На правах рукописи

ФИЛИППОВА Оксана Евгеньевна

СООТНОШЕНИЕ ФЕНОТИПОВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЛЮДЕЙ В ПРОЦЕССЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ИММУННОГО ОТВЕТА

03.03.01 - физиология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Архангельск - 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт физиологии природных адаптаций Уральского отделения Российской академии наук

Научный руководитель: заслуженный деятель науки РФ, доктор медицинских наук, профессор
Добродеева Лилия Константиновна

Официальные оппоненты: **Пащенко Владимир Петрович**
доктор медицинских наук, профессор, ГБОУ ВПО Северный государственный медицинский университет, профессор кафедры нормальной физиологии

Фёдоров Афанасий Иванович
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Научно-исследовательский институт здоровья Северо-Восточного федерального университета им. М.К. Аммосова

Ведущая организация: Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук

Защита состоится «10» апреля 2015 года в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 212.008.04 на базе Северного (Арктического) федерального университета имени М.В. Ломоносова» по адресу: 163045, г. Архангельск, проезд Бадигина, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГАОУ ВПО «Северный (Арктический) федеральный университет имени М.В. Ломоносова» и на сайте www.narfu.ru

Автореферат разослан «07» марта 2015 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета Старцева Лариса Федоровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Объективная оценка и интерпретация состояния иммунного фона усложняется необходимостью понятия кооперации и сложных процессов координации, участвующих в реакциях поддержания иммунного гомеостаза клеток. Взаимодействие иммунокомпетентных клеток обеспечивает клеточное распознавание, синхронность активности клеток в образовании мембранных и гуморальных антител, и придает иммунному ответу специфичность (R. Cascao, 2009; С.Г. Нехаев, 2010; Ю.В. Перфильева, 2012; A. D. Yalcin, 2012; J.M. Curtsinger, 2012; A. Doni, 2012). Циркулирующие в периферической крови и со временем мигрирующие в ткани иммунокомпетентные клетки отражают сложнейшие процессы их активизации, пролиферации и дифференцировки в процессе поддержания иммунного гомеостаза (А.Д. Адо, 1978; А.Ю. Барышников, 2002; Л.К. Добродеева, 1989; А.Г. Марачев, 1980; Е.Л. Насонов, 2004; Л.С. Щёголева, 2005). Количество клеток, пределы их содержания, в том числе отдельных фенотипов лимфоцитов, отражают состояние иммунного фона. Однако, количественная оценка концентраций иммунокомпетентных клеток информативна только в крайних случаях – дефицита или повышенного относительно нормы их содержания (Н.А. Агаджанян, 2008; Л.К. Добродеева, 1984, 2003; Е.М. Дюжикова, 1994; Г. Селье, 1972; Л.С. Щёголева, 2009). Увеличение концентраций клеток в периферической крови может отражать и пролиферацию, и компенсацию снижения их функциональной активности, а также выброс клеток из депо и перераспределение маргинального, и циркулирующего слоев клеточного пула (Н.А. Агаджанян, 1998; Р.М. Баевский, 2003; Р.В. Банникова, 1999; Н.С. Гулькина, 2004; A. Doni A, 2012). В то же время процессы кооперации и координации клеточного взаимодействия имеют основное значение в формировании иммунного статуса и иммунных реакций, поскольку и медиаторы, и цитокины, рецепторы и даже их лиганды являются продуктами жизнедеятельности тех же клеток (Р.В. Банникова, 1999, 1994, 1991; Л.К. Добродеева, 2011, 2004; А.В. Ткачев, 1991).

Произведена попытка оценить состояние иммунного фона взрослых трудоспособных людей с позиций изучения соотношения содержания в крови клеточных популяций и их взаимосвязей. На данный момент нет сведений о фоновых изменениях параметров иммунного гомеостаза с учётом кооперации и координации активности различных фенотипов клеток, служащих предикторами развития вторичных экологически зависимых иммунодефицитов и формирования их клинических проявлений. В то время как фон и начальные этапы иммунных реакций являются определяющими для формирования эффективной иммунной защиты или ответа с развитием последующих функциональных расстройств (А.Д. Адо, 1985; Л.К. Добродеева , 2014; В.А. Черешнев, 2002; В.В. Чиркин, 2003). В одних и тех же ситуациях регистрируют и повышение, и снижение содержания в

крови цитотоксических клеток, хелперов и нормальных киллеров; имеются данные и о синхронных параллельных изменениях их концентраций (Л.К. Добродеева, 2003, 2004, 2014; Г.Н. Красовский, 2011; Р.М. Цинкернагель, 2008; В.А. Черешнев, 2002). Создается впечатление, что соотношение иммунокомпетентных клеток проявляется ещё на этапе выбора направления их дифференцировки под влиянием значительного многообразия комплекса влияющих на человека факторов и именно соотношение отдельных фенотипов клеток фона оказывается решающим - стимулировать или тормозить конкретный этап развития иммунной реакции. Всё вышеизложенное определило актуальность проблемы

Цель и задачи исследования: выявить соотношение фенотипов лимфоцитов периферической крови, цитокинового профиля и спектра сывороточных иммуноглобулинов у людей в условиях физиологического состояния иммунного фона.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить в сравнительном плане иммунный фон у лиц трудоспособного возраста, проживающих в городах Москва и Архангельск.
2. Установить удельный вес циркулирующих в периферической крови зрелых Т-клеток и лимфоцитов, ориентированных на развитие антителозависимых реакций.
3. Выявить характер зависимости уровней лимфопролиферации, дифференцировки и апоптоза лимфоцитов периферической крови у лиц, проживающих в городах Москва и Архангельск.
4. Установить физиологические уровни удельного веса содержания зрелых, активированных, дифференцированных лимфоцитов и лимфоцитов, подвергаемых апоптозу, в периферической крови у лиц трудоспособного возраста без манифестных проявлений дефектов иммунной защиты, проживающих в городах Москва и Архангельск.

Положения, выносимые на защиту:

1. Развитие адаптивных иммунных реакций взаимосвязано с состоянием реактивности клеток (нейтрофилов, натуральных киллеров), обеспечивающих врожденный иммунитет.
2. Активность каждого этапа в развитии иммунных реакций зависит от уровня выраженности предшествующего этапа. Соотношения активированных, дифференцированных Т- и В- лимфоцитов и клеток, подготовленных к апоптозу, а также уровней относительного содержания незрелых лимфоцитов и недифференцированных Т-клеток в периферической крови отражают состояние внутрисистемной регуляции иммунитета.

