

УДК 613.64: 616.717 – 057

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ФЕНОЛОВ НА ИММУНОРЕГУЛЯЦИЮ *EX VIVO*

**О.В. Долгих<sup>1,2</sup>, Р.А. Предеина<sup>1</sup>, Д.Г. Дианова<sup>1</sup>**<sup>1</sup> ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Россия, 614990, г. Пермь, ул. Монастырская, д. 82,<sup>2</sup> ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», Россия, 614990, г. Пермь, ул. Букирева, д. 15

Установлены особенности иммунных нарушений в условиях экспериментальной экспозиции фенолом, которые характеризуются изменением количественного состава клеточного звена иммунной системы, угнетением апоптотической активности иммунокомпетентных клеток и нарушением регуляции иммунного ответа в сторону преобладания Th2-типа, что может привести к развитию аутоиммунных и онкопролиферативных процессов.

**Ключевые слова:** экспериментальные исследования, фенол, апоптоз, иммунная регуляция.

Токсическое воздействие низкомолекулярных химических веществ, в том числе фенолов, может привести к нарушению иммунологической реактивности и искажению баланса иммунорегуляторных механизмов [2, 3, 5, 7–9]. Накопление изменений отдельных компартментов иммунной защиты в условиях экспозиции химическими контаминантами может реализоваться нарушениями структурной целостности и функциональной полноценности иммунной системы, прежде всего у детей, что может служить предпосылкой для развития целого ряда соматических заболеваний, среди которых аллергические, аутоиммунные заболевания и пролиферативные процессы [1–4, 6]. В рамках этого актуальным является изучение влияния фенолов на иммунорегуляцию в условиях эксперимента.

**Цель исследования** – верификация *ex vivo* нарушений иммунной регуляции у детей в условиях воздействия фенола.

**Материалы и методы.** Предметом исследования являлись биосреды (кровь), в том

числе клеточные культуры мононуклеаров и фагоцитов детей.

С целью выявления непосредственного влияния фенола на регуляцию иммунной системы оценивали экспрессию выработки цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ИЛ-17, ФНО- $\alpha$ , ИФН- $\gamma$ ) в условиях *ex vivo*. Для этого изучали уровни спонтанной, индуцированной митогеном (фитогемагглютинин, 4 мкг/мл; конкавалин А, 4 мкг/мл; липополисахарид, 2 мкг/мл) и фенолом (0,05 мг/дм<sup>3</sup>) продукции цитокинов в супернатантах цельной периферической крови методом иммуноферментного анализа с использованием тест-систем «Вектор-Бест» (Россия) на анализаторе Elx808IU (США). Влияние фенола на фагоцитарную активность определяли в условиях эксперимента путем добавления фенола (0,05 мг/дм<sup>3</sup>) в кровь перед инкубацией с формализованными эритроцитами барана. Рабочую концентрацию фенола подбирали опытным путем (исследовали влияние на клетки трех концентраций фенола: 0,01; 0,05 и 0,1 мг/дм<sup>3</sup>)

© Долгих О.В., Предеина Р.А., Дианова Д.Г., 2014

**Долгих Олег Владимирович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунобиологических методов, профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности (e-mail: oleg@fcrisk.ru, тел.: 8-(342)-236-39-30).

**Предеина Регина Атласовна** – младший научный сотрудник отдела иммунобиологических методов диагностики (e-mail: itkinina-regina@yandex.ru, тел.: 8-(342)-236-39-30).

**Дианова Дина Гумеровна** – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточных методов диагностики (e-mail: dianovadina@rambler.ru, тел.: (342) 236-39-30).

по оценке визуальных изменений мембраны иммуноцитов и оценке фагоцитарной активности нейтрофилов.

Для статистической обработки результатов исследования применяли методы математической статистики на базе современного компьютерного обеспечения с использованием программы Microsoft® Office Excel 2003 и пакета статистического анализа Statistica 6.0 (StatSoft, США). Для оценки уровня достоверности полученных результатов использовали параметрический критерий Стьюдента (сравнение групп по количественным признакам). Различия полученных результатов являлись статистически значимыми при  $p \leq 0,05$ . Для изучения взаимосвязи двух метрических переменных, измеренных на одной и той же выборке, применялся коэффициент корреляции Спирмена. Результаты исследования представлены в виде среднего значения ( $M$ ) и ошибки среднего ( $m$ ) изученных показателей.

**Результаты и их обсуждение.** Проведен анализ модулирующего действия фено-

ла на показатели регуляции иммунной системы в условиях эксперимента. В результате оценки спонтанной продукции цитокинов клетками периферической крови обследуемых детей, характеризующей текущую активацию клеток иммунной системы, установлено статистически значимое ( $p < 0,05$ ) повышение уровня содержания ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8 в 3,4; 4,1 и 5,8 раза соответственно у детей основной группы по отношению к аналогичным показателям группы сравнения (табл. 1).

