

УДК 613.954:502.3+616.097

ВЛИЯНИЕ КОНТАМИНАЦИИ ФОРМАЛЬДЕГИДОМ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У ДЕТЕЙ

© 2014 Н.В. Зайцева^{1,2}, О.В. Долгих^{1,2,3}, Д.Г. Дианова¹

¹ Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения, г. Пермь

² Пермский государственный национальный исследовательский университет

³ Пермский государственный национальный исследовательский политехнический университет

Поступила в редакцию 03.10.2014

Поступление в организм химических загрязняющих веществ (формальдегид) может быть причиной развития иммунных нарушений, в основе которых лежит дисбаланс маркеров апоптоза. Установлено, что у детей по мере возрастания в биосредах концентрации формальдегида снижается уровень показателей активационных процессов и модифицируются физиологические значения показателей клеточной гибели иммуноцитов: ингибируется гибель клеток по типу апоптоза на фоне активации гибели клеток путем некроза. Очевидно, что высокое содержание формальдегида в биосредах способствует формированию нарушений в иммунной системе в виде дисрегуляции программированной клеточной гибели.

Ключевые слова: *формальдегид, иммунная система, апоптоз*

Современные негативные тенденции в изменении показателей здоровья населения определяются комплексом факторов среды обитания [1, 4]. Иммунной системе принадлежит ведущая роль в обеспечении и поддержании гомеостаза организма, а также формировании согласованных реакций его отдельных систем в ответ на внешние воздействия, в том числе и на химические техногенные факторы среды [3, 11]. Следует отметить, что до настоящего времени нарушения иммунитета, или сбои в работе иммунной системы остаются малоизученными у детей, проживающих условиях техногенной нагрузки.

Цель работы: оценить влияние контаминации формальдегидом на показатели апоптоза у детей, проживающих на промышленно развитых территориях.

Материалы и методы. Исследование выполнено на примере детского населения, проживающего в различных условиях среды обитания. Группа наблюдения – 153 ребенка, проживающие в условиях экспозиции формальдегидом не менее 1 года (территория наблюдения). Группу контроля составили дети, проживающие на территории относительного санитарно-гигиенического благополучия, всего 121 ребенок (контрольная территория). Группа наблюдения и контрольная группа были сопоставимы по гендерному и возрастному составу, соматической заболеваемости. По социально-бытовым критериям выборка детей соответствовала среднему уровню материальной обеспеченности, жилищные условия отвечали гигиеническим нормативам. Выборка обследуемых была

достаточна для достоверного определения межгрупповых отличий. Биомедицинские исследования выполнены в соответствии с обязательным соблюдением этических принципов медико-биологических исследований, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 г. с дополнениями 1983 г., с национальным стандартом РФ ГОСТ-Р 52379-2005. Исследование одобрено Этическим комитетом Федерального научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения. Все родители (опекуны) подписали информированное согласие на участие в исследовании и использовании персональных данных.

Для выявления воздействия химических факторов среды обитания на состояние здоровья проведены натурные исследования содержания приоритетных загрязняющих веществ (формальдегид) в атмосферном воздухе на территории интенсивного промышленного освоения (территория наблюдения). Одновременно по этим же показателям были проанализированы пробы атмосферного воздуха на территории с минимальным техногенным воздействием (контрольная территория).

Химический анализ крови детей включал количественное определение содержания приоритетных загрязняющих веществ (формальдегида). Идентификация формальдегида в биосредах (кровь) выполнена методами газовой хроматографии и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) 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. Для установления диапазонов ответных реакций иммунной системы на воздействие, дети, проживающие в условиях экспозиции, были поделены на группы с учетом содержания анализируемого компонента в образцах крови (группа I – содержание формальдегида в крови 0,001-0,009 мг/дм³, группа II – содержание формальдегида в крови 0,009-0,041 мг/дм³).

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

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

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

Фенотипирование лимфоцитов, идентификацию апоптоза проводили на проточном цитометре FACSCalibur фирмы «Becton Dickinson» («BD», USA), с использованием универсальной программы CellQuestPrO с помощью компьютера Macintosh. Определение субпопуляций лимфоцитов (CD25⁺, CD95⁺ (FAS)) проводили методом мембранной иммунофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител (МКАТ) к мембранным CD-рецепторам («BD», USA). Уровень апоптоза лимфоцитов определяли с помощью окрашивания аннексином V-FITC (Annexin V-FITC (Fluorescein Isothiocyanate)) и 7-аминоактиномицином D (7-AAD (7-aminoactinomycin D) согласно протоколу фирмы-производителя «Becton Dickinson» («BD», USA). Для определения количества апоптотических клеток использовали суспензию мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина («Pharmacia Fine Chemicals», Sweden) [12]. Annexin V-FITC⁺7-AAD⁻ – ранний апоптоз (апоптотические клетки), Annexin V-FITC⁺7-AAD⁺ – поздний апоптоз и некроз [8].

