосредственного влияния стронция на иммунную регуляцию оценивали экспрессию выработки цитокинов интерлейкина (IL)-6, IL-10, IL-12, IL-17, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора GM-CSF, фактора некроза опухолей (TNF)- α в условиях *ex vivo* с использованием наборов «Цитокин-стимул» (ЗАО «Вектор-Бест», Россия). Определяли уровни спонтанной, индуцированной митогеном (фитогемагглютинин 4 мкг/мл, конкавалин А 4 мкг/см³, липополисахарид 2 мкг/см³) и стронцием (0,01 мг/см³) продукции цитокинов в супернатантах цельной периферической крови методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем ЗАО «Вектор-Бест» (Россия) на анализаторе «Elx808IU» (BioTek, США).

Статистическую обработку результатов проводили методом вариационной статистики с расчетом среднего арифметического (M) и его стандартной ошибки (m). Достоверность различий при сравнении групп по количественным признакам оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты химико-аналитического исследования показали повышенные концентрации стронция в крови обследованных детей, достоверно превосходящие уровни в группе сравнения, кратность различий составила в среднем в 3,8 раза ($0,13 \pm 0,015$ мкг/см³ и $0,034 \pm 0,006$ мкг/см³ соответственно, $p = 0,000$; референтный интервал 0,01–0,077 мкг/см³).

В условиях эксперимента *ex vivo* (Таблица 1) выявлены особенности влияния экспозиции стронцием на продукцию цитокинов. При оценке спонтанного синтеза медиаторов клетками

периферической крови детей установлено достоверное снижение продукции TNF- α относительно группы сравнения в 5,6 раза ($p = 0,008$). Под воздействием стронция наблюдалось повышение концентрации данного цитокина в обеих группах, однако в группе наблюдения индуцированная стронцием продукция TNF- α была достоверно ниже в 5,0 раз ($p = 0,001$).

Спонтанный уровень IL-12 также достоверно снижался относительно показателей группы сравнения в 3,1 раза ($p = 0,002$), в условиях индуцирующего влияния стронция в группе наблюдения показан стимулирующий эффект при достоверно более низком в 2,4 раза уровне относительно группы сравнения ($p = 0,048$).

Кроме того, в обследуемой группе индуцированная стронцием продукция IL-6 была снижена относительно группы сравнения в 1,7 раза ($p = 0,047$), при этом в присутствии стронция отмечено возрастание секреции цитокина в обеих группах, а кратность стимуляции IL-6, наряду с TNF- α , превышала данный показатель всех исследованных цитокинов.

Отсутствовали достоверные различия в спонтанной продукции и влияние стронция на синтез IL-10, хотя отмечена тенденция к снижению данного цитокина относительно группы сравнения в 1,6 и 1,5 раза соответственно.

Также показано уменьшение индуцированной стронцием продукции IL-17 в группе наблюдения при соотнесении со спонтанным уровнем и группой сравнения (в 1,6 раза, $p = 0,000$), показатели которой достоверно не изменялись в условиях инкубации с металлом.

Отмечен стимулирующий эффект стронция на синтез GM-CSF, более выраженный в группе сравнения, кратность стимуляции составила в 18,7 раз против повышения в 2,2 раза в группе наблюдения, показана достоверность различий в уровне продукции цитокина в 5,0 раз ($p = 0,018$).

В условиях митогенной стимуляции показано достоверное возрастание продукции исследованных цитокинов как в группе наблюдения, так и в группе сравнения, что указывает на высокую функциональную активность и цитокинпродуцирующий потенциал клеток периферической крови обследованных детей. Так, в группе наблюдения кратность повышения индуцированного митогеном синтеза IL-6 относительно спонтанной продукции составила в 28,0 раз ($p = 0,000$), IL-12 в 13,5 раза ($p = 0,000$), IL-17 в 17,1 раза ($p = 0,008$), IL-10 в 14,5 раз ($p = 0,000$), GM-CSF в 14,8 раза ($p = 0,005$), TNF- α в 1121,1 раза ($p = 0,002$).

Таблица 1. Спонтанная и индуцированная продукция цитокинов клетками периферической крови детей (эксперимент), пг/см³

