

Immuntoxikológiai vizsgálatok alkalmazása a kockázati csoportok jellemzésében

Biró Anna,¹ Pállinger Éva,² Falus András,² Tompa Anna¹

¹Fodor József Országos Közegészségügyi Központ, Országos Kémiai Biztonsági Intézet, Citogenetikai és Molekuláris Toxikológiai Osztály, Immuntoxikológiai labor,

²MTA-SE Molekuláris Immunológiai Kutató Csoport, Budapest

Az OKK Országos Kémiai Biztonsági Intézetében immuntoxikus hatásnak kitett kőolajipari, egészségügyi és fémipari dolgozók immunológiai státusát mértük föl. A kapott adatokat expozíciónak ki nem tett, egészséges kontroll donorok adataihoz viszonyítottuk. Vizsgálataink célja az immunrendszer működése és az immuntoxikológiai hatások összefüggéseinek vizsgálata, a különféle expozíciók hatásait specifikusan monitorozni képes teszrendszer kidolgozása volt. A keringő limfociták alcsoportjait és aktiváltsági állapotát immunfenotipizálási módszerrel, áramlásos citofluorimetriával határoztuk meg. A vizsgált kockázati csoportokban a kontroll csoporthoz képest általában nőtt a helper-, és csökkent a citotoxikus T-limfociták százalékos aránya, ami a Th/Tc arány eltolódásához vezetett. Ez a tendencia az expozáló anyagoktól független, ugyanakkor összefügg magával a vegyi expozíció tényével. A legtöbb csoportban a limfociták aktiválódását tapasztaltuk, de a csoportok között voltak eltérések az expresszálandó aktivációs antigének mintázatában. Eredményeink arra utalnak, hogy a keringő limfociták nyomonkövetése immunfenotípusuk és aktiváltsági állapotuk szerint alkalmas vizsgálati módszer lehet a környezeti immuntoxikus hatások feltérképezésére. *Magyar Onkológia* 48:137–139, 2004

At the National Institute of Chemical Safety we have surveyed the immunological status of donors from the oil industry, health services, and metallurgy exposed to different immunotoxic compounds. Their data were compared to those of healthy, non-exposed controls. Our aim was to study the relationship between immunotoxic exposure and immune function, and to establish a system of immunological parameters by which chemical exposure can be specifically monitored. Subpopulations and activation of lymphocytes was measured by flow cytometry, using immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes. In the groups exposed to immunotoxic compounds we found an increase in helper, and a decrease in cytotoxic T lymphocytes, leading to a shift in Th/Tc ratios. These phenomena are not substance specific, but relate to chemical exposure. The lymphocytes of exposed groups showed a higher proportion of activated cells, but there was a difference in the expressed activation markers. Our results suggest that characterizing lymphocyte subpopulations and activation markers on PBL of donors is a useful tool in tracking environmental immunotoxic effects. *Biró A, Pállinger É, Falus A, Tompa A. Characterization of chemically exposed groups by immunotoxicological methods. Hungarian Oncology* 48:137–139, 2004



Bevezetés és célkitűzés

Az OKK Országos Kémiai Biztonsági Intézetében már évekkel ezelőtt megkezdődött az immuntoxikus hatásnak kitett dolgozók immunológiai stá-

tusának felmérése. A Széchenyi Pályázat keretében végzett vizsgálatok célja az immunológiai eltérések feltérképezése különféle expozíciós hatásokra.

A környezeti – (munkahelyi) immuntoxikus hatások következtében megváltozhat a limfocitaszubpopulációk megoszlása, ill. funkcionális állapota, ami az immunrendszer válaszkészségének megváltozásához, a fertőző betegségek iránti fogékonyság fokozódásához, vagy akár a nem-fertőző krónikus betegségek kockázatának növekedéséhez vezethet.

Az expozíció hatására kialakuló genetikai és immunológiai eltérések sok esetben már évekkel a kórkép (pl. daganat) kialakulása előtt kimutathatók, lehetőséget adva ezáltal az ártalom korai

Közlésre érkezett: 2004. március 20.
Elfogadva: 2004. május 5.

Levelezési cím: Dr. Biró Anna, Fodor József Országos Közegészségügyi Központ, Országos Kémiai Biztonsági Intézet, Citogenetikai és Molekuláris Toxikológiai Osztály, Immuntoxikológiai labor, 1450 Budapest, Pf. 36., Tel.: 1-476-1100/2406, Fax: 1-476-1227, e-mail: biro.okbi@okk.antsz.hu

Készült a Széchenyi NKFP-1/016/2001 pályázat támogatásával.

felismerésére és kiküszöbölésére. Ez jelenti az alapját a *primer prevenciónak* (5), aminek két legcélravezetőbb módja az expozíció csökkentése, ill. megszüntetése, valamint az exponált szervezetben bekövetkezett kóros elváltozások felszámolása. Egy immuntoxikológiai monitor segíthet a target-specifikus kemoprevenció sikeres alkalmazásában.