Научная новизна исследования. Впервые установлены уровни снижения активных фагоцитов и относительного содержания зрелых Т-клеток (ниже 40%), обусловливающие риск манифестных проявлений иммунодефицита у жителей Москвы и Архангельска; показано, что в периферической крови В-клеточная популяция представлена преимущественно клетками, способными к пролиферации. Доказана

взаимосвязь общего содержания циркулирующих лимфоцитов и уровня концентраций в крови молодых форм нейтрофилов. Показана прямая зависимость концентраций в крови фенотипов $CD8^+$ и $CD4^+$ Т-лимфоцитов от содержания $CD16^+$. Впервые в сравнительном аспекте изучено различие уровней участия в активации иммунокомпетентных клеток трансферрина, антигенов HLADRII и интерлекина-2 в обеспечении иммунного гомеостаза у взрослых трудоспособных людей. В результате проведённого комплексного исследования физиологических реакций иммунной системы выявлены особенности формирования иммунных дисбалансов у жителей мегаполиса (В-клеточная активация) и приполярного города (Т-клеточная активация). Получены доказательства того, что разнообразные соотношения фенотипов лимфоцитов в различном сочетании с цитокинами и иммуноглобулинами формируют этапы иммунного ответа и регулируют их продолжительность.

Научно-практическая значимость исследования. Полученные в процессе исследования данные о кооперации иммунокомпетентных клеток дополняют современные представления о физиологических механизмах развития адаптивных иммунных реакций у лиц, проживающих в различных географических территориях. Результаты исследования могут получить практическое применение как база данных по иммунофизиологическому профилю человека для разработки мер по предупреждению вторичных экологически зависимых иммунодефицитов, связанных с условиями жизни на Европейском Севере РФ и в средней полосе. Полученные данные о соотношении фенотипов лимфоцитов периферической крови у лиц разных климато-экологических районов проживания расширяют представления об индивидуальной адаптивной способности организма и вносят существенный вклад в знания экологической физиологии. Установленные в исследовании механизмы активации каждого этапа развития иммунных реакций, зависящие от уровня выраженности предшествующего, цитокинового профиля и спектра антител могут быть использованы в качестве прогноза состояния здоровья и для обоснования компенсационных мероприятий населению.

Материалы исследования включены в лекционные программы по проблемам экологической иммунологии человека на Севере на кафедре экологической физиологии и биохимии Института естественных наук и биомедицины Северного Арктического федерального университета имени М.В. Ломоносова (акт внедрения от 13.10.13); результаты иссследования используются в практической деятельности МК «Биолам» при постановке диагноза и назначении лечебно-профилактических мероприятий. Материалы диссертации могут быть использованы для решения медико-биологических проблем в работе социальных комиссий. Выявленная в работе высокая степень активации системы иммунитета у северян, чем у москвичей позволяет дать объективную оценку эффективности профилактических мероприятий в г. Архангельске.

Диссертационное исследование выполнено в соответствии с комплексным планом НИР ФГБУН Российской академии наук Института

физиологии природных адаптаций Уральского отделения РАН (ИФПА УрО РАН) г. Архангельск в лаборатории регуляторных механизмов иммунитета (зав. лаб. д.м.н., профессор, Засл. деятель науки РФ Л. К. Добродеева) по теме «Выявление иммунных, эндокринных и метаболических маркёров возрастных перестроек функций человека, разработка методов сохранения работоспособности и продления активного периода жизни» (номер государственной регистрации 0120.0.951605). Фрагмент исследования по приполярному региону был осуществлен при финансовой поддержке Грантов УрО РАН №11-4-НП-330, 2012; №12-У-4-1021, 2012; №12-4-5-025, 2012; Администрации Архангельской области №08-2013-03а, 2013; работа по обследованию жителей г. Москвы осуществлялась в рамках программы фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», МК «Биолам», рук. Л.К. Добродеева, 2004-14.

Апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования доложены и обсуждены на научных семинарах ФГБУН Российской академии наук Института физиологии природных адаптаций Уральского отделения РАН (ИФПА УрО РАН) г. Архангельск (2009-2014), Архангельском отделении физиологического общества имени И.П. Павлова (Архангельск); VII конференции иммунологов Урала (Архангельск, 2009; 2014); XXI съезд физиологического общества им. И.П. Павлова, г. Калуга, 2010; Всероссийской молодёжной научно-практической конференции «Адаптация человека на Севере: медико-биологические аспекты», г. Архангельск, 2012; XXII съезд физиологического общества им. И.П. Павлова, г. Волгоград, 2013; Всероссийской конференции «Резервные возможности адаптации и компенсаторные реакции у людей, работающих в условиях Арктики», 2014; Международной научной конференции «Конкурентный потенциал северных и арктических регионов», 2014.
Основные положения диссертационной работы отражены в 9 научных публикациях, в том числе: 3 в журналах рекомендованных по списку ВАК для защиты диссертаций.

Структура и объем диссертации. Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 3 глав собственных исследований, заключения и выводов. Работа изложена на 153 страницах машинописного текста, содержит 4 таблицы, 8 рисунков. Библиографический указатель включает 239 источников, в том числе 130 отечественных и 109 зарубежных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

Проанализированы результаты обследования 152 человек, жителей г. Москва в МК «Биолам» (96 женщин, 56 мужчин) и 115 человек, жителей г. Архангельска в лаборатории регуляции иммунных механизмов ФГБУН ИФПА УрО РАН (59 женщин и 56 мужчин в возрасте 40-55 лет, не имеющих хронической патологии в анамнезе на момент обследования). Обследуемые

лица являлись клинически здоровыми добровольцами, у которых не было выявлено на момент обследования, острых заболеваний и обострения хронических болезней. Все обследуемые лица не прививались в ближайшие 6 месяцев какими-либо вакцинами. Обследование проводили с письменного согласия респондентов с соблюдением основных норм биомедицинской этики в соответствии с документом «Этические принципы проведения медицинских исследований с участием людей в качестве субъектов исследования» (Хельсинкская декларация Всемирной медицинской ассоциации 1964 (с изменениями и дополнениями на 2008 год).