При исследовании спонтанной продукции ИЛ-17, ФНО- $\alpha$  и ИФН- $\gamma$  у детей группы наблюдения обнаружено снижение данных показателей в 2,8; 1,9 и 2,6 раза соответственно по отношению к группе сравнения (см. табл. 1).

Полученные результаты свидетельствуют, что у детей, проживающих в условиях внешнесредового воздействия фенолов, наблюдается супрессия иммунного ответа с замедлением апоптотической активности лимфоцитов (снижение ФНО- $\alpha$ ) и нарушением

Таблица 1

Сравнительная характеристика продукции цитокинов мононуклеарами у детей, пг/мл

Показатель продукции цитокинов		Основная группа ( $n=85$ )	Группа сравнения ( $n=30$ )	Межгрупповое различие ( $p$ )
ИЛ-1 $\beta$	Спонтанная	13,45 $\pm$ 2,90	4,00 $\pm$ 1,07	0,003
	Индуцированная митогеном	7560,31 $\pm$ 552,19	4569,83 $\pm$ 414,06	0,000
	Индуцированная фенолом	799,49 $\pm$ 133,29	193,10 $\pm$ 10,95	0,001
ИЛ-4	Спонтанная	0,71 $\pm$ 0,05	1,40 $\pm$ 0,15	0,000
	Индуцированная митогеном	1,48 $\pm$ 0,11	4,26 $\pm$ 0,35	0,000
	Индуцированная фенолом	0,85 $\pm$ 0,05	3,57 $\pm$ 0,34	0,000
ИЛ-6	Спонтанная	65,30 $\pm$ 9,79	15,79 $\pm$ 5,09	0,022
	Индуцированная митогеном	29241,73 $\pm$ 1527,21	19556,67 $\pm$ 1359,10	0,000
	Индуцированная фенолом	9373,95 $\pm$ 970,08	1850,69 $\pm$ 307,58	0,000
ИЛ-8	Спонтанная	1900,62 $\pm$ 294,56	325,04 $\pm$ 79,83	0,001
	Индуцированная митогеном	27100,86 $\pm$ 1466,79	19506,67 $\pm$ 1765,85	0,004
	Индуцированная фенолом	20296,24 $\pm$ 1921,33	935,02 $\pm$ 203,51	0,000
ИЛ-10	Спонтанная	2,68 $\pm$ 0,76	2,07 $\pm$ 0,28	0,171
	Индуцированная митогеном	176,69 $\pm$ 24,79	99,81 $\pm$ 8,89	0,028
	Индуцированная фенолом	27,07 $\pm$ 4,85	17,52 $\pm$ 1,88	0,166
ИЛ-17	Спонтанная	1,40 $\pm$ 0,13	3,97 $\pm$ 0,15	0,000
	Индуцированная митогеном	16,33 $\pm$ 3,80	28,16 $\pm$ 3,55	0,486
	Индуцированная фенолом	1,94 $\pm$ 0,49	5,09 $\pm$ 0,24	0,062
ФНО- $\alpha$	Спонтанная	5,00 $\pm$ 0,91	9,51 $\pm$ 0,96	0,001
	Индуцированная митогеном	1991,40 $\pm$ 175,66	3036,67 $\pm$ 270,53	0,002
	Индуцированная фенолом	111,15 $\pm$ 21,28	105,39 $\pm$ 8,88	0,877
ИФН- $\gamma$	Спонтанная	2,18 $\pm$ 0,49	5,60 $\pm$ 0,85	0,001
	Индуцированная митогеном	647,61 $\pm$ 108,14	300,17 $\pm$ 40,15	0,023
	Индуцированная фенолом	3,07 $\pm$ 0,51	7,85 $\pm$ 1,05	0,316

Таблица 2

Показатели фагоцитарного звена иммунитета у детей в условиях эксперимента *ex vivo*

Показатель	Спонтанный уровень		$p_1$	Уровень, индуцированный фенолом		$p_2$	$p_3$	$p_4$
	Основная группа (n=17) $M \pm m$	Группа сравнения (n=15) $M \pm m$		Основная группа (n=17) $M \pm m$	Группа сравнения (n=15) $M \pm m$			
Процент фагоцитоза	43,82 $\pm$ 2,2	52,00 $\pm$ 3,1	<0,05	39,00 $\pm$ 2,5	51,47 $\pm$ 3,4	<0,05	<0,05	>0,05
Фагоцитарное число, усл. ед.	0,71 $\pm$ 0,05	0,92 $\pm$ 0,08	<0,05	0,53 $\pm$ 0,04	0,84 $\pm$ 0,07	<0,05	<0,05	>0,05
Абсолютный фагоцитоз, 10 <sup>9</sup> /л	1,300 $\pm$ 0,1	2,850 $\pm$ 0,5	<0,05	1,16 $\pm$ 0,1	2,66 $\pm$ 0,5	<0,05	>0,05	>0,05

