

УДК 613.954:502.3 + 616.097

## ОСОБЕННОСТИ АПОПТОЗА У ДЕТЕЙ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ АЭРОГЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ ФЕНОЛА

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

ФБУН «Федеральный научный центр медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Пермь, e-mail: root@fcrisk.ru

Проведена оценка воздействия фенола на маркеры апоптоза у детей, проживающих в условиях внешнесредового хронического аэрогенного воздействия фенола. Для идентификации диапазонов ответных реакций иммунной системы на воздействие дети, проживающие в условиях экспозиции, были поделены на группы с учетом содержания анализируемого компонента в образцах крови (от 0,010 до 1,864 мг/дм<sup>3</sup>). Установлено, что диапазон концентрации фенола в крови обследуемых детей определяет динамику изменения показателей апоптоза. Максимальное статистически значимое ( $p < 0,05$ ) уменьшение количества TNFR-рецептора на Т-лимфоцитах и статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение экспрессии белка p53 обнаружено при диапазоне концентрации фенола в биосредах от 0,081 до 1,864 мг/дм<sup>3</sup>. Таким образом, у детей, проживающих в условиях хронического внешнесредового воздействия фенола, отмечается ингибирование гибели клетки по типу апоптоза.

**Ключевые слова:** фенол, иммунная система, апоптоз, маркер апоптоза, лимфоцит

## FEATURES OF APOPTOSIS IN CHILDREN UNDER CHRONIC AIRBORNE PHENOL EXPOSURE

Zaitseva N.V., Dianova D.G., Dolgikh O.V.

Federal Scientific Center for Medical and Preventive Health Risk Management Technologies, Perm, e-mail: root@fcrisk.ru

Phenol impact on apoptosis markers in children living in conditions of exogenous aerogenic chronic phenol exposure has been evaluated. To identify the ranges of the immune system responses exposed children were divided into groups according to the analyte content in blood samples (from 0,010 to 1,864 mg/dm<sup>3</sup>). It was found that the range of phenol concentration in blood of exposed children determines the dynamics of changes in apoptosis indicators. Maximum statistically significant ( $p < 0,05$ ) decrease in the number of TNFR – receptor on T-lymphocytes and statistically significant ( $p < 0,05$ ) decrease in p53 protein expression was found in the range of phenol concentration in biological media from 0,081 to 1,864 mg/dm<sup>3</sup>. Thus, inhibition of cell death by apoptosis type has been marked in children living in conditions of chronic exogenous phenol impact.

**Keywords:** phenol, the immune system, apoptosis, apoptosis marker, lymphocyte

Иммунная система является высоко специализированной, сложно регулируемой системой, её клеточные элементы находятся в состоянии постоянной пролиферации. В этой связи любое токсическое воздействие химического вещества обязательно амплифицируется [3]. Для задач ранней диагностики нарушений здоровья при различных путях поступления химических веществ в организм, в том числе аэрогенным способом, актуальным является изучение особенностей ответных реакций иммунной системы на воздействие.

**Цель работы** – оценить особенности изменения апоптоза у детей, проживающих в условиях внешнесредового хронического аэрогенного воздействия фенола.

### Материалы и методы исследования

Исследование выполнено на примере детского населения, проживающего в различных санитарно-гигиенических условиях среды обитания. Биомедицинские диагностические исследования у детей выполнены в соответствии с обязательным соблюдением этических принципов медико-биологических исследований, изложенных в Хельсинкской декларации 1975 года с дополнениями 1983 года. Исследование одобрено Этическим комитетом Федерального

научного центра медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения (протокол № 10 от 17.10.2011 г.). Критерии включения в исследование: возраст детей от 4 до 7 лет, проживание на исследуемых территориях. Критерии исключения: невозможность или нежелание родителей обследуемых детей дать информационное согласие на участие в исследовании, участие обследуемых детей в другом исследовании. Все родители (опекуны) подписали информированное согласие на участие в исследовании и использовании персональных данных. Группу наблюдения составили 154 ребенка (средний возраст  $7,20 \pm 0,14$  лет, мальчиков – 75 человек (48,7%), девочек – 79 человек (51,3 %)). Группу контроля составили 93 ребенка (средний возраст  $6,58 \pm 0,13$  лет, мальчиков – 39 человек (41,9%), девочек – 54 человека (54,1 %)), проживающих на территории относительного санитарно-гигиенического благополучия (контрольная территория). На втором этапе исследований для установления диапазонов ответных реакций иммунной системы на воздействие дети, проживающие в условиях экспозиции, были поделены на подгруппы с учетом содержания анализируемого компонента в образцах крови. Группы обследуемых не отличались между собой по гендерному и возрастному составу. Группа наблюдения и контрольная группа были сопоставимы по возрастному и гендерному составу. Выборка обследуемых была достаточна для достоверного определения межгрупповых отличий.

