

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ РЯДА ВИТАМИНОВ НА АКТИВНОСТЬ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК

Д. В. Незговоров¹

Проведено исследование содержания витаминов А, Е, В₁, В₂, В₆ в лимфоцитах и сыворотке крови с одновременным определением популяций лимфоцитов CD3+, CD5+, CD4+, CD8+, CD16+, CD25+, CD71+, CD95+, HLA-DR+. По данным клеточного иммунитета разделили на 2 группы: с физиологической нормой и дефицитом. В результате показано, что независимо от группы содержание витаминов А, Е, В₆ в сыворотке не изменяется, но концентрация В₁ и В₂ в группе с физиологической нормой выше, чем в группе с дефицитом. В группе с дефицитом клеточного иммунитета выявлено повышение внутриклеточных витаминов А, Е, В₂ и В₆. Концентрация тиамин и сыворотке и лимфоцитах в группе с физиологической нормой выше, чем в группе с дефицитом.

Ключевые слова: витамины, клетки, лимфоциты, полисахарид

ВВЕДЕНИЕ

Климат и условия жизни на Севере не комфортны для человека. Длительное проживание на Севере формирует дисбаланс иммунных механизмов, фоновое напряжение иммунной системы с последующим сокращением резервных возможностей иммунной регуляции. Это влечёт за собой возникновение хронических заболеваний с развитием различного рода осложнений [1, 9].

Известно, что витамины являются биологическими катализаторами. Их основная задача — усиливать биологические процессы в организме человека. Недостаток витаминов вызывает развитие различных заболеваний [8]. Витамины модулируют активность иммунной системы, но неизвестно какие именно витамины обладают такой активностью. У большинства обследованных выявляется полигиповитаминоз независимо от возраста, места проживания и профессиональной принадлежности [1, 4, 7].

В данной работе проведён анализ экспериментальных данных содержания витаминов в сыворотке, внутриклеточных витаминов в лимфоцитах и активности клеточного иммунитета. Цель работы — выявить взаимосвязь концентрации витаминов в сыворотке и лимфоцитах при различных состояниях клеточного звена иммунитета у людей в зависимости от нагрузки.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследуемую группу составили жители г. Архангельска, входящие в 1 и 2-ю группу здоровья, на момент сдачи крови не имевшие воспалительных и обострения хронических заболеваний в количестве 173

человек. Общий анализ крови проводили с определением содержания лейкоцитов, эритроцитов, подсчетом лейкоцитарной формулы и определением содержания гемоглобина на гематологическом анализаторе BC 3000 Plus (Китай).

Кровь забирали в 2 вакутейнера: для получения сыворотки использовали вакутейнеры без реагента, для выделения лимфоцитов вакутейнеры с гепарином.

Сыворотку получали путем центрифугирования вакутейнеров без наполнителя в течение 10 мин при 3000 об/мин.

Выделение лимфоцитов из периферической крови производили по методу А. Воупп и отмывали 3 раза средой 199 при 1000 об/мин [6]. Подсчитывали количество лимфоцитов и проверяли цитологически процент лимфоцитов в каждом анализе. В среднем он составил 98,1 %.

Для фенотипирования лимфоцитов использовали непрямую иммунофлюоресцентную реакцию с использованием мышиных моноклональных антител (НПЦ “МедБиоСпектр”, Москва). Определяли популяции лимфоцитов CD5+, CD3+, CD4+, CD8+, CD16+, CD25+, CD71+, HLA-DR+, CD22+, CD95+. Подсчёт клеток проводили на люминесцентном микроскопе МИКМЕД 2 вариант 11, Люмэкс, Санкт-Петербург.

Содержание витаминов А и Е определяли в сыворотке и клеточной суспензии лимфоцитов по методу Р. Ч. Черняускене и соавт. [11]. Витамин В₁ определяли тихромным методом [3]. Концентрацию витамина В₆ определяли по способу Курсона и Броуна [3]. Содержание витамина В₂ определяли люмифлавиновым методом [10]. Определение витаминов Е, А, В₁, В₂ и В₆ проводили в лизированных лимфоцитах, концентрацию витаминов пересчитывали на $3,5 \cdot 10^9 \cdot 100$ кл. Определение проводили на ФЛЮОРАТ-02-АБЛФ-Т, Люмекс, Санкт-Петербург. Коэффициент 100 взят для

¹ Северный государственный медицинский университет, 163000, Архангельск, пр. Троицкий, 51.

