

УДК 546.76 : 57.05

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ И БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХРОМА НА ОРГАНИЗМ КРЫС ВИСТАР

И.В. Михайлова,
А.И. Смолягин,
С.И. Красиков,
Е.В. Ермолина, В.М. Боев

ГБОУ ВПО «Оренбургский
государственный медицинский
университет» Минздрава РФ,
460000, г. Оренбург, Российская
Федерация

В условиях модельного эксперимента исследовали хроническое влияние бихромата калия на иммунологические и биохимические показатели крыс Вистар. Выявлено, что: во-первых, длительное поступление хрома в организм крыс Вистар оказывало угнетающее влияние на количественные и функциональные параметры селезенки экспериментальных животных; во-вторых, установлено, что в основе выявленных сдвигов параметров иммунной системы лежит: повышение интенсивности процессов СРО у крыс (сыворотка крови, селезенка, печень) и ПОЛ, выразившееся в нарастании концентрации ДК и МДА (селезенка, печень) на фоне снижения активности каталазы и СОД (эритроциты крыс); в-третьих, выявленные механизмы, лежащие в основе изменений иммунологических показателей, являются экспериментальным обоснованием для разработки подходов к предупреждению отрицательных последствий воздействия данного ксенобиотика.

Ключевые слова: хром, иммунитет, свободнорадикальное окисление, крысы.

Введение. Известно, что снижение функций иммунной системы под влиянием токсичных веществ вызывает индуцированный вариант вторичных иммунодефицитных состояний. В качестве химических загрязнителей могут выступать различные неорганические соединения (ртуть, мышьяк, бериллий, цинк, медь, никель, хром, свинец, кадмий и др.), среди которых внимание привлекают соединения шестивалентного хрома, которые широко используются в промышленности (металлообрабатывающей, кожевенной, текстильной, химической, лакокрасочной, фармацевтической и др.) [1], а также потому, что вследствие высокой кумулятивной способности шестивалентного хрома, его токсичность может проявляться при различных концентрациях [2]. Вместе с тем, необходимо отметить и тот факт, что при любом пути воздействия химических веществ, в том числе и хрома, возникает непосредственный контакт с клетками иммунной системы и форми-

руется системная реакция с соответствующими иммунологическими проявлениями. В ранее проведенных исследованиях на аналогичной модели не выявлено существенных изменений числа лейкоцитов и установлено снижение массы органа и количества клеток в селезенке крыс Вистар [3]. Учитывая вышесказанное, целью настоящего исследования явилось определение некоторых механизмов воздействия шестивалентного хрома на иммунологические показатели крыс Вистар.

Материалы и методы исследования. Экспериментальные исследования проведены на 308-и здоровых половозрелых крысах-самцах линии Вистар массой 250-300 г. Доза токсиканта соответствовала одной ПДК [4]. Все животные, включенные в исследование, содержались на стандартном пищевом рационе и были разделены на 2 группы. Животные 1-ой группы вместе с водой, перорально получали бихромат калия («Полихим», Россия) из расчёта 20 мг/кг. Животные

Михайлова Ирина Валерьевна (Mikhaylova Irina Valer'evna), доктор биологических наук, доцент кафедры химии и фармацевтической химии Оренбургского государственного медицинского университета Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, Российская Федерация, mikhaylova74@yandex.ru
Смолягин Александр Иванович (Smolyagin Aleksandr Ivanovich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий проблемной лабораторией по изучению механизмов естественного иммунитета Оренбургского государственного медицинского университета Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, Российская Федерация, problab.orenburg@mail.ru

Красиков Сергей Иванович (Krasikov Sergey Ivanovich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой химии и фармацевтической химии Оренбургского государственного медицинского университета Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, Российская Федерация, ks_oren@mail.ru

Ермолина Евгения Вячеславовна (Ermolina Evgeniya Vjacheslavovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник проблемной лаборатории по изучению механизмов естественного иммунитета Оренбургского государственного медицинского университета Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, Российская Федерация, problab.orenburg@mail.ru

Боев Виктор Михайлович (Boev Viktor Mihajlovich), доктор медицинских наук, профессор, ректор Оренбургского государственного медицинского университета Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, Российская Федерация, problab.orenburg@mail.ru

второй группы (контроль), содержались в том же виварии и получали воду. Через 45, 90 и 135 суток животные выводились из эксперимента летальной дозой эфирного наркоза. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными, отраженными в «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей» (Страсбург, 1985) и «Правилами лабораторной практики» (Приказ Минздравсоцразвития от 23.08.2010 N 708н).

