

Количественная оценка антиген-специфических клеток в крови человека после ритмических холодовых воздействий

UDC 612.11.014.43.017

V.G. BABIICHUK

Quantitative Estimation of Antigen-Specific Cells in Human Blood After Rhythmic Cold Effect

В крови мужчин 50–60 лет проведено иммунофенотипирование лимфоцитов крови, определено содержание специфических групп с помощью экспрессирующих фенотипических маркеров на проточном цитофлюориметре после РХВ. Показано, что клетки адаптивного иммунитета обладают уникальными характеристиками благодаря расположенным на их поверхности узкоспециализированным рецепторам. Установлено, что 9 сеансов РХВ существенно улучшают функцию иммунной системы, что способствует усилению адаптации организма к действию неблагоприятных факторов.

Ключевые слова: ритмические холодовые воздействия, клеточное и гуморальное звено иммунной системы, фенотипические маркеры, лейкоциты.

У крові чоловіків 50–60 років проведено імунофенотипування лімфоцитів крові, аналіз вмісту специфічних груп за допомогою експресуючих фенотипових маркерів на проточному цитофлюориметрі після РХВ. Показано, що клітини адаптивного імунітету мають унікальні характеристики завдяки розміщенню на їх поверхні вузькоспеціалізованих рецепторів. Встановлено, що 9 сеансів РХВ значно покращують функцію імунної системи, що підвищує адаптацію організму до дії несприятливих факторів.

Ключові слова: ритмічні холодові впливи, клітинне і гуморальне кільце імунної системи, фенотипові маркери, лейкоцити.

There was performed an immune phenotyping of blood lymphocytes in 50–60 years' men blood, the content of specific groups was determined with expressing phenotypic markers using flow cytometer after rhythmic cold effects. Cells of adaptive immunity were shown to have the unique characteristics due to the single-functioned receptors, locating on their surface. Nine RCE sessions were established to significantly improve the immune system function, contribute to strengthening of organism's adaptation to the effect of unfavourable factors.

Key-words: rhythmic cold effects, cell and humoral link of immune system, phenotypic markers, leukocytes.

Очень трудно переоценить роль иммунной системы в проблеме долголетия, качества жизни и здоровья человека. Эта система обеспечивает раннюю и надежную защиту от действия болезнетворных агентов внешней среды за счет включения полноценных механизмов защиты против возбудителя [1, 8]. Очевидно, для функционирования иммунной системы необходимы выработанные в ходе эволюции многообразные факторы иммунной защиты, которые действуют в антагонизме или синергизме с возбудителем, обеспечивая или его элиминацию, или “мирное” сосуществование [4]. Причем “стратегия” возбудителя в организме хозяина играет важную роль в развитии болезни, так как может приобретать форму “тайного присутствия”. В этом случае патоген не распознается иммунной системой, а в более агрессивной форме он повреждает механизмы иммунной защиты или использует их в своих интересах [9].

Функция иммунной системы, как и других жизненно важных систем, подвержена динамическим изменениям. Старение организма, как правило,

The role of immune system in such problems as longevity, life quality and human health is very difficult to be overestimated. This system provides an early and reliable protection against the effect of environmental pathogens due to triggering integral protective mechanisms against pathogen [1, 8]. Obviously, the variety of immune protection factors, formed during evolution, being in antagonism or synergism with antigen, providing either its elimination or “peaceful” coexistence, are necessary for immune system functioning [4]. Moreover the antigen “strategy” in host organism plays an important role in disease development, because of possibility to get a “hidden presence” form. In this case the immune system does not recognise pathogen, but in more aggressive way it either damages the mechanisms of immune protection or uses them for its purposes [9].

The function of immune system, as another vital systems, is subjected to dynamic changes. The organism ageing is generally accompanied by a decrease in the efficiency of its activity, resulting in an increase in risk of disease occurrence. Changes in functioning

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Адрес для корреспонденции: ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-38-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3807, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

сопровождается снижением эффективности ее деятельности, в результате чего повышается риск возникновения заболеваний. Установлено, что изменения в функционировании иммунной системы у людей старшего возраста являются одной из основных причин старения, причем врожденный иммунитет страдает в меньшей степени, чем адаптивный. Очевидно, при возрастных изменениях развивается процесс сбалансированного иммунодефицита, при котором нарушается функция различных звеньев иммунной системы. Следовательно, проблема продления жизни человека тесно связана с состоянием иммунного статуса, поиском эффективной терапии, которая способствовала бы коррекции нарушений как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Можно предположить, что для отсрочки старения необходимо найти способ повышения активности ослабленных функций иммунитета.

Экстремальная криотерапия может использоваться как средство медицинской реабилитации после многих заболеваний. Особенно эффективными в этом отношении являются ритмические холодовые воздействия (РХВ). Экстремальные температуры (-120°C) улучшают обменные процессы и вегетативные функции, стимулируют иммунитет, что очень важно для лиц пожилого возраста [2].

Успешно применяется общее охлаждение организма человека при различных заболеваниях, в том числе в основе которых лежат нарушения функции иммунной системы.

В доступной литературе системные исследования состояния иммунной системы после действия на организм низких температур отсутствуют.

Цель работы – исследовать влияние РХВ на количественные характеристики популяций лимфоцитов в крови людей.

Материалы и методы

Обследованы 10 пациентов-добровольцев 50–60-летнего возраста, в анамнезе которых отсутствовали противопоказания к применению РХВ.

Охлаждение пациентов проводили в криокамере производства ОАО “Холод” (Киев) при рабочей температуре -115°C . Перед и после процедуры пациентам измеряли пульс, артериальное давление, частоту дыхания, температуру тела, записывали электрокардиограмму. Все пациенты получали 9 процедур по методике [2].

В качестве показателей нормы принимали показатели иммунитета здоровых 25–35-летних добровольцев.

Для иммунофенотипирования лимфоцитов при определении содержания специфических групп этих клеток использовали экспрессирующие фено-

of immune system in aged people were established to be one of the main causes of ageing, moreover a congenital immunity suffers less, than an adaptive one. Evidently, under age changes the process of a balanced immune deficiency is in progress, when the function of different immune system links is damaged. Consequently, the problem of human life prolongation is tightly related to the state of immune status, search for an efficient therapy, which might contribute to correct disorders in both congenital and adaptive immunities. We may suggest, that in order to postpone ageing it is necessary to find out the way to increase the activity of weakened immune functions.