Для выявления воздействия химических факторов среды обитания на состояние здоровья проведены натурные исследования содержания приоритетных загрязняющих веществ (фенол) в атмосферном воздухе на территориях исследования. Идентификация фенола в биосредах (кровь) выполнялось на капиллярном газовом хроматографе «Кристалл 5000» (ЗАО СКБ «Хроматэк», Russia) 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). Определение субпопуляций лимфоцитов (CD95<sup>+</sup>(FAS)) проводили методом мембранной иммунофлуоресценции с использованием панели меченых моноклональных антител (МКАТ) к мембранным CD-рецепторам («BD», USA). Для определения уровня экспрессии рецептора к фактору некроза опухоли-α 1-го типа (TNFRI) использовали цитофлуориметрический метод, основанный на взаимодействии соответствующих МКАТ с мембранным рецептором к TNFα на лимфоцитах «Becton Coulter» («BC», USA). Определение внутриклеточного маркера апоптоза – p53-протеина, проводилось с помощью МКАТ против белка p53, конъюгированные с PE (фикоэритрин) («BC», USA). Для определения количества апоптотических клеток использовали суспензию мононуклеарных клеток периферической крови, выделенных центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина («Pharmacia Fine Chemicals», Швеция) [6]. 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 («BC», USA). Annexin V-FITC<sup>+</sup>7-AAD<sup>+</sup> – ранний апоптоз (апоптотические клетки).

Для выбора критериев оценки значимости межгрупповых различий средних проверяли соответствие формы выборочных распределений нормальному, используя критерий  $\chi^2$ , а также контролировали равенство генеральных дисперсий с помощью F-критерия Фишера. В случае отклонения от нормального рас-

пределения, 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 [1, 5].

### Результаты исследования и их обсуждение

При исследовании качества атмосферного воздуха на территории наблюдения зарегистрированы превышения фенола до 2,04 ПДК<sub>с.с</sub> (предельно допустимая концентрация среднесуточная) и до 1,9 ПДК<sub>м.р</sub> (предельно допустимая концентрация максимально разовая). На контрольной территории не обнаружено присутствия изучаемого органического соединения (фенол) ни в одной из проанализированных проб. Качество атмосферного воздуха на контрольной территории соответствует гигиеническим нормативам.

Средняя концентрация фенола в крови детей, проживающих на территории наблюдения, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) превышает фоновый региональный уровень ( $0,010 \pm 0,001$  мг/дм<sup>3</sup>) и значения, зафиксированные у детей с контрольной территории (табл. 1). В условиях длительной экспозиции фенолом у экспонируемого населения в крови регистрируется фенол, который можно рассматривать как маркер экспозиции [4, 7]. Отмечено, что у детей, постоянно проживающих в зоне экспозиции, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижено количество CD95<sup>+</sup>-рецептора и TNFRI-рецептора на Т-лимфоцитах относительно результатов, полученных в группе контроля.

Таблица 1

Маркеры экспозиции и маркеры эффекта иммунной системы у детей, проживающих в зоне внешнесредового воздействия фенола ( $M \pm m$ )

| Показатели                                                         | Группа контроля ( <i>n</i> = 93) | Группа наблюдения ( <i>n</i> = 154) | <i>p</i> |
|--------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------------|----------|
| Концентрация фенола в крови                                        |                                  |                                     |          |
| Диапазон концентрации, мг/дм <sup>3</sup>                          | 0,001–0,030                      | 0,010–1,860                         | 0,000    |
| Среднее значение, мг/дм <sup>3</sup>                               | 0,0107 ± 0,001                   | 0,2227 ± 0,0287                     |          |
| Характеристика биомаркеров апоптоза с учетом уровня фенола в крови |                                  |                                     |          |
| CD95 <sup>+</sup> , %                                              | 27,13 ± 1,05                     | 17,15 ± 0,66                        | 0,000    |
| p53, %                                                             | 1,23 ± 0,11                      | 0,57 ± 0,05                         | 0,000    |
| TNFRI, %                                                           | 1,29 ± 0,10                      | 0,47 ± 0,04                         | 0,000    |
| Annexin V-FITC <sup>+</sup> 7-AAD <sup>+</sup> , %                 | 1,72 ± 0,16                      | 0,82 ± 0,05                         | 0,001    |

Примечание: *p* – различие между основной группой и группой контроля по средним величинам  $p < 0,05$ .