Комплекс обследования включал изучение гемограмм, фагоцитарной активности нейтрофилов, фенотипирование лимфоцитов в периферической крови: $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+$, $CD5^+$, $CD16^+$, $CD10^+$, $CD71^+$, $CD25^+$, $HLA\text{-}DR^+$, $CD22^+$, $CD95^+$, а также сывороточных IgA, IgM, IgG, IgE, циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), цитокинов (IL-1β, IL-2, TNF-α,), комплементарных белков (пропердин-фактора В, С3 и С4), а также трансферрина и раково - эмбрионального антигена (РЭА).

Содержание лейкоцитов определяли стандартным методом подсчета клеток в камере Горяева. Количество клеток гемограммы, моноцитограммы, лимфоцитограммы подсчитывали в мазках крови, окрашенных по методу Романовского – Гимза. Моноцитограмму определяли по методу О.Н. Григоровой (1956). Фагоцитарную активность изучали инкубацией клеток нейтрофилов крови с частицами латекса в течении 30 минут при температуре 30°С. В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза, подсчитывали % активных фагоцитов и среднее фагоцитарное число на 100 нейтрофильных гранулоцитов.

Определение уровня циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови проводилось с помощью тест – набора химической компании «Реакомплекс» (г. Чита).

Для фенотипирования выделенных в градиенте плотности лимфоцитов использовали непрямую иммунопероксидазную реакцию с моноклональными антителами (НПЦ «МедБиоСпектр, г. Москва). Содержание сывороточных иммуноглобулинов определяли методом конкурентного иммуноферментного анализа с использованием реактивов «Bender MedSystems», Австрия; концентрации цитокинов наборами «DRG» , (Германия), для определения содержания белков системы комплемента использовали диагностических наборов фирмы «Bender MedSystems» (Австрия). Концентрации сывороточного трансферрина определяли с помощью биохимического анализатора и реактивов «Human» (Германия).

Оценку результатов и контроль качества выполнения анализов осуществляли применением контрольных сывороток, стандартных нормативов и референсных возможностей диагностической системы, входящих в комплект диагностических наборов.

Все полученные результаты статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ «MICROSOFT EXCEL MX» и

«STATISTICA 6.0» («StatSoft», США) FOR WINDOWS 2000. Проверку нормальности распределения количественных показателей осуществляли при помощи критерия Шапиро-Уилка. Данные исследования представлены в виде их средних значений и средней ошибки (M±m). Статистическую значимость различий между выборками выявляли при помощи t критерия Стьюдента и с использованием непараметрических методов – Крускала-Уоллиса и Манна-Уитни. Различия сравниваемых показателей принимались достоверными при уровне значимости $p<0,05$-0,001. Корреляционный анализ проводился с определением непараметрического коэффициента ранговой корреляции Спирмена (r) и оценкой его достоверности (p). Уровень дисбалансов иммунологических показателей рассчитывался по данным частоты регистрации повышенных и пониженных их концентраций относительно нормативных пределов физиологических колебаний (%).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Различные комплексы факторов долговременного действия, способные оказывать неблагоприятное влияние на организм человека обусловливают фактически однотипные реакции, характерные для хронического стресса (А.В. Ткачев, 2001; 2004; 2005; Е.И.Губанова, 2012). Иммунная система отвечает при этом повышенным фоновым уровнем активизации клеточно-опосредованных и антителозависимых реакций, системы комплемента альтернативным и классическим путем (Добродеева Л.К.,2004) с последующим сокращением резервных возможностей иммунной системы (Л.С. Щёголева, 2007) и формированием экологически зависимого вторичного иммунодефицита.

Среди дефектов иммунной защиты у жителей и Москвы, и Архангельска наиболее часто выявлен дефицит активных фагоцитов (85,53% среди жителей Москвы и 92,10% у проживающих в Архангельске), дефицит содержания в крови IgA (соответственно в 78,19 и 64,47%) и Т-хелперный иммунодефицит (соответственно 3,29 и 19,08%).

Доля зрелых Т-клеток от общего количества циркулирующих лимфоцитов составляет в среднем 48,79%, (43-53% в пределах M±σ); в том числе 48,84% у москвичей и 46,61% у жителей Архангельска. Высокий удельный вес незрелых Т- лимфоцитов на периферии снижает эффективность реакций адаптивного иммунитета, что выявляется низким уровнем РБТЛ, индуцированной ФГА (в 28,00%). Частота регистрации дефицита содержания в периферической крови зрелых Т-лимфоцитов ($<1,0\cdot10^9$ кл/л) в среднем составила 48,79±1,14%, (43-53% в пределах M±σ) и соответственно 45,39 и 52,91% в зависимости от группы обследованных лиц. Дефицит содержания Т-хелперов составил соответственно 3,29±1,03 и 19,08±1,51%. Снижение уровня содержания зрелых Т-клеток менее 40,0% обусловливает низкое содержание Т-хелперов ($CD4^+$). Более 60,0% зрелых Т-лимфоцитов несут кластер $CD4^+$: в среднем 60,08%, без существенных различий у жителей

Москвы 58,49 и Архангельска 63,11%, а также в зависимости от пола обследуемых лиц (соответственно 61,394 и 63,16% у женщин, 56,25 и 63,91% у мужчин).

Активированные Т-лимфоциты (с рецепторами к трансферрину, к интерлейкину-2, к антигенам гистосовместимости класса II) $CD25^+$ $CD71^+$ и $HLADRII^+$, составляют соответственно 37,85, 68,32 и 52,48% от содержания зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$) без существенных различий в зависимости от климата, места проживания и пола обследованных лиц (рис.1).

