

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОЧИСТКИ ГАЗО-ВОЗДУШНЫХ СМЕСЕЙ ОТ ЛЕТУЧИХ НИТРОЗАМИНОВ И ПОЛИЦИКЛИЧЕСКИХ АРОМАТИЧЕСКИХ УГЛЕВОДОРОДОВ

Жигачева И. В., Евсеенко Л. С., Бурлакова Е. Б., Никонова М. Ф.,  
Кривошеева Л. В.

*Эффективность очистки газо-воздушных смесей от полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) и нитрозаминов (НА) определяли по влиянию конденсатов этих смесей на уровень спонтанной бласттрансформации лимфоцитов периферической крови доноров. Митогенный эффект конденсатов оценивали по включению <sup>3</sup>H-тимидина в культивируемые с конденсатом лимфоциты. Уровень пролиферации лимфоцитов тесно коррелировал с содержанием ПАУ и НА в исследуемых образцах газо-воздушных смесей. На основании полученных данных делается вывод о возможности использования иммунологической модели для оценки эффективности очистки газо-воздушных смесей от ПАУ и НА*

**Введение.** В воздухе промышленной зоны, у оживленных автомагистралей и накурных помещениях содержится большое количество полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), нитрозаминов (НА) и тяжелых металлов. Они способны накапливаться в почве, воде, пищевых продуктах. При этом возрастает риск злокачественных новообразований [1]. При длительном воздействии на организм эти вещества даже в микродозах приводят к развитию ряда патологических состояний [2,3]. Одним из наиболее опасных последствий длительного воздействия ПАУ и НА на организм является снижение реактивности иммунной системы [4]. В связи с этим эффективность очистки газо-воздушных смесей от этих токсикантов, вероятно, можно оценить по иммунологическим тестам.

**Модель.** Исследовали влияние «конденсатов» искусственной газо-воздушной смеси на спонтанную бласттрансформацию лимфоцитов человека. Химический состав смеси был близок по составу к воздуху промышленной зоны (см. табл.1).

**Таблица 1.** Состав искусственной газо-воздушной смеси (нг/л)

| СОЕДИНЕНИЯ           |            |             |            |
|----------------------|------------|-------------|------------|
| ПАУ                  | Количество | Нитрозамины | Количество |
| Пирен                | 5.40       | НДМА        | 4.58       |
| Бенз(а)пирен         | 5.50       | НПНП        | 7.60       |
| Бенз(е)пирен         | 6.30       | НПНР        | 70.50      |
| Перилен              | 1.70       | НМОР        | 26.0       |
| Дибенз(а,h)антрацен  | 1.00       | НДЭА        | 18.0       |
| Дибенз(а,с) антрацен | 1.20       | -           | -          |
| Дибенз(g,h,i)перилен | 5.00       | -           | -          |
| Бензантрацен         | 1.10       | -           | -          |

*Условные обозначения: НДМА – N-нитрозодиметиламин; НПНП – N-нитрозопиперидин; НПНР – N-нитрозопирролидин; НМОР- N-нитрозоморфолин; НДЭА – N-нитрозодиэтиламин*

«Конденсат» получали пропусканием газо-воздушной смеси через 100 мл физиологического раствора в течение 1 часа с объемной скоростью потока 19,8 л/час. Газо-воздушную смесь либо непосредственно пропускали через физиологический раствор, либо предварительно пропускали через 25 мм слой адсорбента. Использовали три различных вида адсорбентов: 1-природный цеолит (клиноптиолит), 2-«Онкосорб»-N,N'-бис(3-триэтоксисилилпропил)тио-карбамид, синтезированный в Иркутском институте органической химии СО РАН; 3-цеолит импрегнированный «Онкосорбом». Все препараты стерилизовали пропусканием через миллиметровые стерильные фильтры одноразового использования с диаметром пор 22мкм.

