

УДК 616-097

ОСОБЕННОСТИ ЛИМФОЦИТАРНО-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА У ДЕТЕЙ, ПРОЖИВАЮЩИХ НА ТЕХНОГЕННО-НАГРУЖЕННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ

© 2012 г. О. В. Долгих*, Н. В. Зайцева, Д. Г. Дианова,
Т. С. Лыхина, А. В. Кривцов, А. М. Гугович

Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения
Роспотребнадзора, 614045, Россия, Пермь, ул. Орджоникидзе, 82;

*электронная почта: oleg@fcrisk.ru

Поступила в редакцию 27.07.2011 г.

Многообразие и интенсивность неблагоприятной химической нагрузки на индустриальных территориях соответствуют высокому содержанию токсикантов в биосредах и способствуют изменению иммунной системы. Для ранней диагностики нарушений здоровья при различных путях поступления химических веществ в организм, в том числе с водой сети хозяйственно-питьевого водоснабжения, актуально выявление маркеров особенностей иммунного статуса. Оценка иммунного статуса, проведенная у 491 ребенка дошкольного возраста, проживающего в условиях техногенной нагрузки, выявила увеличение экспрессии рецептора CD25⁺ на иммунокомпетентных клетках, что указывает на повышенное функциональное состояние активированных Т-лимфоцитов при гаптенной нагрузке. Отсутствие повышения экспрессии CD95⁺, маркера негативной активации лимфоцитов, в условиях загрязнения биосред хлорорганическими соединениями свидетельствует о напряжении адаптационных процессов клеточной регуляции. Все это подчеркивает важность включения в иммунограмму изучение ранних (CD25⁺) и поздних (CD95⁺) маркеров активации. Таким образом, существует необходимость в идентификации маркеров ответа на экспозицию с использованием современных иммунологических методов, приоритетным из которых является CD-типирование при помощи проточной цитометрии.

Ключевые слова: хлорорганические соединения, ранний маркер активации, поздний маркер активации, апоптоз, субпопуляция лимфоцитов.

Сложившийся в нашей стране стандарт оценки иммунного статуса, включающий в себя двухуровневое изучение состояния иммунной системы [1], имеет, несомненно, важное значение для лечебно-диагностической деятельности врача. Однако спектр используемых критериев не всегда отвечает требованиям современной медицины и запросам практикующих врачей. В частности, констатируется ограниченность методов иммунофенотипирования в трактовке клинической картины конкретного пациента, проживающего на техногенно-нагруженных территориях. Более того, часто один и тот же набор методов оценки иммунного статуса применяется ко всем видам патологий с самыми разнообразными механизмами их развития [2]. Подобное положение формирует основу для необоснованных рекомендаций по профилактике иммунных нарушений.

Цель представленной работы состояла в оценке особенности отдельных показателей клеточного звена иммунной системы у детей, проживающих на техногенно-нагруженных территориях, с

использованием современной многопараметровой системы для иммунофенотипирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Всего, включая контрольную группу, обследован 491 ребенок в возрасте от 3 до 7 лет (средний возраст 5.5 ± 0.11 года), из них 55% мальчиков (270) и 45% девочек (221). Основную группу составили 286 детей, проживающих на техногенно-нагруженных территориях, где источником хозяйственно-питьевого водоснабжения служат поверхностные воды низкого питьевого качества по санитарно-химическим показателям (90.9% нестандартных проб). В данных районах используется многоступенчатая технология обработки исходной воды, включающая первичное хлорирование, коагуляцию, осветление, фильтрацию и вторичное хлорирование. Дополнительное хлорирование в сочетании с присутствием в воде большого количества органических соединений создает реальную опасность загрязнения воды в

результате образования вторичных, зачастую более токсичных, хлорорганических производных. Проведен мониторинг содержания химических соединений в воде с учетом эффекта суммации, или “суммарной” опасности загрязнения воды. Установлено, что суммарное загрязнение воды разводящей сети хлороформом, дихлорэтаном, дихлорбромметаном, дибромхлорметаном находится в пределах 1.1–2.5 мг/дм³, что превышает гигиенический регламент (≤ 1). Контрольная группа – 205 детей дошкольного возраста, проживающих вне зоны антропогенного влияния промышленных предприятий, где в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения используются подземные грунтовые воды. Основная и контрольная группы были сопоставимыми по полу, возрасту, соматической заболеваемости.

Органические соединения (дибромхлорметан, дихлорбромметан, 1,2-дихлорэтан, хлороформ) в биосредах (кровь) определяли с использованием капиллярного газового хроматографа “Кристалл 2000” (Россия) в соответствии с МУК 4.1.2102-4.1.2116-06.

Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы Becton Dickinson (BD, США) с использованием универсальной программы CellQuestPro с помощью компьютера Macintosh. Определение Популяции и субпопуляции лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD25⁺, CD95⁺) определяли методом мембранной иммунофлуоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител к мембранным CD-рецепторам (BD), при этом регистрировали суммарно не менее 10000 событий.

Для определения целевых популяций клеток использовали следующие сочетания моноклональных антител:

- CD3/CD8/CD45/CD4
- CD3/CD16⁺CD56/CD45/CD19
- CD3/CD45/CD25/CD95

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ Microsoft Office и дополнительной программы статистического анализа Statistica 6.0. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка уровня контаминации крови у всех обследуемых позволила установить, что концентрация определяемых хлорорганических соединений (дибромхлорметан, дихлорбромметан, 1,2-дихлорэтан, хлороформ) в биосредах детей основ-

ной группы статистически значимо превышает значения, зафиксированные в группе контроля ($p < 0.05$). У детей, проживающих на техногенно-нагруженных территориях, уровень дибромхлорметана в биосредах составил 0.00001 ± 0.000001 мг/л, дихлорбромметана – 0.0005 ± 0.0002 мг/л, 1,2-дихлорэтана – 0.0196 ± 0.0037 мг/л, хлороформа – 0.0113 ± 0.0024 мг/л. Изучаемые органические соединения в крови детей контрольной группы при помощи используемой методики не идентифицировались.

Сравнительный анализ иммунограмм выявил значимое снижение относительного числа CD3⁺ и CD4⁺ у детей основной группы по сравнению со значениями в контроле ($p < 0.05$) (таблица). В группе детей, проживающих в условиях техногенной нагрузки, отмечено статистически значимое повышение абсолютного и относительного числа CD3⁺CD16⁺CD56⁺-лимфоцитов (NKT) и CD19⁺-лимфоцитов по сравнению с контрольными величинами ($p < 0.05$). Количество клеток (по относительному и абсолютному показателю), экспрессирующих CD25⁺-маркер, у детей из техногенно-нагруженных территорий, значимо превышает контрольные величины ($p < 0.05$). Однако оценка полученных результатов не выявила статистически значимых различий в содержании CD95⁺-лимфоцитов (Fas) у детей основной и контрольной группы. При помощи корреляционного анализа выявлена статистически значимая отрицательная связь между концентрацией дибромхлорметана и уровнем CD95⁺-рецептора на Т-лимфоцитах ($r = -0.15$, $p < 0.05$).

Антигенная стимуляция приводит к активации и пролиферации Т-клеток, поэтому должен работать механизм, позволяющий элиминировать клоны больше не нужных клеток и поддерживать гомеостаз в иммунной системе. Одним из таких механизмов является индуцированная активация клеточной гибели по апоптотическому пути [3], обусловленная повторным связыванием антигена с Т-клеточным рецептором уже активированной клетки. Этот путь, по некоторым данным, требует взаимодействия между Fas и FasL (Fas-лиганд), причем синтез FasL увеличивается после антигенной стимуляции большим количеством антигена. Этот механизм, с одной стороны, помогает поддерживать клеточный гомеостаз, а с другой – препятствует длительному ответу Т-клеток на антигены, что может неблагоприятно влиять на возможное возникновение патологического процесса.

Исследование причин снижения содержания CD4-лимфоцитов показывает высокую склонность этих клеток к апоптозу [4]. Так как апоптоз Th1-клеток развивается быстрее, чем Th2, имен-

но Th1-клетки в большей степени подвержены генетически детерминированной клеточной гибели [5]. Можно предположить, что большей степенью готовности к Fas-зависимому апоптозу будут отличаться Th1. Установлено также, что нарушение апоптоза мононуклеарных клеток может быть обусловлено цитокиновым механизмом регуляции. Большинство исследователей считают популяцию NKT ответственной за реализацию цитокинового взрыва [6], в том числе, за повышенную выработку интерлейкинов Th2-профиля в ответ на антигенную стимуляцию. Необходимо отметить, что медиаторы Th1-лимфоцитов способствуют развитию апоптоза, медиаторы Th2-лимфоцитов препятствуют ему [7], а преобладание эффектов Th2-клеток способствуют подавлению апоптоза при антигенной стимуляции. Однако другие исследователи относят NKT-лимфоциты к популяции регуляторных Т клеток, приобретающих супрессорные характеристики в процессе антигенной стимуляции [8]. В ряде работ установлено, что источником FasL, необходимого для процесса активационного апоптоза Т-лимфоцитов, служат активированные В-лимфоциты [7, 9], причем экспрессировать FasL способны только зрелые В-клетки [10]. Предполагается, что В-лимфоциты могут служить источником интерлейкина-4 для дифференцировки Th2-клеток [11], однако это не единственный механизм поддержания Th2-ответа. На основании этих данных можно предположить, что интенсивность В-клеточной активации, которая часто регистрируется в ходе антигенной стимуляции, представляет собой не только фактор адаптивного иммунитета, но и условие, необходимое для торможения иммунологической ответной реакции [7]. В настоящее время полагают, что качество иммунного ответа непосредственно связано с активностью различных субпопуляций иммунокомпетентных клеток [12].

