

УДК 546.766 : 611.42

ВЛИЯНИЕ БИХРОМАТА КАЛИЯ НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ КРЫС ВИСТАР

*А.И. Смолягин, И.В. Михайлова,
Е.В. Ермолина, А.А. Стадников,
В.М. Боев*

ГБОУ ВПО «Оренбургская государственная
медицинская академия» Минздрава РФ,
460000, г. Оренбург, Российская Федерация

В условиях хронического эксперимента (135 сут) исследовали влияние бихромата калия (в дозе 1 ПДК) на морфологические и иммунологические параметры лимфоидных органов крыс Вистар. Длительное поступление хрома в организм крыс Вистар приводит к снижению массы тимуса и числа тимоцитов, вызывает комплекс структурно-функциональных изменений, свидетельствующих о статусе акцидентальной инволюции, лимфоретикулярной гиперплазии и плазмоцитарно-макрофагальной трансформации лимфатических узлов и селезенки, индуцирует программированную гибель тимоцитов и лимфоцитов в Т-зонах селезенки и лимфатических узлах. Хром вызывает морфофункциональные изменения в селезенке, характеризующиеся снижением ее массы и количества спленоцитов, клеток лимфоидного ряда и, напротив, увеличением клеток эритроидного ряда. Влияние хрома на костный мозг проявлялось в снижении уровня миелоидного ряда, нейтрофилов и, напротив, в увеличении количества лимфоидных клеток, а также содержания эритроидных клеток.

Ключевые слова: хром, лимфоидные органы, крысы.

Введение. Одним из актуальных направлений в современной токсикологии является определение параметров хронического влияния различных токсикантов в эксперименте и клинике. Одной из наиболее чувствительных систем организма, чутко реагирующей на контакт с химическими веществами, является система иммунитета. Поэтому иммунная система может выступать как показатель воздействия на организм различных антропогенных факторов, т.е. быть чувствительной индикаторной системой наличия в регионе экологически неблагоприятной ситуации. В задачи современной иммуноморфологии входит установление морфофункциональных изменений в лимфоидной ткани при длительном воздействии различных экотоксикантов неорганической и органической природы, одним из которых являются соединения хрома. Основными промышленными источниками хрома являются производство цветных ме-

таллов, удобрений, автомобильное, нефтехимическое производство [1]. В этой связи представляет интерес исследование морфологических параметров иммунной системы, как мишени воздействия ксенобиотиков, в условиях длительного хронического влияния хрома в эксперименте.

Целью настоящей работы явилась комплексная оценка воздействия бихромата калия на морфологические и иммунологические параметры лимфоидных органов крыс Вистар в динамике хронического эксперимента.

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

Смолягин Александр Иванович (Smolyagin Aleksandr Ivanovich), доктор медицинских наук, профессор, заведующий проблемной лабораторией по изучению механизмов естественного иммунитета Оренбургской государственной медицинской академии Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, probllab.orenburg@mail.ru

Михайлова Ирина Валерьевна (Mikhaylova Irina Valer'evna), доктор биологических наук, доцент кафедры химии и фармацевтической химии Оренбургской государственной медицинской академии Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, mikhaylova74@yandex.ru

Ермолина Евгения Вячеславовна (Ermolina Evgenija Vjacheslavovna), кандидат биологических наук, старший научный сотрудник проблемной лаборатории по изучению механизмов естественного иммунитета Оренбургской государственной медицинской академии Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, probllab.orenburg@mail.ru

Стадников Александр Абрамович (Stadnikov Aleksandr Abramovich), доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой гистологии, цитологии эмбриологии, 460000, г. Оренбург, k_histology@orgma.ru

Боев Виктор Михайлович (Boev Viktor Mihajlovich), доктор медицинских наук, профессор, ректор Оренбургской государственной медицинской академии Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, probllab.orenburg@mail.ru

Доза токсиканта соответствовала одной ПДК [2]. Животные 2-й группы (контроль), содержались в том же виварии и получали воду. Через 45, 90 и 135 суток животные выводились из эксперимента летальной дозой эфирного наркоза. Результаты, полученные у животных первой группы в каждой серии экспериментов, достоверно не отличались между собой, что позволило объединить их и использовать в качестве контроля. 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 РФ от 23.08.2010 г. № 708н).

Морфологические исследования проводились на 5 животных опытной и 5 крысах контрольной групп на 45-е, 90-е и 135-е сутки с использованием общепринятых морфометрических, гистологических и электронно-микроскопических методов исследования. Для определения экспрессии проапоптотического белка p53 и антиапоптотического белка bcl2 использовали стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод [3].