An extreme cryotherapy may be used as the mean of medical rehabilitation after many diseases. In this regard of especial efficiency are the rhythmic cold effects (RCE). Extreme temperatures (-120°C) improve metabolic processes and vegetative functions, stimulate the immunity, that is very important for aged persons [2].

General cooling of human organism is successfully applied for various diseases, including those based on disorders in immune system functioning.

In available literature there are no system researches of immune system state after low temperature effect on organism.

The research was aimed to study the RCE effect on quantitative characteristics of lymphocyte populations in human blood.

Materials and methods

There were examined 10 patients-volunteers of 50–60 years old with no contraindications in anamnesis for RCE application.

Patients were cooled down in cryochamber (“Kholod” JSC, Kiev) at -115°C operative temperature. Prior to and after the procedure for patients we measured the pulse, arterial pressure, respiratory frequency, body temperature, the electrocardiogram was recorded. Patients received 9 sessions according to the methods reported [2].

As the norm indices there were admitted those of immunity of healthy volunteers of 25–35 years old.

For lymphocyte immune phenotyping, when determining the content of specific groups of these cells, we used the expressing phenotype markers. Stained cells were analysed with flow cytometer FACS Calibur (BD Biosciences, USA) using CellQuest Pro software (BD Biosciences, USA).

Results were statistically processed with the Student-Fisher method.

Results and discussion

In aged people there is a change in thymus-dependent link of immune system and, particularly, population of developing T-cells, accomplishing some key functions during immune response. As cells of

типические маркеры. Окрашенные клетки анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Calibur (BD Biosciences, США) с использованием программного обеспечения CellQuest Pro (BD Biosciences, США).

Для статистической обработки результатов использовали метод Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

У людей преклонного возраста изменяется тимусзависимое звено иммунной системы и, в частности популяция развивающихся Т-клеток, выполняющих ряд ключевых функций при иммунном ответе. Как клетки адаптивного иммунитета лимфоциты характеризуются наличием на их поверхности узкоспециализированных рецепторов, позволяющих каждой отдельной клетке реагировать на антиген, способностью рециркуляции из тканей в кровотоки, длительной продолжительностью жизни, что является основой иммунной памяти и специфичности.

В процессе старения численность клеток иммунной системы может не изменяться, тогда как их функциональная активность снижается, что в значительной степени является результатом недостаточности функции Т-лимфоцитов.

Как известно [5], в тимусе Т-лимфоциты проходят ряд последовательных стадий, в процессе которых формируются Т-клеточные рецепторы, предназначенные для распознавания антигена, в том числе образуются Т-хелперы (CD4⁺-клетки) и цитотоксические клетки (CD8⁺-клетки).

Наличие CD4⁺-клеток в составе Т-лимфоцитов – один из важнейших механизмов защиты, так как CD4⁺ – Т-хелперы стимулируют продукцию антител В-лимфоцитами, а также активируют CD8⁺-клетки.

CD4-рецептор представляет собой трансмембранный гликопротеин, который экспрессирован на Т-лимфоцитах. Основное назначение CD4⁺-лимфоцитов – активация индукции и “помощи” в синтезе иммуноглобулинов В-клетками. Выявлено достоверное снижение содержания CD4⁺-клеток в крови наблюдаемых пациентов по сравнению с нормой (рис. 1). После 9 процедур РХВ по описанной методике общее количество CD4⁺-клеток в крови пациентов существенно увеличивается и соответствует показателям нормы, характерным для людей репродуктивного возраста.

Возможно, снижение численности CD4⁺ – Т-лимфоцитов, мигрирующих из тимуса, сопровождается уменьшением количества специфических рецепторов, результатом чего могут быть нарушения его функции.

CD8-рецептор экспрессируется на субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, которые часто

adaptive immunity, lymphocytes are characterised by the presence of single-functioned receptors on their surface, enabling each cell to respond to an antigen, by the capability of recirculation from tissue into blood flow, a long-term life duration, that is the base for immune memory and specificity.

During ageing the number of immune system cells may vary, meanwhile their functional activity reduces, that is mostly the result of T-lymphocyte function failure.

As known [5], T-lymphocytes in thymus come through some consequent stages, during which there are formed T-cell receptors, designated to recognise the antigen, as well as T-helpers (CD4⁺) and cytotoxic cells (CD8⁺).

CD4⁺ T-cell presence as part of T-lymphocytes is one of the most important protective mechanisms, since CD4⁺ T-helpers stimulate antibody production by B-lymphocytes and activate CD8⁺ as well.

CD4-receptor represents a transmembrane glycoprotein, expressing on T-lymphocytes. The main mission of CD4⁺ lymphocytes is the induction activation and “helping” in immunoglobulin synthesis by B-cells. There was revealed a statistically significant decrease in CD4⁺ cell content in blood of observed patients compared to the norm (Fig. 1). After 9 RCE sessions by the described technique, the total number of CD4⁺ cells in patients’ blood considerably augments and corresponds to the normal indices, typical for people of reproductive age.

A decrease in the number of CD4⁺ T-lymphocytes, migrating from thymus, is possibly accompanied by the reduction of a number of specific receptors, resulting in disorders of its function.

CD8-receptor is expressed on the subpopulation of cytotoxic T-lymphocytes, which frequently co-express CD4-receptor and represents a disulfide bound dimer. Antigen-specific CD8⁺ cells play an important role in immune suppression and destroying different viral infections as well [11, 12]. A part of CD8⁺-cells is the pool of “naive” T-lymphocytes, entering blood and peripheral lymphoid organs from thymus.

Of note is also the fact, that after final differentiation T-cells, carrying CD4 and T-cytotoxic lymphocytes (CD8⁺), form the memory cell subpopulation (CD45RO⁺). A decrease in the content of CD4⁺ at the background of CD8⁺ cell content rise is a bad prognostic sign in old people (80–90 years old), because it characterises the complex of changes in immune system.