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 [10].

Результаты и их обсуждение. В ходе инструментальных исследований зарегистрированы превышения гигиенических нормативов содержания формальдегида в атмосферном воздухе до 1,9 ПДК_{м.р.} (предельно допустимая концентрация максимально разовая) и 3,8 ПДК_{с.с.} (предельно допустимая концентрация среднесуточная), число проб с превышением гигиенических нормативов составило 6 %. На контрольной территории не выявлено превышений ПДК_{м.р.} и ПДК_{с.с.} формальдегида ни в одной из проанализированных проб. В крови детей, постоянно проживающих в зоне воздействия формальдегида, идентифицированы повышенные концентрации исследуемого компонента (0,0149±0,0006 мг/дм³) относительно фоновых значений (0,005±0,0014 мг/дм³) и значений, идентифицированных в биосредах детей контрольной группы. Сравнительный анализ уровня контаминантной нагрузки биосред формальдегидом показал, что количество детей I группы с содержанием формальдегида в крови 0,001-0,009 мг/дм³ составило 26,9%, тогда как 73,1% группы наблюдения составили дети II группы с диапазоном концентраций формальдегида в крови 0,091-0,041 мг/дм³ (табл. 1). В условиях длительной экспозиции формальдегидом у экспонируемого населения в крови регистрируется формальдегид, который можно рассматривать как маркер экспозиции [6].

Анализ результатов исследования показал, что у детей I группы статистически значимо (p<0,05) снижено абсолютное число CD95⁺-клеток и процентное содержание Annexin V-FITC⁺7-AAD⁺-клеток относительно контрольных значений. Обнаружено, что у обследуемых II группы статистически значимо (p<0,05) снижена экспрессия CD25⁺-маркера, CD95⁺-маркера и количество Annexin V-FITC⁺7-AAD⁺-лимфоцитов, а также достоверно (p<0,05) повышено процентное содержание Annexin V-FITC⁺7-AAD⁺-клеток в сравнении с анализируемыми показателями, полученными у детей контрольной группы.

Таблица 1. Диапазон значений маркера экспозиции формальдегидом и сопутствующие им диапазоны маркеров апоптотической регуляции у детей, проживающих в зоне внешнесредового воздействия формальдегидом (M±m)

Показатели	Контрольная группа, n=121	I группа, n=42	II группа, n=114	p ¹	p ²
концентрация формальдегида в крови, мг/дм ³					
диапазон концентрации	0,001-0,006	0,001-0,009	0,009-0,041	0,001	0,001
среднее значение	0,004±0,0005	0,007±0,0003	0,019±0,0007		
характеристика биомаркеров апоптоза с учетом уровня токсиканта в крови					
CD25 ⁺ , %	6,29±0,30	5,93±0,27	4,81±0,15	0,600	0,001
CD95 ⁺ , 10 ⁹ /дм ³	0,67±0,03	0,31±0,03	0,30±0,02	0,001	0,001
AnnexinV-FITC ⁺ 7AAD ⁻ , %	1,72±0,16	0,52±0,05	0,42±0,04	0,001	0,001
AnnexinV-FITC ⁺ 7AAD ⁺ , %	6,70±0,37	7,22±0,49	8,89±0,25	0,500	0,001

Примечание: p¹ - различие между контрольной и I группой по средним величинам p<0,05; p² - различие между контрольной и II группой по средним величинам p<0,05.

Анализ результатов исследования продемонстрировал, что у детей по мере возрастания в биосредах концентрации формальдегида изменяются активационные процессы и форма клеточной гибели. Апоптотическая реактивность организма

способствует поддержанию баланса между количеством появляющихся и гибнущих клеток. Этот механизм, с одной стороны, помогает поддерживать клеточный гомеостаз, а с другой – препятствует продолжительному ответу клеток на антигены

[7]. Инициация и осуществление апоптоза активно подавляют развитие некроза в клетках, в частности, путем снижения ферментов, активность которых может приводить к запуску некроза [13]. Однако, если в клетках нарушены механизмы осуществления апоптоза, клетки погибают путем некроза. Существует сигнальный путь инициации некроза в ответ на связывание рецепторами таких молекул как TNF, на фоне подавления апоптоза [14]. Индуцировать программу некроза можно, если активировать программу апоптоза связыванием таких лигандов как FAS, либо вызывая гиперэкспрессию антиапоптотических белков. В то же время гибель клетки путем некрозом может быть не только вариантом гибели в условиях подавления апоптоза [9], но и выполнять функцию усиления иммунных реакций в ответ на антигенную стимуляцию [2, 5].