перевода полученной концентрации на содержание витаминов в сыворотке с целью установления одинаковых уровней в сыворотке и внутри клеток.

Исследуемые образцы делили на группы по физиологической активности клеточного иммунитета [5]. В первую группу вошли лица, имеющие физиологические значения клеточного иммунитета (56 человек), во вторую — с лабораторно выявленным иммунодефицитом (117 человек). В каждом случае проводили определение клеточного иммунитета и концентрацию витаминов в сыворотке и лимфоцитах, выявляли взаимосвязи между клеточным иммунитетом и концентрацией сывороточных и внутриклеточных витаминов.

Стимулирующую нагрузку на лимфоциты с дефицитом клеточного иммунитета проводили сульфатированным полисахаридом Ламинарии сахаристой (молекулярная масса 68 кД, концентрация полисахарида 2 мкг/мл) в присутствии витаминов А, Е, В₁, В₂, В₆ в среде культивирования в дозе нижней границы физиологической нормы содержания витаминов в сыворотке крови [12]. Для приготовления среды для краткосрочного культивирования использовали среду 199 с добавлением витаминов: Е — 4 мкг/мл, А — 0,3 мкг/мл, В₁ — 0,05 мкг/мл, В₂ — 0,12 мкг/мл, В₆ — 5 нг/мл (“Sigma-Aldrich”). Водорастворимые витамины добавляли к среде перед проведением исследования до их полного растворения. Жирорастворимые витамины (А и Е) добавляли в среду и перемешивали на шейкере в течение 40 мин при 3500 об/мин. Лимфоциты культивировали при 37 °С в течение 30 мин.

Статистическую обработку проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 6.0. Критический уровень значимости принимался меньше 0,05. Статистический уровень различий между сравниваемыми группами рассчитывался по критерию Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По литературным данным известно, что на территории Европейского севера выявлен дисбаланс иммунных реакций. При этом у жителей наблюдается снижение популяционного состава лимфоцитов относительно физиологической нормы. Эти изменения связывают с экологозависимым иммунодефицитом [9].

Проведенный анализ показывает (табл. 1), что в группе с иммунодефицитом содержание клеток Т-лимфоцитов (CD3+) снижено относительно нормы на 25,7 %.

Известно, что в периферической крови клетки с рецептором CD5+ выявляются только на зрелых Т-лимфоцитах, в то же время клетки с рецептором CD5- находятся в тканях, не определяются в периферической крови и относятся к В-лимфоцитам [2]. Содержание CD5+-лимфоцитов в группе с иммунодефицитом снижено относительно группы с нормой на 34,2 %. Концентрация дифференцированных лимфоцитов Т-хелперов (CD4+), цитотоксических лимфоцитов (CD8+) и естественных киллеров (CD16+) снижено на 45,1; 46,5 и 66,1 % соответственно.

Концентрация активированных лимфоцитов в группе с иммунодефицитом понижена относительно группы с физиологической нормой. Содержание CD25+-лимфоцитов в группе с иммунодефицитом снижено на 61,3 %, концентрация CD71+-лимфоцитов снижена на 53,5 %, содержание HLA DR+-лимфоцитов понижено на 48,7 %.

Концентрация В-лимфоцитов (CD22+) относительно группы с нормой снижена в группе с иммунодефицитом на 61,7 %, в то время как содержание лимфоцитов с маркером CD95+ уменьшено на 45,2 %.

В результате установлено (табл. 2), что изменение содержания витаминов (А, Е, В₆) в сыворотке у людей в группе с дефицитом и нормой иммунных показателей изменяется незначительно, а достоверное увеличе-

Таблица 1. Влияние высокомолекулярной фракции сульфатированного полисахарида на рецепторную активность лимфоцитов