The Fig. 2 shows no observed statistically significant changes of CD8⁺ cell content in blood, but there was traced the dynamics of their decrease in respect to the control.

In the experiments (Fig. 3) the ratio of CD4⁺ to CD8⁺ cell content remained statistically and signifi-

коэкспрессируют CD4-рецептор и представляет собой дисульфидно связанный димер. Антиген-специфические CD8⁺-клетки играют важную роль в иммуносупрессии и в уничтожении различных вирусных инфекций [11, 12]. Некоторая часть CD8⁺-клеток представляет пул “наивных” Т-лимфоцитов, которые поступают в кровь и периферические лимфоидные органы из тимуса.

Следует также отметить, что после окончательной дифференцировки Т-клетки, несущие CD4 и Т-цитотоксические лимфоциты (CD8⁺), формируют субпопуляцию клеток памяти (CD45RO⁺). Снижение содержания CD4⁺- на фоне повышения уровня CD8⁺-клеток является плохим прогностическим признаком у людей 80–90 лет, так как характеризует комплекс изменений иммунной системы.

Как видно из рис. 2, достоверных изменений в крови содержания CD8⁺-клеток не наблюдалось, однако прослеживалась динамика их уменьшения по отношению к норме.

В экспериментах (рис. 3) отношение содержания CD4⁺-клеток к CD8⁺-клеткам достоверно не изменялось по отношению к норме, однако существенно повышалась после 9 сеансов РХВ, что можно рассматривать как компенсаторную реакцию на возможное ослабление Т-лимфопоэза в тимусе, так как активация CD4⁺- и CD8⁺-клеток с возрастом подавляется.

Ослабление функциональной способности Т-клеток в процессе старения возможно связано с изменением молекулярных механизмов запуска активационных сигналов, процессов фосфорилирования, нарушением секреции интерлейкинов, ослаблением формирования транскрипционных белков, что создает условия для снижения активации Т-клеток. Эти изменения в “наивных” клетках выражены сильнее, чем в клетках памяти, в CD4⁺-клетках сильнее, чем в CD8⁺-клетках.

Очевидно, РХВ могут быть фактором, приводящим к активации угасающего в старости иммуногенеза, сопровождающегося выраженной компенсацией, в большей степени характерной для молодого организма.

Одним из наиболее общих (интегральных) маркеров Т-лимфоцитов является CD3, который представляет собой комплекс полипептидных цепей, включающий Т-клеточный рецептор, который присутствует на зрелых клетках. Одно из свойств CD3⁺-клеток – активация других субпопуляций Т-лимфоцитов. В процессе старения человека количество “наивных” (CD3⁺CD45RA⁺), не успевших проконтактировать с антигеном Т-лимфоцитов, снижается значительно быстрее, чем Т-клеток памяти (CD3⁺CD45RO⁺), которые с возрастом практически не меняются за счет повторных контактов с антигенами. Подобными свойст-

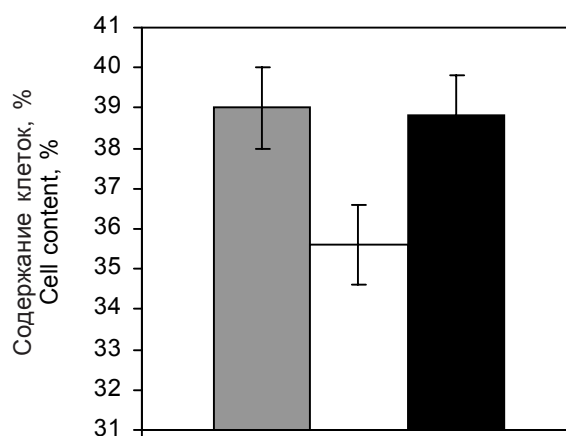


Рис. 1. Популяция CD4⁺-лимфоцитов в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 1. CD4⁺ cell population in blood: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

cantly unchanged in respect of the norm, but significantly increased after 9 RCE sessions, that might be envisaged as a compensatory response to a possible weakening of T-lymphopoiesis in thymus, since the activation of CD4⁺ and CD8⁺ cells is suppressed with age.

Weakening of T-cell functional capability during ageing is possibly associated to a change in molecular mechanisms of triggering of activation signals, phosphorylation processes, disorder of interleukine secretion, weakening of transcription protein formation, that creates the conditions for T-cell activation decrease. These changes are more pronounced in the “naive” and in CD4⁺ cells, than in memory and CD8⁺ ones, correspondingly.

Obviously, RCE may be the factor, resulting in the activation of immunogenesis, declining in old age, accompanied with a manifested compensation, mostly typical for young organism.

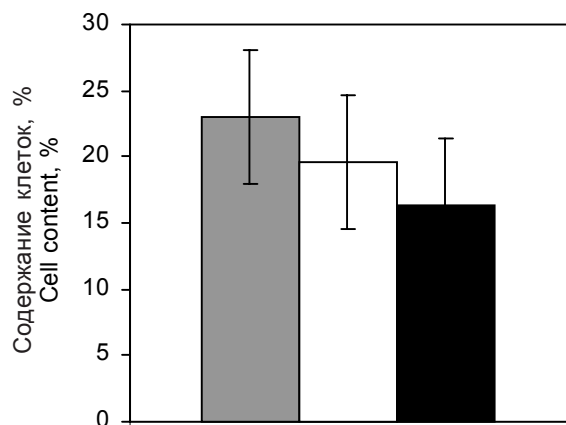


Рис. 2. Популяция CD8⁺-лимфоцитов в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 2. CD8⁺ cell population in blood: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

вами обладают клетки, содержащие CD5-рецептор, который присутствует на зрелых Т-лимфоцитах (их основная функция костимуляция и активация тимоцитов), а также на мембране зрелых В-клеток. Мембранные антигены CD3 и CD5 являются одним из наиболее ранних Т-клеточных маркеров, дифференцировка которых осуществляется в костном мозге.

Представленные на рис. 4 данные свидетельствуют о снижении содержания CD3⁺-клеток у наблюдаемых пациентов по отношению к норме и увеличении их фенотипа после 9 сеансов криотерапии. Такая же тенденция (рис. 5) была характерна для интерпретации функциональных свойств клеток CD5⁺, хотя изменения в данном случае были статистически недостоверными.