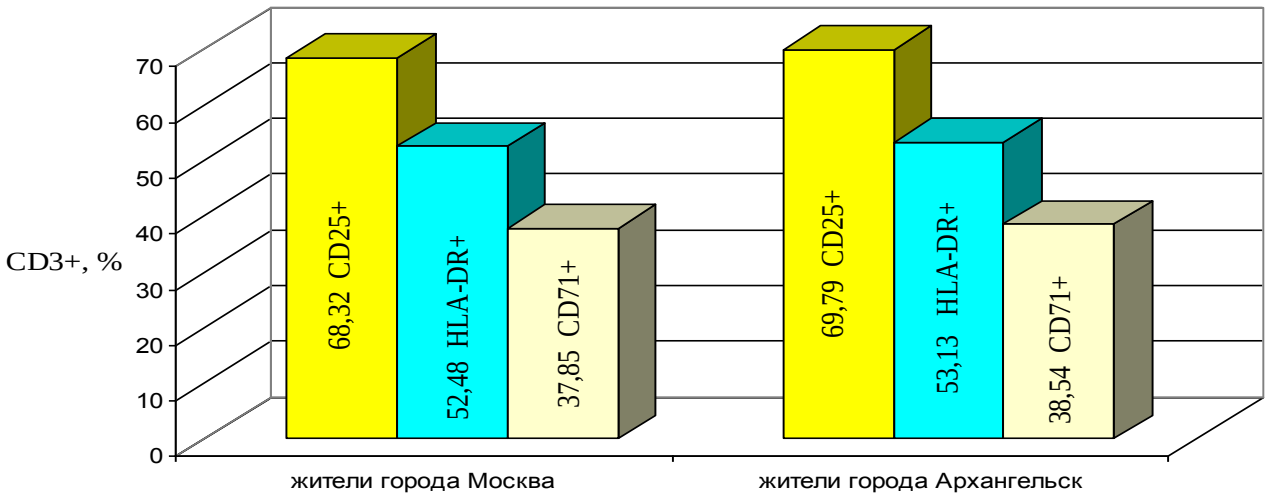

Рис. 1. Удельный вес активационных Т-лимфоцитов, (%), $p<0,001$.

Появление рецептора к трансферрину обеспечивает дополнительное поступление железа в клетку, что необходимо при дефиците энергетического ресурса (R. Metzgar, M. Borowitz, N. Jones et all., 1981). С экспрессией $CD71^+$ лимфоциты активируются и начинают пролиферировать (M. Los, H. Schenk, K. Hexel, P. Baeuerle, et all., 1995). Лимфоциты начинают активно синтезировать IL-2 сразу после появления мембранного рецептора к трансферрину; сам трансферрин стимулирует синтез ДНК, активирует Т-лимфоциты, выработку интерлейкина-2, стимулирует пролиферацию (V. Gerriets, J. Rathmell, 2012; D. Kominsky et al., 2010). Через рецептор к IL-2 активировано 68,34% зрелых Т-клеток (67,92% у москвичей и 69,79% у архангелогородцев), в том числе соответственно 69,31 и 69,98% у женщин и 66,53 и 69,61% у мужчин).

Клетки, меченные для апоптоза, в общей сумме содержания Т- и В-зрелых лимфоцитов ($CD5^+$) не отличаются в зависимости от места жительства обследуемых лиц, составляя в среднем 50,13±1,46% (соответственно 52,14±2,13 и 48,11±2,87% у жителей Москвы и Архангельска); удельный вес $CD95^+$ от общей концентрации лимфоцитов составляет 26,44±1,38% (28,11±1,45 и 24,76±1,49% соответственно). Выявлена прямая взаимосвязь содержания $CD95^+$, с одной стороны, и концентраций пропердина, а также ЦИК и IgM,с другой (r=0,59; 0,48 и 0,51). 50,13. Полученные данные свидетельствуют о том, что физиологический

уровень активации иммунной системы, необходимый для обеспечения иммунного гомеостаза у практически здоровых взрослых людей формируется последовательностью изменений количества и соотношения содержания активированных Т-клеток $CD3^+$, HLA-DR II и последующих изменений концентраций сывороточных иммуноглобулинов.

У лиц, проживающих на Севере выше уровень антителозависимых реакций - чаще выявляются аномально высокие концентрации IgM (соответственно 56,32 и 38,16%) и IgE (23,03 и 9,21%). Вполне логично, поэтому считать, что дефицит активности тех или иных реакций иммунокомпетентных клеток ассоциируется со снижением эффективности защиты и лечебных мероприятий. Это касается не только воспалительных процессов, но и стрессовых расстройств (Г.М. Бодиенкова, В.С. Рукавишников с соав., 2007; В.Б. Никитина, Т.П. Ветлугина, 2007; А.И. Смолягин, А.Л. Фроленко, Е.А. Злодеева, Н.М. Лившиц, 2008; Е.В. Маслова, 2008; Н.И. Кубышева, Л.Б. Постникова с соав., 2008; Ю.В. Перфильева, А.Е. Аббаллов, 2012; S. Levy, R. Herberman, A. Simons, 1989; R. Herberman, 1999; T. Whiteside, R. Herberman,1994; D. Rayler, R. Vance, 2006), (рис.2).

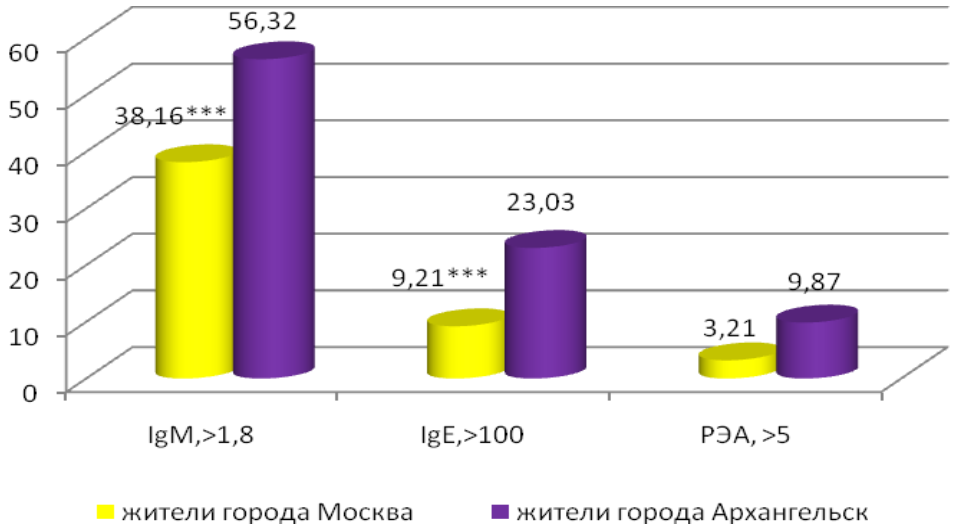

Рис. 2. Частота регистрации повышенных концентраций IgM, IgE, РЭА у жителей города Архангельск и города Москва.
Примечание: *** - p<0,001 при сравнении жителей города Архангельск с жителями города Москва.

