

УДК 613.954:502.3+616.097

АДАПТАЦИОННЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ФЕНОЛА

© 2013 Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова, О.В. Долгих

Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления
рисками здоровью населения, г. Пермь

Поступила в редакцию 22.09.2013

Изложены результаты обследования детей, проживающих в условиях хронического воздействия фенола. В данном исследовании показано, что диапазон концентраций фенола (от 0 и больше 0,081 мг/дм³) в крови обследуемых детей определяет динамическое изменение адаптационных возможностей иммунной системы. Соотношением внешних и внутренних условий формируются адаптационные процессы, ассоциированные с неблагоприятным влиянием фенола.

Ключевые слова: фенол, адаптация, иммунная система, апоптоз

Уровень здоровья населения ставится в прямую зависимость от интенсивности, продолжительности влияния загрязнения и степени адаптации индивида к среде обитания [3, 5]. Наиболее эффективным вариантом снижения и профилактики антропогенного прессинга является комплексный мониторинг состояния природной среды и ее обитателей, одним из элементов которого является оценка действия ксенобиотиков на иммунную систему организма как наиболее чувствительную к токсикантам [4, 12].

Цель работы: оценить особенности изменения адаптационных возможностей у детей, проживающих в условиях хронического воздействия фенола.

Материалы и методы. Исследование выполнены на примере детского населения Пермского края. Группу наблюдения составили 154 ребенка младшего дошкольного возраста, постоянно проживающие на территории наблюдения и посещающие не менее 1 года детские организованные учреждения, расположенные на расстоянии от 0,3 до 3 километров от источника загрязнения среды обитания исследуемыми органическими соединениями (фенол) [9]. Биомедицинские исследования у детей выполнены в соответствии с обязательным соблюдением

этических принципов медико-биологических исследований, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 года с дополнениями 1983 года.

Для выявления воздействия химических факторов среды обитания на состояние здоровья проведены натурные исследования содержания приоритетных загрязняющих веществ (фенол) в атмосферном воздухе в районе детских садов на территории интенсивного промышленного освоения. Идентификация фенола в биосредах (кровь) выполнялось в соответствии с методическими указаниями «Сборник методик по определению химических соединений в биологических средах», утвержденными Минздравом России 06.09.99. №763-99 – 4.1.779.99. Фенотипирование лимфоцитов, идентификацию мембранных и внутриклеточных маркеров апоптоза, детекцию апоптоза проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» («BD», USA), компьютерную обработку осуществляли с использованием программы CellQuestPro. Определение субпопуляций лимфоцитов (CD25⁺, CD95⁺ (FAS)) проводили методом мембранной иммуофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител (МКАТ) к мембранным CD-рецепторам («BD», USA; «Becton Coulter» «BC», USA). Для определения уровня экспрессии рецептора к фактору некроза опухоли-α 1-го типа (TNFRI) использовали цитофлюориметрический метод, основанный на взаимодействии соответствующих МКАТ с мембранным рецептором к TNFα на лимфоцитах. Уровень апоптоза лимфоцитов определяли с помощью окрашивания аннексином V-FITC

Зайцева Нина Владимировна, академик РАМН, доктор медицинских наук, профессор, директор. E-mail: root@fcrisk.ru

Дианова Дина Гумеровна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики. E-mail: dianovadina@rambler.ru

Долгих Олег Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов диагностики. E-mail: oleg@fcrisk.ru

(Annexin V-FITC) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD (7-aminoactinomycin D) («BC», USA). Annexin V-FITC⁺7-AAD⁻ – ранний апоптоз (апоптотические клетки), Annexin V-FITC⁺7-AAD⁺ – поздний апоптоз и некроз [10]. Цитокины (TNF α , фактор некроза опухоли альфа) определяли с помощью иммуноферментного анализа (тест-системы фирмы «Вектор-Бест», г. Новосибирск) на анализаторе «Elx808IU».