На ранней стадии дифференцировки В-лимфоцитов происходит начальный этап перестройки генов иммуноглобулинов с появлением на мембране CD19-рецепторов, что необходимо для формирования специфических рецепторов-иммуноглобулинов для избирательной экспрессии мембранных и цитоплазматических маркеров. Эти процессы осуществляются в костном мозге, в котором В-лимфоциты проходят этап антигеннезависимой дифференцировки.

CD19 является общим маркером для всех В-лимфоцитов, так как не экспрессируется на клетках других типов и участвует в активации клеток (рис. 6). Присутствие на мембране CD19-маркера соответствует зрелому В-лимфоциту, после чего клетка приобретает способность взаимодействовать с антигеном. После этого В-клетка покидает костный мозг и приобретает свойства периферических В-клеток, основной функцией которых является реализация гуморально-иммунного ответа. При иммунном ответе антитела нейтрализуют свободные антигены, образуя иммунные комплексы, активируют комплемент с помощью сывороточного фактора опсонина (иммуноглобулин G), обладающего свойствами соединяться с попавшими в организм человека бактериями, повышать их восприимчивость к действию фагоцитов и естественных киллеров, которые их уничтожают.

У наблюдаемых пациентов содержание CD19⁺-клеток было значительно ниже, чем в норме, что является основанием для предположения снижения его содержания с возрастом. Очевидно, РХВ не приводили к существенным изменениям содержания CD19⁺-клеток в крови.

Экспрессия CD72 также характерна для идентификации клеток, содержание которых в крови наблюдаемых пациентов было ниже, чем в норме, но не изменялось после проведенной экстремальной криотерапии (рис. 7).

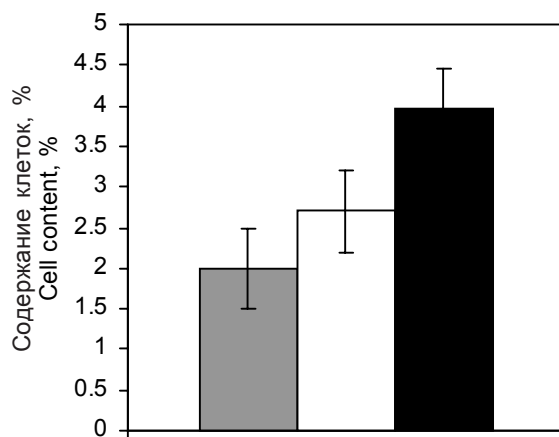


Рис. 3. Популяция CD4⁺/CD8⁺-лимфоцитов в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 3. CD4⁺/CD8⁺ cell population in blood: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

One of the most common markers of T-lymphocytes is CD3, representing the complex of polypeptides chains, including T-cell receptor, being present on mature cells. One of CD3⁺ cell effect is activation of other T-lymphocyte subpopulations. During ageing the number of “naive” (CD3⁺ CD45RA⁺) T-lymphocytes, failed to contact with antigen, reduces much more rapidly, than memory T-cells (CD3⁺CD45RO⁺), not practically changed with age due to the repeated contacts with antigens. The similar properties are intrinsic to cells comprising CD5 receptor, being present on mature T-lymphocytes (their principal function is thymocyte co-stimulation and activation), as well as on mature B-cell membrane. CD3 and CD5 membrane antigens are one of the earliest T-cell markers, which differentiation is realised in bone marrow.

The data presented in Fig. 4 testify to a decrease in CD3⁺ cell content in the examined patients in respect of the norm and an increase in their phenotype after 9 cryotherapeutic sessions. The same tendency (Fig. 5) was typical for interpreting functional properties of CD5⁺ cells, though the changes in this case were not statistically significant.

At an early stage of B-lymphocyte differentiation, there is occurred an initial stage of immunoglobulin gene rearrangement with the CD19 receptor appearance on membrane, that is necessary to form specific receptor immunoglobulins for a selective expression of membrane and cytoplasmic markers. These processes occur in bone marrow, where B-lymphocytes come through the stage of antigen-dependent differentiation.

The CD19 is the common marker for all B-lymphocytes, because of not expressing on cells of other types and participating in cell activation (Fig. 6). The presence of CD19 marker on a membrane corresponds to the mature B-lymphocyte, after that a cell gets the

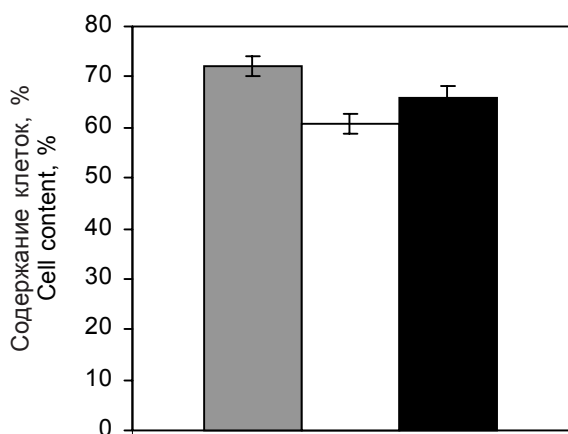


Рис. 4. Популяция CD3⁺-лимфоцитов в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 4. CD3⁺ cell population in blood: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

Активность клеток – натуральных киллеров (НК) у людей снижается с возрастом. У пожилых людей в ответ на внешний стимул образовывается гораздо меньшее количество этих клеток (рис. 8).

В периферической крови НК-клетки составляют от 5 до 25% лимфоцитов и оказывают цитотоксическое действие на инфицированные вирусом клетки, они лишены маркеров Т- и В-клеток. Цитоплазма этих клеток содержит перфорин – белок, который способствует образованию пор в мембранах клеток-мишеней, а также ферменты, вызывающие индукцию апоптоза. Таким образом, основной функцией естественных киллеров является выброс сигнальных молекул, включающих апоптоз в клетках-мишенях с последующим контактным цитолизом.

