Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

2.2.9. СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ РАБОТАЮЩИХ В СВЯЗИ С СОСТОЯНИЕМ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Определение цитокинового баланса при оценке состояния здоровья у работников промышленных предприятий

Методические рекомендации
МР 2.2.9.0049—11

gost.e-ecolog.ru

ББК 51.24
О60

О60 **Определение** цитокинового баланса при оценке состояния здоровья у работников промышленных предприятий: Методические рекомендации.—М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.—15 с.

ISBN 978—5—7508—1075—8

1. Разработаны: ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Т. В. Юдина, Л. М. Сааркоппель, Е. Н. Крючкова, И. М. Коновалов, В. А. Мирзонов).

2. Утверждены Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации Г. Г. Онищенко 25 декабря 2011 г.

3. Введены в действие с момента утверждения.

4. Введены впервые.

ББК 51.24

ISBN 978—5—7508—1075—8

© Роспотребнадзор, 2012
© Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012

Содержание

Обозначения и сокращения:.....4
1. Область применения.....5
2. Введение.....5
3. Формула способа.....8
4. Материально-техническое обеспечение.....8
5. Описание способа.....9
6. Пример выполнения способа.....11
7. Эффективность использования способа.....13
Библиографический список.....15

Обозначения и сокращения:

ИЛ – интерлейкины;
ИР – иммунореактивность;
ИФА – иммуноферментный анализ;
Иц – цитокиновый индекс;
Ц – цитокины;
ЦБ – цитокиновый баланс.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный
врач Российской Федерации

Г. Г. Онищенко
25 декабря 2011 г.
Дата введения: с момента утверждения

2.2.9. СОСТОЯНИЕ ЗДОРОВЬЯ РАБОТАЮЩИХ В СВЯЗИ С СОСТОЯНИЕМ ПРОИЗВОДСТВЕННОЙ СРЕДЫ

Определение цитокинового баланса при оценке состояния здоровья у работников промышленных предприятий

Методические рекомендации
МР 2.2.9.0049—11

1. Область применения

Настоящие методические рекомендации предназначены для специалистов органов и организаций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в субъектах Российской Федерации, осуществляющих санитарно-эпидемиологический надзор за условиями труда на промышленных предприятиях, для специалистов по вопросам организации охраны труда на промышленных предприятиях; для врачей лечебно-профилактических организаций, проводящих медицинские осмотры населения, центров, кафедр и клиник профпатологии, медицинских образовательных и научных учреждений.

2. Введение

Приоритетной задачей социальной политики государства и здравоохранения является сохранение здоровья работающего населения, способствующее укреплению трудового потенциала страны и росту экономического благополучия общества (Г. Г. Онищенко, А. И. Потапов, 2010).

Современные условия труда характеризуются комплексным, комбинированным и сочетанным воздействием факторов рабочей среды и трудового процесса при одновременном или последовательном влиянии на функционирование различных органов, а также системы-мишени. В структуре причин формирования профессиональных заболеваний и патологий, связанных с трудовым процессом, ведущее место принадлежит аэрозолям фиброгенного действия, физическим факторам, а также вредным химическим веществам, обладающим аллергенным действием (Н. Ф. Измеров, 2008—2009).

Проблема выявления наиболее ранних симптомов на этапах предварительного или периодического медицинского осмотра диктует необходимость широкого внедрения в практику здравоохранения качественно новых диагностических методов и подходов. Как известно, система иммунитета одна из первых реагирует на неблагоприятные факторы производства (Г. М. Бодиенкова, 2009; В. С. Рукавишников с соавт., 2010), в связи с чем актуальными являются исследования по выявлению общих закономерностей и особенностей нарушения иммунореактивности организма работающих под воздействием негативных производственных факторов.

В ряде работ показано, что в реализации иммунного ответа на всех его этапах и развитии адекватной воспалительной реакции ведущая роль принадлежит регуляторным белкам – цитокинам (А. В. Литовская, 2005; С. Н. Серебренникова, И. Ж. Семинский, 2008).

Исследования в области молекулярной биологии, иммунологии и физиологии указывают на существование коммуникационной сети, обеспечивающей межклеточное взаимодействие на тканевом, органном и системном уровнях как основу для функционирования иммунной системы. Межклеточные связи реализуются посредством медиаторов, секретируемых специализированными клетками лимфоидного и миелоидного ряда.

Роль медиаторов выполняют интерлейкины (ИЛ) – большая группа цитокинов – регуляторных белков, осуществляющих передачу сигналов через контакт со специфическими рецепторами на поверхности клеток. В совокупности ИЛ формируют разветвленную и многоуровневую цитокиновую сеть (Н. М. Бережная, 2007).