Для выбора критериев оценки значимости межгрупповых различий средних проверяли соответствие формы выборочных распределений нормальному, используя критерий χ^2 , а также контролировали равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. В случае отклонения от нормального распределения, для сравнения данных использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При соответствии данных нормальному распределению использовали t-критерий Стьюдента. Результаты исследования представлены в виде среднего значения (M) и ошибки средней (m) изученных показателей. Во всех процедурах статистического анализа рассчитывался достигнутый уровень значимости (p), при этом критический уровень значимости в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты и их обсуждение. При исследовании качества атмосферного воздуха на территории наблюдения зарегистрированы превышения фенола до 2,7 ПДК_{с.с.} (предельно допустимая концентрация среднесуточная) и до 1,9 ПДК_{м.р.} (предельно допустимая концентрация максимально разовая). Кратность превышения ПДК_{с.с.} и ПДК_{м.р.} фенола составляет 2,7 раза и 1,9 раз соответственно. Средняя концентрация фенола в крови детей, проживающих на территории наблюдения, составила $0,223 \pm 0,029$ мг/дм³, что статистически значимо ($p < 0,05$) превышает фоновые значения $0,010 \pm 0,007$ мг/дм³. Все обследуемые дети, проживающие в условиях внешнесредовой экспозиции органическими соединениями, были поделены на три группы с учетом контаминантной нагрузки фенолом. Результаты обследования выявили, что у детей II (содержание фенола в крови в диапазоне 0,041–0,080 мг/дм³) и III (контаминация биосред фенолом выше 0,081 мг/дм³) групп среднее содержание фенола в крови статистически значимо ($p < 0,05$) превышает среднегрупповое содержание анализируемого вещества в образцах крови детей I группы (диапазон фенола в крови 0–0,040 мг/дм³) (табл. 1). В условиях длительной экспозиции фенолом у экспонируемого населения в крови регистрируется фенол, который можно рассматривать как маркер экспозиции [7].

Таблица 1. Диапазон концентрации фенола в крови обследуемых детей и соответствующие уровни показателей ($M \pm m$)

Показатели	I группа, n=30	II группа, n=60	III группа, n=64	p^1	p^2
концентрация фенола в крови, мг/дм ³					
диапазон концен- трации	0-0,040	0,041-0,080	> 0,081		
среднее значение	0,019±0,003	0,051±0,001	0,412±0,029	0,000	0,000
Характеристика биомаркеров апоптоза с учетом уровня токсикантов в крови					
CD25 ⁺ , %	5,95±0,55	5,19±0,24	5,97±0,30	0,600	0,700
CD25 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,17±0,02	0,15±0,01	0,18±0,01	0,600	0,900
CD95 ⁺ , %	18,32±1,80	14,22±0,65	20,22±1,27	0,020	0,300
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,52±0,05	0,40±0,02	0,60±0,04	0,045	0,060
p53, %	0,75±0,12	0,69±0,08	0,39±0,08	0,500	0,010
TNFR1, %	0,67±0,10	0,57±0,08	0,30±0,03	0,500	0,002
TNFα, пкг/мл	0,35±0,09	0,40±0,11	0,16±0,06	0,500	0,100
Annexin V- FITC ⁺ 7-AAD ⁻ , %	0,61±0,08	0,53±0,07	0,99±0,06	0,500	0,002
Annexin V- FITC ⁺ 7-AAD ⁺ , %	6,45±0,79	6,41±0,58	7,25±0,46	0,700	0,500

Примечание: p^1 - различие между I группой и II группой по средним величинам $p < 0,05$; p^2 - различие между I группой и III группой по средним величинам $p < 0,05$

Оценка иммунного статуса показала, что у детей II группы статистически значимо ($p < 0,05$) снижено количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD95-антиген, а также достоверно

($p < 0,05$) реже определяется внутриклеточный белок p53 в сравнении с результатами, полученными у детей I группы. Обнаружено, что у детей при контаминации биосред фенолом выше 0,081

мг/дм³ статистически значимо ($p < 0,05$) повышается количество Annexin V-FITC⁺7-AAD⁻-лимфоцитов относительно значений, полученных у обследуемых I группы. Анализ иммунограмм, выявил, что у детей III группы статистически значимо ($p < 0,05$) снижена экспрессия белка p53 и TNFR1 в сравнении с результатами, зарегистрированными у детей I группы.