Показатель	Группа с физиол. нормой	Группа с дефицитом	30 мин с нагрузкой группы с дефицитом	30 мин с нагрузкой и В ₁ у группы с дефицитом	30 мин с нагрузкой и В ₂ у группы с дефицитом	30 мин с нагрузкой и В ₆ у группы с дефицитом	30 мин с нагрузкой и А у группы с дефицитом	30 мин с нагрузкой и Е у группы с дефицитом
CD3+ · 10 ⁹ кл/л	1,05 ± 0,04	0,78 ± 0,18	0,95 ± 0,18	1,09 ± 0,15*	0,97 ± 0,17	0,94 ± 0,18	0,96 ± 0,16	0,95 ± 0,16
CD4+ · 10 ⁹ кл/л	0,62 ± 0,07	0,34 ± 0,14	0,55 ± 0,15	0,61 ± 0,14*	0,49 ± 0,13	0,54 ± 0,18	0,49 ± 0,12	0,51 ± 0,16
CD5+ · 10 ⁹ кл/л	1,49 ± 0,06	0,98 ± 0,19	1,02 ± 0,19	1,03 ± 0,13	1,01 ± 0,17	0,99 ± 0,15	0,98 ± 0,14	0,99 ± 0,15
CD8+ · 10 ⁹ кл/л	0,43 ± 0,05	0,23 ± 0,14	0,54 ± 0,15	0,59 ± 0,11*	0,52 ± 0,14	0,51 ± 0,13	0,52 ± 0,11	0,50 ± 0,14
CD16+ · 10 ⁹ кл/л	0,65 ± 0,06	0,22 ± 0,13	0,53 ± 0,16	0,57 ± 0,12*	0,49 ± 0,12	0,49 ± 0,14	0,51 ± 0,16	0,50 ± 0,12
CD22+ · 10 ⁹ кл/л	0,67 ± 0,07	0,22 ± 0,15	0,39 ± 0,09	0,37 ± 0,11	0,36 ± 0,13	0,36 ± 0,12	0,39 ± 0,14	0,36 ± 0,15
CD25+ · 10 ⁹ кл/л	0,53 ± 0,05	0,21 ± 0,15	0,44 ± 0,11	0,51 ± 0,10*	0,41 ± 0,13	0,42 ± 0,11	0,43 ± 0,11	0,42 ± 0,13
CD71+ · 10 ⁹ кл/л	0,56 ± 0,07	0,26 ± 0,14	0,44 ± 0,15	0,49 ± 0,15*	0,42 ± 0,14	0,38 ± 0,12	0,38 ± 0,11	0,42 ± 0,11
HLA DR+ · 10 ⁹ кл/л	0,41 ± 0,04	0,21 ± 0,14	0,40 ± 0,11	0,42 ± 0,11	0,42 ± 0,15	0,40 ± 0,11	0,40 ± 0,14	0,39 ± 0,14
CD95+ · 10 ⁹ кл/л	0,53 ± 0,04	0,29 ± 0,16	0,53 ± 0,13	0,57 ± 0,13*	0,49 ± 0,14	0,54 ± 0,13	0,51 ± 0,12	0,50 ± 0,11

Примечание. * — достоверные различия по сравнению с 30 минутным культивированием полисахарида со средой содержащей витамины относительно 30 минутной нагрузкой без добавления витаминов в среду культивирования $p \leq 0,05$

ние выявляется в группе с нормой в отношении содержания в сыворотке витамина В₂ и В₁ [12]. Концентрация витамина В₂ в сыворотке крови у людей с дефицитом снижена на 23,7 %, а тиамин на 12,6 % относительно группы с нормой иммунитета.

Изменение внутриклеточных витаминов в группах характеризовалось достоверным снижением содержания витаминов А, Е, В₂ и В₆ в группе с физиологическими значениями клеточного иммунитета (табл. 2). Концентрация витамина А была снижена в группе с нормой относительно группы с дефицитом на 23,9 %, витамина Е на 16,8 %, рибофлавина на 47,3 % и В₆ на 24,3 %. Обращает на себя тот факт, что концентрация тиамин находится на повышенном уровне в группе с физиологической нормой относительно группы с дефицитом на 27,9 %. На основании этого можно предположить, что у жителей города Архангельска с дефицитом клеточного иммунитета выявляются повышенные уровни внутриклеточных витаминов А, Е, В₂ и В₆ вследствие снижения биологических процессов в лимфоцитах, в то время как внутриклеточный витамин В₁, возможно, указывает на физиологическое состояние клеточного иммунитета.

Для подтверждения повышенного содержания витаминов А, Е, В₂ и В₆ в лимфоцитах у группы с дефицитом иммунитета были проведены нагрузочные тесты с использованием среды с содержанием витаминов А, Е, В₁, В₂, В₆ с концентрацией нижней физиологической нормы содержания витаминов в сыворотке крови и нагрузкой сульфатированным полисахаридом ламинарии с молекулярной массой 68 кД [12].