Источником наибольшего набора ИЛ являются активированные Т-хелперы, что позволяет этим клеткам выполнять функцию регуляторных лимфоцитов, определяющих характер и напряженность специфического иммунного ответа. В зависимости от характера и стадии нарушения целостности ткани иммунокоррегирующее действие ИЛ может быть

направлено на клетки, участвующие в воспалении, регенерации или в развитии иммунного ответа. Действие ИЛ реализуется по сетевому принципу, то есть передаваемая клеткой информация содержится не в индивидуальном пептиде, а в наборе регуляторных ИЛ. При этом ИЛ действуют в синергизме или антогонизме, каскадно индуцируя выработку друг друга, трансмодулируют поверхностные рецепторы к другим медиаторам воспаления и аллергии.

Цитокиновая сеть является саморегулирующейся системой, нарушение которой приводит к избыточному или недостаточному синтезу определяемых ИЛ, что в свою очередь может вызывать развитие патологических процессов, составляющих основу широкого спектра заболеваний человека. Для ее правильного функционирования необходимо соблюдение баланса цитокинов, содержание которых подвергается существенным изменениям в зависимости от состояния участвующих во взаимодействиях клеток (Г. Ф. Железникова, 2009).

В норме продукция цитокинов незначительна и направлена на поддержание взаимодействия между клетками, продуцирующими ИЛ, и клетками, выделяющими другие медиаторы воспаления. Но она резко возрастает при воспалении в связи с активацией клеток, вырабатывающих их. В начальной стадии развития воспаления одновременно выделяются провоспалительные и противовоспалительные ИЛ. Повреждающее действие провоспалительных цитокинов в значительной степени нейтрализуется противовоспалительными, в их продукции сохраняется баланс. При развитии хронического воспаления наступает дисбаланс между уровнями этих типов медиаторов, результатом чего является клеточное повреждение.

Учитывая множественность, а также синергизм и плейотропность участвующих в этих реакциях цитокинов, определение концентрации в крови какого-то одного из них не адекватно отражает состояние всего цитокинового баланса. Более корректна одномоментная оценка уровня нескольких медиаторов (по меньшей мере, 2—3 из оппозитных подгрупп).

В настоящее время имеются работы, в которых учитывается только односторонний подход к определению активности цитокинового звена, а именно противовоспалительного действия, что не позволяет установить цитокиновый баланс в организме, а также выполнить интегральную оценку взаимного влияния обеих сторон процесса в сети цитокинового каскада.

В настоящих методических рекомендациях изложен способ оценки реактивности иммунной системы организма, базирующийся на показа-

телях цитокинового баланса, как одного из важнейших звеньев формирования риска для здоровья человека.

Преимущество разработанного способа – возможность интегрального количественного выражения активности цитокинового звена воспаления с учетом направленности действия оппозитных подгрупп, что позволит объективно оценить степень отклонений в иммунной системе.

3. Формула способа

Предлагаемый способ включает установление интегрального коэффициента цитокинового баланса путем определения значения индексов интерлейкинов как отношения параметров про- и противовоспалительных оппозитных групп в сыворотке крови к референтным значениям, расчет средних арифметических для каждой группы, устанавление цитокинового индекса $\mathbf{И_Ц}$ (усл. ед.). При значениях $И_Ц \leq 1$ констатируют оптимальный баланс цитокинов, при $И_Ц > 1$ – его нарушение (усиление воспалительных процессов).

Отличительная особенность способа – интегральная оценка, наиболее полно отражающая состояние цитокинового звена в организме, что позволяет объективно оценить изменения в системе иммунитета у работников, подвергающихся воздействию комплекса неблагоприятных производственных факторов.

4. Материально-техническое обеспечение

Вакуумная система для взятия крови
VACUETTE кат. № 455092.
Тест-системы фирмы ЗАО «Вектор-Бест» (РУ
№ ФСР 2008/02120, РУ № ФСР 2009/04035,
РУ № ФСР 2009/04034)
Автоматический иммуноферментный анализатор
Biochem Analette (рег. № 34066—07)
Полуавтоматический иммуноферментный
анализатор Stat Fax–2100 (рег. № 33979—07)
Шейкер термостатируемый на 500-700 об./мин
Stat Fax–2200 (рег. № 33979—07)
Устройство для промывки планшет Flexi Wash
(рег. № 47034—11)
Дозаторы полуавтоматические одноканальные,
объем жидкости 20, 50, 100, 300 и 1 000 мкл
BIOHIT (рег. № 36152—07)

Дозаторы полуавтоматические многоканальные,
объем жидкости 100, 300 мкл BIOHIT
(рег. № 36153—07)

Допустимо использование другого оборудования и материалов, обладающих аналогичными или более высокими свойствами.

