

УДК 569.323.4:615.777.9:615.7

ИЗУЧЕНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ ВЛИЯНИЯ ВАНАДИЯ И ХРОМА НА НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА КРЫС

Балабекова М.К.

Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, Алматы, e-mail: balabekovamarina@mail.ru

В работе исследовано влияние ванадата аммония и бихромата калия на состояние Т-клеточного звена иммунитета у крыс. Проведены 2 серии экспериментов, в каждой серии было по 26 животных. Затравку животных ванадатом аммония и бихроматом калия проводили в течение двух недель из расчета по 5 мг/кг массы тела перорально при помощи металлического зонда. Оценку иммунного статуса проводили с помощью методик по определению в крови: общего количества лейкоцитов, лейкоформулы; спонтанного и индуцированного НСТ теста, спонтанного и индуцированного фагоцитоза; общего количества лимфоцитов и их субпопуляций (CD3 + , CD4 + , CD8 +) реакцией поверхностной иммунофлюоресценции с помощью набора неконъюгированных моноклональных антител. Результаты экспериментальных исследований и проведенный корреляционный и факторный анализ показали, что под влиянием соединений ванадия и хрома снижаются метаболические и фагоцитарные функции нейтрофилов, хелперно-супрессорная активность лимфоцитов, а также общее содержание лейкоцитов периферической крови.

Ключевые слова: тяжелые металлы, ванадий, хром, крысы, иммунный статус, эксперимент, CD-рецепторы

A STUDY IN THE EXPERIMENT, THE EFFECT OF VANADIUM AND CHROMIUM ON ANALYTICAL CELLULAR IMMUNITY RATS

Balabekova M.K.

Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Almaty, e-mail: balabekovamarina@mail.ru

The influence of ammonium vanadate and potassium dichromate on the state of T-cell immunity in rats. Two series of experiments were conducted, within each series were 26 animals. Seeded animals ammonium vanadate and potassium dichromate was conducted for two weeks at the rate of 5 mg/kg body weight orally by a metal probe. Evaluation of the immune status were performed using methods for determining blood: total leukocyte leukoformuly; spontaneous and stimulated NBT test, spontaneous and induced phagocytosis; the total number of lymphocytes and their subsets (CD3 + , CD4 + , CD8 +) reacting the surface with immunofluoristsentsii pomoshchu set unconjugated monoclonal antibodies. The results of experimental studies and correlation and factor analysis showed that under the influence of vanadium and chromium reduced metabolic and phagocytic function of neutrophils, helper-suppressor activity of lymphocytes, as well as the total amount of peripheral blood leukocytes.

Keywords: heavy metals, vanadium, chromium, rats, immune status, experiment, CD – receptors

Вопрос о влиянии биогеохимических характеристик среды обитания на состояние здоровья человека, а именно на иммунный статус при микро- и макроэлементозах, остается недостаточно изученным [1].

Повышенный уровень содержания различных токсических веществ, в том числе микроэлементов, в выбросах и стоках промышленных предприятий приводит к их накоплению в окружающей среде и в организме человека и изменению реактивности организма [2, 3]. Между тем темпы развития антропогенных изменений биосферы значительно опережают адаптационные возможности организма человека [4, 5]. Так как реакции адаптации проявляются в первую очередь на уровне регуляторных систем: нервной, эндокринной, иммунной, системы неспецифической резистентности, Черешнев В.А. с соавт. считают, что антропогенные факторы вносят свой дополнительный вклад в раздражительную нагрузку

и нередко приводят к срыву нормальных адаптационных процессов [6].

В связи с вышеизложенным целью настоящего исследования стало изучение влияния соединений тяжелых металлов на показатели клеточного звена иммунитета опытных и контрольных крыс.

Материал и методы исследования

В эксперимент взяты белые беспородные крысы-самцы массой тела 180–220 г, содержащиеся в стандартных условиях вивария. При проведении экспериментов руководствовались рекомендациями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и научных целях», Страсбург, 18 марта 1986 г. Получено решение локальной этической комиссии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова о проведении экспериментальных работ (протокол № 2 от 18.04.2013 г.).