На основании полученных данных (табл. 1) достоверные изменения выявлены при двойном культивировании лимфоцитов в среде 199, содержащей тиамин и сульфатированный полисахарид. При этом установлено увеличение концентрации популяций лимфоцитов через 30 мин культивирования относительно группы без добавления в среду витаминов. Содержание лимфоцитов CD3⁺ повысилось на 12,8 %. Концентрация дифференцированных лимфоцитов увеличилась: содержание CD4⁺ на 9,8 %, цитотоксических лимфоцитов CD8⁺ на 8,4 % и CD16⁺ на 7,1 %. В то же время

содержание активированных лимфоцитов увеличивалось под влиянием витамина В₁: CD25⁺ — на 13,7 %, CD71⁺ на 10,2 % и на CD95⁺ 7,1 %. Концентрация CD5⁺, CD22⁺ и HLA DR⁺ через 30 мин культивирования не изменилась.

Культивирование лимфоцитов с выявленным лабораторно иммунодефицитом в присутствии витаминов А, Е, В₂, В₆ достоверных изменений в популяционном составе не выявило (табл. 1).

Снижение концентрации внутриклеточных витаминов выявлено в группе с иммунодефицитом при нагрузке исследуемой фракцией полисахарида (табл. 2). Так, содержание витамина А снизилось при нагрузочном культивировании с исследуемым полисахаридом на 10,3 %, витамина Е — на 20,2 %, витамина В₂ — на 31,5 %, витамина В₆ — на 8,1 %.

Таким образом, содержание витаминов А, Е и В₆ в сыворотке крови не влияет на активность клеточных реакций в иммунной системе, а повышение концентрации витаминов В₂ и В₁, возможно, может говорить о физиологическом состоянии иммунитета.

Накопление внутриклеточных витаминов А, Е, С, В₂ и В₆ в лимфоцитах в группе с иммунодефицитом вероятнее всего связано с тем, что витамины являются биологическими катализаторами физиологических и биохимических процессов в клетке и для поддержания клеточного иммунитета необходимо использование витаминов для ускорения биохимических реакций клетки.

Доказательством накопления витаминов в группе с иммунодефицитом является моделирование процесса иммунного воздействия при культивировании лимфоцитов с полисахаридом *in vitro*. По данным нагрузки в группе с дефицитом установлено увеличение концентрации CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD25⁺, CD71⁺, CD95⁺, HLA DR⁺ через 30 мин культивирования. В то же время показано снижение концентрации внутриклеточных витаминов А, Е, В₂ и В₆ в группе с иммунодефицитом через 30 мин культивирования. На основании этого можно предположить, что состояние иммунодефицита вызывает накопление внутриклеточных витаминов у жителей на Европейском севере и для

Таблица 2. Распределение витаминов в сыворотке и лимфоцитах относительно групп с физиологической нормой и дефицитом клеточного иммунитета

Показатель	Группа с физиол. нормой		Группа с дефицитом		30 минут культивирования
	Сыворотке/100 мл	лимфоциты $3,5 \cdot 10^9 \cdot 100$ кл	Сыворотке/100 мл	лимфоциты $3,5 \cdot 10^9 \cdot 100$ кл	лимфоциты $3,5 \cdot 10^9 \cdot 100$ кл
Витамин А, мкг	37,05 ± 5,51	31,53 ± 4,05*	36,69 ± 4,12	41,47 ± 5,08	37,17 ± 4,05*
Витамин Е, мг	1,06 ± 0,34	0,74 ± 0,17*	0,65 ± 0,07	0,89 ± 0,16	0,71 ± 0,06*
Витамин В ₂ , мкг	9,92 ± 1,12	0,10 ± 0,05*	7,56 ± 0,11	0,19 ± 0,04	0,13 ± 0,03*
Витамин В ₁ , мкг	0,412 ± 0,09	0,43 ± 0,06*	0,36 ± 0,08	0,31 ± 0,07	0,39 ± 0,04*
	/мл	/3,5 · 10 ⁹ кл	/мл	/3,5 · 10 ⁹ кл	/3,5 · 10 ⁹ кл
Витамин В ₆ , нг	3,57 ± 0,22	0,28 ± 0,05*	3,62 ± 0,21	0,37 ± 0,06	0,34 ± 0,05*

Примечание: * — достоверные различия по сравнению с группой дефицита $p \leq 0,05$.

поддержания клеточного иммунитета, в группе физиологической нормой, часть витаминов переходят в коферментные формы и запускают биохимические реакции клетки.

Витамин В₁ при нагрузочном культивировании непосредственно влияет на активность иммунитета, в то же время не выявлено воздействия витаминов А, Е, В₂ и В₆ на способность активировать клеточный иммунитет.