Мононуклеары периферической крови человека (МНПК) выделяли в градиенте плотности фиколл-верографин (плотность 1,077) и дважды промывали средой Игла. Культивировали МНПК в среде RPMI-1640 (Sigma), содержащей L-глутамин (300мкг/мл) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Calbiochem), в 96 луночных планшетах (Limbro). К 50 мл МНПК (2млн/мл) добавляли 50 мкл Т-клеточного митогена фитогемагглютинаина (ФГА) в конечной концентрации 10мкг/мл и 100мкл конденсата газо-воздушной смеси в конечной концентрации 1мкг/мл; 10мкг/мл, 100мкг/мл и 1000мкг/мл или физиологический раствор. В параллельные пробы митоген не добавляли. Культивирование проводили в течение 72 часов в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. За 18 часов до окончания культивирования в каждую лунку добавляли по 1мкКи <sup>3</sup>H-тимидина. Затем содержимое лунок переносили на стекловолокнистые фильтры (Flow) с использованием прибора «Харвестер» (Flow). После высыхания фильтры помещали во флаконы с сцинтиляционной жидкостью, состоящей из толуола с добавлением на 1 л 4 г. 2,5-динитрофенилоксазола и 0,1 г. 1,4-ди-5- фенилоксазолбензола. Уровень включения <sup>3</sup>H-тимидина в лимфоциты определяли на счетчике β-сцинтиляций β-Trac.

Данные, полученные при помощи модели, сравнивали с данными, которые получали в хронических опытах на животных. опыты проводили на крысах самцах линии Вистар весом 100-120 г. Затравку животных осуществляли в камере объемом 10 л, куда подавалась газо-воздушная смесь. В камеру помещали по 4-5 животных, где они находились по 40 сек. Через каждые 30-40 мин процедура повторялась. Количество повторов 5.

Реакцию антителообразования в селезенке крыс в модификации Cunningham [4]. измеряли спустя 3 мес после начала затравки. Крыс иммунизировали эритроцитами барана и на 5 сутки подсчитывали число клеток в селезенке и число антителобразующих клеток (АОК) в пересчете на селезенку.

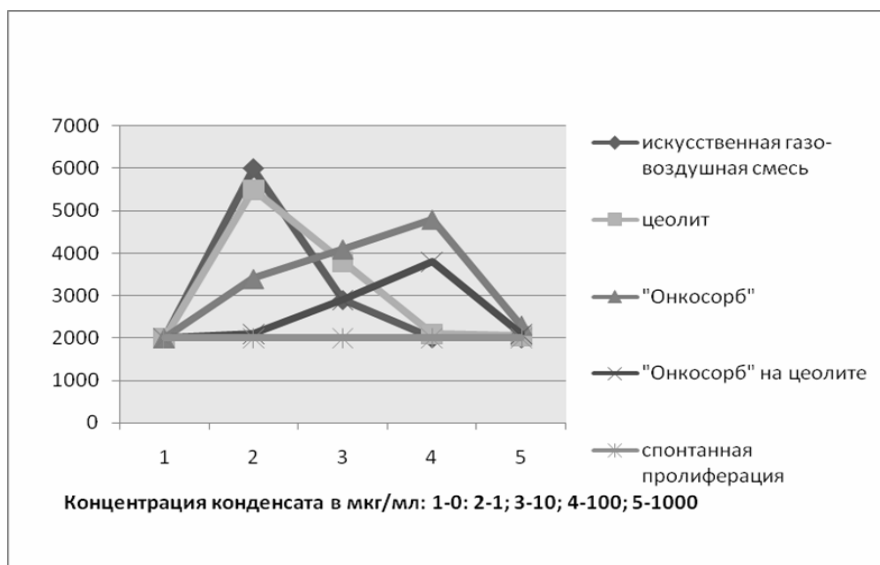
Для сопоставления данных, полученных с помощью биологической модели, с содержанием токсикантов в газо-воздушной смеси, прошедшей через слой адсорбентов, проводили химический анализ газо-воздушной смеси.

Содержание ПАУ в газо-воздушной смеси определяли следующим образом: газо-воздушную смесь адсорбировали на фильтры Петрянова. Содержание ПАУ определяли в бензольном элюате конденсата газо-воздушной смеси методом тонкослойной хроматографии с незакрепленным слоем окиси алюминия 2-ой степени по Брокману.