5. Описание способа

Способ информативен при проведении клинико-лабораторного обследования рабочих с целью оценки состояния здоровья, профотбора, выявления иммунопатологии и воспалительных процессов в организме, разработки лечебно-профилактических мероприятий.

Способ не требует дополнительного взятия крови, помимо необходимого количества для лабораторных исследований в рамках предварительных, периодических и углубленных медицинских осмотров.

Способ включает:

1. Забор венозной крови, который осуществляется в утреннее время натощак в стандартную пробирку (9 мл), сыворотка получается путем центрифугирования (1 500—3 000 об./мин). Для определения концентрации интерлейкинов в сыворотке крови возможно использование образцов как свежеприготовленных, так и хранившихся при температуре 2—8 °С в течение 24 ч, либо хранившихся в течение 3 месяцев при температуре не выше −16 °С. Образцы сывороток сильно гемолизированные, липемичные могут давать недостоверные результаты. Перед постановкой анализа исследуемые образцы должны быть извлечены из холодильника и прогреты при температуре 18—25 °С в течение 30 мин. Замороженные образцы должны быть быстро разморожены и обязательно тщательно перемешаны до однородной консистенции.

От соблюдения этих требований зависит точность и воспроизводимость результатов анализа.

2. Определение иммуноферментным методом в сыворотке крови с применением тест-систем уровней провоспалительных (ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-1β и др.) и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-4, ИЛ-10).

Метод определения уровня ИЛ основан на твердофазном «сэндвич» – варианте иммуноферментного анализа с применением моно- и поликлональных антител к исследуемым интерлейкинам, сорбированных на поверхности лунок разборного полистирольного планшета. Наборы реагентов (для каждого интерлейкина отдельный) рассчитаны на проведение 96 анализов, включая контроли. Комплектуются всеми необходимыми реагентами для проведения ИФА. Для получения надежных ре-

зультатов необходимо строгое соблюдение инструкций, предлагаемых производителями тест-систем.

Перед работой извлекают набор из холодильника, вскрывают упаковку и выдерживают все компоненты набора, в том числе и запечатанный пакет с планшетом, при температуре от 18 до 25 °С не менее 30 мин. Вскрывают пакет с планшетом и устанавливают на рамку необходимое количество стрипов, оставшиеся неиспользованными стрипы сразу упаковывают и помещают в холодильник.

Анализ включает несколько этапов.

На первом этапе образцы сыворотки крови, а также контроль для построения калибровочного графика (100 мкл) инкубируют в лунках с иммобилизованными антителами. Содержащиеся в исследуемом образце интерлейкины связываются с антителами на твердой фазе. Несвязавшийся материал удаляется отмывкой.

Второй этап – образовавшийся комплекс выявляют с помощью конъюгата (антитела к ИЛ человека с биотином) с пероксидазой хрена. В результате образуется связанный с пластиком «сэндвич». Во время инкубации с субстратом тетраметилбензидина (ТМБ) происходит окрашивание растворов в лунках.

Третий этап – реакцию останавливают добавлением стоп-реагента. Интенсивность окраски прямо пропорциональна количеству содержащегося в образце конкретного ИЛ.

Четвертый этап – определяют концентрацию интерлейкинов с помощью спектрофотометрирования при длине волны 450 нм. Расчет концентрации ИЛ осуществляют по калибровочному графику в координатах: ось абсцисс – концентрация ИЛ (пг/мл); ось ординат – значение оптической плотности образца.

Предлагаемый методический подход состоит в установлении значения индексов интерлейкинов как отношения их концентраций к референтным уровням (в зависимости от используемой тест-системы) и расчете **интегрального цитокинового индекса ($И_Ц$)** в усл. ед., который проводят по формуле:

$$И_Ц = И_1 + (И_2 - 1), \text{ где}$$

$И_1$ (у.е.) – среднее арифметическое значение индексов провоспалительных интерлейкинов;

$И_2$ (у.е.) – среднее арифметическое значение индексов противовоспалительных интерлейкинов.

Уровень **$И_Ц$** (у.е.) отражает цитокиновый баланс в организме. При значениях $И_Ц \leq 1$ констатируют оптимальный баланс цитокинов (отсут-

ствие воспалительного процесса), при $И_Ц > 1$ – его нарушение (усиление воспалительных процессов), включая доклинические изменения.