Анализ иммунограмм продемонстрировал, что у детей, проживающих в условиях внешнесредовой экспозиции фенолом, статистически значимо ( $p < 0,05$ ) реже идентифицируется внутриклеточный белок p53, а также достоверно снижено ( $p < 0,05$ ) количество Annexin V-FITC<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>-клеток по сравнению с аналогичными показателями, выявленными в контрольной группе.

Все обследуемые дети, проживающие в условиях экспозиции, были поделены на группы с учетом содержания фенола в образцах крови. Результаты обследования выявили, что у детей II группы среднее содержание фенола в крови статистически значимо ( $p < 0,05$ ) превышает среднегрупповое содержание анализируемого компонента в об-

разцах крови детей I группы (табл. 2). Оценка иммунного статуса показала, что у детей II группы статистически значимо ( $p < 0,05$ ) повышено количество Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD95-антиген в сравнении с результатами, полученными у детей I группы. Обнаружено, что у детей при контаминации биосред фенолом выше 0,081 мг/дм<sup>3</sup> статистически значимо ( $p < 0,05$ ) повышается процентное содержание Annexin V-FITC<sup>+</sup>7-AAD<sup>-</sup>-лимфоцитов относительно значений, полученных у обследуемых I группы. Анализ иммунограмм выявил, что у детей II группы статистически значимо ( $p < 0,05$ ) снижена экспрессия белка p53 и TNFR1 в сравнении с результатами, зарегистрированными у детей I группы.

Таблица 2

Сравнительная характеристика диапазонов маркеров апоптотической регуляции у детей группы наблюдения, проживающих в зоне внешнесредового воздействия фенола, отличающихся уровнем содержания фенола в крови ( $M \pm m$ )

| Показатели                                                         | I группа (n = 90) | II группа (n = 64) | p <sup>1</sup> |
|--------------------------------------------------------------------|-------------------|--------------------|----------------|
| Концентрация фенола в крови                                        |                   |                    |                |
| Диапазон концентрации, мг/дм <sup>3</sup>                          | 0,010–0,080       | 0,081–1,860        |                |
| Среднее значение, мг/дм <sup>3</sup>                               | 0,041 ± 0,010     | 0,412 ± 0,020      | 0,000          |
| Характеристика биомаркеров апоптоза с учетом уровня фенола в крови |                   |                    |                |
| CD95 <sup>+</sup> , %                                              | 15,29 ± 0,4       | 20,22 ± 1,3        | 0,005          |
| p53, %                                                             | 0,75 ± 0,12       | 0,39 ± 0,08        | 0,010          |
| TNFRI, %                                                           | 0,61 ± 0,17       | 0,30 ± 0,03        | 0,002          |
| Annexin V FITC <sup>+</sup> 7-AAD <sup>-</sup> , %                 | 0.56 ± 0.20       | 0.99 ± 0.06        | 0.002          |

Примечание:  $p^1$  – различие между I группой и II группой по средним величинам  $p < 0,05$ .

Обнаружено, что фенол в наибольшей степени ингибирует составляющие TNF- и p53-зависимого апоптоза. Максимальное статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение экспрессии TNFR1 (на 70 %) и внутриклеточного протеина p53 (на 68 %) по отношению к контрольным значениям идентифицированы при содержании фенола в биосредах на уровне 0,081–1,864 мг/дм<sup>3</sup>. Однако фенол в данном диапазоне концентрации формирует наименьшее изменение показателей, характеризующих FAS-зависимый апоптоз: статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение экспрессии CD95<sup>+</sup>-клеток (до 11 %) в сравнении с контрольными цифрами. Наименьшее отклонение параметров TNF- и p53-зависимого апоптоза от контрольных цифр прослеживается при концентрации фенола в крови от 0,01 до 0,08 мг/дм<sup>3</sup>. Выявлены следующие изменения иммунного статуса: статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение количества TNFR1<sup>+</sup>-клеток (на 52 %) и экспрессии внутриклеточного бел-

ка p53 (на 39 %) в сравнении с контрольными цифрами.

Фенольные соединения способны трансформировать компоненты клеточных сигнальных путей [9], что может приводить к изменению активационно-индуцированной гибели клетки. Фенолсодержащие соединения активируют транскрипцию металлотioneина I за счет цинк-зависимого механизма, что приводит к снижению чувствительностей тканей к действию окислительно-стрессовых факторов [2] и тем самым изменяют скорость вхождения клетки в апоптоз. Полагают, что фенолы обладают возможностью модулировать транскрипцию NF-kB фактора [8], регулирующего индуцибельную экспрессию ряда генов, участвующих в выживании и удалении клеток с помощью механизмов апоптоза.