Проведены 2 серии эксперимента (по 26 крыс в каждой серии): 1 серия – половозрелые крысы (контроль); 2 серия – половозрелые крысы + соединения тяжелых металлов.

Затравку животных ванадатом аммония (ВА) и бихроматом калия (БК) проводили в течение двух недель из расчета по 5 мг/кг массы тела перорально при помощи металлического зонда. Контроль за состоянием животных проводили визуально (по состоянию кожных покровов, активности, массе тела, сохранению инстинктов и т.д.), оценку иммунного статуса проводили с помощью методик по определению в крови:

1) общего количества лейкоцитов, лейкоформулы (по общепринятой методике);

2) спонтанного и индуцированного НСТ теста (тест восстановления нитросинего тетразолия), спонтанного и индуцированного фагоцитоза [7];

3) общего количества лимфоцитов и их субпопуляций (CD3+, CD4+, CD8+) реакцией поверхностной иммунофлюоресценции с помощью набора неконъюгированных моноклональных антител фирмы CALTAG Laboratories.

Оценка первого уровня иммунного статуса проводилась в медицинском центре «Иммунодиагностика».

Математическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ «STATISTICA-7». На первом этапе рассчитывали групповые показатели суммарной статистики – сред-

нюю арифметическую величину (M) и ошибку средней (m), а также проводили визуализацию распределения значений с помощью частотных гистограмм. Для выбора критерия оценки значимости парных различий проверяли соответствие формы распределения нормальному, используя критерий Шапиро – Уилка. Учитывая, что этим условиям удовлетворяла лишь часть эмпирических распределений признаков, проверку гипотезы о равенстве генеральных средних во всех случаях проводили с помощью критерия Ван Дер Вардена для независимых переменных. Нулевую гипотезу отвергали в случае $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Двухнедельная затравка соединениями тяжелых металлов приводила к статистически значимому снижению общего количества лейкоцитов в крови у опытных крыс по сравнению с контролем на 40,2% ($p = 0,0007$), что, по-видимому, происходило за счет статистически значимого снижения абсолютного содержания лимфоцитов в 2,2 раза ($p < 0,0001$) (табл. 1).

Таблица 1

Распределение средних показателей крови у крыс, затравленных соединениями тяжелых металлов, в сравнении с контролем

Показатели крови, (10 ⁹ г/л)	Контроль, (n = 26)			Металлы, (n = 26)			p***
	Mean/s*, %	Mean/s, абс.	КВ, % **	Mean/s, %	Mean/s, абс.	КВ, %	
Общих лейкоцитов	–	9,7/0,3	12,6	–	5,8/0,6	18,1	0,0007
Лимфоцитов	78,2/1,0	7,6/0,2	5,2	60,5/2,1	3,4/0,4	15,2	< 0,0001
Палочкоядерных	1,7/0,2	0,2	38,8	2,5/0,5	0,1	19,2	0,1328
Сегментоядерных	16,8/0,9	1,6	23,2	30,8/2,2	1,8	14,5	0,0001
Эозинофилов	0,9/0,2	0,1	76,8	1,8/0,4	0,1	11,4	0,0645
Моноцитов	2,4/0,2	0,2	43,4	4,5/0,4	0,3	16,7	0,0006

Примечания: * – M(CO) – среднее (стандартное отклонение); ** – коэффициент вариации; *** – по Van der Waerden Two-Sample Test уровень статистической значимости по отношению к контролю.

Коэффициент вариации обоих показателей крови был выше на 43,6 и 192,3% соответственно по сравнению с контролем, что свидетельствовало о наибольшей изменчивости данных опытных крыс.

Результаты исследования иммунологических показателей крыс, подвергавшихся воздействию ВА и БК, приведены в табл. 2. Исследование функции нейтрофилов в индуцированном пирогедалом НСТ-тесте показало, что под влиянием ВА и БК последовало статистически значимое увеличение их метаболической активности на 9,1% ($p = 0,0291$).

Вместе с тем статистически значимого повышения фагоцитарной активности нейтрофилов не последовало.

Анализ состояния клеточного звена иммунитета путём определения общего количества лимфоцитов и их субпопуляций (CD3+, CD4+, CD8+) показал, что в опытной серии эксперимента их уровень оказался статистически значимо ниже контрольных значений ($p < 0,0001$) (табл. 3).