В то же время, сравнение направленности изменений концентраций и соотношений иммунокомпетентных клеток в ситуациях, описанных в литературе, свидетельствует о неоднозначности реактивных сдвигов со стороны содержания отдельных фенотипов лимфоцитов. В одних и тех же обстоятельствах регистрируют и повышение, и снижение содержания в крови цитотоксических Т-клеток, Т-хелперов и нормальных киллеров. В одних случаях изменения со стороны содержания в крови $CD8^+$ и NK-клеток параллельны, но или повышается, или снижается их содержание. Наиболее противоречивые сведения касаются реакции со стороны $CD3^+$, $CD5^+$, $CD4^+$ и $CD71^+$. Причин неоднозначности изменения количества клеток в иммунном

ответе достаточно много. Во-первых, влияние клеток, обеспечивающих врожденный иммунитет, нейтрофильных лейкоцитов и натуральных киллеров. Нейтрофилы являются важными эффекторными клетками в иммунном ответе, они способны модулировать функциональную активность других клеток, участвуют в апоптозе, генерации цитокинов, экспрессии рецепторов (R. Cascao, H. Rosario, J. Fonseca, 2009; С.Г. Нехаев, С.Г. Григорьев, 2010). Натуральные киллеры, как и нейтрофильные лейкоциты, являясь клетками, активируемыми как при реакциях врожденного иммунитета, экспрессируют молекулы адгезии, рецепторы цитокинов ($CD25^+$), хемокинов, лимфотоксина (IL-8), дифференцировочные антигены Т-лимфоцитов (CD 6, 7, 8).

Следовательно, можно рассчитывать, что содержание и изменение активности этих клеток может иметь непосредственное отношение к выраженности реакций пролиферации и дифференцировки лимфоцитов. Прямых взаимосвязей содержания нейтрофильных гранулоцитов и общего уровня лимфоцитов в периферической крови обследуемых людей нами не установлено, но регистрируется прямая зависимость активности пролиферативных процессов нейтрофилов (по содержанию палочкоядерных гранулоцитов и нейтрофилов с 2 фрагментами ядра) и общего содержания лимфоцитов (r=0,49 и 0,51). Так, в группе (63 человека) с высокими концентрациями лимфоцитов ($>3,0\cdot10^9$ кл/л; в среднем $3,24\pm0,12\cdot10^9$ кл/л) содержание нейтрофилов с 2-мя фрагментами ядра составило $0,25\pm0,06\cdot10^9$ кл/л; в группе лиц (78 человек) с относительно низкой концентрацией лимфоцитов ($<1,50\cdot10^9$ кл/л; в среднем $1,28\pm0,07\cdot10^9$ кл/л) уровень содержания данных клеток составил в среднем $0,12\pm0,04\cdot10^9$ кл/л). Подобная закономерность выявлена при анализе содержания палочкоядерных нейтрофильных лейкоцитов у людей данных обследуемых групп (соответственно 0,13±0,03 и $0,07\pm0,02\cdot10^9$ кл/л; p=0,02 и 0,03). Коррелятивные взаимосвязи между общим содержанием лимфоцитов и концентрацией нейтрофилов с 2 фрагментами ядра, а также палочкоядерных клеток статистически достоверны (r=0,53 и 0,61 соответственно). Влияние нейтрофилов на общее содержание лимфоцитов в периферической крови возможно посредством вазомоторных аминов и системы комплемента (D.C. Wright, G. Callin,1977) и простагландинов (T. Becker, 1973). К продуктам нейтрофилов, участвующих в изменении проницаемости стенки сосудов, относятся С3а, С5а, гистамин, действующий через С3а и С5а (G. Letner, J. Lunch, S. Betz, P. Henson, 1980). И действительно, концентрации C_3 в сыворотке крови у жителей лиц Москвы было заметно выше, чем у северян г. Архангельска (соответственно 1,55±0,06 и 1,03±0,01 г/л; p=0,019). В этой группе лиц более высоким было и содержание пропердина (соответственно 1,01±0,04 и 0,64±0,08 г/л; p=0,021), что свидетельствует о реакциях альтернативного пути активизации системы комплемента. Механизмом реализации влияния нейтрофильных гранулоцитов на общее содержание лимфоцитов в крови, вероятно, являются общее (системное) влияние

цитокинов пролиферирующих нейтрофилов. Повышение содержания лимфоцитов в периферической крови (>3,0 10^9 кл/л; в среднем 3,24±0,12·10^9 кл/л) у практически здоровых взрослых людей ассоциировано с пролиферацией клеток миелоидного ряда с увеличением концентраций нейтрофилов с 2-мя фрагментами ядра и палочкоядерных их форм (соответственно с 0,12±0,04 до 0,25±0,06·10^9 кл/л и с 0,13±0,03 до 0,07±0,02·10^9 кл/л). Известно, что физиологическое восстановление постоянной численности Т-лимфоцитов у взрослых людей происходит в результате гомеостатической пролиферации в периферическом отделе иммунной системы. Таким путем обеспечивается восстановление популяции Т-лимфоцитов, количество которых снижается под влиянием различных неблагоприятно влияющих на организм факторов (A. Broers, J. Meijerink, 2002; D. Rosa, R. Pabst, 2005).