Установление значения интегрального цитокинового индекса имеет диагностическое и прогностическое значение в оценке дисфункции иммунной защиты, в том числе на доклинических стадиях развития патологии.

Предложенный способ позволяет установить как индивидуальные изменения цитокинового баланса организма, отражающие глубину формирования воспалительного процесса, так и его показатели в равновесных группах для оценки неблагоприятного влияния факторов рабочей среды и объективизации лечебно-профилактических комплексов по результатам обследования различных контингентов работающих.

6. Пример выполнения способа

Способ иллюстрирует данные по расчету интегрального коэффициента цитокинового баланса.

Например, у больного Г., 38 лет, страдающего начальными проявлениями хронического пылевого бронхита, при проведении иммунологического обследования с определением уровней интерлейкинов сыворотки крови с целью диагностики фазы воспалительного процесса были получены следующие данные:

- ИЛ-1β = 10,8 пг/мл;
- ИЛ-2 = 13,1 пг/мл;
- ИЛ-4 = 3,9 пг/мл;
- ИЛ-6 = 12,5 пг/мл;
- ИЛ-8 = 11,3 пг/мл;
- ИЛ-10 = 33,7 пг/мл.

Референтные значения при предложенном способе их определения в сыворотке крови составляют соответственно: ИЛ-1β = 11 пг/мл; ИЛ-2 = 10 пг/мл; ИЛ-4 = 4 пг/мл; ИЛ-6 = 10 пг/мл; ИЛ-8 = 10 пг/мл; ИЛ-10 = 31 пг/мл.

Индексы интерлейкинов составляют:

- И ИЛ-1β = 10,8 : 11 = 0,98 усл. ед.;
- И ИЛ-2 = 13,1 : 10 = 1,31 усл.ед;
- И ИЛ-4 = 3,9 : 4 = 0,97 усл.ед;
- И ИЛ-6 = 12,5 : 10 = 1,25 усл.ед.;
- И ИЛ-8 = 11,3 : 10 = 1,13 усл.ед.;
- И ИЛ-10 = 33,7 : 31 = 1,1 усл.ед..

Значение $И_1$ = (И ИЛ-1β + И ИЛ-2 + И ИЛ-6 + И ИЛ-8) / 4 = (0,98 + + 1,31 + 1,25 + 1,13) / 4 = 1,17 у.е.

Значение $И_2$ = (И ИЛ-4 + И ИЛ-10) / 2 = (0,97 + 1,1) / 2 = 1,035 у.е.

Расчет и значение интегрального цитокинового индекса:

$$И_Ц = И_1 + (И_2 - 1) = 1,17 + (1,035 - 1) = 1,2 \text{ у.е.}$$

Уровень цитокинового индекса 1,2 у.е. свидетельствует о проявлениях воспалительного процесса, что предполагает проведение у данного больного лечебно-профилактического комплекса противовоспалительной физио- и медикаментозной терапии.

После проведенных лечебных мероприятий рекомендуется повторно выполнить клинико-диагностические исследования и рассчитать **Иц.**

Если значение интегрального цитокинового индекса будет равно или меньше 1, то это соответствует оптимальному балансу цитокинов и указывает на снижение активности воспалительного процесса у данного больного.

Изучение уровня цитокинового баланса позволяет выбрать специфическую стратегию коррекции нарушений иммунореактивности при воздействии на организм негативных экзогенных и эндогенных факторов.

Справочно

7. Эффективность использования способа

Разработанный способ был использован при обследовании 420 рабочих цементного производства в возрасте 24—50 лет со стажем работы во вредных условиях до 25 лет. В связи с этим сформированы 3 стажевые группы (табл. 1).

Таблица 1

Показатели цитокинового статуса в зависимости от стажа работы у обследованных рабочих ($M \pm m$)

Стажевые группы	ИЛ-2 0—40 пг/мл	ИЛ-4 0—4 пг/мл	ИЛ-1β 0—11 пг/мл	ИЛ-8 0—30 пг/мл	Иц (усл.ед.)
I гр. < 10 лет	33,4 ± 1,8	3,1 ± 0,2	10,7 ± 1,2	11,6 ± 1.1	0,50 ± 0,04
II гр. 11—20 лет	26,3 ± 1,5	3,6 ± 0,3	7,9 ± 0,7	24,9 ± 1,4	0,66 ± 0,03
III гр. > 20 лет	33,9 ± 1,7	3,9 ± 0,3	9,9 ± 0,5	29,1 ± 1,5	0,95 ± 0,05

В результате клинико-лабораторных исследований у работающих выявлено увеличение интегрального цитокинового индекса **Иц** от 0,5 до 0,95 у.е.