Для определения летучих НА смесь пропускали через жидкостные ловушки с цитратно-фосфатным буфером (рН 4,5), содержащим 20мМ аскорбиновой кислоты. Поглощительный раствор экстрагировали двуххлористым метиленом, отделяли воду,

экстрагировали 2М едким натром и довели до объема 5 мл на водяной бане под током азота. Анализировали на газовом хроматографе «Цвет» с детектором термальной энергии ТЕА 502А (США), специфичным для НА.

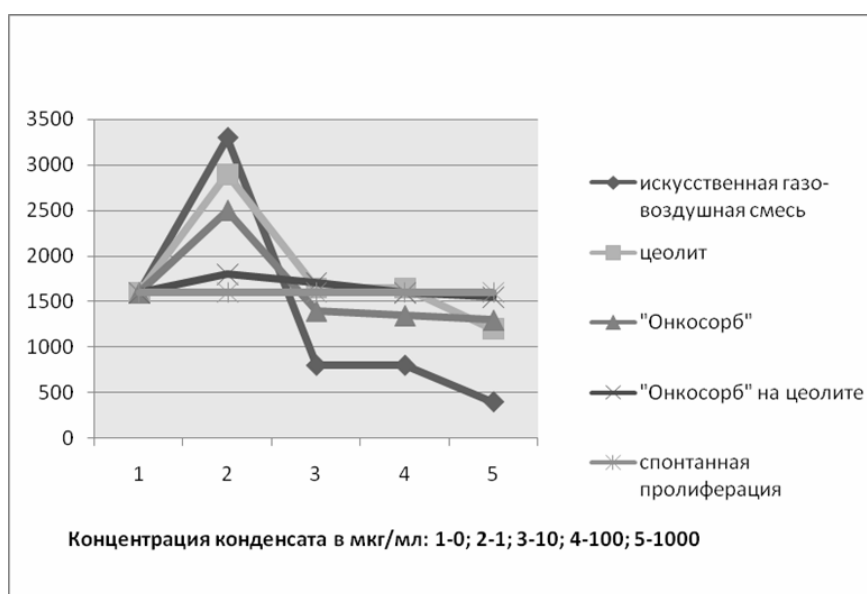
**Результаты.** «Конденсаты» газо-воздушной смеси оказывают либо стимулирующее, либо подавляющее действие на спонтанную пролиферацию лимфоцитов. Митогенный эффект «конденсата» газо-воздушной смеси, прошедшей через адсорбент, представляющий собой цеолит, импрегнированный «Онкосорбом» выражен значительно меньше, чем у других «конденсатов». Для проявления его митогенного эффекта требуется концентрация на два порядка превышающая концентрацию, при которой проявляется митогенный эффект «конденсатов» газо-воздушной смеси не прошедшей через адсорбент и прошедшей через слой цеолита (клиноптиолита) и на один порядок превышающая концентрацию «конденсата», полученного с использованием адсорбента, содержащего только «Онкосорб». Даже в данных условиях величина митогенного эффекта этого «конденсата» в 1,5 раза ниже, чем у «конденсата» неочищенной газо-воздушной смеси. Все четыре вида препаратов конденсата газо-воздушной смеси оказывают сходное действие на ФГА-индуцированную бласттрансформацию лимфоцитов: в больших дозах (100мкг/мл и 1000мкг/мл) подавляют ее, а в малых (1мкг/мл и 10мкг/мл) не влияют (включение <sup>3</sup>H-тимидина на уровне ответа на ФГА).