Módszerek és vizsgálati csoportok

A keringő limfociták alcsoportjait és aktiváltsági állapotát immunfenotipizálási módszerrel, áramlások citofluorimetriával határoztuk meg (1). A vizsgált antigének: CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD25, CD45, CD54, CD56, CD62L, CD71 és HLA-DR.

A Széchenyi NK F Pályázat keretében eddig a kőolajiparban foglalkoztatott, benzollal, sztirollal, különböző szerves oldószerekkel, ill. policiklusos aromás szénhidrogénekkel (PAH) exponált dolgozókat (192 fő), az egészségügyben citosztatikumokkal, anesztetikumokkal, formalinnal, ill. ETO-val foglalkozó kórházi személyzetet (399 fő) ill. nemes-, színes- és nehézfémekkel exponált fémipari dolgozókat (48 fő) vizsgáltunk. A kapott adatokat expozíciónak ki nem tett, egészséges kontroll donorok adataihoz viszonyítottuk. Az eredmények statisztikai értékeléséhez Student-féle t-próbát használtunk. A szignifikanciaszintet $p < 0,05$ értékben határoztuk meg.

Eredmények

A kockázati csoportok T-limfocitákra vonatkozó csoportátlagait az 1-2. táblázat tartalmazza.

A kőolajipari munkások körében a T-limfocita-szubpopulációk arányában eltérést találtunk a

szerves oldószer-, CCl_4 - és sztirolexponáltak esetében. Ezekben a csoportokban nőtt a helper-, és csökkent a citotoxikus T-sejtek százaléka, ami a CCl_4 -exponáltak esetében a Th/Tc arány szignifikáns emelkedését is maga után vonta. Az egészségügyi dolgozóknál mind a négy csoportban találtunk eltérést a T-limfocita-szubpopulációk arányában. Az eltérések a citosztatikum-, az altatógáz- és az ETO-exponált csoportban, illetve a fémexponáltaknál a Th/Tc arány szignifikáns emelkedését is maga után vonták.

A kőolajipari munkások körében a CD25+, CD54+, CD56+, CD71+ és HLA-DR+ aktivált limfociták előfordulása majdnem minden expozíciós csoportban emelkedett a kontrollhoz képest, és ez az emelkedés több esetben statisztikailag szignifikáns volt. Ezzel egyidejűleg ugyanezen csoportokban csökkent a CD62L+ limfociták aránya, ami ugyancsak a sejtek aktivációjára utal, hiszen a CD62 ligand a sejtfelszínről az aktiváció hatására lehasad. Ez a megállapítás érvényes mind a T-, mind a B-sejtekre, bár a B-limfociták esetében a változások tendenciaszerűek, statisztikailag általában nem szignifikánsak.

Az egészségügyi dolgozók körében végzett vizsgálatok során is észlelhető volt a CD25+ és a CD71+ limfociták százalékos arányának emelkedése. A limfocita-aktiváció legkifejezettebben az ETO-exponált csoportban volt kimutatható. A CD25+/CD4+ sejtek aránya a különböző vizsgálati csoportokban változó volt, nem mutatva ugyanazt a tendenciát, mint a CD25+/CD3+ és a CD25+/CD8+ sejtek aránya, mely az exponált csoportokban általában emelkedett. A CD25+/CD4+ fenotípusú sejtek százalékos aránya az ETO-exponált csoportban emelkedett meg szignifikáns (70%-os) mértékben.

1. táblázat.
T-limfocita mérések
csoportátlagai ($\pm$ SE) a
kockázati csoportokban