С целью выявления связи между изучаемыми показателями иммунного статуса крыс группы «Хром + Ванадий» был проведен корреляционный анализ. Структура зависимости показателей иммунного статуса крыс, подвергавшихся воздействию ВА и БК, отражающая скрытую связь между изучаемыми переменными, представлена в корреляционной матрице (табл. 4).

Таблица 2

Распределение средних показателей спонтанной и индуцированной активности нейтрофилов в НСТ-тесте у крыс, затравленных соединениями тяжелых металлов, в сравнении с контролем

Показатель	Контроль, n = 26			Shapiro-Wilk ***	Хром + Ванадий, n = 26			Shapiro-Wilk	p ****
	М (СО)*	95% ДИ	КВ**		М (СО)	95% ДИ	КВ		
НСТ спонт., %	16,6 (2,7)	15,6–17,7	16,1	0,0485	18,0 (3,3)	16,7–19,3	18,1	0,2684	0,1695
НСТ индуц., %	36,3 (4,9)	34,3–38,2	13,4	0,0035	39,6 (6,0)	37,1–42,0	15,2	0,5197	0,0291
ФГ спонт., %	15,3 (2,8)	14,2–16,4	18,0	0,4528	17,0 (3,3)	15,7–18,3	19,2	0,0138	0,0660
ФГ индуц., %	35,3 (5,4)	33,1–37,5	15,4	0,4287	38,3 (5,6)	36,1–40,6	14,5	0,9852	0,0620

Примечания: * – М (СО) – среднее (стандартное отклонение); ** – коэффициент вариации; *** – нормальность распределения; **** – по Van der Waerden Two-Sample Test уровень статистической значимости по отношению к контролю.

Таблица 3

Распределение средних показателей CD3+, CD4+, CD8+ лимфоцитов у крыс, затравленных соединениями тяжелых металлов, в сравнении с контролем

Показатель	Контроль, n = 26			Shapiro-Wilk ***	Хром + Ванадий, n = 26			Shapiro-Wilk	p ****
	М (СО)*	95% ДИ	КВ**		М (СО)	95% ДИ	КВ		
CD3+, абс.	5,6 (0,8)	5,2–6,0	13,9	0,0536	1,9 (0,8)	1,4–2,4	40,6	0,0225	< 0,0001
CD3+, %	73,8 (2,6)	72,5–75,1	3,5	0,8038	55,2 (2,3)	53,7–56,6	4,2	0,9885	< 0,0001
CD4+, абс.	2,5 (0,5)	2,3–2,8	19,5	0,0138	0,5 (0,2)	0,4–0,7	41,8	0,0654	< 0,0001
CD4+, %	44,5 (4,1)	42,4–46,5	9,2	0,0048	28,1 (2,6)	26,5–29,6	9,2	0,3232	< 0,0001
CD8+, абс.	1,7 (0,3)	1,5–1,8	15,9	0,2608	0,5 (0,2)	0,4–0,6	42,0	0,2531	< 0,0001
CD8+, %	29,8 (2,9)	28,3–31,2	9,8	0,1831	26,6 (4,0)	24,2–29,1	15,2	0,0044	0,0347
CD4+/CD8+	1,5 (0,3)	1,4–1,6	18,6	0,0223	1,0 (0,3)	0,8–1,2	19,3	0,0033	< 0,0001

Примечания: * – М (СО) – среднее (стандартное отклонение); ** – коэффициент вариации; *** – нормальность распределения; **** – по Van der Waerden Two-Sample Test уровень статистической значимости по отношению к контролю.