Одно из перспективных направлений изучения иммунного статуса — анализ активационного профиля субпопуляций лимфоцитов. Многолетний экспериментальный опыт показал, что определение экспрессии CD25-, CD95-маркеров на поверхности лимфоцитов считается наиболее простым и эффективным способом оценки активационных процессов в иммунной системе.

На сегодняшний день известно большое число активационных антигенов, которые экспрессируются на мембране лимфоцитов, в том числе активационные антигены дифференцировочного характера CD25 и CD95. CD25 рассматривают как ранний маркер активации, а CD95 — как поздний маркер [7, 13, 14].

Характеристика отдельных показателей иммунной системы обследуемых

Показатель	Группа контроля, (n = 205), $M \pm m$	Основная группа, (n = 286), $M \pm m$
CD3 ⁺ , %	72.58 ± 1.49	68.05 ± 0.69*
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	1.83 ± 0.13	1.79 ± 0.07
CD4 ⁺ , %	40.58 ± 1.98	36.26 ± 0.68*
CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	1.02 ± 0.08	0.95 ± 0.04
CD8 ⁺ , %	25.94 ± 1.54	25.19 ± 0.71
CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л	0.66 ± 0.06	0.66 ± 0.03
CD19 ⁺ , %	13.79 ± 1.01	17.33 ± 0.84*
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0.35 ± 0.04	0.45 ± 0.03*
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	11.56 ± 1.51	13.98 ± 0.73*
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , 10 ⁹ /л	0.29 ± 0.05	0.37 ± 0.02*
CD25 ⁺ , %	5.42 ± 0.12	6.49 ± 0.46*
CD25 ⁺ , 10 ⁹ /л	0.14 ± 0.004	0.17 ± 0.01*
CD95 ⁺ , %	24.87 ± 0.60	26.03 ± 1.01
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /л	0.69 ± 0.07	0.68 ± 0.04

*Различие статистически значимо ($p < 0.05$).

Экспрессия CD25 считается обязательным этапом активации иммунной системы и признаком готовности лимфоцитов к вступлению в пролиферацию и дифференцировку. Анализ активационных процессов в иммунной системе показал, что для антигенной нагрузки характерен высокий уровень прироста в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации — CD25-антиген, что обеспечивает быстрое размножение и последующую дифференцировку наивных Т-клеток до зрелых форм.

К апоптотическим маркерам, позволяющим судить о степени негативной активации иммунокомпетентных клеток, относится CD95-маркер, экспрессируемый мембранами активируемых мононуклеаров. В качестве одного из апоптотических маркеров, позволяющих судить о степени негативной активации иммунокомпетентных клеток, используют CD95-маркер, экспрессируемый мембранами активируемых мононуклеаров. Fas-антиген при взаимодействии с Fas-лигандом запускает процессы апоптоза в клетке после ее активации и выполнения возложенной на нее

функции и позволяет выявить способность иммуноцитов к иммунному ответу. Величина экспрессии маркера CD95 отражает готовность лимфоцитов вступить в апоптоз — включить Fas-зависимый механизм программированной клеточной гибели.

Все вышеперечисленное (увеличение CD25⁺-клеток по относительной и абсолютной величине, отсутствие изменения относительного и абсолютного числа CD95⁺-лимфоцитов) на фоне повышенной гаптенной нагрузки позволяет предположить развитие стрессовых изменений физиологического течения Fas-зависимого апоптоза у обследуемых детей, что является одним из механизмов функционального дисбаланса иммунорегуляции в условиях техногенной нагрузки. Потеря равновесия между пролиферацией Т-клеток и индуцированной активацией клеточной гибели приводит к нарушению процесса элиминации потенциально защищающих специфических клонов, завершающегося развитием иммунопатологических состояний.

В настоящее время модуляция апоптоза иммунокомпетентных клеток рассматривается как возможный подход к терапии ряда заболеваний иммунной системы [15], однако не всегда при иммунодиагностике оценивают основные маркеры апоптоза.

Все это подчеркивает важность включения в иммунограмму определение ранних (CD25⁺) и поздних (CD95⁺) маркеров активации, участвующих в протективном ответе и в патологии, для своевременной и эффективной диагностики, а также для создания новых мер профилактики и терапии аутоиммунных и пролиферативных заболеваний.