### Выводы

Таким образом, у детей, проживающих в условиях хронического внешнесредового воздействия фенола, отмечается

ингибирование гибели клетки по типу апоптоза. Установлено, что диапазон концентрации фенола в крови обследуемых детей (0,010 до 1,864 мг/дм<sup>3</sup>) определяет динамику изменения показателей апоптоза. Максимальное статистически значимое ( $p < 0,05$ ) снижение количества TNFR-рецептора на Т-лимфоцитах и экспрессия белка p53 идентифицировано при диапазоне концентрации фенола в биосредах от 0,081 до 1,864 мг/дм<sup>3</sup>. Для сохранения баланса между пролиферацией и гибелью клетки, то есть процесса, необходимого для сохранения популяции тех или иных клеток, в условиях экспозиции формируется компенсаторные реакции иммунной системы, которые проявляются повышением активации составляющих FAS-зависимого апоптоза на фоне ингибирования TNF- и p53-зависимого апоптоза.

### Список литературы

1. Гланц С. Медико-биологическая статистика; под ред. Н.Е. Бузикашвили. – М.: Практика, 1998. – 459 с.
2. Громова О.А., Сотникова Н.Ю., Катаев С.И., Галустян А.Н., Красных Л.М., Мазина С.В. // Цитокины и воспаление. – 2005. – Т. 4, № 1. – С. 42–46.
3. 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.
4. Онищенко Г.Г., Зайцева Н.В., Землянова М.А. Гигиеническая индикация последствий для здоровья при внешнесредовой экспозиции химических факторов; под ред. Г.Г. Онищенко. – Пермь: Книжный формат, 2011. – 531 с.
5. Флетчер Р., Флетчер С., Вагнер Э. Клиническая эпидемиология: Основы доказательной медицины. – М.: Медиа Сфера, 1998. – 352 с.
6. Boyum 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.
7. Dolgikh O.V., Kharakhorina R.A., Dianova D.G., Gugovich A.M. State of cell regulation in children exposed to phenols //

Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies». – 2013 – P. 149–152.

8. Ma Q. Chemoprotection by phenolic antioxidants. Inhibition of tumor necrosis factor  $\alpha$  induction in macrophages / Q. Ma, K. Kinneer // J. Biol. Chem. – 2002. Vol. 277. – P. 2477–2484.

9. Soobrattee M.A. Chemopreventive actions of polyphenolic compounds in cancer / M.A. Soobrattee, T. Bahorun, O.I. Aruoma // BioFactors. – 2006. – Vol. 27. – P. 19–35.

### References

1. Glants S. *Medicobiological statistics* [under edition N.E. Buzikashvili]. M.: Praktika, 1998. 459 p.
2. Gromova O.A., Sotnikova N.YU., Kataeva S.I., Galustyan A.N., Krasnykh L.M., Mazina S.V. *Tsitokiny and inflammation*, 2005. vol. 4, № 1, pp. 42–46.
3. Zaitseva N.V., Dolgikh O.V., Dianova D.G. *News of the Samara scientific center of the Russian inflammation academy of sciences*, 2012, vol. 14, № 5(2), pp. 341–343.
4. Onischenko G.G., Zaitseva N.V., Zemlyanova M. A. *Hygienic indication of consequences for health at a vnesredovoy exposition of chemical factors*; [under edition G.G. Onischenko]. Perm: «Book format». 2011. 531 p.
5. Fletcher R., Fletcher S., Wagner E. *Clinical epidemiology: Bases of evidential medicine*. M.: «Media Sfera», 1998. 352 p.
6. Boyum A. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 1968, vol. 21, suppl. 97, pp. 77–89.
7. Dolgikh O.V., Kharakhorina R.A., Dianova D.G., Gugovich A.M. State of cell regulation in children exposed to phenols // Proceedings of the 3rd International Academic Conference «Applied and Fundamental Studies», 2013 pp. 149–152.
8. Ma Q., Kinneer K. J. Biol. Chem., 2002, vol. 277, pp. 2477–2484.
9. Soobrattee M.A., Bahorun T., Aruoma O. I. *BioFactors*, 2006, vol. 27, pp. 19–35.

### Рецензенты:

Юшкова Т.А., д.м.н., профессор, Пермская фармацевтическая академия, кафедра фармакологии с курсом клинической иммунологии, г. Пермь;

Рочев В.П., д.м.н., профессор кафедры экологии человека и безопасности жизнедеятельности Пермского государственного национального исследовательского университета, г. Пермь.

Работа поступила в редакцию 04.02.2014.