Для проведения иммунологических исследований у 120 животных (по 60 в каждой группе) на 45-й, 90-й и 135-й день эксперимента определяли массу тимуса и селезенки, а также количество ядродержащих клеток в тимусе, селезенке и костном мозге; оценивали клеточный состав селезенки и костного мозга в соответствии с лабораторными методами исследования экспериментальных животных [4]. Результаты проведенных исследований обработаны методами параметрической статистики с использованием пакета программ для ПК «Microsoft Excel 7.0,» «STATISTICA 10.0».

Результаты и обсуждение. При морфологической характеристике тимуса у крыс опытной группы во все сроки наблюдений отмечен комплекс структурно-функциональных изменений, свидетельствующих о статусе акцидентальной инволюции органа. Это проявлялось в выраженной клеточной реорганизации паренхимы и стромы, ультраструктурных повреждениях цитоплазматических компонентов, увеличении деструктивных форм тимоцитов, существенном снижении их числа в корковом веществе долек тимуса, увеличении числа телец Гассалья и адипоцитов, фибриллогенезе стромы органа, реактивных изменениях сосудов микроциркуляции, снижении количества функционально специализированных ретикулоэпителиоцитов и их взаимодействий с Т-лимфоцитами. Данные изменения со всей очевидностью приводят к функциональному расстройству центрального звена иммунной системы.

Гистологическое изучение селезенки крыс опытной группы на 45-й, 90-й и 135-й день эксперимента показало выраженное полнокровие трабекулярных и пульпарных сосудов, а также увеличение размеров лимфоидных фолликулов. Гиперпластическая реакция герминативных зон сочеталась с накоплением в них плазматических и макрофагов. Морфометрический анализ показал увеличение размеров белой пульпы селезенки (табл.1) за счет возрастания территории В-зон. Значимого возрастания Т-зависимых (периартериальных) зон не происходило.

При структурно-функциональной оценке лимфатических узлов крыс 2-й группы во все сроки эксперимента было установлено увеличение размеров лимфатических узлов и резкое их полнокровие, приводящее к дискомплексации клеточных элементов.

Таблица 1

Морфометрические показатели белой пульпы селезенки крыс Вистар при влиянии хрома (мкм)

| Показатели | 1 группа | | | 2 группа |
|------------------------------------|------------|------------|-------------|------------|
| | 45-е сутки | 90-е сутки | 135-е сутки | |
| Герминативный центр (В-зона) | 892,6±8,7* | 910,6±4,3* | 1010,6±4,7* | 810,8±10,6 |
| Периартериальные влаглища (Т-зона) | 181,6±3,6* | 189,9±4,1 | 200,6±3,6 | 196,7±4,6 |

* - обозначены достоверные отличия ($p < 0,05$) по отношению к контролю

Ультраструктурный анализ паракортикальной зоны выявил нарушения внутриклеточных компартментов ретикулярных клеток и лимфоцитов. В цитоплазме регистрировались мелкие митохондрии с признаками разрушения крист, а также появлялись липосомы. Иммуноцитохимические исследования показали, что воздействие хрома индуцирует программированную гибель тимоцитов (табл. 2) и лимфоцитов в Т-зонах селезенки (периартериальная муфта) и лимфатических узлов (паракортикальная зона). На ультраструктурном уровне выявлены апоптотические тимоциты и лимфоциты Т-зависимых зон селезенки и лимфатических узлов с характерными изменениями их ядер и цитоплазмы. В поздние сроки эксперимента (90 и 135 сут) установлено, что апоптозу подлежат не только одиночные клетки, но и их скопления. При этом апоптотические дискретные тельца не подвергаются фагоцитозу, а чаще всего находятся в окружении индексных стромальных элементов, которые иногда формируют кистозные полости. Появление подобных апоптотических клеток и их группировок свидетельствует, скорее всего, о межклеточной индукции программированной клеточной гибели. В своей совокупности полученные сведения свидетельствуют о понижении активности Т-лимфоцитов, что отражает, очевидно, состояние Т-клеточного иммунодефицита.

Вероятно, это происходит на фоне дисфунк-

ции иммуноцитов (в частности В-клеточные зоны проявляли морфологические признаки гиперреактивности). Таким образом, развивающаяся морфологическая картина у экспериментальных животных свидетельствует о содружественной реактивности центральных и периферических органов иммуногенеза. Данная реактивность проявляется лимфоретикулярной гиперплазией и плазмочитарно-макрофагальной трансформацией лимфатических узлов и селезенки. Фенотипически отслеженные эти реакции «выходят» за пределы тимико-лимфоидной системы. Причем, динамика поражений указанных органов соответствует интенсивности их инфильтрации полиморфноядерными лейкоцитами, тучными клетками, характеризующими неспецифический клеточный компонент воспалительной реакции.

