

МОДУЛЯЦИЯ ЖИЗНЕННОГО ЦИКЛА КЛЕТКИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПОЗИЦИИ ФЕНОЛАМИ

Нина Владимировна Зайцева, Олег Владимирович Долгих, Дина Гумеровна Дианова*

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

Реферат

Цель. Оценка особенностей жизненного цикла клетки в условиях экспозиции фенолами.

Методы. Обследованы 128 человек: в основную группу вошли 90 человек с рабочей специальностью «изолировщик», в контрольную группу – 39 человек, не имеющих контакта с производственными вредностями. Использованы материалы аттестации рабочих мест, результаты производственного контроля, данные химико-аналитического анализа содержания веществ (фенола) в воздухе рабочей зоны. На капиллярном газовом хроматографе в крови определяли содержание органических соединений (фенола, о-крезола, м-крезола, п-крезола). Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре. Популяции и субпопуляции лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD95⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺127⁻) определяли методом мембранной иммуофлюоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител. Регистрацию апоптоза лимфоцитов проводили путём определения экспрессии фосфатидилсерина с помощью аннексина V, конъюгированного с флюоресцини-зотиоцианатом.

Результаты. У работающих в условиях экспозиции фенолами (основная группа) отмечены изменения количественного и качественного состава клеточно-лимфоцитарного звена иммунной системы. Выявлены признаки активации иммунной системы, что выражается достоверным ($p < 0,05$) увеличением экспрессии ранних активационных антигенов на иммуноцитах (11,33±0,33%) в сравнении с контрольными величинами (7,82±0,39%). Вместе с тем статистически значимо ($p < 0,05$) повышалось количество регуляторных лимфоцитов (0,81±0,05%), оказывающих супрессорное влияние на различные типы иммунокомпетентных клеток относительно значений, полученных в контрольной группе (0,55±0,06%). Зафиксировано достоверное снижение количества маркёров, характеризующих апоптотическую гибель клетки: экспрессия рецептора к фактору некроза опухолей альфа I типа (1,39±0,11%), транскрипционный фактор p53 (1,44±0,11%) в сравнении с аналогичными показателями в группе контроля (3,31±0,27% и 3,42±0,29% соответственно, $p < 0,05$). Анализ иммунограмм продемонстрировал, что у работающих в условиях экспозиции фенолами статистически значимо ($p < 0,05$) снижен уровень апоптотических (2,17±0,09%) и некротических (7,69±0,25%) клеток относительно цифр, зарегистрированных в группе контроля (апоптотические – 4,77±0,42%, некротические – 13,06±1,17%). Отмечена статистически значимая отрицательная зависимость показателей, определяющих активационно-индуцированную гибель клетки, от содержания фенола в крови обследуемых основной группы.

Вывод. Экспозиция фенолами обуславливает развитие иммунных нарушений, в частности изменения количественного и качественного состава клеточно-лимфоцитарного звена иммунной системы, и может индуцировать апоптотическую гибель иммунокомпетентных клеток.

Ключевые слова: профессиональные вредности, гигиена труда, иммунитет, лимфоцитарно-клеточное звено, гибель клетки, апоптоз, фенолы.

MODULATION OF CELL LIFE CYCLE DURING EXPOSURE TO PHENOLS *N.V. Zaitseva, O.V. Dolgikh, D.G. Dianova. Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, Russia.*

Aim. To evaluation the life cycle characteristics of cells under conditions of exposure to phenols. **Methods.** Examined were 128 people: the main group included 90 people with an occupational specialty «insulator», the control group included 39 people with no exposure to industrial hazards. Materials of working environment attestation, the results of industrial control, data of analytical chemical analysis on the content of substances (phenol) in the working area were used. Using a capillary gas chromatograph the content of organic compounds in the blood (phenol, o-cresol, m-cresol, p-cresol) was determined. Phenotyping of lymphocytes was performed by flow cytometry. Populations and subpopulations of lymphocytes (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺, CD95⁺, CD3⁺CD16⁺CD56⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁺127⁻) were determined by membrane immunofluorescence using a panel of labeled monoclonal antibodies. Registration of apoptosis of lymphocytes was performed by determining the expression of phosphatidylserine using annexin V conjugated with fluorescein isothiocyanate.