Примечание:

 $p_1$  – достоверность межгрупповых различий ( $p < 0,05$ ) спонтанного фагоцитоза; $p_2$  – достоверность межгрупповых различий ( $p < 0,05$ ) индуцированного фагоцитоза; $p_3$  – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) спонтанного и индуцированного фагоцитоза в основной группе; $p_4$  – достоверность различий ( $p < 0,05$ ) спонтанного и индуцированного фагоцитоза в группе сравнения.

баланса цитокинпродуцирующей активности иммуноцитов, характеризующимся интенсификацией регуляции иммунного ответа за счет примитивных лейкоцитарных ростков (ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-8) и угнетением Th1-звена иммунитета (снижение ИФН- $\gamma$ ).

Обнаружено, что клетки периферической крови обследуемых детей обладают высоким цитокинпродуктивным потенциалом, что проявляется в статистически значимом повышении продукции изучаемых цитокинов в режиме митогенной стимуляции. Это связано, с одной стороны, с особенностью клеток детского организма к быстрому ответу, с другой – отражает биологическое значение исследуемых цитокинов как активаторов и регуляторов многих физиологических и патологических процессов.

В сравнительном анализе митогениндуцированной продукции цитокинов установлено достоверное ( $p < 0,05$ ) повышение выработки ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ИФН- $\gamma$  клетками крови детей основной группы в 1,7; 1,5; 1,4; 1,8 и 2,2 раза по сравнению с аналогичными показателями группы сравнения (табл. 2). Подобранная опытным путем для условий эксперимента рабочая концентрация фенола, равная 0,05 мг/дм<sup>3</sup>, характеризовалась отсутствием визуальных изменений мембраны иммунных клеток и не вызывала потерю способности нейтрофилов к фагоцитозу.

В результате исследования стимулированной фенолом продукции цитокинов мононуклеарами периферической крови обнаружено, что фенол в концентрации 0,05 мг/дм<sup>3</sup> оказывает цитокинстимулирующее влияние в отношении как про-, так и противовоспалительных цитокинов. При этом фенол обладает более существенной способностью активировать синтез цитокинов при взаимодействии с клетками крови детей, проживающих в условиях внешнесредового воздействия фенолов. Так, у детей основной группы выявлена повышенная фенолиндуцированная активация синтеза ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10 и ФНО- $\alpha$  – в 1,2; 1,2; 3,7; 1,2 и 2,0 раза соответственно по отношению к аналогичным показателям группы сравнения. При этом не наблюдалось активации синтеза ИЛ-17 и ИФН- $\gamma$  при влиянии фенола у детей основной группы.

Исследование фагоцитарного звена иммунитета в условиях экспериментальной экспозиции фенолом у детей основной группы показало статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение относительного фагоцитоза и фагоцитарного числа (табл. 2).

Полученные данные свидетельствуют об угнетении фагоцитарной активности иммуноцитов под действием фенола у детей с содержанием его в крови, изначально превышающим фоновую концентрацию и концентрацию группы сравнения.

**Выводы.** Экспериментально доказано модулирующее действие фенола на продукцию цитокинов мононуклеарами и фагоцитарную активность нейтрофилов, что выражается достоверной стимуляцией индуцированной фенолом продукции ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-10, ФНО- $\alpha$  в 1,2; 1,2; 3,7; 1,2 и 2,0 раза по отношению к группе сравнения, супрессией индуцированной продукции по критериям ИНФ- $\gamma$  и ИЛ-17, снижением относительного фагоцитоза и фагоцитарного числа.

### Список литературы

1. Гигиенические аспекты нарушения здоровья детей при воздействии химических факторов среды обитания / под ред. Н.В. Зайцевой. – Пермь: Книжный формат, 2011. – 489 с.
2. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Модуляция жизненного цикла клетки в условиях экспозиции фенолами // Казанский медицинский журнал. – 2012. – Т. XCIII, № 4. – С. 683–687.
3. Зайцева Н.В., Долгих О.В., Дианова Д.Г. Особенности клеточного звена иммунитета у детей в условиях внешнесредовой экспозиции толуолом, формальдегидом, фенолом // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14, № 5 (2). – С. 341–343.
4. Окружающая среда. Оценка риска для здоровья (мировой опыт) / С.Л. Авалиани, М.М. Андрианова, Е.В. Печенникова, О.В. Пономарева. – М., 1996. – 159 с.
5. Bernard S.M. The potential impacts of climate variability and change on air pollution-related health effects in the United States // *Environ. Health. Perspect.* – 2001. – Vol. 109, suppl. 2. – P. 199–209.
6. Braga M. Environment and T regulatory cells in allergy // *Science of The Total Environment*. – 2012. – Vol. 423. – P. 193–201.
7. Descotes J. Assessment of immunotoxic effects in humans // *Clin. Chem.* – 1995. – Vol. 41, № 12. – P. 1870–1873.
8. Descotes J., Vial Th. Immunotoxic effects of xenobiotics in humans: A review of current evidence // *Toxicology in Vitro*. – 1994. – Vol. 8, № 5. – P. 963–966.
9. Duramad P. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies // *Toxicol. Lett.* – 2007. – Vol. 172 (1–2). – P. 48–59.