При содержании фенола в биосредах в диапазоне 0-0,040 мг/дм³ у детей формируется срочная адаптация, ассоциированная с воздействием фенола. Повышение в биологических субстратах концентрации изучаемого вещества от 0,041 мг/дм³ до 0,08 мг/дм³ у обследуемых вызывает снижение срочных адаптационных возможностей организма, что проявляется в достоверном ($p < 0,05$) снижении экспрессии сигнального маркера CD95⁺ и отсутствием активации апоптоза в условиях повышения гаптенной нагрузки. Увеличение в крови концентрации фенола более чем 0,081 мг/дм³ формирует долгосрочную адаптацию, что выражается в модификации (стимуляции) апоптоза ($p < 0,05$) иммунокомпетентных клеток на фоне стабилизации количества CD95⁺-клеток.

Долгосрочные адаптационные процессы в условиях повышенной внешнесредовой экспозиции фенолом у обследуемых детей достигаются за счет активации FAS-зависимого апоптоза на фоне угнетения факторов, опосредующих TNF-зависимый и p53-зависимый апоптоз. Роль апоптоза значима в уравнивании эффекта клеточной пролиферации, дифференцировке, а также в элиминации функционально неполноценных иммунокомпетентных клеток. Для обеспечения нормальной жизнедеятельности организма в условиях экспозиции необходима функциональная активность всех звеньев иммунной системы в полном объеме и на всех этапах реализации адаптации.

Среди таких черт в приспособлении организма к любым факторам среды следует выделять два вида адаптации – срочную, но несовершенную, и долговременную, совершенную [6]. В результате длительного, постоянного или многократно повторяющегося действия на организм факторов среды постепенно возникает долговременная адаптация. Основными условиями долговременной адаптации являются последовательность и непрерывность воздействия экстремального фактора [1]. Принципиальной особенностью долговременной адаптации является то, что она возникает не на основе готовых физиологических механизмов, а на базе вновь сформированных программ регулирования [8]. Долговременная адаптация, по существу, развивается на основе многократной реализации срочной

адаптации и характеризуется тем, что в итоге постепенного количественного накопления каких-то изменений организм приобретает новое качество в определенном виде деятельности – из неадаптированного превращается в адаптированный [11]. Как срочная, так и долговременная адаптация организма к действию стрессорных раздражителей начинается с нарушений гомеостаза организма. Вероятность того, что конкретное химическое вещество вызовет нарушение гомеостаза, в конечном счете, зависит от ряда переменных, включая уровень воздействия химического вещества на организм, распределение и удержание химического вещества по мере попадания в организм, эффективность систем метаболической активации и/или детоксикации в тканях-мишенях и др. [2].