Выводы: формальдегид, идентифицированный в крови детей в диапазоне $0,001 \text{ мг/дм}^3 - 0,041 \text{ мг/дм}^3$, снижает активационные процессы и изменяет форму клеточной гибели: ингибирует гибель клетки по типу апоптоза и активирует гибель клетки путем некроза. Эффект, оказываемый формальдегидом на вариabельность активационных и апоптотических показателей иммунной системы, зависит от концентрации контаминанта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Боев, В.М. Детерминированные экологические факторы риска для здоровья населения моногородов / В.М. Боев, М.В. Боев, Л.М. Тулина, А.А. Неплохов // Анализ риска здоровью. 2013. № 2. С. 39-44.
2. Дианова, Д.Г. Изучение молекулярных механизмов апоптоза у детей с химической контаминацией биосред / Д.Г. Дианова, Д.Г. Зайцева, Н.В. Долгих // Сборник трудов VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика». – М., 2014. Т. II. С. 377-379.
3. Долгих, О.В. Новые подходы и методы клеточных исследований / О.В. Долгих, Д.Г. Дианова, Р.А. Харахорина и др. // Сборник статей международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация»,

4. под ред. В.П. Зинченко, А.В. Бережнова. – Пушкино, 2013. Т. 1. С. 374-378.
4. 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.
5. Зайцева, Н.В. Метод проточной цитометрии в диагностике нарушений показателей иммунной системы у детей, проживающих в условиях техногенной нагрузки / Н.В. Зайцева, Д.Г. Дианова // Российский иммунологический журнал. 2014. Т. 8 (17), № 2(1). С. 60-61.
6. 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.
7. Пичугин, А.В. Апоптоз клеток иммунной системы при туберкулезной инфекции / А.В. Пичугин, А.С. Ант // Проблемы туберкулеза и болезней легких. 2005. № 12. С. 3-7.
8. 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.
9. Скибо, Ю.В. Методы исследования программируемой клеточной гибели: Учебно-методическое пособие для магистров по курсу «Теория апоптоза» / Ю.В. Скибо, З.И.Абрамова. – Казань: ФГАОУ ВПО КФУ, 2011. 61 с.
10. Флетчер, С. Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины / Р. Флетчер, С. Флетчер, Э. Вагнер. – М.: «Медиа Сфера», 1998. 352 с.
11. Якушина, В.Д. Роль галектина-1 в регуляции гомеостаза Т-лимфоцитов / В.Д. Якушина, О.А. Васильева, Н.В. Рязанцева и др. // Бюллетень сибирской медицины. 2011. № 6. С. 93-99.
12. Woym, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at Ig // Scand. J. Clin. Lab. Invest. 1968. Vol. 21, Suppl. 97. P. 77-89.
13. Edinger, A.L. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy / A.L. Edinger, C.B. Thompson // Curr. Opin. Cell Biol. 2004. Vol. 16. P. 663-669.
14. Fiers, W. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage / W. Fiers, R. Beyaert, W. Declercq, P. Vandenabeele // Oncogene 1999. Vol. 18. P. 7719-7730.

FORMALDEHYDE CONTAMINATION INFLUENCE ON IMMUNE SYSTEM IN CHILDREN

© 2014 N.V. Zaitseva^{1,2}, O.V. Dolgikh^{1,2,3}, D.G. Dianova¹

¹ Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies

² Perm State National Research University

³ Perm State National Research Polytechnical University

Chemical pollutants (formaldehyde) intake may be the cause of immune disorders which are based on the imbalance of apoptosis markers. It has been found that in children with the increasing of formaldehyde concentrations in biological media, the performance level of activation processes is reduced and physiological values of immune cell death indicators are modified: cell death is inhibited by apoptosis type on the background of cell death activation by necrosis. It is obvious that high formaldehyde content in the biological media promotes the formation of immune system disturbances in the form of programmed cell death dysregulation.

Keywords: *formaldehyde, immune system, apoptosis*

Nina Zaitseva, Academician of RAS, Doctor of Medicine, Professor, Director. E-mail: root@fcrisk.ru; Oleg Dolgikh, Doctor of Medicine, Professor, Head of the Immunobiological Methods of Diagnostics Department. E-mail: oleg@fcrisk.ru; Dina Dianova, Candidate of Medicine, Senior Research Fellow at the Cellular Diagnostics Laboratory. E-mail: dianovadina@rambler.ru