

ИЗМЕНЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ АЦЕТАТОМ СВИНЦА

CHANGES IN HEMATOLOGICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL PARAMETERS OF WHITE RAT BLOOD DURING LEAD ACETATE INTOXICATION

**O. Komusova
O. Shubina
O. Kirdyashkina**

Summary. This study is aimed at studying the leukogram and leukocyte indices of blood, T — and B — lymphocyte subpopulations to assess the state and functioning of the cellular and humoral immunity in acute lead acetate intoxication. Studies have shown that the introduction of lead acetate in animals of the experimental group showed changes in the leukogram and leukocyte indices, the content of CD3, CD4, CD8, CD20-lymphocytes, indicating the course of pathological processes, disruption of the cellular and humoral links of immunity, inhibition of immunoreactivity caused by the action of lead acetate.

Keywords: blood, lymphocytes, cellular immunity, humoral immunity, leukogram.

Комусова Ольга Ивановна

К.б.н., ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический университет имени М.Е. Евсевьева»

(г. Саранск)

timoshkina03@mail.ru

Шубина Ольга Сергеевна

Д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический университет имени М.Е. Евсевьева» (г. Саранск)

os.shubina@mail.ru

Кирдяшкина Ольга Викторовна

Аспирант, ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический университет имени М.Е. Евсевьева»

(г. Саранск)

Sigma.ov@mail.ru

Аннотация. Данное исследование направлено на изучение лейкограммы и лейкоцитарных индексов крови, субпопуляции Т- и В- лимфоцитов для оценки состояния и работы клеточного и гуморального звена иммунитета при острой интоксикации ацетатом свинца. Исследования показали, что при введении ацетата свинца у животных опытной группы отмечались изменения, в лейкограмме и лейкоцитарных индексах, содержании CD3, CD4, CD8, CD20-лимфоцитов, указывающие на протекание патологических процессов, нарушение работы клеточного и гуморального звеньев иммунитета, угнетение иммунореактивности, вызванные действием ацетата свинца.

Ключевые слова: кровь, лимфоциты, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, лейкограмма.

Введение

Изучение лейкоцитарного профиля в норме и при различных воздействиях является традиционным и важнейшим направлением современной гематологии. Несмотря на большое число исследований в данном направлении и с учетом выраженной защитной функции и высокой реактивности лейкоцитов периферической крови представляется целесообразным изучение их количественного содержания для оценки степени эндогенной интоксикации животного организма, клеточного и гуморального звеньев иммунитета при подостром отравлении соединениями свинца [1,2,4].

Цель выполнения исследования

Выявить закономерности изменений лейкограммы, лейкоцитарных индексов крови, оценить экспрессию субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у крыс при подострой интоксикации ацетатом свинца.

Материалы и методы исследования

Данное исследование проведено на 50 белых беспородных половозрелых крысах-самцах, которые были разделены на 2 группы. Контрольная группа находилась на общем режиме вивария. Опытная группа получала в течение 7 суток перорально ацетат свинца

Таблица 1. Лейкограмма крови крыс (M±s)

Показатель	Контроль	Опыт
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	6,8±0,3	7,2±0,2*
Палочкоядерные нейтрофилы,%	2,4±1,4	5,6±1,0*
Сегментоядерные нейтрофилы,%	16,2±1,9	17,3±0,9**
Эозинофилы,%	3,1±1,0	9,3±0,9*
Базофилы,%	1,8±0,8	1,0±0,4*
Моноциты,%	4,1±1,5	2,3±0,5*
Лимфоциты,%	72,3±2,6	64,3±1,6*

Примечание: * — достоверно по отношению к контролю $P \leq 0,01$; ** — достоверно по отношению к контролю $P \leq 0,05$; # — достоверно по отношению к опыту 1 $P \leq 0,01$; ## — достоверно по отношению к опыту 1 $P \leq 0,05$.

Pb(CH₃COO)₂·3H₂O в дозе 45 мг/кг/сутки (в пересчете на свинец), что соответствует подострой интоксикации экспериментальных животных [4,5].

В работе применялись высокоинформативные методы исследования периферической крови: гематологические, иммуноцитохимические, статистические.

Периферическую кровь получали из хвостовой вены крысы под наркозом смеси эфира с хлороформом (1:1) перед декапитацией.

Мазки крови окрашивали по методу Романовского — Гимзы. Лейкоциты подсчитывали в камере Горяева. Относительное содержание лейкоцитов определяли путем цитологического исследования мазков крови [1,3,5].

Расчет индексов производился на основании данных лейкограммы.