| Показатель продукции цитокинов | | Группа наблюдения | Группа сравнения | p ₁ | p ₂ | p ₃ |
|--------------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| IL-6 | Спонтанная | 542,07±127,52 | 658,56±102,72 | 0,480 | - | - |
| | Индуцированная митогеном | 15160,0±2290,24 | 10628,13±1331,90 | 0,078 | 0,000 | 0,000 |
| | Индуцированная стронцием | 72173,33±17582,16 | 120750,0±15626,75 | 0,047 | 0,001 | 0,000 |
| IL-12 | Спонтанная | 19,21±3,77 | 57,28±10,28 | 0,002 | - | - |
| | Индуцированная митогеном | 259,49±42,54 | 336,89±79,48 | 0,365 | 0,000 | 0,006 |
| | Индуцированная стронцием | 26,58±5,33 | 63,78±16,58 | 0,048 | 0,030 | 0,742 |
| IL-17 | Спонтанная | 2,45±0,40 | 2,17±0,25 | 0,545 | - | - |
| | Индуцированная митогеном | 41,98±11,70 | 30,56±5,46 | 0,330 | 0,008 | 0,000 |
| | Индуцированная стронцием | 1,52±0,142 | 2,37±0,08 | 0,000 | 0,045 | 0,435 |
| IL-10 | Спонтанная | 5,39±0,63 | 8,37±1,35 | 0,060 | - | - |
| | Индуцированная митогеном | 78,32±11,45 | 50,19±5,95 | 0,025 | 0,000 | 0,000 |
| | Индуцированная стронцием | 8,03±1,46 | 11,74±5,26 | 0,515 | 0,102 | 0,567 |
| GM-CSF | Спонтанная | 3,34±1,03 | 1,98±0,48 | 0,230 | - | - |
| | Индуцированная митогеном | 49,35±13,14 | 19,90±2,73 | 0,012 | 0,005 | 0,000 |
| | Индуцированная стронцием | 7,35±1,94 | 37,07±11,35 | 0,018 | 0,013 | 0,007 |
| TNF-α | Спонтанная | 8,80±2,175 | 49,10±12,45 | 0,008 | - | - |
| | Индуцированная митогеном | 9865,89±2249,81 | 9428,56±1434,28 | 0,865 | 0,002 | 0,000 |
| | Индуцированная стронцием | 15,88±3,783 | 78,64±16,03 | 0,001 | 0,047 | 0,101 |

Примечание: p₁ – достоверность межгрупповых различий относительно группы сравнения, p₂ – достоверность различий относительно спонтанной продукции в группе наблюдения, p₃ – достоверность различий относительно спонтанной продукции в группе сравнения.

В условиях воздействия стронция отмечено преимущественное влияние на показатели группы наблюдения, имеющей предварительную сенсибилизацию к металлу. Все эффекты в отношении исследуемых медиаторов имели выраженную стимулирующую направленность за исключением продукции IL-17, которая в присутствии стронция достоверно снижалась в 1,6 раза (p=0,045), и отсутствия воздействия на синтез IL-10. Показано индуцированное стронцием повышение концентрации IL-6 в 133,1 раза (p=0,001), IL-12 в 1,4 раза (p=0,030), GM-CSF в 2,2 раза (p=0,013), TNF-α в 1,8 раза (p=0,047).

ОБСУЖДЕНИЕ

Иммунная система, определяя в значительной степени адаптационный потенциал организма, оказывает регулирующее влияние как на физиологические, так и патологически протекающие процессы. В частности, нарушение обмена

костной ткани может индуцироваться в условиях дисбаланса про- и противовоспалительных цитокиновых медиаторов, связанного с повышенной активностью иммунокомпетентных клеток [5, 6]. Стронций смещает вектор регуляции в сторону активации провоспалительного компонента, таким образом формируя патологические тенденции развития иммуноопосредованных нарушений здоровья в условиях хронического воздействия.

В то же время соединения стронция рассматриваются как потенциальные противовоспалительные факторы, механизм действия которых реализуется, в том числе, через снижение провоспалительной активности цитокинов [7, 8]. Многие исследования направлены на изучение применения стронция (стронция ренелата) в малых дозах в качестве перспективной терапии при различных видах патологических процессов, таких как язвенный колит, цистит, аллергический

ринит, костная резорбция. Известно, что особенности специфических эффектов стронция в значительной степени определяются дозой воздействия. При этом низкие уровни стронция способны стимулировать пролиферацию и остеогенез, тогда как высокие концентрации ингибируют дифференцировку и способствуют апоптозу мезенхиальных стволовых клеток, нарушая процессы костного ремоделирования, в значительной степени опосредованного цитокинами [9, 10].

ВЫВОДЫ

1. Результаты исследования указывают на возможность модулирующего влияния стронция на продукцию цитокинов в культуре цельной крови, причем иммунокомпетентные клетки обследованных детей группы наблюдения обладали высоким функциональным потенциалом при неспецифической стимуляции митогеном.

2. Особенности сенсibiliзирующего эффекта стронция связаны с активирующим воздействием на цитокины, обладающие провоспалительными свойствами (IL-6, IL-12, GM-CSF, TNF- α), и могут участвовать в формировании патологических тенденций иммунной регуляции.