Относительное содержание дифференцированных $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов не имеет различий у жителей Москвы и Архангельска, составляя в среднем 48,63±2,13% (соответственно 46,23±2,34 и 51,04±1,97%) от общего количества зрелых Т-лимфоцитов, с несущественной разницей у проживающих в Москве и Архангельске. Установлена прямая корреляция удельного веса содержания цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров (r=0,52). Наиболее значимо данная закономерность выявляется при высоких концентрациях NK. Так у лиц с относительно высокими концентрациями NK (>,05·10^9 кл/л у 96 человек; в среднем 0,62±0,07·10^9 кл/л) содержание $CD8^+$ составило в среднем 0,59±0,1,94·10^9 кл/л. В группе лиц (19 человек), где уровень содержания натуральных киллеров был ниже 0,30·10^9 кл/л, содержание цитотоксических клеток было значительно ниже (0,28±0,13·10^9 кл/л; 1,24±0,11·10^9 кл/л). Подобная закономерность выявлена при анализе соотношения содержания натуральных киллеров и Т-хелперов в периферической крови у людей данных обследуемых групп (соответственно 0,66±0,19·10^9 кл/л и 0,41±0,18·10^9 кл/л). Однако, статистически значимые взаимосвязи абсолютных параметров были очень слабыми (r=0,19 и 0,22). Более четко указанная зависимость проявляется при изменении соотношения содержания натуральных киллеров и общего количества лимфоцитов. В группе лиц (96 человек) с относительно высоким содержанием $CD16^+$ от общей концентрации лимфоцитов более (29,96%) концентрации $CD8^+$ и $CD4^+$ значительно выше (соответственно 0,59±0,19 и 0,29±0,13·10^9 кл/л, а также 0,79±0,11 и 0,41±0,11·10^9 кл/л), чем у лиц (19 человек), относительный уровень содержания NK у которых не превышает 15,00% (13,53%). При этом коррелятивные взаимосвязи между удельным весом содержания NK и концентрацией $CD8^+$, $CD4^+$ становятся сильными (r=0,53 и 0,61).

Интерес представляет тот факт, что увеличение содержания натуральных киллеров ассоциировано с одновременным повышением концентраций циркулирующих $CD4^+$ и $CD8^+$. Следует предположить, что активизация натуральных киллеров не предопределяет направление

дифференцировки Т-лимфоцитов для клеточно-опосредованных и антитело-зависимых реакций, а просто индуцирует дополнительный выход из депо Т-клеток с данными кластерами. Стимулирующее влияние NK на Т-лимфоциты, вероятнее всего, связано с наличием на поверхности NK многих дифференцировочных антигенов Т-лимфоцитов (CD4, 6, 7, 8) и способностью этих клеток секретировать очень широкий спектр интерлейкинов (J. Thiery, D. Keefe, S. Boulant, 2011; D. Gale, P. Maxwell, H. Patrik, 2010; С.Б. Николаев, Н.А.Быстрова, В.А. Лазаренко, 2010; S. Yun, S.Lee., S. Yoon, P.-K. Myung, 2011). Клетки $CD16^+$ играют роль в реализации врожденного иммунитета, как антигенпредставляющие клетки, способные индуцировать пролиферацию Т-лимфоцитов (C. Sanchez-Torres, G. Garcia-Roto, M. Cornejo-Cortes, 2013).

Итак, установлена зависимость активности дифференцировки Т-цитотоксических лимфоцитов ($CD8^+$) и Т-хелперов ($CD4^+$) от уровня содержания в периферической крови натуральных киллеров ($CD16^+$) вне зависимости от района проживания и пола обследуемых лиц.

Так в группе лиц с дефицитом Т-хелперов (24 человека) общее содержание зрелых Т-лимфоцитов статистически не имело отличий от средней концентрации $CD3^+$ (соответственно 0,97±0,11 и $1{,}01\pm0{,}08\cdot10^9$ кл/л), а их доля в составе всей массы циркулирующих лимфоцитов была значительно ниже (соответственно 38,23 и 52,84%). Подобная закономерность в тенденции проявляется и относительно $CD8^+$: при дефиците содержания $CD8^+$ (в среднем по этой группе обследуемых лиц $0{,}17\pm0{,}05\cdot10^9$ кл/л) средние концентрации зрелых Т-клеток также мало отличались от таковых для людей с нормальным уровнем Т-цитотоксических лимфоцитов (соответственно 0,89±0,13 и $0{,}92\pm0{,}08\cdot10^9$ кл/л), в то время как относительные уровни зрелых лимфоцитов в составе общей концентрации циркулирующих лимфоцитов имели тенденцию различия (соответственно 39,45 и 45,21%). Малая статистическая достоверность закономерности, касающейся взаимосвязи соотношения относительного дефицита зрелых Т-лимфоцитов и дифференцировки $CD8^+$ объясняется тем, что дефицит клеток данного фенотипа встречается крайне редко - всего 7 случаев из общего числа обследованных лиц. В то же время принципиально важно знать, касается ли данная закономерность только Т-хелперов или и цитотоксических клеток (Т-киллеров/супрессоров). Скорее всего, касается, так как в процессе дифференцировки данных фенотипов могут образовываться клетки $CD4^+$, $CD8^+$.

Итак, на фоне низкого удельного веса зрелых Т-клеток (менее 40,0% от общей концентрации лимфоцитов) меньше содержание дифференцированных Т-хелперов. Низкое абсолютное содержание зрелых Т-клеток у северян встречается очень часто (51,31%), Т-хелперный дефицит выявляется почти в 2,5 раза реже, а дефицит $CD8^+$ встречается совсем редко (2,63%). Всем случаям отсутствия Т-хелперного дефицита при наличии низких концентраций зрелых Т-клеток присуще высокое содержание

лимфоцитов или даже лимфоцитоз. Можно полагать, что снижение содержания $CD3^+$ на периферии вызывает быстрый выброс лимфоцитов из депо лимфоидных органов, что стимулирует пролиферацию и дифференцировку лимфоцитов в этих структурах. Тогда стойкий Т-хелперный дефицит отражает отсутствие резервных возможностей не только компенсаторного выброса из депо, но и лимфопролиферации ($CD10^+$): без существенных различий у жителей Москвы (58,49%) и Архангельска (63,11%), а также в зависимости от пола обследуемых лиц, соответственно, 61,39 и 63,16% у женщин, 56,25 и 63,91% у мужчин. Как видно из представленных выше данных, удельный вес Т-клеток, осуществляющих хелперные функции, мало отличается от уровня содержания клеток, ориентированных на распознавание антигена с кластером HLAD-RII.