Иммунофенотипирование спленоцитов проводили с использованием моноклональных антител («eBioscience», США) к рецепторам CD3, CD4, CD8. Процентное содержание CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺- лимфоцитов селезенки определяли на проточном двухлазерном цитофлюориметре «FACS Canto II» («Becton Dickinson», США). Продукцию цитокинов в супернатантах нестимулированных и стимулированных конкавалином А (Кон А) культур спленоцитов (ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН γ) оценивали с использованием метода ИФА (тест-системы «Bender MedSystems», Австрия). Регистрацию результатов проводили на фотометре Multiskan (LabSystems, Финляндия). Интенсивность процессов перекисного окисления липидов оценивали по величине спонтанной и железоиндуцированной хемилюминесценции (ХЛ) в сыворотке крови и гомогенатах печени и селезенки [5,6]. В эритроцитарной массе определяли активность антиоксидантных ферментов: каталазы – по скорости утилизации перекиси водорода, супероксиддисмутазы (СОД) – по аутоокислению адреналина [7]. В гомогенатах печени и селезенки определяли содержание малонового диальдегида (МДА) по методу, основанному на тесте с 2-тиобарбитуровой кислотой и диеновых конъюгатов (ДК) по характерному для диеновых конъюгатов максимуму поглощения раствора липидов в системе изопропанол-гептан (1:1) при длине волны 233 нм. Динамику нарастания концентрации МДА в печени и селезенке определяли посредством стимуляции ПОЛ с помощью Fe²⁺. Интенсивность хемилюминесценции регистрировали на приборе «Хемилюминометр ХЛ-003» (Россия), оптическую плотность проб измеряли на спектрофотометре «Genesys 5» (США). Результаты проведенных исследований обработаны методами параметрической и непараметрической статистики с использованием пакета программ для ПК «Microsoft Excel 7.0,» «STATISTICA 10.0».

Результаты и обсуждение. Исследование субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в селезенке крыс опытной группы (табл.1) выявило снижение относительного и абсолютного числа CD3⁺-, CD4⁺-, CD8⁺- лимфоцитов чаще всего на 90-е сутки экспозиции, которое свидетельствовало об им-

муносупрессивном характере воздействия хрома на крыс.

Исследование влияния хрома на секрецию цитокинов спленоцитами крыс показало, что спонтанная продукция ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-10, ИФН γ была ниже чувствительности ИФА-наборов. Индуцированная Кон А выработка указанных цитокинов спленоцитами крыс (табл. 2) характеризовалась увеличением уровня ИЛ-4 на всех сроках наблюдения. Напротив, уровень ИЛ-6 имел тенденцию к уменьшению на 45 и 90 сутки эксперимента и достоверно снижался на 135-е сутки. Что касается выработки ИЛ-10 и ИФН- γ , то необходимо отметить, что их концентрация значимо не отличалась от уровня контрольной группы крыс.

Выявленные сдвиги субпопуляционного состава Т-лимфоцитов в селезенке крыс опытной группы, можно объяснить тем, что они характеризуются наиболее высоким содержанием в них микросомальных цитохромов Р-450, которые участвуют в биотрансформации ксенобиотиков [1,8].

Изменение индуцированной Кон А выработки цитокинов спленоцитами крыс, может быть связано с различной чувствительностью клеток-продуцентов этих цитокинов к действию хрома, обусловленное особенностями экспрессии фолатных рецепторов на поверхности данных клеток: Th1 (для ИФН γ) и Th2 (для ИЛ-4). Подобное предположение подтверждается сведениями [9] о неравномерном распределении одного из подтипов фолатных рецепторов (FR-4) на мембранах регуляторных Т-лимфоцитов, позволяющих идентифицировать по этому признаку их различные субпопуляции.