Для получения характеристики Т-клеточного звена циркулирующих лимфоцитов оценивалась экспрессия маркеров CD3, CD4, CD8. Для оценки В-системы иммунитета (гуморального звена) определялось количество В-лимфоцитов (CD20).

Согласно инструкции фирмы производителя Dako (Дания) суспензию лимфоцитов раскапывали на стеклах с лунками, предварительно обработанными 0,1% поли-L-лизинном (Serva, Германия). В каждую лунку вносили по 20 мкл клеточной взвеси в концентрации 5×10⁶/мл. Инкубировали в течение 30 мин во влажной камере. Фиксировали 70% этиловым спиртом 10 мин. После фиксации клетки отмывали в фосфатном буфере (PBS) 3 раза по 5 мин. Далее на приготовленные клетки наносили по 20 мкл специфических моноклональных антител (МКАТ) к CD-маркерам клеток: к CD3, к CD4, к CD8, к CD20 (в разведении 1/100), производства Dako (Дания) и PBS в качестве контроля для исключения пря-

мого иммуномечения (окрашивания) клеток вторичными антителами и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре во влажной камере. Затем стекла трижды отмывали в PBS, после чего на лунки наносили вторые связывающие антитела по 20 мкл с инкубацией 10 мин. Далее проводили трехкратную промывку стекол PBS. Затем на лунки наносили стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой, по 20 мкл с инкубацией 10 мин. Далее трехкратно промывали стекла PBS. Приготовленный *ex tempore* хромоген (3-диаминобензидин тетрагидрохлорид) наносили по 30 мкл на лунку на 10 мин. и смывали его дистиллированной водой. Стекла подсушивали [5].

Визуализацию и подсчет иммунопозитивных клеток проводили с помощью бинокулярного светового микроскопа (Axioscop «Carl Zeiss», Германия). Увеличение: объектив ×100, окуляр ×10. CD-позитивные клетки имели отчетливое коричневое окрашивание. Определяли среднее содержание клеток, экспрессирующих CD белки [5].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 8.0. Для проверки статистических гипотез использовали t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых выборок. Результаты представлены как среднее ± стандартное отклонение (s). Критический уровень значимости $p \leq 0,01$, $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При изучении показаний лейкограммы контрольных животных было установлено, что изучаемые показатели крови находились в пределах физиологической нормы (табл. 1) [1,2]. В тоже время в лейкограмме опытных животных наблюдались значительные изменения, что свидетельствует о воздействии свинца на клетки крови и органы лейкопоза и демонстрирует признаки интоксикации (табл. 1).

Таблица 2. Лейкоцитарные индексы крови у крыс ($M \pm s$)

Показатель, усл.ед	Контроль	Опыт
Индекс Кребса	0,2±0,04	0,3±0,03*
Лейкоцитарный индекс	3,9±0,5	2,8±0,2*
Лейкоцитарный индекс интоксикации	0,2±0,03	0,3±0,03*
Индекс сдвига лейкоцитов крови	0,3±0,04	0,5±0,04*
Индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов	22,1±9,6	28,1±5,0*

Примечание: * — достоверно по отношению к контролю $P \leq 0,01$; * — достоверно по отношению к опыту 1 $P \leq 0,01$.

Таблица 3. Содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у крыс, % ($M \pm s$)

Субпопуляция лимфоцитов	Контроль	Опыт
CD3	45,1±2,6	36,2±1,8*
CD4	31,7±2,5	20,5±1,0*
CD8	18,4±1,4	8,6±0,4*
CD20	22,0±1,3	13,1±0,6*

Примечание: * — достоверно по отношению к контролю $P \leq 0,01$; * — достоверно по отношению к опыту 1 $P \leq 0,01$.