Results. Among those who work in conditions of exposure to phenols (main group) noted were changes in the quantitative and qualitative composition of the cell-lymphocytic link of the immune system. Revealed were signs of activation of the immune system, which is expressed in a significant ($p < 0,05$) increase in the expression of early activation antigens on the immune cells (11.33±0.33%) compared with the control values (7.82±0.39%). At the same time, the number of regulatory lymphocytes (0.81±0.05%) increased with statistical significance ($p < 0,05$), providing suppressive effect on various types of immune cells with respect to the values obtained in the control group (0.55±0.06%). Registered was a significant reduction in the number of markers that characterize apoptotic cell death: the expression of a receptor for the tumor necrosis factor-alpha type I (1.39±0.11%), transcription factor p53 (1.44±0.11%) compared with such in the the control group (3.31±0.27% and 3.42±0.29% respectively, $p < 0,05$). Analysis of the immunograms has demonstrated that those who work in conditions of phenol exposure have significantly ($p < 0,05$) reduced levels of apoptotic (2.17±0.09%) and necrotic (7.69±0.25%) cells

with respect to such numbers registered in the control group (apoptotic — $4.77 \pm 0.42\%$, necrotic — $13.06 \pm 1.17\%$). Noted was a statistically significant negative relationship between indicators that determine the activation-induced cell death and the content of phenol in the blood of the main group of examined individuals. **Conclusion.** Exposition of phenols leads to the development of immune disorders, in particular changes in the quantitative and qualitative composition of the cell-lymphocytic link of the immune system and can induce apoptotic death of immunocompetent cells. **Keywords:** occupational hazards, occupational hygiene, immunity, lymphocyte-cellular link, cell death, apoptosis, phenols.

Важнейшая задача медицины в настоящее время — сохранение трудового потенциала страны. Техногенные химические загрязнители производственной среды обладают выраженным иммунотоксическим эффектом [2]. Углублённое изучение состояния иммунной системы работающего населения необходимо для своевременной диагностики и адекватных лечебно-профилактических мероприятий.

Целью работы была оценка особенностей жизненного цикла клетки в условиях экспозиции фенолами.

Обследованы 128 человек. В основную группу вошли 90 человек, имеющие рабочую специальность «изолировщик». Возраст обследуемых основной группы составлял от 21 до 56 лет (в среднем $39,1 \pm 5,2$ года), мужчин было 59 (69,5%), женщин — 31 (30,5%). Трудовой стаж на производстве в среднем составлял $7,8 \pm 1,8$ лет. Для оценки условий труда на рабочих местах использованы материалы аттестации рабочих мест, результаты производственного контроля, данные химико-аналитического анализа содержания веществ (фенола) в воздухе рабочей зоны на рабочих местах. Контрольную группу составили 39 человек в возрасте от 20 до 54 лет (средний возраст $39,83 \pm 2,90$ года), 20 (51%) мужчин и 19 (49%) женщин, не имеющих контакта с производственными вредностями (служащие налоговой инспекции).

Определение органических соединений (фенола, о-крезола, м-крезола, п-крезола) в крови выполняли на капиллярном газовом хроматографе «Кристалл 2000» («Хроматэк», Россия) в соответствии с методическими указаниями 4.1.2102-4.1.2116-06. Фенотипирование лимфоцитов проводили на проточном цитометре FACSCalibur («Becton Dickinson», USA). Определение популяций и субпопуляций лимфоцитов ($CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$, $CD95^+$, $CD3^+CD16^+CD56^+$, $CD4^+CD25^+$, $CD4^+CD25^+127^-$) проводили методом мембранной иммунофлуоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител (МКАТ) к мембранным CD-рецепторам («BD», USA). Для определения уровня экспрессии рецептора фактора некроза опухолей альфа I типа (TNFR1 — tumor necrosis factor receptor I) использовали цитофлюориметрический метод, основанный на взаимодействии соответствующих МКАТ с мембранным рецептором TNFR1 на лимфоцитах. Клетки (1×10^6 клеток/мл) отмывали фосфатно-солевым буфером и окрашивали стандартными МКАТ к рецептору TNFR1, мечеными фикоэритрином («BD», USA), согласно протоколу фирмы-производителя. Использовали цитофлюориметр («BD», USA).