Помимо перечисленных механизмов, приводящих, на наш взгляд, к установленным сдвигам иммунологических параметров, в их основе может также лежать активация процессов СРО, которая является результатом воздействия хрома, как металла переменной валентности. Так, согласно современным представлениям, ионы Cr (VI), попадая в организм, подвергаются процессу восстановления до Cr (III), что сопровождается появлением АФК, которые образуются по реакциям Хабера-Вейса и Фентона [1,8]. Поэтому были изучены особенности воздействия бихромата калия на свободно-радикальное перекисное окисление липидов и антиоксидантный статус. Установлено, что, активация процессов СРО в сыворотке крови, селезенке и печени крыс опытной группы характеризовалась увеличением параметров хемилюминесценции (повышение величины быстрой вспышки и интенсивности светосуммы быстрой вспышки) (табл. 3).

Негативные результаты нарушения окислительно-восстановительного баланса клетки реализуются, прежде всего, через усиление процесса ПОЛ и накопление продуктов окисления

Таблица 1

Влияние бихромата калия на субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки у крыс Вистар

Показатели		Сутки	1 группа	2 группа, n=24
Количество спленоцитов (млн)		45 (n=16)	912,00±38,95	912,64±68304
		90 (n=13)	647,62±61,21 ▲	
		135 (n=13)	625,87±25,61 ▲	
CD3 ⁺	%	45 (n=16)	46,65±1,95	48,50±0,83
		90 (n=13)	45,48±1,46	
		135 (n=7)	46,64±2,04	
	x10 ⁶	45 (n=16)	421±20,44	452,00±36,53
		90 (n=13)	297±29,65 ▲	
		135 (n=7)	273±22,60 ▲	
CD4 ⁺	%	45 (n=16)	31,86±1,56	37,50±0,8
		90 (n=13)	32,48±1,48	
		135 (n=7)	34,87±2,80	
	x10 ⁶	45 (n=16)	289±16,99	339±27,42
		90 (n=13)	214±25,01 ▲	
		135 (n=7)	204±21,25 ▲	
CD8 ⁺	%	45 (n=16)	16,27±1,66	14,60±1,06
		90 (n=13)	10,04±1,87 ▲	
		135 (n=7)	15,76±0,83#	
	x10 ⁶	45 (n=16)	146±14,05	139±18,01
		90 (n=13)	58±7,20 ▲	
		135 (n=7)	97±5,90 ▲ #	

Примечание: здесь и далее: 1 группа – животные, получавшие бихромат калия, 2 группа – интактная (контроль); обозначены достоверные отличия (p < 0,05): жирным – по отношению к контролю; ▲ – 45 и 90, 45 и 135 дней; # – 90 и 135 дней.

Таблица 2

Влияние бихромата калия на продукцию цитокинов (пг/мл) спленocytesми крыс Вистар

Группа	Сутки	ИЛ-4	ИЛ-6	ИЛ-10	ИФН-γ
1 группа	45 (n=8)	15,64±4,88	102,78±20,22	62,48±4,78	85,51±15,79
	90 (n=10)	19,10±3,78	97,42±16,26	82,36±6,17 ▲	52,37±7,01 ▲
	135 (n=9)	63,42±16,10 ▲ #	83,48±12,25	90,38±7,66 ▲	73,79±21,61
2 группа (n=18)		4,58±0,86	129,24±15,47	85,23±15,84	46,83±2,04

(ДК, МДА) на 90 сутки в печени и селезенке крыс (табл. 4). Необходимо также отметить и тот факт, что одна из причин активации СРО может быть связана со снижением активности антиоксидантных ферментов, поэтому на данном этапе работы была также исследована активность СОД и ката-

лазы в различные сроки воздействия изучаемых веществ.