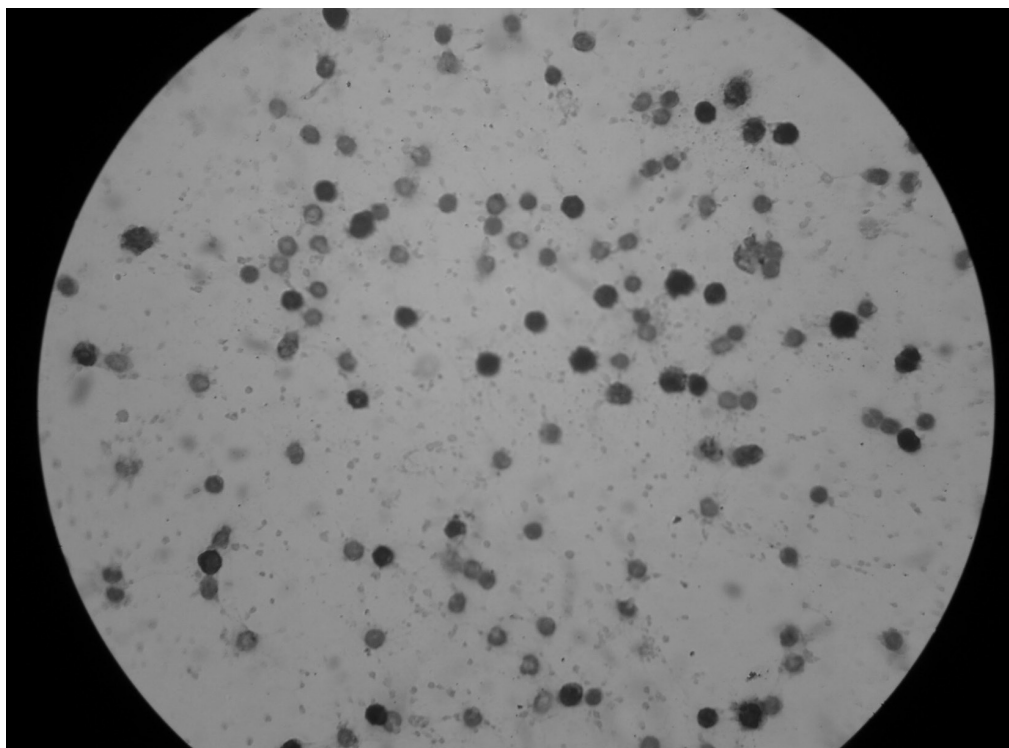


Рис. 1. Субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3) в периферической крови у крыс (контроль). Окрашивание (иммуномечение) моноклональными антителами к CD3-маркеру клеток. Об. 100 × ок. 10.

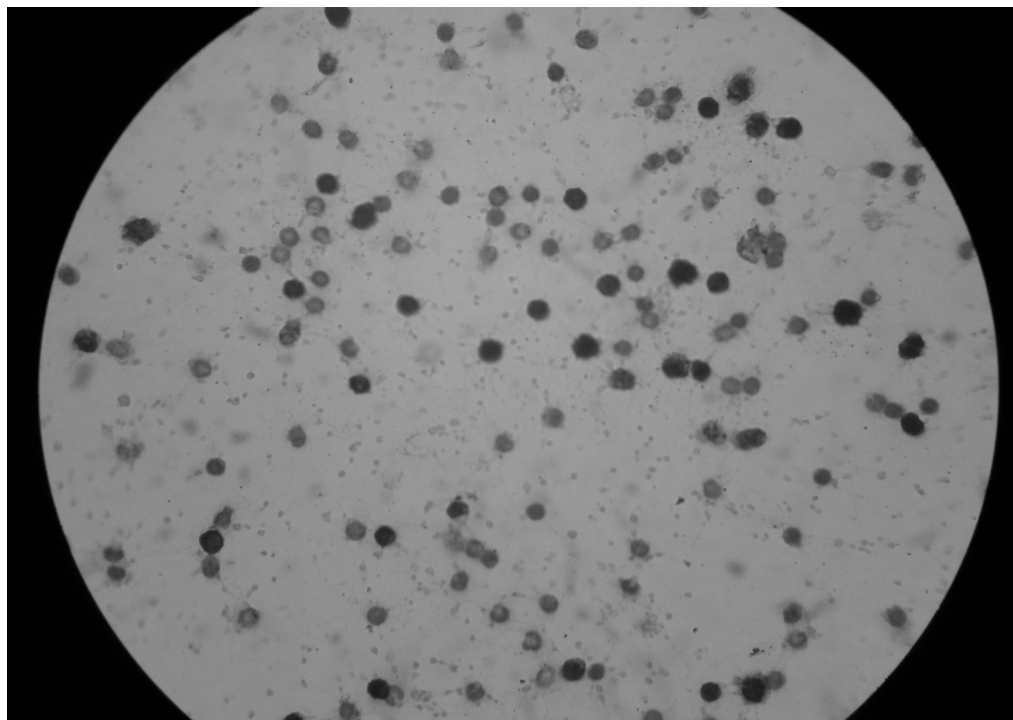


Рис. 2. Субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3) в периферической крови у крыс (опыт 1). Окрашивание (иммуномечение) моноклональными антителами к CD3-маркеру клеток. Об. 100 × ок. 10.