При исследовании влияния бихромата калия на лимфоидные органы крыс (табл.3) установлено снижение массы органа и количества клеток тимуса, селезенки крыс опытной группы преимущественно в поздние сроки эксперимента, а также изменения клеточного состава селезенки (уменьшение абсолютного количества клеток лимфоидного ряда, плазматических клеток и, напротив, повышение содержания клеток эритроидного ряда на 90-е сутки). В костном мозге наблюдалось снижение клеток миелоидного ряда, числа нейтрофилов и увеличение количества лимфоидных

Таблица 2

Содержание проапоптотического белка p53 и антиапоптотического белка bcl2 в органах иммунной системы крыс Вистар при действии хрома (промилли)

| Показатели | 1 группа | | | 2 группа |
|---|------------|-----------------|-----------|------------|
| | 45 сут | 135 сут | 90 сут | |
| Тимус (кортикальная зона) | 2,8±0,08 * | 0,05±0,01(p53) | 3,1±0,07* | 4,6±0,09* |
| | 3,3±0,06* | 1,07±0,02(bcl2) | 4,1±0,11* | 5,1±0,06* |
| Селезенка (периартериальная зона) | 3,1±0,08* | 0,03±0,01(p53) | 4,3±1,12* | 4,9±0,06* |
| | 4,1 ±0,07* | 0,91±0,03(bcl2) | 4,8±0,09* | 5,0±0,11 * |
| Лимфатические узлы (паракортикальная зона) | 3,2±1,11* | 0,08±0,01(p53) | 5,6±1,22* | 6,7±0,18* |
| | 3,9±0,97* | 0,11±0,05(bcl2) | 4,9±0,76* | 5,9±0,22* |

* – обозначены достоверные отличия ($p < 0,05$) по отношению к контролю

Таблица 3

Количество ядросодержащих клеток в лимфоидных органах крыс Вистар при влиянии хрома ($M \pm m$)

| Показатели | | 1 группа | | | 2 группа |
|---|---|----------------|---------------------|----------------------|-------------------|
| | | 45-е сутки | 90-е сутки | 135-е сутки | |
| Тимус | масса, мг (n) | 234 ± 14 (30) | 250 ± 14 (22) | 164±6,97*,** (13) | 247 ± 8 (54) |
| | число тимоцитов на орган, × 10 ⁶ | 411 ± 30 (30) | 371 ± 33 (22) | 195±9*,** (13) | 434 ± 23 (54) |
| Селезенка | масса, мг | 1000 ± 31 (40) | 1076 ± 22** (22) | 757±28*,** (13) | 1042 ± 20 (54) |
| | число кариоцитов на орган, × 10 ⁶ | 1039 ± 41 (40) | 1002 ± 60 (22) | 589±22*,**,# (13) | 1031 ± 30 (54) |
| Костный мозг, число кариоцитов на орган, × 10 ⁶ | | 84 ± 3,73 (21) | 70 ± 1,31*, ** (22) | 83±2,34# (13) | 79 ± 3,12 (54) |

* – обозначены достоверные отличия ($p < 0,05$) по отношению к контролю, ** – 45 и 90 дней, 45 и 135 дней, # – 90 и 135 дней.

клеток, а также содержания эритроидных клеток.

Установленное нами снижение массы тимуса и числа тимоцитов крыс опытной группы во все сроки наблюдений может быть обусловлено перераспределением тимоцитов в связи с необходимостью пополнения пула лимфоцитов в периферической крови и периферических лимфоидных органах [5]. С другой стороны, причиной снижения количества клеток в тимусе может быть выявленное нами, особенно на 135 сутки исследования, значительное увеличение уровня проапоптотического белка p53 в кортикальной зоне тимуса. Одним из механизмов опустошения селезенки может быть угнетение пролиферации лимфоидных клеток, то есть убыль числа клеток может зависеть от их естественной миграции из органа на фоне сниженного воспроизводства [6]. Увеличение относительного и абсолютного числа клеток лимфоидного ряда в костном мозге, выявленное в миелограмме, можно объяснить поступлением лимфоцитов за счет клеток тимуса или селезенки, установленное в эксперименте, что обусловлено их мобилизацией и перераспределением в связи с необходимостью пополнения пула лимфоцитов

в данном органе [7,8]. Вместе с тем, увеличение количества лимфоидных клеток происходит за счет миграции в костный мозг внекостномозговых лимфоцитов, необходимой для стимуляции гемопоэза. Снижение количества миелоидных клеток и нейтрофилов, возможно, связано с механизмом мобилизации нейтрофилов из костного мозга в кровотоки. Причина уменьшения клеточности в лимфоидных органах может быть связана также с прямым повреждающим действием хрома на клетки, нарушающим энергетический обмен и приводящим к энергетическому дефициту [8]. Кроме того, в основе всех выявленных изменений может лежать активация процессов свободно-радикального окисления (СРО), так как известно, что одним из механизмов повреждения клеток является чрезмерная активация цепных свободно-радикальных реакций перекисного окисления липидов (ПОЛ) [6,9].