Изучение активности антиоксидантных ферментов в эритроцитах крыс опытной группы характеризовалось снижением, при этом активность СОД достигала минимума на поздних сроках экс-

Таблица 3

Влияние бихромата калия на параметры хемилюминесценции в крови, селезенке, печени крыс Вистар

Сутки		Спонтанная светимость, у.е.	Быстрая вспышка, у.е.	Светосумма медленной вспышки, у.е.
Кровь				
1 группа	45 (n=8)	0,25±0,03	0,36±0,02	4,60±1,27
	90 (n=4)	0,39±0,10 ▲	4,87±2,59	5,10±2,08
	135 (n=6)	0,52±0,31	1,09±0,43#	2,50±0,43
2 группа (n=15)		0,33±0,05	0,75±0,22	2,01±0,32
Селезенка				
1 группа	45 (n=10)	0,63±0,14	1,14±0,20	2,61±0,24
	90 (n=6)	0,37±0,08	0,96±0,07	3,42±0,18 ▲
	135 (n=13)	0,37±0,05	0,57±0,06 ▲ #	3,17±0,16
2 группа (n=28)		0,39±0,05	0,71±0,11	1,96±0,11
Печень				
1 группа	45 (n=10)	0,72±0,23	2,35±0,55	3,32±0,18
	90 (n=6)	0,36±0,06	1,02±0,02 ▲	3,60±0,22
	135 (n=13)	0,42±0,06	0,81±0,25 ▲ #	3,93±0,45
2 группа (n=29)		0,36±0,05	0,57±0,05	1,74±0,10

Таблица 4

Влияние бихромата калия на интенсивность образования ДК (ед.опт.пл./мг белка) и МДА (нмоль/мг белка) в селезенке и печени крыс Вистар

Группы	Сутки	Селезенка		Печень	
		Диеновые конъюгаты	Малоновый диальдегид	Диеновые конъюгаты	Малоновый диальдегид
1 группа	45	0,34±0,01 (10)	2,26±0,40 (8)	0,36±0,01 (10)	8,28±1,71 (8)
	90	0,47±0,01 ▲ (8)	2,03±0,32 (12)	0,57±0,01 ▲ (8)	3,86±0,60 ▲ (23)
	135	0,33±0,02# (8)	4,10±1,18 (9)	0,36±0,01# (8)	5,96±2,19 (9)
2 группа		0,39±0,01 (28)	1,33±0,09 (28)	0,40±0,02 (6)	3,73±0,53 (32)

Таблица 5

Влияние бихромата калия на активность антиоксидантных ферментов в эритроцитах крыс Вистар

Группы	Сутки	СОД, Усл.ед./гНб	Каталаза, Усл.ед./гНб
1 группа	45 (n=6)	189,01±9,86	218,68±3,75
	90 (n=6)	123,39±14,24 ▲	274,79±8,04 ▲
	135 (n=7)	124,78±53,01	171,93±20,85 ▲ #
2 группа (n=20)		226,68±25,58	257,40±8,49

перимента, в то время как активность каталазы – на 45 и 135-е сутки экспозиции (табл. 5.).

Таким образом, воздействие бихромата калия на крыс, приводило к активации процессов СРО и ПОЛ на фоне подавления активности антиоксидательных ферментов, что выражалось в падении активности каталазы и супероксиддисмутазы эритроцитов крови и нарастании концентрации МДА, ДК в гомогенатах печени и селезенке экспериментальных животных.

Заключение. В целом, установленная способность хрома активировать процессы СРО можно расценивать как значимый механизм цитотоксичности данного вещества, определяющий установленные в работе структурные и функциональные изменения иммунной системы при его воздействии. Избыточная генерация АФК нарушает баланс между продукцией АФК и механизмами антиоксидантного контроля за их содержанием, и в