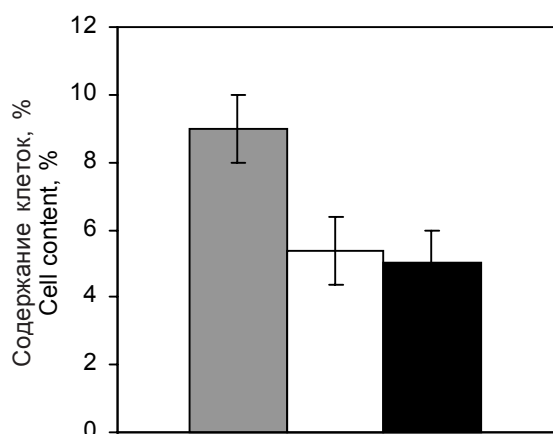


Рис. 6. Популяция CD19⁺-лимфоцитов в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 6. CD19⁺ cell population in blood: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

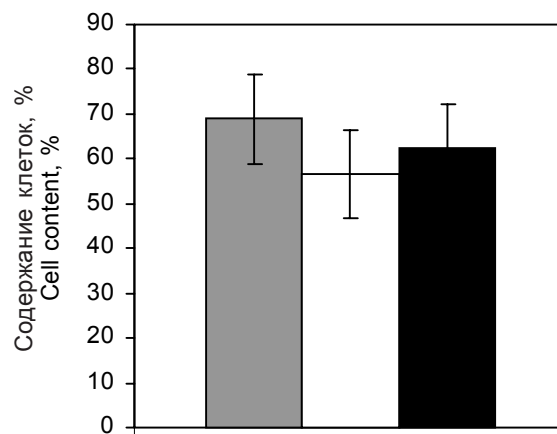


Рис. 5. Популяция CD5⁺-лимфоцитов в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 5. CD5⁺ cell population in blood: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

capability to interact with antigen. Afterwards B-cell leaves bone marrow and acquires properties of peripheral B-cells, which principal function is to realise a humoral-immune response. During immune response the antibodies neutralise free antigens, by forming immune complexes, activate the complement by means of opsonin serum factor (immunoglobulin G), having the property to bind with bacteria, entering human organism, increase their susceptibility to the effect of phagocytes and natural killers, destroying them.

The CD19⁺ cell content was much lower in the examined patients, than in the norm, that enabled suggesting about a decrease in its content with age. Obviously, RCE did not result in significant changes of CD19⁺ cell content in blood serum.

The CD72 expression is typical for identifying cells, which content in blood of the observed patients was lower, than in the norm, but remained unchanged after performed extreme cryotherapy (Fig. 7).

The activity of natural killer (NK) cells in humans reduces with age. Much lower content of these cells is formed as a response to external stimulus in aged people (Fig. 8).

In peripheral blood the NK cells, represent from 5 to 25% lymphocytes and cause a cytotoxic effect on virus infected cells, they are deprived of T- and B-cell markers. Cytoplasm of these cells comprises perforin, protein, furthering the pore formation in cell-target membranes, as well as enzymes, causing apoptosis induction. Thus, the main function of natural killers is a discharge of signal molecules, triggering apoptosis in cell-targets with following contact cytolysis.

In the performed researches there was noted a decrease in NK cell content in respect of the norm, but after cold procedures the dynamics of their content increase is distinctly traced, that might be explained

В проведенных исследованиях было отмечено снижение содержания НК-клеток по отношению к норме, однако после холодových процедур четко прослеживается динамика увеличения их содержания, что можно объяснить как компенсаторную реакцию на ослабление Т-лимфопоэза, направленную на повышение содержания и функциональной активности НК-клеток в динамике старения организма человека (рис. 8).

CD11a экспрессируется на всех типах лейкоцитов, участвует в межклеточной адгезии и костимуляции. Популяция CD11a⁺-клеток практически не изменялась в периферической крови наблюдаемых пациентов, но была достоверно меньше по отношению к норме (рис. 9).

CD11b представляет собой рецептор-адгезин, экспрессирован на гранулоцитах, макрофагах, моноцитах, НК-клетках и является активатором рецептора клеток-киллеров, а также медиатором антителозависимой цитотоксичности, способствует взаимодействию кроветворных клеток с активированным эндотелием сосудов, хемотаксису и фагоцитозу. При атеросклеротических повреждениях сосудов в результате нарушения взаимодействия между эндотелием и лейкоцитами стимулируется синтез цитокинов, адгезионных молекул, что ассоциируется с процессами тромбоза и атерогенеза. В результате экспрессии адгезионных молекул как на лейкоцитах, так и на эндотелии происходят миграция лейкоцитов и их взаимодействие с эндотелием. Под действием цитокинов (IL-8) CD11b способствует пролонгированному контакту лейкоцитов с сосудистым эндотелием.

Как видно из рис.10, РХВ достоверно снижает содержание CD11b⁺-клеток в крови пациентов, что позволяет предположить о благоприятном влиянии холодových процедур на механизм развития атеро-

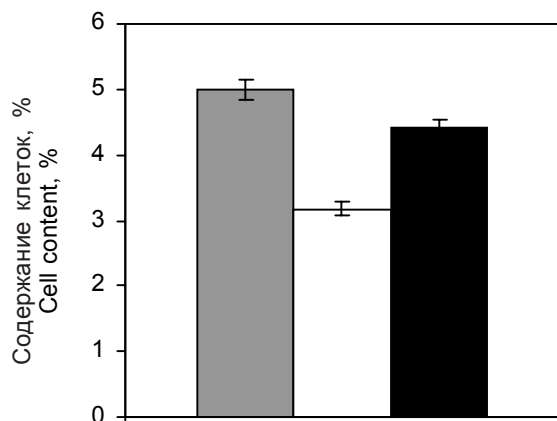


Рис. 8. Популяция НК-клеток в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 8. Population of NK-cells in in blood: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

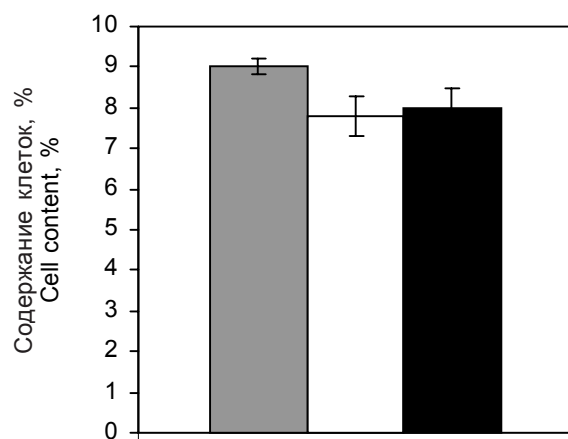


Рис. 7. Популяция CD72⁺-лимфоцитов в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 7. CD72⁺ cell population in blood: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

as a compensatory response to T-lymphopoiesis weakening, directed to an increase in the content and functional activity of NK cells in dynamics of human organism ageing (Fig. 8).