Таблица 4

Корреляционная матрица показателей иммунного статуса крыс, подвергавшихся воздействию соединений тяжелых металлов

Переменная	ОЛ	Л	НСТс	НСТи	ФГс	ФГи	CD3+	CD4+	CD8+
Общих лейкоцитов (ОЛ)	1,0								
Лимфоцитов (Л)	0,81*	1,0							
НСТ спонт. (НСТс)	0,06 (0,554)	0,10 (0,331)	1,0						
НСТ индуц. (НСТи)	0,064 (0,554)	0,06 (0,582)	0,80*	1,0					
ФГ спонт. (ФГс)	–0,02 (0,884)	0,03 (0,785)	0,85*	0,70*	1,0				
ФГ индуц. (ФГи)	–0,02 (0,823)	0,02 (0,818)	0,79*	0,80*	0,84*	1,0			
CD3+, абс.	0,65*	0,84*	0,037 (0,755)	0,03 (0,802)	–0,03 (0,824)	0,03 (0,791)	1,0		
CD4+, абс.	0,62*	0,81*	0,033 (0,781)	0,02 (0,875)	–0,06 (0,644)	0,0004 (0,998)	0,97*	1,0	
CD8+, абс.	0,54 (0,536)	0,72*	0,03 (0,812)	0,001 (0,994)	–0,02 (0,896)	0,007 (0,954)	0,93*	0,86*	1,0

Примечание. * – коэффициенты корреляции значимы при $p < 0,0001$, в скобках приведены достигнутые уровни значимости.

Максимальный уровень корреляции (0,90466, $p < 0,001$) в контрольной группе был достигнут между признаками «НСТ спонтанный» и «НСТ индуцированный», тогда как в группе «Хром + Ванадий» эта связь слабее (0,80029, $p < 0,001$).

Обнаружена положительная корреляционная связь между увеличением абсолютного содержания лимфоцитов и общего количества лейкоцитов (0,90197, $p < 0,0001$) в группе «Контроль», так же, как и сильная положительная корреляция между уменьшением абсолютного содержания лимфоцитов и общего количества лейкоцитов (0,81204, $p < 0,0001$) в группе «Хром + Ванадий».

Состояние хелперно-супрессорной активности CD4+, CD8 + субпопуляций Т-лимфоцитов положительно коррелировало с содержанием CD3 + лимфоцитов

($r = 0,97$; $r = 0,93$; $p < 0,0001$). Также уменьшение абсолютного содержания лимфоцитов приводило к уменьшению всех изучаемых субпопуляций лимфоцитов ($r = 0,84$ $r = 0,81$; $r = 0,72$; $p < 0,0001$).

Описываемая корреляционная матрица используется в качестве исходной информации для определения главных факторов (табл. 5). Основной задачей факторно-аналитического подхода, кроме сжатия информации, является физиологическая смысловая интерпретация данных. Значительно легче интерпретировать полученные факторы, используя для получения простой структуры процедуру вращения факторов. В наших исследованиях используется «варимакс» вращение. Указанный аналитический метод приводит к еще большему увеличению больших и уменьшению малых нагрузок факторов.

Таблица 5

Факторная модель показателей иммунного статуса крыс, подвергавшихся воздействию ВА и БК (матрица факторных нагрузок после процедуры вращения «варимакс»)

Переменная	Нагрузки для факторов	
	Фактор 1 (F ₁)	Фактор 2 (F ₂)
НСТ спонт., %	0,894250	-0,028274
НСТ индуц., %	0,913055	-0,002645
ФГ спонт., %	0,857319	-0,016029
ФГ индуц., %	0,863014	0,002517
Общих лейкоцитов	0,007111	0,136281
Лимфоцитов, %	0,011983	0,941991
Сегментоядерных, %	-0,011311	-0,945703

Из представленной таблицы видно, что в первом факторе 4 признака имеют большие нагрузки. Эти признаки характеризуют метаболическую и фагоцитарную активность нейтрофилов. Причем спонтанная метаболическая активность нейтрофилов в первом наиболее значимом компоненте с факторной нагрузкой +0,894 имеет сильную прямую ассоциацию с индуцированной (+0,913), а спонтанная фагоцитарная активность (+0,857) – среднюю прямую ассоциацию с индуцированной (+0,863). Второй фактор образовали признаки, характеризующие такие показатели крови, как процентное содержание лимфоцитов и сегментоядерных нейтрофилов. Матрица повернутых компонентов показала, что процентное содержание сегментоядерных нейтрофилов у крыс, затравленных соединениями тяжелых металлов, имеет отрицательную корреляционную зависимость

(векторная нагрузка -0,946) от процентного содержания лимфоцитов (0,942). Из представленных в табл. 1 результатов исследования периферической крови видно, что относительное и абсолютное содержание лимфоцитов у крыс, затравленных ВА и БК, по сравнению с контролем снижалось на 22,6 и 55,3 % соответственно, тогда как относительное и абсолютное содержание сегментоядерных нейтрофилов повышалось на 83,3 и 12,5 % соответственно.