Регистрацию апоптоза лимфоцитов проводили путём определения экспрессии фосфатидилсерина с помощью аннексина V, конъюгированного с флюоресцинизоцианиатом (Annexin V-FITC, «BD», USA). После отмывания клетки ресуспендировали в рабочем растворе буфера для окрашивания и инкубировали с добавлением красителей. Через 15 мин их фиксировали рабочим раствором связывающего буфера и подвергали проточной цитофлюориметрии. Определение внутриклеточного маркера апоптоза, протеина p53, проводили с помощью МКАТ против белка p53, конъюгированных с фикоэритрином, на проточном цитометре. Для анализа использовали суспензию мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных путём центрифугирования в градиенте плотности фиколл-верографина. Затем клетки, дважды отмые в холодном фосфатно-солевом буфере, ресуспендировали и окрашивали стандартными МКАТ, согласно протоколу фирмы-производителя.

Анализ информации проводили с помощью пакета «Statistica 6.0» и специально разработанных программ, сопряжённых с приложениями MS Office. Сравнение групп выполнено методами параметрической статистики с использованием двухвыборочного критерия Стьюдента (t). Качественные данные представлены в виде абсолютных или относительных (%) частот, количественные признаки представлены как $M \pm m$ (среднее арифметическое \pm ошибка среднего). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Максимальное содержание фенола в воздухе рабочей зоны производственных помещений составило $1,4 \text{ мг/м}^3$, что превышает предельно допустимую концентрацию ($0,3 \text{ мг/м}^3$). В соответствии с руководством Р 2.2.2006-05 условия труда изолировщиков по фактору «фенол в воздухе рабочей зоны» относятся к классу 3.2. В крови всех обследуемых основной группы зафиксировано статистически значимое ($p < 0,05$) повышение концентрации м-крезола в сравнении со значениями, зафиксированными в контрольной группе (табл. 1). Крезолы (о-крезол, м-крезол, п-крезол) в биосредах группы контроля данной методикой не идентифицировались. Отмечена достоверная зависимость количества м-крезола в крови обследуемых в зависимости от стажа работы в условиях производства ($r=0,34$, $p < 0,05$).

Сравнительный анализ иммунограмм продемонстрировал, что у обследуемых основной группы статистически значимо ($p < 0,05$) снижено относительное число лимфоцитов $CD3^+$ и повышена доля $CD19^+$ в сравнении с величинами, полученными в группе контроля (табл. 2).

Таблица 1
Уровень низкомолекулярных химических соединений
в крови обследуемых

Показатели	Контрольная группа (n=39), M±m	Основная группа (n=58), M±m
Фенол, мг/л	0,0531±0,002	0,0740±0,005
o-Крезол, мг/л	—**	0,0005±0,0003
m-Крезол, мг/л	—**	0,0062±0,002*
p-Крезол, мг/л	—**	0,0010±0,0007

Примечание: *разница статистически значима по сравнению с контрольной группой (p < 0,05); **ниже предела чувствительности.

Оценка уровня регуляторных клеток (CD4⁺CD25⁺127⁻, Treg) позволила установить, что у работающих в условиях производства статистически значимо (p < 0,05) повышено абсолютное и относительное число Treg в сравнении с контрольной группой. При оценке активационных процессов в иммунной системе у изолированных выявлен высокий (в 1,5 раза больше по сравнению с контролем, p < 0,05) уровень прироста в периферической крови лимфоцитов, экспрессирующих маркер ранней активации — CD25-антиген. У обследуемых основной группы отмечено достоверное (p < 0,05) снижение количества маркера Fas-зависимого апоптоза (относительного

и абсолютного числа) на популяции CD3⁺ клеток в сравнении с показателями контрольной группы. При изучении уровня апоптотической готовности иммуноцитов периферической крови выявлено статистически значимое (p < 0,05) уменьшение содержания TNFR1⁺-лимфоцитов у работающих в условиях производства по сравнению со средним уровнем данного показателя в контрольной группе. У обследуемых основной группы зарегистрировано достоверное (p < 0,05) понижение уровня белка p53 относительно значений, зафиксированных в группе контроля.