### References

1. Gigienicheskie aspekty narusheniya zdorov'ya detey pri vozdeystvii khimicheskikh faktorov sredy obitaniya [Hygienic aspects of children's health violation from exposure to chemical environmental factors]. Ed. N.V. Zaytseva. Perm': Knizhnyy format, 2011. 489 p.
2. Zaytseva N.V., Dolgikh O.V., Dianova D.G. Modulyatsiya zhiznennogo tsikla kletki v usloviyakh ekspozitsii fenolami [Modulation of cell cycle life under phenol exposure]. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*, 2012, vol. XCIII, no. 4, pp. 683–687.
3. Zaytseva N.V., Dolgikh O.V., Dianova D.G. Osobennosti kletoch'nogo zvena immuniteta u detey v usloviyakh vneshnesredovoy ekspozitsii toluolom, formal'degidom, fenolom [Peculiarities of cellular immunity in children in the conditions of environmental exposure to toluene, formaldehyde, phenol]. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiyskoy akademii nauk*, 2012, vol. 14, no. 5 (2), pp. 341–343.
4. Avaliani S.L., Andrianova M.M., Pechennikova E.V., Ponomareva O.V. Okruzhayushchaya sreda. Otsenka riska dlya zdorov'ya (mirovoy opyt) [Environment. Health risk assessment (international experience)]. Moscow, 1996. 159 p.
5. Bernard S.M. The potential impacts of climate variability and change on air pollution-related health effects in the United States. *Environ. Health. Perspect.*, 2001, vol. 109, suppl. 2, pp. 199–209.
6. Braga M. Environment and T regulatory cells in allergy. *Science of The Total Environment*, 2012, vol. 423, pp. 193–201.
7. Descotes J. Assessment of immunotoxic effects in humans. *Clin. Chem.*, 1995, vol. 41, no. 12, pp. 1870–1873.
8. Descotes J., Vial Th. Immunotoxic effects of xenobiotics in humans: A review of current evidence. *Toxicology in Vitro*, 1994, vol. 8, no. 5, pp. 963–966.
9. Duramad P. Cytokines and other immunological biomarkers in children's environmental health studies. *Toxicol. Lett.*, 2007, vol. 172 (1–2), pp. 48–59.

## EXPERIMENTAL ASSESSMENT OF PHENOL INFLUENCE ON IMMUNOREGULATION *EX VIVO*

O.V. Dolgikh<sup>1,2</sup>, R.A. Predeina<sup>1</sup>, D.G. Dianova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> FBSI "Federal Scientific Center for Medical and Preventive  
Health Risk Management Technologies",  
82, Monastyrskaya St., Perm, 614045, Russia,

<sup>2</sup> FSBEI HPE "Perm State National Research University",  
15, Bukireva St., Perm, 614990, Russia

The peculiarities of immune disorders in the conditions of experimental phenol exposure have been determined, which are characterized by changing the quantitative composition of the cellular component of the immune system, inhibition of the apoptotic activity of immune cells and dysregulation of the immune response towards Th2-type prevail, which could lead to the development of autoimmune and oncoproliferating processes.

**Key words:** experimental studies, phenol, apoptosis, immune regulation.

---

© Dolgikh O.V., Predeina R.A., Dianova D.G., 2014

**Dolgikh Oleg Vladimirovich** – MD, Professor, Head of Department of Immunobiological Diagnostic Methods, Professor of Academic Department of Human Ecology and Life Safety (e-mail: oleg@fcrisk.ru, tel.: 8 (342) 236-39-30).

**Predeina Regina Atlasovna** – junior research associate at Department of Immunobiological Diagnostic Methods (e-mail: itkinina-regina@yandex.ru, tel.: 8 (342) 236-39-30).

**Dianova Dina Gumerovna** – CM, senior research associate of the Laboratory of Cellular Diagnostic Methods (e-mail: dianovadina@rambler.ru, tel.: 8 (342) 236-39-30).