Csoport	Eset (n)	Összes T-limfocita	T helper	T citotox.	Th/Tc	CD25/CD3	CD25/CD4
Kontroll	25	72,6 $\pm$ 1,5	41,1 $\pm$ 1,3	28,1 $\pm$ 1,3	1,6 $\pm$ 0,1	11,7 $\pm$ 1,8	19,5 $\pm$ 2,9
<i>Kőolajipari munkások</i>							
Benzol	57	69,1 $\pm$ 0,8*	40,5 $\pm$ 0,8	27,1 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,1	11,8 $\pm$ 1,3	17,2 $\pm$ 1,8
PAH	34	71,8 $\pm$ 0,9	41,1 $\pm$ 1,7	28,2 $\pm$ 1,1	1,6 $\pm$ 0,1	16,6 $\pm$ 2,2	24,7 $\pm$ 2,9
Szerves oldószer	13	69,1 $\pm$ 1,7	42,3 $\pm$ 2,3	23,1 $\pm$ 1,5*	2,0 $\pm$ 0,2	13,1 $\pm$ 2,7	20,8 $\pm$ 4,0
CCl_4	17	70,9 $\pm$ 1,2	47,1 $\pm$ 1,5*	21,7 $\pm$ 0,5*	2,2 $\pm$ 0,1*	15,0 $\pm$ 3,0	19,3 $\pm$ 3,7
Kokszolók	12	65,4 $\pm$ 2,8*	36,4 $\pm$ 1,6*	25,4 $\pm$ 2,4	1,6 $\pm$ 0,1	16,5 $\pm$ 3,4	25,0 $\pm$ 4,0
Környezetvédelmi labor	18	74,6 $\pm$ 1,8	44,4 $\pm$ 1,6	29,9 $\pm$ 2,6	1,7 $\pm$ 0,2	13,5 $\pm$ 2,9	19,4 $\pm$ 3,8
Sztirol	41	71,2 $\pm$ 0,9	45,2 $\pm$ 1,1*	25,0 $\pm$ 0,9	1,9 $\pm$ 0,1*	13,1 $\pm$ 1,6	16,9 $\pm$ 2,0
<i>Kórházi személyzet</i>							
Citosztatikum	261	72,2 $\pm$ 0,4	44,4 $\pm$ 0,5*	25,1 $\pm$ 0,4*	1,9 $\pm$ 0,1*	11,9 $\pm$ 0,7	16,8 $\pm$ 0,9
Altatógáz	111	72,9 $\pm$ 0,6	44,6 $\pm$ 0,7*	25,6 $\pm$ 0,7	1,9 $\pm$ 0,1*	13,4 $\pm$ 1,2	19,2 $\pm$ 1,8
ETO	14	68,2 $\pm$ 2,1	45,8 $\pm$ 2,8	20,8 $\pm$ 1,7*	2,5 $\pm$ 0,3*	24,5 $\pm$ 3,1*	33,7 $\pm$ 3,7*
Formalin	13	72,5 $\pm$ 1,9	46,0 $\pm$ 1,4*	24,6 $\pm$ 1,6	2,0 $\pm$ 0,2	12,3 $\pm$ 3,4	17,3 $\pm$ 5,1
<i>Fémexponáltak</i>							
Fémexponáltak	48	72,4 $\pm$ 1,0	44,5 $\pm$ 1,5	26,8 $\pm$ 1,4	1,9 $\pm$ 0,1*	12,9 $\pm$ 1,7	20,6 $\pm$ 2,8

* $p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva.

Megbeszélés

Krónikus, kis mértékű vegyi expozíciónak kitett dolgozók immunológiai státusát mértük föl immunfenotipizálási módszerrel. A vizsgált kockázati csoportokban a kontroll csoporthoz képest általában nőtt a helper-, és csökkent a citotoxikus T-limfociták százalékos aránya, ami több csoportban a Th/Tc arány szignifikáns mértékű eltolódásához vezetett. Ez a jelenség exponáló anyagoktól független, ezért nem tekinthető az exponáló ágensekre specifikusnak, ugyanakkor összefügg magával a vegyi expozíció tényével. A dohányzás mint vegyi expozíció szintén a Th-sejtek szignifikáns emelkedésével jár (1, 3). A T-limfocita-alpopulációk eltolódása sztirol-exponáltak esetében ismert (1, 6).

A legtöbb csoportban a limfociták aktiválódását tapasztaltuk. Az aktivációs antigének (CD25, CD71, CD56, HLA-DR, CD54) fokozott expressziója kőolajipari munkásoknál illetve az ETO-exponáltaknál volt a legkifejezettebb, előbbieknél a nyugvó fenotípusra jellemző antigén (CD62L) csökkent kifejeződése is megfigyelhető volt. A különböző csoportok között azonban eltérések mutatkoztak az expresszáldó aktivációs antigének mintázatában.

A CD25 felszíni antigén az IL-2 receptor a α -lánc, mely aktivált T- és B-sejteken expresszáldódik. Bár a CD25 aktivációs marker, a CD25+/CD4+ sejteknek van egy funkcionálisan és fenotípusosan elkülönülő, immunreguláló T-sejt alcsoportja, melynek egerekben a saját antigénnel szembeni tolerancia fenntartásában van szerepe (2, 4). A CD25+/CD4+ fenotípusú sejtek aránya az ETO-exponált csoportban 70%-kal emelkedett meg. A CD25+/CD4+ szabályozó

T-sejtek expozícióhoz kapcsolódó mennyiségi változása immunregulációs zavarhoz vezethet.