CD11a is expressed on all types of leukocytes, participates in intercellular adhesion and co-stimulation. The population of CD11a⁺ cells remained practically unchanged in peripheral blood of observed patients, and it was statistically and significantly reduced vs. the norm (Fig. 10).

The CD11b is the adhesin receptor, expressing on granulocytes, macrophages, monocytes, NK cells, being the killer cell receptor activator, as well as the mediator of antibody-dependent cytotoxicity, contributes to the interaction of hemopoietic cells with activated endothelium of vessels, chemotaxis and phagocytosis. Under atherosclerotic vascular damages as a result of a disordered interaction between

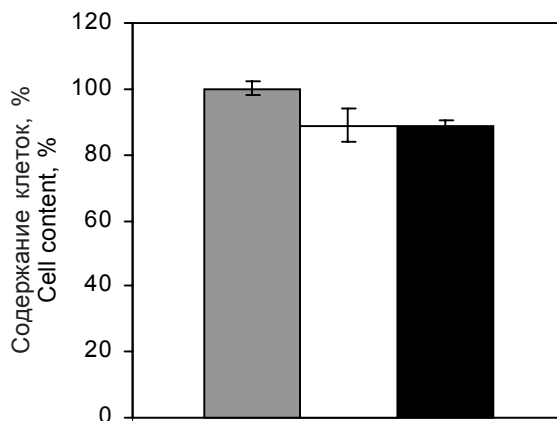


Рис. 9. Популяция CD11a⁺-лимфоцитов в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 9. CD11a⁺ cell population in blood: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

склеротических изменений сосудов у людей пожилого возраста.

Возрастным изменениям в иммунной системе подвержены все ее отделы, однако наиболее глубоким нарушениям – тимусзависимое звено иммунитета. Первичными в этих процессах являются нарушения, затрагивающие строму тимуса, особенно ее эпителиальный компонент. Эти нарушения в процессе старения являются доминирующими в формировании возрастных изменений. Следовательно, “иммунологические часы” в организме человека тесно связаны с тимусом и отражают запрограммированные процессы, имеющие однонаправленный и необратимый характер.

Изучение роли $CD4^+$, $CD8^+$ -клеток в механизмах нарушения клеточного иммунитета имеет чрезвычайно важное значение, так как они служат мишенью для ряда вирусов и, следовательно, являются показателем необходимости иммунокорректирующих воздействий.

Основными клетками-мишенями для многих вирусов, в частности иммунодефицита человека, являются $CD4^+$ – Т-лимфоциты, поддерживающие адаптивный иммунитет [3]. При попадании вирусов в организм их свойства изменяются, что позволяет неопределенно долго избежать уничтожения, а также вызывать глубокую иммуносупрессию, что со временем перерастает в выраженный синдром иммунодефицита с последующей гибелью больного и вируса. Проникновение вируса в клетки происходит посредством связывания молекулы $CD4$. Попадая в Т-лимфоцит через иммунные рецепторы, вирус долгое время находится в латентном периоде, приобретая способность использовать биохимический аппарат Т-лимфоцитов для своего размножения.

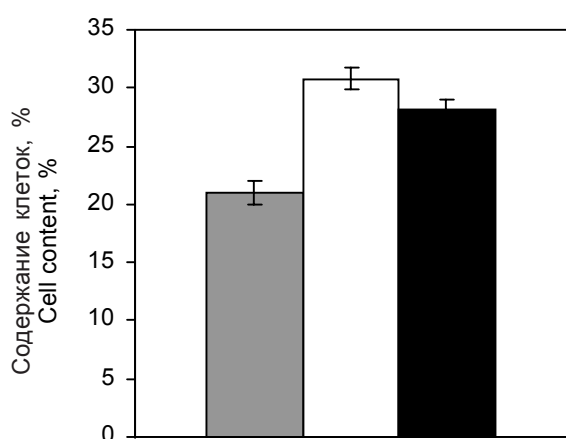


Рис. 10. Популяция $CD11b^+$ -лимфоцитов в крови: ■ – норма; □ – до охлаждения; ■ – после охлаждения.

Fig. 10. $CD11b^+$ population of blood lymphocytes: ■ – norm; □ – before cooling; ■ – after cooling.

endothelium and leukocytes, there is stimulated the synthesis of cytokines, adhesive molecules, associated to thrombosis and atherogenesis processes. As a result of expression of adhesive molecules both on leukocytes and endothelium, the migration of leukocytes and their interaction with endothelium occurred.

The Fig. 10 shows RCE as statistically and significantly reducing the $CD11b^+$ cell content phenotype in patient’s blood, that enables suggesting about a favourable effect of cold procedures on mechanisms of the development of atherosclerotic vascular changes in aged people.

All compartments of immune system are subjected to age changes, but a thymus-dependent immunity link undergoes the deepest ones. The disorders, affecting thymus stroma, especially its epithelial component, are primary in these processes. During ageing these disorders are dominating in age change formation. Consequently, the “immunological clock” in human organism is tightly related to thymus and reflects the programmed processes with one-way and irreversible character.

Studying the role of $CD4^+$ and $CD8^+$ cells in the mechanisms of cell immunity disorder is of great importance, because of serving as a target for some viruses, and, consequently, being the index for need in immune corrections.