Заключение

На основании приведенных экспериментальных данных можно заключить, что под влиянием соединений ванадия и хрома снижаются метаболические и фагоцитарные функции нейтрофилов, хелперно-супрессорная активность лимфоцитов, а также общее содержание лейкоцитов периферической крови.

Благодарности. Автор выражает благодарность редактору Биометрики Леонову В.П. за помощь в проведении статистического анализа экспериментальных данных.

Список литературы

1. Волков С.Н. Геохимическая эволюция кадмия в естественном и техногенном циклах миграции // Техногенез и биогеохимическая эволюция таксонов биосферы: тр. биохим. лаб. – М.: Наука, 2003. – Т. 24. – С. 113–141.
2. Фролова Т.В., Охупкина О.В. Роль дисбалансу мікро_ і макроелементів у формуванні хронічної патології дітей. Перинатологія і педіатрія. – 2013. – № 4(56). – С. 127–133.
3. Балабекова М.К. Хелперно-супрессорная активность лимфоцитов у крыс с экспериментальным воспалением. Современные проблемы гуманитарных и естественных наук: материалы IV международной научно-практической конференции 18–20 октября 2010 г.: в 2-х т. Т. 2 – М., 2010. – С. 184–186.
4. Скальный А.В. Биоэлементы в медицине / А.В. Скальный, И.А. Рудаков. – М.: Мир, 2003. – 272 с.
5. Василенко И.Я. Медицинские проблемы техногенного загрязнения окружающей среды / И.Я. Василенко, О.И. Василенко // Гигиена и санитария. – 2006. – № 1. – С. 22–25.
6. Черешнев В.А., Кеворков Н.Н., Бахметьев Б.А. и др. Физиология иммунной системы и экология // Иммунология. – 2001. – № 3. – С. 12–16.
7. Фрадкин В.А. Диагностика аллергии реакциями нейтрофилов крови. – М.: Медицина. – 1985. – 170 с.

References

1. Volkov S.N. Geokhimitskaya evolyuciya kadmiya v estestvennom i tekhnogenom ciklakh migracii // Tekhnogenez I biokhimitskaya evolyuciya taksonov biosfery: tr. biokhim. lab M.: Nauka, 2003. T. 24. pp. 113–141.
2. Frolova T.V., Okhapkina O.V. Rol disbalansa mikro I makroelementov v formirovanii khronicheskoi patologii u detei. Perinatologiya I pediatriya. 4(56). 2013. pp. 127–133.
3. Balabekova M.K. Khelperno-supressornaya aktivnost limfocitov u kryс s eksperimentalnym vospaleniem. Sovremennye problem gumanitarnykh I estestvennykh nauk: Materialy IV mezhdunarodnoi nauchno-prakticheskoi konferencii 18–20 oktyabrya 2010 g.: v 2-ch t. Tom 2 Moskva. 2010. pp. 184–186.
4. Skalny A.V. Bioelementy v medicine / A.V. Skalny, I.A. Rudakov. M.: Mir, 2003. 272 p.
5. Vasilenko I.Ja. Medicinskie problemy tekhnogenogo zagrjaznenija okruzhajushhej sredy / I.Ja. Vasilenko, O.I. Vasilenko // Gigiena i sanitarija. 2006. no. 1. pp. 22–25.
6. Chernyshov V.A., Kevorkov N.N., Bachmetev B.A. i dr. Fiziologiya immunnoi sistemy I ekologiya // Immunologiya. 2001. no. 3. pp. 12–16.
7. Fradkin V.A. Diagnostika allergii reakciyami neitrofilov krovi. M.: Medicina. 1985. 170 p.

Рецензенты:

Пичхадзе Г.М., д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии, КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы;

Шортанбаев А.А., д.м.н., профессор, зав. кафедрой иммунологии, КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы.

Работа поступила в редакцию 29.09.2014.