

Влияние органических и неорганических экотоксикантов на некоторые показатели иммунной системы крыс

Л.А. Чеснокова, к.б.н., И.В. Михайлова, д.б.н., Д.С. Карманова, ассистент, ГБОУ ВПО Оренбургский ГМУ

Известно, что к группе длительно персистирующих в окружающей среде веществ относятся тяжёлые металлы и хлорорганические пестициды. Широко распространённая группа гербицидов — производных 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д), содержащих хлорированное бензольное кольцо, вызывают инициацию радикальных реакций, которые приводят к многочисленным невыгодным изменениям в тканях [1]. Хром входит в группу тяжёлых металлов, особенность циркуляции которых в окружающей среде определяется их устойчивостью, биодоступностью и вероятностью вызывать негативные эффекты в весьма низких дозах [2]. Электронная конфигурация другого тяжёлого металла — железа, позволяющая осуществлять одноэлектронные переносы, предопределяет этот элемент в качестве основного компонента образования и метаболизма свободных радикалов в биологических системах [3].

Многие экотоксиканты уже при низкодозированном поступлении способны влиять на различные системы и органы, в том числе на иммунную систему, которая отвечает на любой контакт с химическими веществами на самых ранних этапах. Представляет интерес изучение нетоксичных концентраций металлов переменной валентности Cr^{6+} , Fe^{2+} и гербицида 2,4-Д на изменения органов иммунной системы, что и послужило целью данного исследования.

Материал и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено на 121 особи здоровых половозрелых крыс-самцов линии Вистар массой 250–300 г. Все животные содержались на стандартном пищевом рационе и были разделены на группы. Особи I гр. (контроль) получали питьевую бутилированную воду. Крысы II гр. вместе с водой получали железо (П) в дозе, равной 1 ПДК, III гр. — с питьевой водой 2,4-Д диметиламмониевую соль в концентрации, равной 1 ПДК. Животным IV гр. в воду добавляли смесь железа и 2,4-Д в указанных дозах, аналоги V гр. получали с питьевой водой хром (VI), доза соответствовала 1 ПДК [4].

Через 45 сут. животные выводились из эксперимента летальной дозой эфирного наркоза. Эксперименты проведены в соответствии с этическими нормами и рекомендациями по гуманизации работы с лабораторными животными («Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей», Страсбург, 1985).

Интенсивность процессов липопероксидации

в сыворотке крови и тканях определяли по содержанию малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) по реакции с тиобарбитуровой кислотой спектрофотометрическим методом [5]. Содержание в сыворотке крови животных интерлейкина-6 (ИЛ-6) и фактора некроза опухоли (ФНО- α) устанавливали методом твердофазного иммуноферментного анализа с помощью наборов реактивов R&D Systems (США). Массу тимуса и селезёнки, численность клеток в тимусе, селезёнке и костном мозге определяли в соответствии с методами экспериментальной иммунологии [6]. Кровь центрифугировали при 2600 об/мин в течение 10 мин. для разделения на плазму и эритроциты. В лизатах эритроцитов определяли активность супероксиддисмутазы (СОД) по скорости аутоокисления адреналина в адренохром и активность каталазы кинетическим методом путём прямой регистрации разложения пероксида водорода [7]. Исследования выполнялись на спектрофотометре Genesys 5 (США). Математические расчёты выполнены с помощью пакета статистического анализа Microsoft Excel, независимые выборки сравнивали с помощью U-критерия Манна — Уитни.

Результаты исследования. Результатом воздействия Fe^{2+} и гербицида 2,4-Д на лимфоидные органы крыс явилось снижение массы тимуса и численности клеток в органе (табл. 1). В то же время масса селезёнки несколько увеличивалась под действием катионов железа и не изменялась в группе, употреблявшей 2,4-Д, но при этом число кариоцитов уменьшалось у животных обеих опытных групп, причём более значительное снижение численности тимоцитов и спленоцитов отмечено при совместном употреблении указанных веществ. Количество клеток в костном мозге при этом менялось разнонаправленно.

Отмеченное выше действие 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты, сопоставимое с воздействием железа, сопровождалось увеличением содержания провоспалительных цитокинов ИЛ-6 и ФНО- α в 1,3–1,5 раза относительно интактной группы при раздельном употреблении веществ и снижением их концентрации при сочетанном применении.

Воздействие хрома на лимфоидные органы крыс выражалось в снижении массы тимуса, селезёнки и количества клеток в этих органах (табл. 2.), а также клеточного состава селезёнки и костного мозга.

Проведённые нами исследования выраженности окислительных процессов показали способность к наращиванию ТБК-реактивных продуктов под действием нетоксичных концентраций железа и 2,4-ДА, что сопровождалось снижением активности антиоксидантных ферментов (табл. 3).