конечном итоге приводит к истощению эндогенного антиоксидантного потенциала и развитию «окислительного стресса», который оказывает негативное влияние на иммунокомпетентные клетки, нарушая их способность к пролиферации и изменяя соотношение регуляторных субпопуляций лимфоцитов, нарушая синтез ДНК и белка в лимфоцитах и, как следствие этого, приводя к подавлению иммунных реакций [2,8,9]. Еще одним следствием избыточной активации ПОЛ является запуск апоптотического каскада с участием его «митохондриального» механизма, который реализуется и в лимфоцитах, в частности, под действием глюкокортикоидов [10]. Таким образом, выявленные механизмы, лежащие в основе изменений иммунологических показателей, являются экспериментальным обоснованием для разработки подходов к предупреждению отрицательных последствий воздействия данного ксенобиотика.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Куценко С. А. Основы токсикологии. СПб.: Фолиант; 2004.
2. Мамырбаев А.А. Токсикология хрома и его соединений. Актобе; 2012.
3. Ермолина Е. В., Михайлова И. В. Влияние бензола и хрома на иммунологические показатели крыс Вистар. Вестник ОГУ. 2011; 16 (135): 274-276.
4. ГН 2.1.5.2280-07 «Предельно допустимые концентрации (ПДК) химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования». М.: Роспотребнадзор; 2008.
5. Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: ЧГПУ; 2000.
6. Фархутдинов Р.Р. Свободнорадикальное окисление в биологическом материале и хемилюминесцентные методы исследования в экспериментальной и клинической медицине. Уфа; 2002.
7. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании процесса аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы. Вopr. мед. химии. 1999; 3:263 – 272.
8. Курляндский Б.А., Филов В.А., ред. Общая токсикология. М.: Медицина; 2002.
9. Walker L.S.K. Folate receptor 4: A new handle on regulation and memory? Immunol. and Cell. Biol. 2007; 85(7):506-7.
10. Владимирская Е.Б. Апоптоз в регуляции клеточного равновесия и формирования опухолевого роста. Вопросы гематологии, онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2003; 7:5-11.

REFERENCES:

1. Kutsenko S.A. Bases of toxicology. St. Petersburg: Foliant; 2004 (in Russian).
2. Mamyrbayev A.A. Toxicology of chromium and its compounds. Aktoobe; 2012 (in Russian).
3. Ermolina E.V., Mihajlova I.V. Effect of benzene and chromium on immunological parameters in Wistar rats. Vestnik OGU. 2011; 16 (135):274-6 (in Russian).
4. GN 2.1.5.2280-07. Maximum permissible concentration (MPC) of chemicals in water of the economy-drinking and cultural-everyday objects. Moscow: Rospotrebnadzor; 2008 (in Russian).
5. Volchegorskij I.A., Dolgushin I.I., Kolesnikov O.L., Cejlikman V.Je. Experimental modeling and laboratory evaluation of the adaptive reactions. Cheljabinsk: ChGPU; 2000 (in Russian).
6. Farhutdinov R.R. Free radical oxidation in biological material and chemiluminescent methods of research in experimental and clinical medicine. Ufa; 2002 (in Russian).
7. Sirota T.V. A new approach to the study of adrenaline auto-oxidation process and its use for measuring the activity of superoxide dismutase. Vopr. med. Himii. 1999; 3:263 – 272 (in Russian).
8. Kurljandskiy B.A., Filov V.A., red. General Toxicology. Moscow: Meditsina; 2002 (in Russian).
9. Walker L.S.K. Folate receptor 4: A new handle on regulation and memory? Immunol. and Cell. Biol. 2007; 85(7):506-7.
10. Vladimirskaia E.B. Apoptosis in the regulation of cellular equilibrium and the formation of tumor growth. Voprosy gematologii, onkologii i immunopatologii v pediatrii. 2003; 7: 5-11(in Russian).

I.V. Mikhaylova, A.I. Smolyagin, S.I. Kraskov, E.V. Ermolina, V.M. Boev

INFLUENCE OF POTASSIUM BICHROMATE ON BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF WISTAR RATS ORGANISM

SBEI «Orenburg State Medical University», Ministry of Health of Russia, 460000 Orenburg, Russian Federation

The impact of potassium dichromate on immunological and biochemical parameters in Wistar rats was investigated in a model experiment. In the first place it was found out that a lasting uptake of chromium by the Wistar rat organism produces a depressive influence on the spleen quantitative and functional characteristics in laboratory animals; secondly, it was established that revealed shifts in the immune system parameters are caused by an increased intensity of free radical oxidation (FRO) in rats (blood serum, spleen, liver) and

lipid peroxidation (LPO), shown in an increasing concentration of conjugated dienes (CD) and malondialdehyde (MDA) in spleen and liver against the background of the catalase decreased activity and superoxide dismutase (SOD) -erythrocytes in rats; and third, revealed mechanisms accounting for changes in immunological indicators present an experimental validation to elaborate approaches to preventing adverse effects of that xenobiotic.

Keywords: chromium, immunity, free radical oxidation, rats.

Переработанный материал поступил в редакцию 05.02.2015 г.