В аннексиновом тесте были установлены изменения апоптотической реакции лимфоцитов при повышенном содержании фенолов в биологических средах. В иммунограммах отмечено статистически значимое (p < 0,05) снижение уровня апоптотических (Annexin V-FITC⁺PI⁻) и некротических (Annexin V-FITC⁺PI⁺) клеток в группе обследуемых основной группы относительно цифр, зарегистрированных в группе контроля. Выявлен достоверный положительный коэффициент корреляции между концентрацией фенола в биологических средах и количеством клеток, экспрессирующих ранний маркер активации (r=0,24, p < 0,05), а также процентным содержанием Treg (r=0,17, p < 0,05). Отмечена статистически значимая отрицательная зависимость показателей, характеризующих активационно-индуцированную гибель клетки — CD95⁺ (r=-0,54,

Таблица 2

Характеристика показателей иммунной системы обследуемых

Показатели	Контрольная группа (n=39), M±m	Основная группа (n=90), M±m
CD3+, %	73,00±1,16	68,19±0,67*
CD3+, 10 ⁹ /л	1,51±0,07	1,48±0,04
CD4+, %	43,10±0,90	41,32±0,89
CD4+, 10 ⁹ /л	0,90±0,05	0,89±0,03
CD8+, %	25,44±0,95	24,41±0,69
CD8+, 10 ⁹ /л	0,52±0,03	0,53±0,02
CD19+, %	9,39±0,48	11,08±0,41*
CD19+, 10 ⁹ /л	0,20±0,01	0,24±0,01
CD3+CD16+CD56+, %	14,46±1,22	12,54±0,51
CD3+CD16+CD56+, 10 ⁹ /л	0,30±0,02	0,27±0,02
CD4+ CD25+127-, %	0,55±0,06	0,81±0,05*
CD4+ CD25+127-, 10 ⁹ /л	0,01±0,001	0,02±0,001*
CD4+CD25+, %	7,82±0,39	11,33±0,33*
CD4+CD25+, 10 ⁹ /л	0,16±0,01	0,25±0,01*
CD95+, %	35,14±1,55	31,34±0,77*
CD95+, 10 ⁹ /л	0,69±0,03	0,67±0,02
p53, %	3,42±0,29	1,44±0,11*
TNFR1+, %	3,31±0,27	1,39±0,11*
Annexin V-FITC+PI-, %	4,77±0,42	2,17±0,09*
Annexin V-FITC+PI+, %	13,06±1,17	7,69±0,25*

Примечание: *разница статистически значима по сравнению с контрольной группой (p < 0,05); TNFR1 — рецептор фактора некроза опухолей алфа I типа; Annexin V-FITC — аннексин V, конъюгированный с флюоресцинизиотианином.

$p < 0,05$), p53 ($r = -0,56$, $p < 0,05$), TNFR1⁺ ($r = -0,57$, $p < 0,05$), Annexin V-FITC⁺PI⁻ ($r = -0,44$, $p < 0,05$), Annexin V-FITC⁺PI⁺ ($r = -0,44$, $p < 0,05$) — от содержания фенола в крови обследуемых основной группы.