**Рис. 1.** Влияние конденсата газо-воздушной смеси на пролиферацию лимфоцитов донора 2

Полученные данные позволяют предположить, что адсорбент, состоящий из цеолита, импрегнированного «Онкосорбом», адсорбирует значительно большее количество токсических веществ из газо-воздушной смеси с чем, возможно, связан и меньший эффект на бласттрансформацию МНПК оказываемый конденсатом газо-воздушной смеси, прошедшей через слой этого адсорбента. Это предположение подтверждается опытами по длительной затравке крыс искусственной газо-воздушной смесью, которая приводит к снижению числа клеток селезенки и числа антителобразующих клеток более чем в 3 раза. В то время как затравка крыс газо-

воздушной смесью, прошедшей через слой «Онкосорба» на цеолите не влияет на данный показатель. Адсорбент «Онкосорб» оказывает несколько меньший защитный эффект и еще более низкий защитный эффект наблюдается при использовании клиноптиолита. Т.о., данные по оценке токсичности газо-воздушных смесей, полученные на животных согласуются с данными, полученными в модельных экспериментах на выделенных лимфоцитах периферической крови.



**Рис 2.** Влияние конденсата газо-воздушной смеси на пролиферацию лимфоцитов донора 1

**Таблица 2.** Влияние 3-месячной затравки крыс искусственной газо-воздушной смесью на число клеток в селезенке и количество АОК в пересчете на селезенку крысы

| ГРУППА ЖИВОТНЫХ   | ЧИСЛО КЛЕТОК              | ЧИСЛО АОК В ПЕРЕСЧЕТЕ НА ОРГАН ( $\times 10^8$ ) |
|---|---------------------------|--|
| Контрольные животные  | 233100 $\pm$ 6720<br>(10) | 5.50 $\pm$ 0.60<br>(10)                          |
| Крысы, затравливаемые искусственной газо-воздушной смесью   | 84000 $\pm$ 1600<br>(15)  | 3.36 $\pm$ 1.10<br>(15)                          |
| Крысы, затравливаемые газо-воздушной смесью, пропущенной через слой <i>цеолита</i>                | 147000 $\pm$ 5350<br>(15) | 3.90 $\pm$ 0.70<br>(15)                          |
| Крысы, затравливаемые газо-воздушной смесью, пропущенной через слой «Онкосорба»                   | 193300 $\pm$ 5990<br>(15) | 4.90 $\pm$ 0.80<br>(15)                          |
| Крысы, затравливаемые газо-воздушной смесью, пропущенной через слой «Онкосорба» на <i>цеолите</i> | 231500 $\pm$ 5700<br>(15) | 6.00 $\pm$ 1.50<br>(15)                          |

Более того, полученные с помощью иммунологической модели данные тесно коррелируют с данными по эффективности улавливания ПАУ и летучих НА исследуемыми адсорбентами. Из таблицы 2. видно, что адсорбент цеолит,

импрегнированный «Онкосорбом» в 1.3 раза эффективнее адсорбирует N-нитрозодиметиламин (NDMA), чем адсорбент, состоящий из «Онкосорба». Его эффективность в отношении N-нитрозопиперидина (НПИП) N-нитрозопирролидина (НПИР) и N-нитрозодиэтиламина (НДЭА) в 3.0; 1.8 и 2.9 раза соответственно выше, чем у адсорбента, содержащего в качестве действующего начала «Онкосорб» и в 3.3; 2.2 и 6.25 раз выше, чем у цеолита (клиноптиолита).

**Таблица 3.** Содержание летучих нитрозаминов в искусственной газо-воздушной смеси (нг/л)

| НИТРОЗАМИНЫ | АДСОРБЕНТЫ |       |       |       |
|-------------|------------|-------|-------|-------|
|             | -          | 1     | 2     | 3     |
| НДМА        | 4.08       | 1.75  | 1.71  | 0.90  |
| НПИП        | 70.80      | 5.30  | 4.80  | 1.60  |
| НПИР        | 70.50      | 50.00 | 41.60 | 23.16 |
| НМОР        | 28.00      | 3.00  | 6.00  | 3.30  |
| НДЭА        | 18.00      | 5.00  | 2.30  | 0.80  |

Условные обозначения: НДМА – N-нитрозодиметиламин; НПИП – N-нитрозопиперидин; НПИР – N-нитрозопирролидин; НМОР- N-нитрозоморфолин; НДЭА – N-нитрозодиэтиламин. Адсорбенты : 1-цеолит; 2- «Онкосорб»; 3- «Онкосорб» на цеолите.