В **I-й** группе рабочих повышенные значения **Иц** регистрировались у 19,2 %, во **II-й** – у 33,4 %, в **III**-й – у 77,4 %, что свидетельствует об изменении иммунореактивности организма, характеризующейся нарастанием выраженности и частоты воспалительных реакций по мере увеличения экспозиции неблагоприятных производственных факторов.

Полученные данные подтверждают, что действие производственной пыли сопровождается синтезом как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Дисбаланс цитокинового статуса отражает хроническое иммунозависимое воспаление, а также связанные с ним нарушения процессов апоптоза и развитие интерлейкин-зависимого вторичного иммунодефицитного состояния.

Выявленные у части рабочих изменения послужили обоснованием дальнейшего углубленного обследования и проведения лечебно-профилактических мероприятий по показаниям.

Положительный эффект предложенного способа состоит в следующем:

• большая точность оценки выраженности воспалительных процессов на основе диагностики нарушений цитокинового баланса и иммунореактивности организма человека;

• информативность полученных результатов.

Таким образом, групповое обследование, выполненное предлагаемым способом, позволило верифицировать наличие воспалительных изменений, сформировать «группу риска» для углубленного обследования, адекватных лечебно-профилактических мероприятий.

Библиографический список

1. Бережная Н. М. Цитокиновая регуляция при патологии: стремительное развитие и неизбежные вопросы //Журнал «Цитокины и воспаление». 2007. № 2. С. 3—8.

2. Бодиенкова Г. М. Состояние иммунореактивности организма работающих в условиях воздействия различных нейротоксикантов. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. 2009. № 1 (65). С. 93—97.

3. Железникова Г. Ф. Цитокины как предикторы течения и исхода инфекций //Журнал «Цитокины и воспаление». 2009. № 1. С. 10—17.

4. Измеров Н. Ф., Прокопенко Л. В. Реализация глобального плана действий ВОЗ по охране здоровья работающих на 2008—2017 годы в РФ //Материалы IV Всероссийского форума «Здоровье нации – основа процветания России». М., 2008. С. 191—192.

5. Измеров Н. Ф., Суворов Г. А., Куралесин Н. А. Физические факторы производственной среды. Гигиеническая оценка и контроль. М.: Медицина, 2009. С. 556.

6. Литовская А. В. Информативность иммунных показателей при оценке действия вредных веществ //Медицина труда и промышленная экология. 2005. № 9. С. 30—33.

7. Онищенко Г. Г. Гигиенические проблемы здоровья населения //Гигиена и санитария. 2010. С. 87—90.

8. Описание изобретения к патенту RU 2150113 C1 «Способ оценки противовоспалительной активности цитокинов», опубликованному 27.05.2009. Авторы: Еричев В. П., Ковальчук Л. В., Ганковская Л. В., Василенкова Л. В., Клебанов Г. И., Долгига Е. Н., Никанкина Л. В.

9. Описание изобретения к патенту RU 2417263 C2 «Способ диагностики воспалительного процесса при раннем ревматоидном артрите», опубликованному 27.04.2011. Авторы: Ребриков Д. В., Бурменская О. В., Трофимов Д. Ю.

10. Потапов А. И. Здоровье населения региона и приоритеты здравоохранения //Здравоохранение Российской Федерации. 2010. № 5. 56 с.

11. Рукавишников В. С., Бодиенкова Г. М., Боклаженко Е. В., Кротова О. Н. Сравнительная оценка иммунореактивности организма работающих при воздействии физических факторов различного этиогенеза //Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2010. № 4 (74). С. 51—53.

12. Серебренникова С. Н., Семинский И. Ж. Роль цитокинов в воспалительном процессе //Сибирский медицинский журнал. 2008. № 6. С. 5—8.

Определение цитокинового баланса при оценке состояния здоровья у работников промышленных предприятий

Методические рекомендации
МР 2.2.9.0049—11

Редактор Н. В. Кожока
Технический редактор Е. В. Ломанова

Подписано в печать 17 05.12

Формат 60x88/16 Печ. л 1,0
Тираж 200 экз Заказ 38

Федеральная служба по надзору
в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
127994, Москва, Вадковский пер., д. 18, стр. 5, 7

Оригинал-макет подготовлен к печати и тиражирован
отделом издательского обеспечения
Федерального центра гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
117105, Москва, Варшавское ш., 19а

Отделение реализации, тел./факс 952-50-89

gost.e-ecolog.ru