Кластер цитотоксических Т-лимфоцитов $CD8^+$ выявлен на 48,63% клеток от общего количества зрелых Т-лимфоцитов, с несущественной разницей у проживающих в Москве и Архангельске (соответственно 46,23 и 51,04). Если условно принять, что разница между содержанием $CD3^+$ и концентрацией $CD3^+CD4^+CD8^-$ и $CD3^+CD4^-CD8^+$ составляет резерв зрелых Т-лимфоцитов, то получается, что практически все зрелые циркулирующие в крови Т-лимфоциты имеют данные кластеры дифференциации. Резервная разница находится в пределах $0{,}05\text{-}0{,}15\cdot10^9$ кл/л, составляя 9,93-14,58% от общего содержания $CD3^+$; случаев, когда регистрируется даже отрицательный баланс резерва достаточно много (14,58% общего количества обследованных людей). Подобные рассуждения конечно условны, но все-таки наводят на мысль, что именно в таких случаях велика вероятность появления клеток с рецепторами $CD3^+CD4^+CD8^+$, которые являются недеятельными и быстро элиминируются апоптозом.

Изменение функции антиген-реактивной Т-клетки на супрессорную происходит по типу обратной связи: степень супрессорной активности увеличивается пропорционально числу активированных клеток, а основной мишенью действия супрессоров, являются те же индукторные клетки, ответственные за активацию конкретного пути дифференцировки (H. Cantor, J. Hugenberger, Mc.-Vay-Boudreau et all., 1978; H. Cantor, R. Gershon ,1979). Приобретение супрессорных функций обычно связано с потерей дифференцирующих молекул (Z. Nagy, P. Kusnierczyk, J. Klein, 1981). Возможно, что приобретение супрессорных функций индукторами $CD4^+$ связано с потерей клеткой мембранных HLAD-RII.

Так, разделив анализируемые результаты исследования на группы с низким (35 человек) и высоким (47 человек) содержанием клеток HLA- DRII (в среднем соответственно $0{,}25\pm0{,}06\cdot10^9$ и $0{,}81\pm0{,}11\cdot10^9$ кл/л; p=0,022 и 0,026), установлены значительные различия содержания в данных группах клеток с мембранным $CD4^+$: соответственно $0{,}38\pm0{,}07\cdot10^9$ кл/л) и $0{,}79\pm0{,}11\cdot10^9$ кл/л; p=0,025 и 0,029). Содержание Т-хелперов ($CD4^+$) ассоциировано с экспрессией HLAD-RII и, возможно, что потеря

индукторной функции Т-хелпером связана с прекращением экспрессии и щетингом клеткой антигенов HLA- DRII.

Принимая во внимание, что супрессивная роль IgM (или В-клеток, их синтезирующих) на антителообразование известна, можно предположить, что экспрессия $CD5^+$ как-то связана с этой супрессией. И, вероятнее всего, суть заключается в том, что, как известно, $CD5^+$ стимулирует синтез естественного иммунодепрессанта IL-10 В-клетками (S. Garaud, A. Marva, S. Lemain, et all., 2011), тем самым снижает активность антителообразования.

Поддержание иммунного гомеостаза обеспечивается и апоптозом иммунокомпетентных лимфоцитов, которому повергаются зрелые дифференцированные клетки, меченные $CD95^+$, в том числе Т- и В-лимфоциты. В среднем доля помеченных к апоптозу клеток среди зрелых Т-лимфоцитов составила 55,34, в том числе 57,55 и 53,13% у жителей Москвы и Архангельска соответственно. Было бы более объективно определять данный уровень от содержания $CD5^+$, включающего не только Т-клетки, но и В-лимфоциты: в удельном весе от содержания Т- и В-зрелых лимфоцитов доля $CD95^+$ - 50,13 (соответственно 52,14 и 48,11% у жителей Москвы и Архангельска). Создается впечатление, что уровень апоптоза, индуцированного внешним путем, соизмерен уровню активизации. Вполне логично предположить, однако, что в инициации апоптоза внешним путем могут преобладать факторы межклеточного пространства. Во всяком случае, выявляется прямая зависимость содержания $CD95^+$ и концентраций пропердина, а также ЦИК и IgM (r=0,59; 0,48 и 0,51).

Полученные в исследовании результаты позволяют утверждать, что в условиях воздействия на организм человека комплекса разных неблагоприятных факторов меняющейся среды (мегаполис средней полосы и Приарктический регион) развивается практически однотипная реакция повышения фоновых уровней антитело-зависимых, клеточно-опосредованных реакций, что сокращает резервные возможности регуляции с риском формирования функциональной недостаточности Т-лимфоцитов, дисиммуноглобулинемии и дефицита фагоцитарной защиты: дефицит активных фагоцитов 85,53% среди жителей Москвы и 92,10% у проживающих в Архангельске, дефицит содержания в крови IgA соответственно в 78,19 и 64,47% и зрелых Т-лимфоцитов соответственно 45,39 и 51,31%. У проживающих в неблагоприятной климатической обстановке выше частота регистрации повышенных концентраций IgM (соответственно 56,32 и 38,16%), IgE (23,03 и 9,21%) и РЭА (9,87 и 3,21%).

Полученные в работе результаты исследования свидетельствуют о том, что физиологическая регуляция иммунного ответа характеризуется вовлечённостью минимального количества фенотипов лимфоцитов и других иммунологических показателей, меньшим удельным весом их от общего количества лимфоцитов и минимальным количеством жёстких корреляционных взаимосвязей. В то же время большая вовлечённость фенотипов лимфоцитов, больший удельный вес их от общего количества

лимфоцитов, множество жёстких корреляционных связей способствуют формированию иммунных дисбалансов, что в конечном итоге может проявиться развитием вторичных экологически зависимых иммунодефицитов.