Eredményeink arra utalnak, hogy a keringő limfociták nyomonkövetése immunfenotípusuk és aktiváltsági állapotuk szerint alkalmas vizsgálati módszer lehet a környezeti immuntoxikus hatások feltérképezésére. Az általunk használt markerek változása csupán a vegyi expozíció tényét, és nem a minőségét vagy dózist jellemezte. A legtöbb esetben vegyi expozícióra a limfociták aktiválódtak, de az eltérések mintázata különbözött. Összegezve, a fenti eredmények alátámasztják azt a korábbi hipotézisünket, hogy a vegyi expozíció – jelentős egyéni különbségekkel – az immunrendszer fokozott aktivitásához vezethet.

Irodalom

1. Biró A, Pállinger É, Major J. Lymphocyte phenotype analysis and chromosome aberration frequency of workers occupationally exposed to styrene, benzene, polycyclic aromatic hydrocarbons or mixed solvents. *Immunol Lett* 81:133-140, 2002
2. Kuniyasu Y, Takahashi T, Itoh M, et al. Naturally anergic and suppressive CD25(+)CD4(+) T cells as a functionally and phenotypically distinct immunoregulatory T cell subpopulation. *Int Immunol* 12:1145-1155, 2000
3. Tanigawa T, Araki S, Nakata A, Sakurai S. Increase in the helper inducer (CD4+CD29+) T lymphocytes in smokers. *Ind Health* 36:78-81, 1998
4. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 188:287-296, 1998
5. Tompa A, Major J, Jakab M. A perifériás limfocita genotoxikológiai markereinek változása a vegyipari expozíciók kapcsán. (Genotoxikológiai monitor). *Magyar Onkológia* 37:169-180, 1993
6. Tulinska J, Dusinska M, Jahnova E, et al. Changes in cellular immunity among workers occupationally exposed to styrene in a plastics lamination plant. *Am J Ind Med* 38:576-583, 2000

Csoport	Eset (n)	CD25/CD8	CD71/CD3	CD56/CD3	HLA-DR/CD3	CD54/CD3	CD62L/CD3
Kontroll	25	2,4 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 1,5	6,9 $\pm$ 1,1	4,8 $\pm$ 2,3	67,6 $\pm$ 2,1
Kőolajipari munkások							
Benzol	57	5,4 $\pm$ 1,1*	2,8 $\pm$ 0,3*	9,3 $\pm$ 0,8	15,7 $\pm$ 1,6*	5,4 $\pm$ 0,8	58,2 $\pm$ 2,1*
PAH	34	8,1 $\pm$ 1,6*	4,4 $\pm$ 1,4	9,0 $\pm$ 0,8	13,6 $\pm$ 1,7*	15,4 $\pm$ 8,6	53,8 $\pm$ 3,6*
Szerves oldószer	13	2,7 $\pm$ 0,8	2,3 $\pm$ 0,3	7,8 $\pm$ 0,9	11,8 $\pm$ 2,4	7,4 $\pm$ 6,0	57,5 $\pm$ 3,3*
CCl ₄	17	8,5 $\pm$ 2,9	2,7 $\pm$ 0,8	6,6 $\pm$ 0,5	7,7 $\pm$ 0,5	7,7 $\pm$ 3,3	66,2 $\pm$ 6,1
Kokszolók	12	7,3 $\pm$ 4,0	3,3 $\pm$ 0,7	10,7 $\pm$ 1,7	-	-	-
Környezetvédelmi labor	18	5,8 $\pm$ 2,2	5,1 $\pm$ 2,4	8,9 $\pm$ 1,4	-	-	-
Sztirol	41	6,5 $\pm$ 1,6*	2,2 $\pm$ 0,3	7,4 $\pm$ 0,7	11,4 $\pm$ 1,9	4,4 $\pm$ 0,9	63,3 $\pm$ 2,8
Kórházi személyzet							
Citosztatikum	261	4,7 $\pm$ 0,5*	3,0 $\pm$ 0,4*	6,3 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,2	63,9 $\pm$ 1,7
Altatógáz	111	5,7 $\pm$ 0,8*	2,6 $\pm$ 0,3	6,5 $\pm$ 0,6	7,4 $\pm$ 1,1	1,3 $\pm$ 0,4	59,3 $\pm$ 3,7
ETO	14	11,3 $\pm$ 1,8*	3,9 $\pm$ 0,5*	8,4 $\pm$ 2,1	8,9 $\pm$ 3,5	6,5 $\pm$ 5,3	62,4 $\pm$ 6,6
Formalin	13	4,1 $\pm$ 1,3	3,3 $\pm$ 0,9	9,0 $\pm$ 1,4	-	-	-
Fémexponáltak							
Fémexponáltak	48	3,5 $\pm$ 0,6	2,5 $\pm$ 0,4	11,0 $\pm$ 1,2	-	-	-