В крови животных, получавших ацетат свинца, наблюдался умеренный рост общего количества лейкоцитов (на 5,2%, $p \leq 0,01$). При этом произошло существенное увеличение количества палочкоядерных нейтрофилов (на 127,8% ($p \leq 0,01$), при умеренном росте концентрации сегментоядерных (на 6,4%, $p \leq 0,05$). Обращает на себя внимание резкое увеличение под влиянием свинцовой интоксикации количества эозинофилов (в 2,95 раза, $p \leq 0,01$), при существенном уменьшении содержания базофилов (на 42,7%, $p \leq 0,01$), моноцитов (на 41,9%, $p \leq 0,01$) и лимфоцитов (на 11%, $p \leq 0,01$, табл. 1).

В качестве оценки интоксикации организма крысы провели анализ лейкоцитарных индексов, который показал, что в опытной группе по сравнению с контрольной, наблюдалось увеличение индекса Кребса (на 38,4%, $p \leq 0,01$), лейкоцитарного индекса интоксикации (на 25%, $p \leq 0,01$), индекса сдвига лейкоцитов крови (на 61,3%, $p \leq 0,01$), индекса соотношения лимфоцитов и моноцитов крови (на 26,9%, $p \leq 0,01$), уменьшение лейкоцитарного индекса (на 28,8%, $p \leq 0,01$), (табл. 2).

Совокупность изменения индексов указывает на течение в организме патологического процесса, сопровождающегося разрушением и сбоем в работе иммунной системы. Это выразилось в стойком повышении пока-

заний всех индексов, за исключением лейкоцитарного, величина которого понизилась вследствие увеличения относительного содержания нейтрофилов.

При оценивании экспрессии маркеров CD3, CD4, CD8, характеризующих работу Т-клеточного звена циркулирующих лимфоцитов так же был обнаружен ряд изменений в сравнении с показаниями контрольной группы животных (табл. 3).

Отмечалось уменьшение содержания CD3, CD4, CD8-лимфоцитов на 20%, 35%, 53% ($p \leq 0,01$). Полученные данные свидетельствуют о возникновении иммунодефицита по клеточному типу, ослабевании цитотоксической и супрессорной функций.

При оценивании работы В-системы иммунитета основным определяемым маркером В-лимфоцитов являлся CD20. В сравнении с показателями контрольной группы, в опытной группе отмечалось снижение CD20-лимфоцитов на 40% ($p \leq 0,01$), что указывает на нарушения в работе гуморального иммунитета и нарушение продукции антител (табл. 3).

Выводы

Получение крысами течение 7 суток перорально ацетат свинца $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$ в дозе 45 мг/кг/сут-

ки привело к резким изменениям в лейкоцитарной формуле: более чем двукратному росту числа палочкоядерных нейтрофилов и еще более значительному увеличению содержания эозинофилов при существенном снижении относительного содержания базофилов и лимфоцитов.

Так же, у животных опытной группы отмечались изменения, в лейкоцитарных индексах, содержании CD3, CD4, CD8, CD20-лимфоцитов, указывающие на протекание патологических процессов, нарушение работы клеточного и гуморального звеньев иммунитета, угнетение иммунореактивности, вызванные действием ацетата свинца.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бышевский, А.Ш. Неспецифическая коррекция изменений гемостаза при заболеваниях, протекающих с гиперкоагуляцией / А.Ш. Бышевский, С.И. Галян, В.А. Полякова // *Фундаментальные исследования*. — 2008. — № 2. — С. 29–36.
2. Васильев, Ю.Г. Ветеринарная клиническая гематология / Ю.Г. Васильев // *Учебное пособие*. Гриф УМО вузов России (+ DVD/ Лань, 2020. — 687 с.
3. Дубынин, В.А. Регуляторные системы организма человека: учеб. пособие для студ. вузов / В.А. Дубынин, А.А. Каменский, М.Р. Сапин. — М.: Дрофа, 2010. — 365 с.
4. Кобец, Т.В. Интегральные лейкоцитарные индексы как критерий оценки тяжести течения эндогенной интоксикации и эффективности проводимого лечения у детей с атопическим дерматитом [Электронный ресурс] / Т.В. Кобец [и др.] // *От научных разработок к внедрению в практику: педиатрия и детская хирургия: материалы VI Всерос. науч.-практ. конф., 4–5 окт. 2012 г. / под ред. Т.И. Текученко; КГМУ им. С.И. Георгиевского*. — Алушта, 2012. — Режим доступа: URL: <http://drcobez.narod.ru/st>
5. Семченко, В.В. Гистологическая техника: учебное пособие / В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.И. Ноздрин, В.Н. Артемьев. — Омск-Орел: Омская областная типография. — 2006. — 290 с.

© Комусова Ольга Ивановна (timoshkina03@mail.ru),

Шубина Ольга Сергеевна (os.shubina@mail.ru), Кирдяшкина Ольга Викторовна (Sigma.ov@mail.ru).

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Мордовский государственный педагогический институт имени М.Е. Евсевьева