Ряд авторов утверждают, что низкая экспрессия CD3, общего популяционного маркера Т-лимфоцитов, — отражение дефекта Т-клеточного звена иммунитета [3]. Другие исследователи полагают, что снижение количества CD3-антигена на иммунокомпетентных клетках — признак мобилизации иммунной системы с преобладанием молодых незрелых форм Т-лимфоцитов, экспрессирующих ещё не CD3, а комплексы антигенов I (CD8⁺) или II (CD4⁺) класса главного комплекса гистосовместимости [1]. Экспериментально доказано, что В-лимфоциты служат источником FasL (Fas-лиганда), необходимого для запрограммированной гибели Т-лимфоцитов [5]. В свете этого можно полагать, что активация В-клеточного звена, фиксируемая при повышенной антигенной нагрузке, — фактор торможения иммунологической ответной реакции организма. Субпопуляция регуляторных Т-лимфоцитов способна оказывать супрессорное влияние на различные типы иммунокомпетентных клеток [4]. Мишенями цитотоксичности Treg могут быть клетки CD4⁺, CD8⁺, моноциты. Будучи однажды активированными, Treg не зависят ни от природы антигена, ни от клетки, на которую они оказывают воздействие. Анализ активационного профиля субпопуляций иммунокомпетентных клеток показателен для оценки остроты и выраженности ответной иммунной реакции на воздействие антигена. Маркер ранней активации, CD25-антиген, обеспечивает быстрое размножение и последующую дифференцировку нативных Т-клеток до зрелых форм в период повышенной гаптенной стимуляции. Решающую роль в регуляции иммунного ответа играет апоптоз, запускаемый через так называемые «рецепторы смерти». Значимую роль в регуляции апоптоза отводят таким рецепторам, как CD95⁺ (FasR) и TNFR1⁺, экспрессия которых отражает готовность лимфоцитов вступить в апоптоз. Белок p53 регулирует многие клеточные функции, включая митотический цикл, репарацию повреждённой дезоксирибонуклеиновой кислоты, дифференцировку клеток и их гибель по типу апоптоза. Отмечено, что p53 трансактивирует некоторые киллерные рецепторы, в частности Fas. Активация p53 даёт мощный апоптогенный сигнал. Поскольку форма реакции клетки в ответ на антигенную стимуляцию определяет результативность иммунного ответа, наиболее значима оценка активационного апоптоза. Реакция ингибирования апоптотической и некротической ги-

бели иммунокомпетентных клеток может быть связана с изменённой чувствительностью лимфоцитов к апоптогенным факторам в условиях гаптенной нагрузки.

ВЫВОДЫ

1. У обследуемой группы изолированных в условиях экспозиции фенолами усиление иммунного ответа сопряжено с интенсивными активационными процессами в иммунной системе, которые сопровождаются выраженным увеличением экспрессии ранних (CD25⁺) активационных антигенов на иммуноцитах ($p < 0,05$) и в то же время повышением содержания лимфоцитов (Treg), оказывающих супрессорное влияние на различные типы иммунокомпетентных клеток ($p < 0,05$).

2. Отмечено статистически значимое ($p < 0,05$) снижение количества маркеров (CD95⁺, p53, TNFR1⁺, Annexin V-FITC⁺PI⁻, Annexin V-FITC⁺PI⁺), ответственных за клеточную гибель. Соотношение физиологических факторов с про- и антиапоптотической активностью определяет способность организма адекватно модулировать процесс гибели клеток в неблагоприятных условиях. На фоне повышенной контаминации биологических сред фенолами направленность апоптотической реакции иммунокомпетентных клеток характеризуется её угнетением.

3. Замедление апоптоза, индуцированного аннексином и фактором некроза опухолей альфа, дефицит содержания транскрипционного фактора p53 в условиях неблагоприятной производственной среды модифицирует ритмичность клеточного цикла, что ведёт к старению клетки и её возможной малигнизации.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баева Е.В., Соколенко В.Л. Модификация экспрессии Т-клеточных активационных маркеров лимфоцитами периферической крови лиц, проживающих на загрязнённых радионуклидами территориях // Иммунология. — 1999. — №1. — С. 54–58.
2. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г., Лыхина Т.С. Гидроксилированные ароматические углеводороды и цитокиновая регуляция апоптоза // Урал. мед. ж. — 2011. — №9. — С. 42–45.
3. Ярилин А.А., Донецкова А.Д. Естественные регуляторные Т-клетки и фактор Foxp 3 // Иммунология. — 2006. — №3. — С. 176–184.
4. Moseman E.A., Liang X. Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells // J. Immunol. — 2004. — Vol. 173, N 7. — P. 4433–4442.
5. Nilsson N., Ingvarsson S., Borrebaeck C.A.K. Immature B cells in bone marrow express Fas/FasL // Scand. J. Immunol. — 2000. — №51. — P. 279–284.