Особенно обращает на себя внимание тот факт, что выявляется повышение концентрации внутриклеточного тиамин в лимфоцитах в группе с физиологической нормой иммунитета. На основании этого можно предположить, что концентрация витамина В₁ в лимфоцитах выше $0,38 \text{ мкг}/3,5 \cdot 10^9 \cdot 100 \text{ кл}$ служит показателем активности клеточного иммунитета.

В соответствии с полученными данными при использовании иммуномодуляторов у людей с выявленным и доказанным лабораторно иммунодефицитом следует ввести в схему лечения витамин В₁ для более эффективного иммунного ответа. Целесообразно повысить содержание и других витаминов до физиологического уровня в биологических средах организма.

ВЫВОДЫ

1. Содержание витаминов А, Е, В₆ в сыворотке крови не влияет на активность клеточного иммунитета.

2. У лиц с дефицитом клеточного иммунитета содержание витаминов А, Е, В₂ и В₆ выше относительно группы с физиологическими значениями иммунитета.

3. Нагрузочное культивирование лимфоцитов с лабораторно выявленным иммунодефицитом при нагрузочном воздействии на клетки полисахаридом и витаминами А, Е, В₂ и В₆ после 30-минутной культивации концентрация витаминов в лимфоцитах снижается. Это доказывает, что для адекватного состояния кле-

точного иммунитета необходимо расходование витаминов.

4. Увеличение концентрации витамина В₁ до физиологических значений в сыворотке и лимфоцитах даёт основание судить о физиологическом состоянии клеточного иммунитета.

5. Витамин В₁ необходимо назначать при лечении иммунодефицитов, особенно во время назначения иммуномодуляторов, для более эффективного иммунного ответа.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Кудрин, А. В. Скальный, А. А. Жаворонков и др., *Имунофармакология микроэлементов*, Изд-во КМК, Москва (2000).
2. А. А. Ярилин, *Основы иммунологии*, Медицина, Москва (1999).
3. А. М. Петрунькина, *Практическая биохимия*, Гос. изд-во мед. литературы МЕДГИЗ Ленинградское отделение, (1961).
4. В. Г. Кукес, В. А. Тутелян, *Витамины и микроэлементы в клинической фармакологии*, "Палей", Москва (2001).
5. Г. И. Козинец, *Физиологические системы организма человека*, основные показатели, "Триада-Х", Москва (2000).
6. Дж Клауса, *Лимфоциты: Методы*, Мир, Москва (1990).
7. Е. В. Ших, *Русский медицинский журнал*, № 21, 11 – 14 (2004).
8. И. Я. Конь, Н. М. Шилина, *Лечащий врач*, № 7, 64 – 72 (2005).
9. Л. К. Добродеева, Л. В. Сенькова, Н. Б. Московская, *Тр. Коми науч. центра УрО РАН*, № 152, 97 – 116 (1997).
10. О. А. Вржесинская, В. М. Коденцова, В. В. Рисник и др., *Вопр. питания*, № 4, 67 – 72 (1991).
11. Р. Ч. Черняускене, З. З. Варшкявичене, П. С. Грибаускас, *Лаб. дело*, № 6, 362 – 365 (1984).
12. Ф. И. Комаров, Б. Ф. Коровкин, *Биохимические показатели в клинике внутренних болезней: Справочник*, МЕДпресс-информ, Москва (2006).

Поступила 08.12.10

EFFECT OF SOME VITAMINS ON ACTIVITY OF IMMUNOCOMPETENT CELLS

D. V. Nezgovorov

Northern State Medical University, pr. Troitskii 51, Arkhangelsk, 163000, Russia

The content of vitamins А, Е, В₁, В₂, В₆ in lymphocytes and serum of blood was studied with simultaneous determination of CD3+, CD5+, CD4+, CD8+, CD16+, CD25+, CD71+, CD95+, and HLADR+ populations. According to cellular immunity response, patients were divided into two groups – with physiological norm and deficiency. It was established that, irrespective of the group, the content of vitamins А, Е, В₆ in blood serum does not change, while the concentration of В₁ and В₂ in the group with physiological norm is greater than that in the group with deficiency. In the group with deficiency of cellular immunity, increased level of endocellular vitamins А, Е, В₂ and В₆ was revealed. Concentration of thiamine in both blood serum and lymphocytes in the group with physiological norm was greater than in the group with deficiency of cellular immunity.

Key words: Vitamins, cells, lymphocytes, polysaccharides