The main target cells for many viruses, in particular, human immune deficiency, is $CD4^+$ T-lymphocytes, supporting adaptive immunity [3]. The acquired viral properties enable in organism to indefinitely long avoid its elimination, as well as to cause a deep immune suppression, developing with time in a manifested immune deficiency syndrome with following death of patient and virus. Virus penetration into cells occurs via $CD4$ molecule binding. When coming in T-lymphocyte through the immune receptors, virus is in a long latent period, by acquiring the capability to use biochemical apparatus of T-lymphocytes for its propagation.

The virus gets the properties, preventing its recognition by cytotoxic $CD8^+$ cells, thereby depriving lymphocyte of antigen-specific function and viral infection elimination [11, 12]. At the same time there is a suppression of signal transfer to inhibited receptors of natural killers, being the most important element of congenital cell anti-viral immunity [10], as well as the production of cytokines, necessary for its activation [7]. An increased $CD4^+/CD8^+$ cell ratio in our experiments may be interpreted as a favourable factor, increasing natural and specific immune protections, actively resisting to viral expansion, possibly augmenting the mechanisms of antigen immune recognition, modulating the signal transfer into a cell and activating transcription processes. In addition, we believe, that the activation of adaptive immune mechanisms after RCE is capable to hinder a disorder in intracellular

Вирус приобретает свойства, препятствующие распознаванию его цитоксическими CD8⁺-клетками, таким образом лишая лимфоцит функции антиген-специфичности и устранения вирусной инфекции [11, 12]. При этом подавляется передача сигналов ингибированным рецепторам натуральных киллеров, являющихся важнейшим элементом врожденного клеточного противовирусного иммунитета [10], а также продукции цитокинов, необходимых для их активации [7]. Повышенное соотношение клеток CD4⁺/CD8⁺ в наших экспериментах можно трактовать как благоприятный фактор, который повышает естественную и специфическую иммунную защиту, активно противодействует вирусной экспансии, возможно, повышает механизмы иммунного распознавания антигенов, модулирует передачу сигналов в клетку и активирует процессы транскрипции. Кроме того, активация адаптивных механизмов иммунитета после РХВ, по нашему предположению, способна препятствовать нарушению внутриклеточных биохимических процессов, предотвращать сбои важнейших иммунных функций, в частности апоптоза.

CD3⁺- и CD4⁺-клетки являются необходимым звеном регуляторных Т-клеток, играющих важную роль в иммуносупрессии, и имеют огромное значение при аутоиммунных заболеваниях [6]. Основная функция регуляторных Т-клеток – регулировать клеточный гомеостаз и особенно при воспалении, стрессе, аллергиях, воздействиях окружающей среды. Они отвечают на них изменением экспрессии молекул на мембранах клеток и таким образом включают механизм иммунорегуляции, модулируя экспрессию маркеров клеточной поверхности. Возможно, РХВ способствуют активации регуляторных процессов Т-клетками, влияя на их количественные и качественные характеристики. Это хорошо коррелирует с улучшением нарушенных регуляторных функций вегетативной нервной системы, которые мы наблюдали в экспериментах после 9 сеансов РХВ. Очевидно, иммунная и вегетативная нервная системы после экстремальных криовоздействий способствуют “омоложению” нарушенного гомеостаза организма [2].

При старении организма изменениям подвержено не только клеточное, но и гуморальное звено иммунитета, которое сопряжено с функцией В-лимфоцитов. Дифференцировка последних в плазматические клетки, их накопление определяют защитные индивидуальные свойства организма. Результаты влияния возраста на способность В-лимфоцитов дифференцироваться в плазматические клетки и секретировать антитела в исследованиях имеют противоречивый характер.

В наших экспериментах В-клеточное звено иммунореактивности было подвержено существенным изменениям, о чем свидетельствует содер-

biochemical processes, prevent damages in important immune function, particularly apoptosis.

The CD3⁺ and CD4⁺ cells are the necessary link of regulatory T-cell phenotype, playing an important role in immune suppression, having huge importance at autoimmune diseases [6]. The main function of regulatory T-cells is the cell homeostasis regulation, especially under inflammation, stress, allergies and environmental effects. They respond to them by changing molecule expression on cell membranes, thereby triggering the immune regulation mechanism, via modelling the expression of cell surface markers. Probably, RCE contribute to activating regulatory processes by T-cells, via affecting their quantitative and qualitative characteristics. This correlates well with the improvement of disordered regulatory functions of vegetative nervous system, that we observed in experiments after 9 RCE sessions. Obviously, after extreme cryoeffects the immune and vegetative nervous systems contribute to “rejuvenescence” of organism’s disordered homeostasis [2].

During organism’s ageing not only cell, but humoral immunity link as well, associated to B-lymphocyte function, undergo changes. Differentiation of the latter into plasma cells and their accumulation determine protective individual properties of an organism. The results of age effect on B-lymphocyte capability to differentiate into plasma cells and secrete antibodies are reported contradictory.

In our research a B-cell link of immune reactivity was subjected to significant changes, testified by CD19⁺ and CD72⁺ cell content in patient’s blood. The performed rhythmic cold procedures did not change the direction of reduced humoral immune status in patients.

If analysing the principal function of NK cells, consisting in elimination of damaged or infected cells, we may trace the relationship between their activity and human health state. The NK cells are a non-specific immune link, which activity is directed by IL-12 macrophage secretion.

There is a direct correlation between the NK-cell activity and health state. Consequently, when increasing the NK cell activity, we may significantly strengthen the immunity and improve health in aged people. People with a high NK cell activity have a low risk of cancer disease development.

A decreased number of NK cells may be assumed to express a weak, but satisfactory cytotoxic capability, however a significant reduction of their number in blood of the studied patients should weaken the total resistance of organism to pathogenic penetration, *i. e.* the probability the diseases, accompanying elderly age, is sharply increased.

Nine rhythmic sessions of extreme cryotherapy contributed to a statistically significant increase in NK-cell content in blood of observed patients and significantly approximated their content to the control values.

жание CD19⁺- и CD72⁺-клеток в крови пациентов. Проведенные ритмические холодовые процедуры не изменяли направленности сниженного гуморального иммунного статуса у пациентов.