ВЫВОДЫ

1. Доля зрелых Т-клеток от общего количества циркулирующих лимфоцитов в периферической крови у взрослых трудоспособного возраста людей составляет в среднем 48,79±1,14%, (43-53% в пределах М±σ) и не различается в зависимости от места проживания (города Москва и Архангельск); снижение уровня содержания зрелых Т-клеток ($CD4^+$) менее 40,0% ассоциирует с дефицитом содержания Т-хелперов ($CD4^+$).
2. Удельный вес активационных молекул $CD71^+$, HLADRII и $CD25^+$ от зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$) составляет соответственно 37,68±1,28; 52,04±1,32; 68,86±1,23% без существенных различий в зависимости от места проживания и пола обследованных лиц; наиболее высокий уровень активизации посредством провоспалительного цитокина - интерлейкина-2 коррелирует (r=0,47) с содержанием $CD10^+$, клеток ориентированных на дифференцировку по В-клеточному типу.
3. Удельный вес содержания $CD10^+$ ($0,28±0,03·10^9$ кл/л) и В-лимфоцитов ($0,29±0,02·10^9$кл/л) от общего количества $CD5^+$ ($1,15±0,07·10^9$ кл/л), содержащих Т- и В-лимфоциты, составляют соответственно 24,35±0,41% и 25,22±0,32%, что позволяет утверждать, что в периферической крови В-клеточная популяция у обследуемых нами лиц представлена преимущественно клетками, способными к пролиферации.
4. Кластер $CD4^+$ несут 60,08±1,6% Т-лимфоцитов, без существенных различий у жителей Москвы 58,49±1,78 и Архангельска 63,11±1,96%, а также в зависимости от пола обследуемых лиц (соответственно 61,39±2,54 и 63,16±2,66% у женщин, 56,25±2,35 и 63,91±1,88% у мужчин).
5. Относительное содержание дифференцированных $CD8^+$ цитотоксических Т-лимфоцитов не имеет различий у жителей Москвы и Архангельска, составляя соответственно 46,22±2,34 и 51,04±1,97%; установлена прямая корреляция удельного веса содержания цитотоксических лимфоцитов и натуральных киллеров (r=0,52).
6. Доли клеток, меченных к апоптозу, от общего содержания Т- и В-зрелых лимфоцитов ($CD5^+$), не отличаются в зависимости от места жительства обследуемых лиц, составляя в среднем 50,13±1,46% (соответственно 52,14±2,13 и 48,11±2,87% у жителей Москвы и Архангельска); удельный вес $CD95^+$ от общей концентрации лимфоцитов составляет 26,44±1,38% (28,11±1,45 и 24,76±1,49% соответственно); выявляется прямая взаимосвязь содержания $CD95^+$, с одной стороны, и концентраций пропердина, а также ЦИК и IgM, с другой (r=0,59; 0,48 и 0,51), что отражает состояние внутрисистемной регуляции иммунитета.

7. Наиболее частыми дефектами иммунной защиты является низкий уровень активных фагоцитов (85,53±5,28% среди жителей Москвы и 92,10±6,34% у проживающих в Архангельске), дефицит содержания сывороточных IgA (соответственно в 78,19±3,17 и 64,47±3,66%) и зрелых Т-лимфоцитов (соответственно 45,39±3,22 и 51,31±3,31%) в периферической крови.
8. У жителей Архангельска выше частота регистрации повышенных концентраций IgM (соответственно 56,32±3,47 и 38,16±1,49%), IgE (23,03±1,26 и 9,21±1,31%) и РЭА (9,87±1,33 и 3,21±0,57%) в сыворотке крови; что ассоциировано с уровнем нейтропении, дефицитом активности фагоцитов и низким содержанием зрелых Т-клеток в периферической крови (r=0,39-0,62).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.

1. Выявленное в результате исследования снижение уровня содержания зрелых Т-клеток менее 40,00% в периферической крови ассоциируется с дефицитом Т-хелперов ($CD4^+$) и может быть использовано в комплексной оценке здоровья.
2. Содержание активных фагоцитов ниже 40,00% является критерием риска манифестных проявлений иммунодефицита.
3. Содержание циркулирующих $CD16^+$ ниже 15%,00 от общего количества мононуклеаров периферической крови ассоциировано с функциональной недостаточностью клеточно-опосредованных защитных реакций.

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Щёголева О.Е. (Филиппова О.Е.) Состояние иммунного гомеостаза у молодых лиц с манифестными формами экологически зависимых иммунодефицитов на Европейском Севере / О.Е. Щёголева (Филиппова О.Е.), М.В. Меньшикова. М.С. Айвазова, Е.Ю. Шашкова, Т.Б. Михайлова / Экология человека.-2010.-№5.-С.35 – 41.**
2. Филиппова О.Е. Активизация иммунного ответа у жителей крайнего Севера / О.Е. Филиппова, А.Ю. Стирманова, Е.Ю. Шашкова, Л.И. Арасланова // Вестник уральской медицинской академической науки. – 2012. – С. 232.
3. Шашкова Е.Ю. Формирование напряжения в иммунной регуляции у молодых лиц на Севере / Е.Ю. Шашкова, О.Е. Филиппова // Мат-лы. междунар. междисц. конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – Судак. – 2012. – С.446-447.
4. Михайлова Т.Б. «Адаптация человека к экологическим и социальным условиям Севера» / Отв. ред. Е.Р. Бойко. / Т.Б. Михайлова, О.Е. Щёголева (О.Е. Филиппова) Шашкова Е.Ю., Щёголева Л.С. – Екатеринбург - Сыктывкар – УрО РАН – 443. (Коми научный центр УрО РАН), 2012. – С.119-121.

5. Филиппова О.Е. Состояние иммунного статуса у мужчин, работающих в условиях профессиональной изоляции Приполярья / О.Е. Филиппова, Л.С. Щёголева, Л.И. Арасланова // Материалы XXII Съезда физиологического общества им. И.П. Павлова.- М. - Волгоград, 2013. – с.547.

6. Филиппова О.Е. Состояние иммунной защиты у жителей мегаполиса/ О.Е. Филиппова, Л.К. Добродеева // Российский иммунологический журнал. №2. – 2013. – 155.

7. Филиппова О.Е. Природные, антропогенные, социальные условия жизни и состояние иммунитета / О.Е. Филиппова, Л. К. Добродеева // Материалы Всероссийской молодежной научно-практической конференции «Адаптация человека на Севере: медико-биологические аспекты», Архангельск, 2012. – С. 329-331.

8**. Филиппова О.Е. Соотношение лимфоидных субпопуляций в иммунном ответе / О.Е. Филиппова // Вестник Уральской медицинской академической науки, №2(48), 2014. – С. 102-104.**

9. **Добродеева Л.К. Соотношение содержания иммунокомпетентных клеток в регуляции иммунного статуса человека, проживающего на Севере / Л.К. Добродеева, О.Е. Филиппова, С.Н. Балашова // Вестник Уральской медицинской академической науки, №2(48), 2014. – С. 132-134.**