3. Стимулирующее действие стронция в отношении провоспалительных цитокинов в группе с предварительной сенсibiliзацией было выражено в достоверно меньшей степени, чем в культурах цельной крови группы сравнения, что указывает на действие компенсаторных адаптивных механизмов, учитывая влияние стронция на процессы ремоделирования костной ткани и участие цитокинов в иммунной регуляции остеометаболизма.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Коновалов И. М. Оценка риска нарушений иммунного статуса в условиях антропогенной нагрузки. Здравоохранение Российской Федерации. 2013, 6, 37–38. [Konovalov I. M. The evaluation of risk of disorders of immune status of population in conditions of anthropotechnogenic burden. Zdravookhraneniye Rossiyskoy Federatsii. 2013, 6, 37–38.]
2. Старкова К. Г., Долгих О. В., Дианова Д. Г., Лебедева Т. М. Иммуномодулирующие эффекты у детей в условиях воздействия стронция при поступлении с питьевой водой. Гигиена и санитария. 2016, 95(1), 63–65. [Starkova K. G., Dolgikh O. V., Dianova D. G., Lebedeva T. M. Immunomodulatory effect in children in conditions of the exposure to strontium due to intake in drinking water. Gigiyena i sanitariya. 2016, 95(1), 63–65.]
3. Симбирцев А. С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. Медицинский академический журнал. 2013, 13(3), 18–41. [Simbirtsev A. S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal. 2013, 13(3), 18–41.]
4. Dar H. Y., Azam Z., Anupam R., Mondal R. K., Srivastava R. K. Osteoimmunology: The Nexus between bone and immune system. Front. Biosci. (Landmark Ed). 2018, 23, 464–492.
5. Jung S. M., Kim K. W., Yang C. W., Park S. H., Ju J. H. Cytokine-mediated bone destruction in rheumatoid arthritis. J. Immunol. Res. 2014, 2014, 263625.
6. Nakamura M., Uehara S., Nakamura H., Udagawa N. Cytokine-mediated bone resorption. Clin. Calcium. 2014, 24(6), 837–844.
7. Pilmane M., Salma-Ancane K., Loca D., Locs J., Berzina-Cimdina L. Strontium and strontium ranelate: Historical review of some of their functions. Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl. 2017, 78, 1222–1230.
8. Berksoy Hayta S., Durmuş K., Altuntaş E. E., Yıldız E., Hisarciklio M., Akyol M. The reduction in inflammation and impairment in wound healing by using strontium chloride hexahydrate. Cutan. Ocul. Toxicol. 2018, 37(1), 24–28.
9. Aimaiti A., Maimaitiyiming A., Boyong X., Aji K., Li C., Cui L. Low-dose strontium stimulates osteogenesis but high-dose doses cause apoptosis in human adipose-derived stem cells via regulation of the ERK1/2 signaling pathway. Stem Cell Res. Ther. 2017, 8(1), 282.
10. Huang M., Hill R. G., Rawlinson S. C. Strontium (Sr) elicits odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells (hDPSCs): A therapeutic role for Sr in dentine repair? Acta Biomater. 2016, 38, 201–211.

FEATURES OF CYTOKINE PRODUCTION *EX VIVO* IN CHILDREN UNDER STRONTIUM EXPOSURE

© 2019 K. G. Starkova*, E. A. Otavina

*E-mail: skg@fcrisk.ru

FBUN Federal Research Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia

Received: 23.05.2019. Accepted: 30.06.2019

The features of spontaneous and induced synthesis of cytokines *ex vivo* in children under strontium exposure were analyzed. The levels of spontaneous, mitogen-induced (phytohemagglutinin 4 µg/ml, concavalin A 4 µg/ml, lipopolysaccharide 2 µg/ml) and strontium (0.01 mg/ml) cytokine production in supernatants of whole peripheral blood of children living in the endemic area of stable strontium exposure were determined by enzyme immunoassay. When compared to the spontaneous production of cytokines by peripheral blood cells of children in the observation group, we revealed a significant decrease in IL-12 levels by 3.1 times, TNF-α by 5.6 times regarding the comparison group and the absence of differences in the spontaneous synthesis of IL-6, IL-10, IL-17, GM-CSF. Under the conditions of inducing effect of strontium, a decrease in production of TNF-α, IL-6, IL-12, IL-17, GM-CSF was found to be by 5.0, 1.7, 2.4, 1.6, 5.0 times, respectively, at the overall stimulating effect of the metal on the indicators of the observation group, IL-6 by 133.1 times, IL-12 by 1.4 times, GM-CSF by 2.2 times, TNF-α by 1.8 times. The data obtained indicate a modulating effect of strontium on cytokine production in whole blood cultures with a predominantly activating effect on mediators of the pro-inflammatory action of IL-6, IL-12, GM-CSF, TNF-α.

Key words: immune regulation, cytokines, strontium

Authors:

Starkova K. G., ✉ PhD (Biology), Head of the laboratory of immunology and allergology FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia; 614045 Perm, Monastyrskaya St., 82, FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”. Phone: +7(342)2363930, **E-mail:** skg@fcrisk.ru;

Otavina E. A., PhD (Biology), laboratory of immunology and allergology FBSI “Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies”, Perm, Russia.