Анализируя главную функцию НК-клеток, заключающуюся в уничтожении поврежденных или инфицированных клеток, можно проследить связь между их активностью и состоянием здоровья человека. НК-клетки представляют собой специфическое звено иммунитета, активность которого опосредована секрецией макрофагами IL-12.

Существует прямая корреляция между активностью НК-клеток и состоянием здоровья. Следовательно, повышая активность НК-клеток, можно существенно укреплять иммунитет и улучшать здоровье пожилых людей. Люди, обладающие высокой активностью НК-клеток, подвержены низкому риску развития раковых заболеваний.

Можно предположить, что уменьшенное количество НК-клеток проявляет слабую, но удовлетворительную цитотоксическую способность, тем не менее существенное снижение их количества в крови исследуемых пациентов должно ослабить общую сопротивляемость организма патогенному проникновению, т. е. вероятность развития сопутствующих пожилому возрасту заболеваний резко возрастает.

Девять ритмических сеансов экстремальной криотерапии способствовали достоверному увеличению содержания НК-клеток в крови наблюдаемых пациентов и значительно приблизили их содержание к норме.

Выводы

Анализируя результаты исследований, можно предположить, что 9 сеансов РХВ существенно улучшают функцию иммунной системы, способствуют усилению адаптации организма к действию неблагоприятных факторов.

Литература

1. Атауллаханов Р.И., Гинцбург А.Л. Иммунитет и инфекция: динамичное противостояние живых систем // Детские инфекции.– 2005.–Т. 4, №1.– С.11–21.
2. Бабичук В.Г. Вплив екстремальної криотерапії на функціональний стан систем нейрогуморальної регуляції старих щурів // Науковий вісник Національного медичного університету ім.О.О.Богомольця.–2007.– №1.– С. 60–62.
3. Железникова Г.Ф. Инфекция и иммунитет: стратегия обеих сторон // Мед. иммунол.– 2006.–Т. 8, №5–6.– С. 597–614.
4. Железникова Г.Ф. Иммуноглобулин Е: биологическая роль при инфекционных заболеваниях // Мед.иммунол.– 2002.– Т. 4, №4–5.– С. 515–534.
5. Луговская С.А., Почтарь М.Е., Тупицын Н.Н. Иммунофенотипирование в диагностике гемобластозов.–М., 2005.– 166 с.

Conclusions

If analysing the results of the study, we may suggest. that 9 RCE sessions significantly improve the immune system function, contributed to strengthening the organism's adaptation to the effect of unfavourable factors.

References

1. Ataullakhanov R.I., Gintsburg A.L. Immunity and infection: dynamical opposition of living systems // Detskiye Bolezni.– 2005.– Vol. 4, N1.– P. 11–21.
2. Babichuk V.G. Effect of extreme cryotherapy on functional state of systems of neurohumoral regulation of old rats // Scient. bulletin of O.O. Bogomolets National Medical University.– 2007.– N1.– P. 60–62.
3. Zheleznikova G.F. Infection and immunity: strategy of both sides // Med. Immunologiya.– 2006.– Vol. 8, N5–6.– P. 597–614.
4. Zheleznikova G.F. Immunoglobulin E: biological role under infectious diseases // Med. Immunologiya.– 2002.– Vol. 4, N4–5.– P. 515–534.
5. Lugovskaya S.A., Pochtar' M.E., Tupitsyn N.N. Immune phenotyping in diagnostics of hemoblastosis.– Moscow, 2005.– 166 p.
6. Khajdukov S.V., Zurochka A.V. Extension of possibilities of flow cytometry method for clinical and immunological practice // Med. Immunologiya.– 2008.– Vol. 10, N1.– P. 5–12.
7. Ahmad A., Ahmad R. HIV's evasion of host's NK cell response and novel ways of its countering and boosting anti-HIV immunity // Curr. HIV Res.– 2003.– Vol. 1, N3.– P. 295–307.
8. Barnes K. Parasite evolution and the immune system // Allergy Clin. Immunol. Int.– J. World Allergy Org.– 2005.– Vol. 17, N6.– P. 229–236.
9. Brodsky M. Stealth, sabotage and exploitation // Immunol. Rev.–1999.– Vol. 168.– P. 5–11.
10. Hamerman J.A., Ogasawa K., Lanier L.L. NK cells in innate immunity // Curr. Opin. Immunol.– 2005.– Vol. 17.– P. 29–35.
11. Harty J.T., Tvinerheim A.R., White D.W. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection // Annu. Rev. Immunol.– 2000.– Vol. 18.– P. 275–308.
12. Klebanoff C.A., Gattinoni L., Restifo N.P. CD8⁺ T cell memory in tumor immunology and immunotherapy // Immunol. Rev.– 2006.–Vol. 211.– P. 214–224.

Accepted in 26.02.2009

6. Хайдуков С.В., Зурочка А.В. Расширение возможностей метода проточной цитометрии для клинико-иммунологической практики // Мед. иммунол.– 2008. –Т. 10, №1.– С. 5–12.
7. Ahmad A., Ahmad R. HIV's evasion of host's NK cell response and novel ways of its countering and boosting anti-HIV immunity // Curr. HIV Res.– 2003.– Vol. 1, N3.– P. 295–307.
8. Barnes K. Parasite evolution and the immune system // Allergy Clin. Immunol. Int.– J. World Allergy Org.– 2005.– Vol. 17, N6.– P. 229–236.
9. Brodsky M. Stealth, sabotage and exploitation // Immunol. Rev.–1999.– Vol. 168.– P. 5–11.
10. Hamerman J.A., Ogasawa K., Lanier L.L. NK cells in innate immunity // Curr. Opin. Immunol.– 2005.– Vol. 17.– P. 29–35.
11. Harty J.T., Tvinerheim A.R., White D.W. CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection // Annu. Rev. Immunol.– 2000.– Vol. 18.– P. 275–308.
12. Klebanoff C.A., Gattinoni L., Restifo N.P. CD8⁺ T cell memory in tumor immunology and immunotherapy // Immunol. Rev.– 2006.–Vol. 211.– P. 214–224.

*Поступила 26.02.2009
Рецензент В.В. Рязанцев*