Выводы: у детей, проживающих в условиях хронического воздействия фенола, при содержании данного вещества в крови от 0 до 0,04 мг/дм³ формируется **срочная** (несовершенная, незавершенная) адаптация; при концентрации от 0,041 мг/дм³ до 0,08 мг/дм³ – **переход от срочных на долгосрочные адаптационные процессы** (снижение ($p < 0,05$) экспрессии CD95⁺-рецептора, тенденция снижения апоптоза); при концентрации более 0,08 мг/дм³ – **долгосрочные (совершенная)** адаптационные реакции, реализуемые за счет активации FAS-зависимого апоптоза при ингибировании составляющих TNF- и p53-зависимого апоптоза (повышение ($p < 0,05$) количества CD95⁺-лимфоцитов и Annexin V-FITC⁺7-AAD⁻-лимфоцитов, снижение ($p < 0,05$) экспрессии TNFR1⁺-клеток и внутриклеточного белка p53). Очевидно, до начала действия фактора, к которому развивается адаптация, в организме отсутствует полностью сформированный механизм, обеспечивающий адекватное приспособление.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Агаджанян, Н.А. Адаптация и резервы организма. – М.: Физкультура и спорт, 1983. 176 с.
2. Бочков, Н.П. Клиническая генетика. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. 448 с.
3. Жданова-Заплесвичко, И.Г. Окружающая среда как фактор риска заболеваемости детей в регионе с газоперерабатывающей промышленностью: автореф. дис. канд. мед. наук. – М., 2006. 23 с.
4. Забродский, П.Ф. Экологическая иммунология / П.Ф. Забродский, Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. – М.: Изд-во ВНИРО, 1995. 219 с.
5. Зайцева, Н.В. Особенности клеточного звена иммунитета у детей в условиях внешнесредовой экспозиции толуолом, формальдегидом, фенолом / Н.В. Зайцева, О.В. Долгих, Д.Г. Дианова // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. 2012. Т. 14, № 5(2). С. 341-343.

6. *Меерсон, Ф.З.* Основные закономерности индивидуальной адаптации // Физиология адаптационных процессов (Руководство по физиологии). – М.: Наука, 1986. 635 с.
7. *Рахимов, Р.Х.* Введение в «Инфра Р» терапию по методу Р. Рахимова / *Р.Х. Рахимов, Н.Н. Тихонова.* – Ташкент: «Фаргона», 2005. С. 14. – Режим доступа: <http://ks.uz/book/metod5/index.htm>.
8. *Онищенко, Г.Г.* Гигиеническая индикация последствий для здоровья при внешнесредовой экспозиции химических факторов / *Г.Г. Онищенко, Н.В. Зайцева, М.А. Землянова*, под ред. *Г.Г. Онищенко.* – Пермь: Книжный формат, 2011. 532 с.
9. Р 2.1.10.1920-04 Руководство по оценке риска для здоровья населения при воздействии химических веществ, загрязняющих окружающую среду. п. 6.4.5.2.
10. *Сибиряк, С.В.* Оценка апоптоза в иммунологических исследованиях: краткое методическое руководство / *С.В. Сибиряк, С.В. Хайдуков, А.В. Зурочка* и др. – Екатеринбург: УрО РАН, 2008. 59 с.
11. *Солодков, А.С.* Физиология спорта: Учебное пособие / *А.С. Солодков, Е.Б. Сологуб.* – СПб.: СПбГАФК им. П. Ф. Лесгафта, 1999. 231 с.
12. *Hermann, A.C.* Effects of arsenic on zebrafish innate immune system / *A.C. Hermann, C.H. Kim* // *Mar. Biotechnol.* (NY). 2005. V. 7, №5. P. 494-505.

ADAPTATION POSSIBILITIES OF THE IMMUNE SYSTEM IN THE CONDITIONS OF CHRONIC PHENOL IMPACT

© 2013 N.V. Zaytseva, D.G. Dianova, O.V. Dolgikh

Federal Scientific Center of Medical and Preventive Population Health Risks
Management Technologies, Perm

Results of examination the children, living in conditions of chronic phenol impact are explained. In this research it is shown that the range of phenol concentration (from 0 and more than 0,081 mg/dm³) in blood of examines children defines dynamic change of adaptation possibilities of immune system. The ratio of external and internal conditions forms the adaptation processes associated with adverse phenol impact.

Key words: *phenol, adaptation, immune system, apoptosis*

*Nina Zaytseva, Academician of RAMS, Doctor of Medicine, Professor,
Director. E-mail: root@fcrisk.ru*

*Dina Dianova, Candidate of Medicine, Senior Research Fellow at the
Laboratory of Cells Methods of Diagnostics. E-mail: dianovadina@rambler.ru*

*Oleg Dolgikh, Doctor of Medicine, Professor, Chief of the Department of
Immunobiological Methods of Diagnostics. E-mail: oleg@fcrisk.ru*