Сопоставление способности адсорбентов удалять из газо-воздушных смеси ПАУ (таблица 4) выявляет наибольшие различия в свойствах адсорбентов связывать такие ПАУ как бенз(а)пирен, перилен, дибенз(g,h,i)перилен. И в данном случае наибольшей эффективностью в адсорбции токсикантов из газо-воздушной смеси обладает адсорбент, представленный цеолитом, обработанный «Онкосорбом».

**Заключение.** На основании приведенных данных можно прийти к заключению, что использование иммунологической модели для оценки эффективности очистки газо-воздушных смесей от ПАУ и НА позволит сделать заключение не только об эффективности очистки, но и оценить токсичность исследуемой газо-воздушной смеси.

**Таблица 4.** Содержание полициклических ароматических углеводородов (ПАУ) в искусственной газо-воздушной смеси (нг/л)

| ПАУ                   | АДСОРБЕНТЫ |     |     |     |
|-----------------------|------------|-----|-----|-----|
|                       | -          | 1   | 2   | 3   |
| Пирен                 | 5.4        | 3.3 | 3.8 | 3.0 |
| Бенз(а)пирен          | 5.5        | 1.5 | 1.6 | 1.1 |
| Бенз(е)пирен          | 6.3        | 3.7 | 3.6 | 2.8 |
| Перилен               | 1.7        | 1.1 | 0.8 | 0.3 |
| Дибенз(а,h)антрацен   | 1.0        | 0.4 | 0.6 | 0.4 |
| Дибенз(а,c) антрацен  | 1.2        | 0.4 | 0.5 | 0.4 |
| Дибенз(g,h,i) перилен | 5.0        | 4.3 | 3.7 | 2.5 |
| Бензантрацен          | 1.1        | 0.6 | 0.7 | 0.7 |

Условные обозначения адсорбентов как и в таблице 3.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Горбунова Н.В. Роль онкогенов в инициации и промоции канцерогенеза // В сб. «Мутагены в окружающей среде. Новые подходы к оценке риска для здоровья». СПб НЦ РАН, 1998. С. 34-58.
2. Белицкий Г.А. Неблагоприятные факторы внешней среды и их влияние на здоровье человека. // В сб «Мутагены в окружающей среде. Новые подходы к оценке риска для здоровья.» СПб НЦ РАН, 1998. С. 14-28
3. Мельников О.Р., Момот В.Я., Пятчанина Е.П., Сидорук Е.П. // Изменение соотношения ферро и феррицитохрома Р-450 в печени животных как условие трансформации гепатоцитов под действием N-нитрозодиэтиламина.// Экспериментальная онкология. 2000. Т. 22. С. 139-141.
4. Жигачева И.В., Бурлакова Е.Б., Евсеенко Л.С., Никонова М.Ф., Буланова Е.Г., Литвина М.М., Воронков М.Г. Курение и иммунологический статус организма / /ДАН. 1999. Т. 366. № 5. С. 705-707.

### USING THE IMMUNOLOGICAL MODEL FOR AN ESTIMATION OF EFFICIENCY OF PURIFICATION OF GAS-AIR MIXTURE FROM VOLATILE NITROSOAMINES AND POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS

**Zhigacheva I. V., Evseenko L. S., Burlakova E. B., Nikonova M. F.,  
Krivosheeva L. V.**

*Efficiency of purification of gas-air mixture from polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile nitrosoamines is estimated based on influence of this mixture condensates on the initial rate of spontaneous proliferation of donor peripheral blood lymphocytes. The mitogenic effect of gas-air mixture condensates was estimated according to <sup>3</sup>H-thymidine incorporation into lymphocytes cultivated in media containing condensate of gas-air mixture. Rate of spontaneous proliferation of lymphocytes is closely correlated to the content of polycyclic aromatic hydrocarbons and volatile nitrosoamines in the investigated samples of gas-air mixtures. On the basis of these data the conclusion about an opportunity of use of immunological model for an estimation of efficiency of purification of gas-air mixture from volatile nitrosoamines and polycyclic aromatic hydrocarbons is made*