1. Влияние железа и 2,4-Д на количество ядродержащих клеток в лимфоидных органах и на продукцию цитокинов у крыс Вистар (n=8; X ± Sx)

| Показатель | Группа | | | | Достоверность отличий |
|---|----------------|----------------|----------------|---------------|-----------------------|
| | I (контроль) | II | III | IV | |
| Масса тимуса, мг | 256,22±19,20 | 243,25±38,82 | 217,31±39,09* | 225,18±29,7 | 0,01<P<0,05* |
| Число тимоцитов 106/орган | 610,94±79,60 | 578,50±106,47 | 532,41±119,47 | 121,50±35,41 | P >0,05 |
| Масса селезёнки, мг | 1246,50±43,63 | 1387,25±101,54 | 1269,32±86,42 | 1125,24±63,43 | P >0,05 |
| Число кариоцитов, 106/орган | 1100,11±123,20 | 1043,5±139,16 | 917,431±148,31 | 793,25±88,85 | P >0,05 |
| Костный мозг, число кариоцитов, 106/орган | 120,83±13,80 | 132,5±27,49 | 101,76±24,04 | 110,25±25,36 | P >0,05 |
| ИЛ-6, пг/мл | 216,92±19,01 | 268,3±24,56 | 310,22±28,44* | 196,04±23,45 | 0,01<P<0,05* |
| ФНО-а, пг/мл | 18,7±2,47 | 23,56±2,86 | 24,7±3,92 | 8,41±1,85 | P >0,05 |

2. Влияние хрома на количество ядродержащих клеток в лимфоидных органах и на продукцию цитокинов спленоцитами крыс Вистар (X ± Sx)

| Показатель | | Группа | | Достоверность отличий |
|---|----------------------------|--------------|---------------|-----------------------|
| | | I (контроль) | V | |
| Тимус | масса, мг | 247±8(n=57) | 234±14 (n=32) | P >0,05 |
| | число тимоцитов 106/орган | 434±23 | 308±22 | P < 0,05 |
| Селезёнка | масса, мг | 1042±20 | 1000±31 | P >0,05 |
| | число кариоцитов 106/орган | 1031±30 | 1039±41 | P >0,05 |
| Костный мозг, число кариоцитов, 106/орган | | 79±3,12 | 84±3,73 | P >0,05 |
| ИЛ-4, пг/мл | | 4,58±0,86 | 15,64±4,88 | P < 0,05 |
| ИЛ-6, пг/мл | | 129,24±15,47 | 102,78±20,22 | P >0,05 |

3. Показатели интенсивности процессов ПОЛ и активности антиоксидантных ферментов в сыворотке животных под действием 2,4-Д и железа (X ± Sx)

| Показатель | Группа | | | | Достоверность отличий |
|--------------------|----------------|----------------|----------------|--------------|----------------------------|
| | I (контроль) | II | III | IV | |
| МДА сыв., мкмоль/л | 181,54±35,731 | 228,86±45,390 | 206,75±50,512 | 281,25±66,49 | P >0,05 |
| ДК сыв., мкмоль/л | 456,111±73,012 | 454,722±47,76 | 537,50±57,590 | 625,69±74,21 | P >0,05 |
| СОД, у.е./гНв | 257,0±26,192 | 159,04±8,025** | 157,81±9,031** | 155,58±9,79 | **P < 0,01 |
| Каталаза, у.е./гНв | 200,77±28,489 | 109,04±6,900** | 131,11±9,202* | 169,02±24,14 | **P < 0,01 *0,01<P<0,05 |

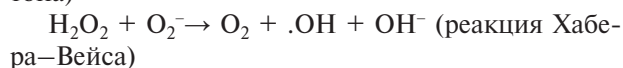
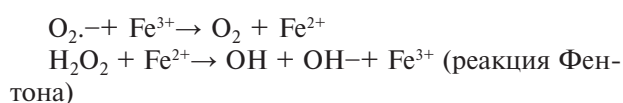
Воздействие хрома, реализующееся в усилении процесса ПОЛ и накоплении продуктов окисления (МДА и ДК) в печени и селезёнке крыс, также сопровождалось снижением активности антиоксидантных ферментов СОД и каталазы (табл. 4).

Очевидно, что одной из причин установленных результатами исследования сдвигов иммунологических параметров под влиянием катионов железа и хрома может являться активация процессов свободно

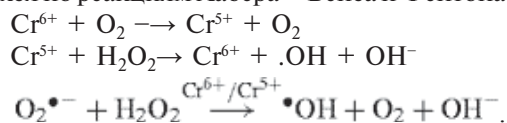
радикального окисления. Металлы с переменными степенями окисления хорошо известны как индукторы окислительного стресса, основным механизмом возникновения которого является генерация свободных радикалов. Многочисленными исследованиями на примере Fe²⁺, принимающего участие в клеточных реакциях, подтверждено образование наиболее токсичного гидроксильного радикала (НО·), которое можно выразить следующими схемами:

4. Влияние хрома на активность антиоксидантных ферментов и интенсивность образования ДК и МДА в селезёнке и печени крыс Вистар ($X \pm Sx$)

| Показатель | Группа | | Достоверность отличий |
|-----------------------------------|--------------|-------------|-----------------------|
| | I (контроль) | V | |
| МДА селезёнка, нмоль/мг белка | 1,33±0,09 | 2,26±0,40 | P >0,05 |
| ДК селезёнка, ед.опт.пл./мг белка | 0,39±0,01 | 0,34±0,01 | P <0,05 |
| МДА печень, нмоль/мг белка | 3,73±0,53 | 8,28±1,71 | P <0,05 |
| ДК печень, ед.опт.пл./мг белка | 0,40±0,02 | 0,36±0,01 | P <0,05 |
| СОД, у.е./гНв | 226,68±25,58 | 189,01±9,86 | P >0,05 |
| Каталаза, у.е./гНв | 257,40±8,49 | 218,68±3,75 | P <0,05 |



Другой металл с переменной степенью окисления – хром, попадая в организм в высшей степени окисления, подвергается восстановлению, что сопровождается появлением АФК, также образующихся по реакциям Хабера – Вейса и Фентона [3, 8]:



Таким образом, одним из биологических эффектов металлов с переменными степенями окисления является генерация АФК, приводящая в том числе к активации процессов ПОЛ, что подтверждается результатами исследования по накоплению ТБК-реактивных продуктов как в сыворотке крови, так и в органах на фоне снижения активности ферментов антиоксидантной защиты. Нарушение баланса между продукцией АФК и механизмами контроля за их концентрацией истощает эндогенный антиоксидантный потенциал и ведёт к развитию окислительного стресса, негативно влияющего на иммунокомпетентные клетки, прежде всего через усиление процесса ПОЛ. Показанное результатами проведённого исследования снижение численности клеточного состава лимфоидных органов, согласно литературным данным, также может быть связано как с прямым повреждающим действием металлов на клетки, нарушающим энергетический обмен, так и с ускоренной миграцией клеток, опустошающей лимфоидные и кроветворные органы [9].

Прооксидантная активность пестицидов реализуется индукцией АФК как побочных продуктов их метаболизма. Высокая липофильность 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты определяет её способность накапливаться в жировой ткани, что даёт возможность оказывать хроническое токсическое влияние уже при низко дозированном воздействии.

Известно, что одним из основных метаболитов 2,4-Д является 2,4-дихлорфенол, прооксидантное действие которого в значительной степени определяется локализацией заместителей в фенольном кольце. Расположение атомов хлора именно во 2-м и 4-м положениях фенольного кольца – причина сильного повреждения антиоксидантных ферментов и инициации ПОЛ, поскольку именно такая структура обеспечивает лёгкое проникновение в клеточные мембраны [1].

Выводы. На наш взгляд, результаты проведённой работы показали способность металлов с переменными степенями окисления и гербицида 2,4-Д при низко дозированном поступлении вызывать окислительный стресс, вероятно за счёт продукции АФК, усиление которого отмечено при совместном применении двух веществ – гербицида и железа.

Другим результатом можно считать наличие признаков хронического воспалительного процесса, проявляющегося в основном в клетках жировой ткани и иммунной системы, одним из маркеров которого является экспрессия провоспалительных цитокинов, в том числе ИЛ-6 и ФНО-α.

Литература

1. В. Bukowska. Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid – Molecular Mechanisms. Polish J. of Environ. Stud. Vol. 15, No. 3 (2006), 365 – 374.
2. Dayan A.D., Paine A.J. Mechanisms of chromium toxicity, carcinogenicity and allergenicity: review of the literature from 1985 to 2000. Hum Exp Toxicol. 2001 Sep; 20(9):439 – 51.
3. Valko, M. Metal, toxicity and oxidative stress / M. Valko, H. Morris, M.T.D. Cronin // Current medical chemistry. 2005. Vol.12. P. 1161 – 1208.
4. СанПиН 2.1.4.1074–01. Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. М.: Роспотребнадзор, 2006. 102с.
5. Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Analyst. Biochem. 1979; 95(2):351 – 821.
6. Горизонтов П.Д., Белоусов О.И., Федотова М.И. Стресс и система крови. М.: Медицина, 1983. 240с.
7. Zack, H. In Methods of enzymatic analysis / Ed by Bergmeger H., Pergamon Press. 1963. P. 885 – 894.
8. Lushchak VI. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. Aquat Toxicol. 2011 Jan 17;101(1):13 – 30.
9. Некоторые показатели микроэлементного и антиоксидантного статуса крыс при хромовой интоксикации / И.В. Михайлова, Л.А. Чеснокова, Н.В. Шаропова, А.И. Смолягин, С.И. Красиков // Гигиена и санитария. 2014. № 3. С. 71 – 74.