Заключение. Таким образом, длительное действие хрома на органы иммунной системы крыс Вистар проявляется: в снижении массы тимуса и числа тимоцитов, в том числе за счет индукции программированной гибели тимоцитов, в формировании комплекса структурно-функциональных изменений тимуса,

свидетельствующих об акцидентальной инволюции органа (выраженная клеточная реорганизация паренхимы и стромы, увеличения деструктивных форм тимоцитов, существенном снижении их числа в корковом веществе долек тимуса, снижении количества функционально специализированных ретикулоэпителиоцитов), а также в усилении апоптоза лимфоци-

тов в Т-зонах селезенки и лимфатических узлах; снижении массы селезенки и количества спленоцитов (за счет клеток лимфоидного ряда) и уменьшения уровня клеток миелоидного ряда, нейтрофилов и, напротив, в увеличении на протяжении всех сроков наблюдения количества лимфоидных клеток, а также содержания эритроидных клеток в костном мозге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ревич Б. А. К оценке влияния деятельности ТЭК на окружающую среду и здоровье населения. Проблемы прогнозирования. 2010; 4:87-99.
2. 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.

3. Киясов А. П. Современные технологии морфологических исследований: Методическое пособие для студентов, аспирантов и врачей-патологов. Казань: КГМУ; 2001.
4. Волчегорский И. А., Долгушин И. И., Колесников О. Л., Цейликман В. Э. Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптивных реакций организма. Челябинск: ЧГПУ;

2000.
5. Ярилин А. А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010.
6. Курляндский Б. А., Филов В. А., ред. Общая токсикология. М.: Медицина; 2002.
7. O'Brien P., Kortenkamp A. Chemical models important in understanding the ways in which chromate can damage DNA. Environ Health Perspect. 1994;

102 (Suppl. 3): S 3-10.
8. Изтлеутов М. К. Патогенез нарушений гомеостаза, вызванных избыточным поступлением хрома в организм, и пути их коррекции: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2004.
9. Valko M., Morris H., Cronin M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr. Med. Chem. 2005; 12:1161-1208.

REFERENCES:

1. Revich B.A. To assess the impact of FEC on the environment and human health. Problemy prognozirovaniya. 2010; 4:87-99 (in Russian).
2. 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).

3. Kiyasov A.P. Modern technology of the morphological studies: Toolkit for students, post-graduate and doctors-pathologists. Kazan': KGMU; 2001 (in Russian).
4. 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).

5. Yarin A.A. Immunology. Moscow: GEOTAR-Media; 2010 (in Russian).
6. Kurlyandskiy B.A., Filov V.A., red. General Toxicology. Moscow: Meditsina; 2002 (in Russian).
7. O'Brien, P., Kortenkamp A. Chemical models important in understanding the ways in which chromate can damage DNA. Environ Health Perspect. 1994; 102 (3): 3-10.

8. Iztleutov M.K. Patogenez of violations of the homeostasis caused by excess intake of chrome in an organism, and ways of their correction: Dr. med. sci. diss. Moscow ; 2004 (in Russian).
9. Valko M., Morris H., Cronin M. T. Metals, toxicity and oxidative stress. Curr. Med. Chem. 2005; 12:1161-1208.

A.I. Smolyagin, I.V. Mikhaylova, E.V. Ermolina, A.A. Stadnikov, V.M. Boev

INFLUENCE OF POTASSIUM BICHROMATE ON MORPHOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF WISTAR RATS

State Budgetary Educational Institution «Orenburg State Medical Academy», Ministry of Health of Russia, 460000 Orenburg, Russian Federation

The impact of Potassium Bichromate (at 1 MAC dose) on morphological and immunological parameters of Wistar rats lymphoid organs was investigated in a chronic experiment (135 days). A lasting uptake of chromium by the Wistar rat organism induces a decrease of thymus mass and thymocytes number, causes a complex of structural and functional alterations evidencing about the status of accidental involution, lymphoreticular hyperplasia and plasmocytic and macrophage transformation of lymphoid nodes and spleen, induces a programmed death of thymocytes and lymphocytes in splenic T-zones and lymphoid nodes. Chromium induces morpho-functional changes in spleen shown by decrease in its weight and number of splenocytes, lymphoid series cells and on the contrary by increase of erythroid series cells. The impact of chromium on the bone marrow was evident in a decreased level of myeloid series, neutrophils and on the contrary in increased amount of lymphoid cells and the content of erythroid cells as well.

Keywords: Chromium, lymphoid organs, rats .

Переработанный материал поступил в редакцию 05.02.2015 г.