Приведенные результаты в их совокупности показывают, что в случае антигенной нагрузки наблюдается максимальное напряжение адаптационных процессов регуляции клеточного звена иммунной системы в ответ на гаптенную стимуляцию техногенными химическими факторами. Существует необходимость в идентификации как маркеров экспозиции, так и маркеров ответа с использованием современных иммунологических методологий, приоритет среди которых отдается CD-типированию методом проточной цитометрии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петров Р.В., Лопухин Ю.М., Чередеев А.Н., Ковальчук Л.В., Лебедев К.А. 1984. *Оценка иммунного статуса человека: Методические рекомендации*. М.: Молодая гвардия, 101 с.
2. Бережная Н.М. 2006. Иммунологические исследования в клинике: состояние вопроса. *Иммунология*. 1, 18–23.
3. Долгих О.В., Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Гугович А.М. 2011. Особенности клеточной гибели у детей. *Вестник Росс. военно-медицинской акад.* 1 (33), 150.
4. Lundy S.K., Lerman S.P., Boros D.L. 2001. Soluble egg antigen-stimulated t helper lymphocyte apoptosis and evidence for cell death mediated by FasL+ T and B cells during murine schistosoma mansoni infection. *Infection Immunity*. 69 (1), 271–280.
5. Lingnau K., Hoehn P., Kerdine S., Koelsch S., Neudorff C., Palm N., Ruede E., Schmitt E. 1998. IL-4 in combination with TGF- β favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J. Immunol.* 161 (9), 4709–4718.
6. Сепиашвили Р.И., Балмасова И.П. 2006. Естественные киллеры и их рецепторы, специфичные к МНС-I. *Иммунология*. 1, 46–51.
7. Порядин Г.В. 2008. *Молекулярные и клеточные механизмы иммунопатологии (Состояние и перспективы развития исследований): Актовая речь*. М.: РГМУ. 48 с.
8. Манских В.Н. 2006. Натуральные киллеры — отдельный класс иммунокомпетентных клеток или совокупность функциональных субпопуляций. *Иммунология*. 1, 56–57.
9. Nilsson N., Ingvarsson S., Borrebaeck C.A.K. 2000. Immature B cells in bone marrow express Fas/FasL. *Scand. J. Immunol.* 51, 279–284.
10. Irmeler M., Renno T., Schroeter M., Hahne M., French L., Bornand T., Mac-Donald H.R., Tschopp J. 1996. Activated B cells express functional Fas ligand. *Europ. J. Immunol.* 26 (3), 721–724.
11. Harris D.P., Haynes L., Sayles P.C., Duso D., Eaton S., Lepak N., Johnson L., Swain S., Lund F. 2000. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat. Immunol.* 1, 475–482.
12. Хаитов Р.М., Игнатъева Г.А., Сидорович И.Г. 2002. *Иммунология*. М.: Медицина, 536 с.
13. Булгакова В.А. 2009. Клиническое значение изучения маркеров активации и апоптоза иммунокомпетентных клеток при atopической бронхиальной астме у детей. *Педиатрия*. 8 (2), 12–18.
14. Бурда Ю.Е., Ершов Д.В. 2005. Влияние аллогенных фибробластов и их супернатанта на экспрессию активационных маркеров мононуклеарами периферической крови *in vitro*. *Фундаментальные исследования*. 5, 43–43.
15. Миннебаев М.М., Бойчук С.В. 2002. *Апоптоз: природа феномена и его роль в норме и патологии*. Казань: КГМУ. 34 с.

Features of Lymphocytes as Components of Cellular Immunity in Children Living in Industrially Polluted Areas

O. V. Dolgikh*, N. V. Zaitseva, D. G. Dianova, T. S. Lykhina, A. V. Krivtsov, A. M. Gugovich

Federal Scientific Centre for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies of Federal service on customers' rights protection and human well-being surveillance, Ordzhonikidze str., 82, Perm, 614045 Russia;

**e-mail: oleg@fcrisk.ru*

The variety and intensity of adverse chemical exposure in industrialized areas correlate with high levels of toxicants in human bio-samples and may cause alterations of the immune system. Early diagnosis of health disorders, related to chemical exposure via different routes including water from a water supply network requires identification of markers characterizing the immune status. The assessment of the immune status in 491 children under the age of 7 living in an area with high levels of industrial pollution revealed an increase in the expression of CD25⁺ receptor on immunocompetent cells, indicating the activation of T-lymphocytes during exposure to haptens. The expression of CD95⁺, a marker of reduced lymphocyte activation, was not increased in children whose bio-samples contained chlorinated organic compounds, which indicates the activation of adaptation processes of cellular regulation. These findings emphasize the importance of including early (CD25⁺) and late (CD95⁺) activation markers in immune testing. Thus, it is of necessity to identify markers of response to exposure, using current immunological methods; the priority method is flow cytometry immunophenotyping.