

УДК 577.2:574:616-002:612.017.014

РЕАКЦИЯ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ КРЫС В ОТВЕТ НА ВОСПАЛЕНИЕ, ВЫЗВАННОЕ НА ФОНЕ ИНТОКСИКАЦИИ СОЕДИНЕНИЯМИ ВАНАДИЯ И ХРОМА (ЭКСПЕРИМЕНТ)

**Токушева А.Н.¹, Балабекова М.К.¹, Мырзагулова С.Е.¹, Ахмедшина Д.А.¹,
Жукешева М.К.¹, Трубачев В.В.¹, Рыспекова Н.Н.¹**

¹Казахский Национальный Медицинский Университет им. С.Д. Асфендиярова, кафедра патофизиологии, Алматы, Республика Казахстан (050050, Алматы, ул. Толе би, 88), balabekovamarina@mail.ru

В работе исследованы изменения периферической крови крыс с асептическим воспалением, вызванным на фоне интоксикации солями ванадия и хрома. Проведены 4 серии экспериментов, в каждой серии было по 30 животных. Животных делили по 3 подгруппы по 10 крыс в каждой. Асептическое воспаление моделировали путем подкожного введения в межлопаточную область 0,3 мл скипидара на вазелиновом масле. Перед этим у крыс в межлопаточной области выстригали шерсть и подкожно вводили 0,5 мл воздуха. Комбинированную затравку ванадатом аммония и бихроматом калия производили ежедневно (кроме воскресенья) в течение двух недель из расчета по 5 мг/кг м.т. перорально при помощи металлического зонда. Сразу после двухнедельной затравки ВА и БК у крыс моделировали асептическое воспаление. Исследования проводили через 1, 7 и 14 суток от начала моделирования асептического воспаления. Установлено, что изменения периферической крови крыс с асептическим воспалением, предварительно затравленных ВА и БК соответствовали картине иммунодепрессии, что существенно усугубило течение асептического воспаления.

Ключевые слова: воспаление, модель асептического воспаления, крысы, тяжелые металлы, ванадий, хром, периферическая кровь

REACTION OF RAT PERIPHERAL BLOOD IN RESPONSE TO INFLAMMATION, INDUCED ON THE BACKGROUND OF INTOXICATION WITH VANADIUM AND CHROMIUM COMPOUNDS (EXPERIMENT)

**Tokusheva A.N.¹, Balabekova M.K.¹, Myrzagulova S.E.¹, Akhmedshina D.A.¹,
Zhukesheva M.K.¹, Trubachev V.V.¹, Ryspekova N.N.¹**

¹Asfendiyarov Kazakh National Medical University, Department of Pathophysiology, Almaty, Republic of Kazakhstan (050050, Almaty, Tole bi street, 88), balabekovamarina@mail.ru

We studied the changes in the peripheral blood of rats with aseptic inflammation caused by intoxication on the background of vanadium and chromium salts. 4 conducted a series of experiments in each series were 30 animals. Animals were divided by 3 groups of 10 rats each. Aseptic inflammation was modeled by subcutaneous injection in the interscapular region of 0.3 ml of mineral oil of turpentine on. Before that, in the rat interscapular region wool cut out and subcutaneously injected 0.5 ml of air. Combination seed ammonium vanadate and potassium dichromate are cleaned daily (except Sunday) for two weeks at the rate of 5 mg / kg bw orally by a metal probe. Just two weeks after seeding BA and BC rats modeled aseptic inflammation. Studies were performed after 1, 7 and 14 days from the beginning of the simulation of aseptic inflammation. It was found that changes in the peripheral blood of rats with aseptic inflammation, previously inoculated BA and BC matched picture immunosuppression, which significantly worsened during the aseptic inflammation.

Keywords: inflammation, aseptic inflammation model, rat, heavy metals, vanadium, chromium, peripheral blood

Одно из приоритетных мест в нарушении иммунологической реактивности занимают тяжелые металлы. Исследованиям иммунотоксического влияния химических факторов окружающей и/или производственной среды уделяется пристальное внимание во всем мире [1, 2]. Воздействие на человека соединений тяжелых металлов приводит к нарушению приспособительных реакций организма в целом, что проявляется снижением

общебиологической его резистентности. При этом происходит формирование иммунопатологического процесса [2]. В основе иммунологических сдвигов, вызываемых токсическими веществами, лежат различные механизмы от грубого повреждения стволовых клеток костного мозга (нарушения их пролиферации и дифференцировки) до изменения продукции цитокинов, модуляции рецепторов на мембранах иммунокомпетентных клеток, количественных и качественных нарушений клеток иммунной системы [4]. Токсическое действие многих ксенобиотиков проявляется в крови снижением количества красных и белых кровяных телец. Показатели состояния кроветворной системы организма можно рассматривать в качестве маркеров неблагоприятного экологического воздействия [3,5].

Известно, что наиболее наглядным и информативным индикатором, позволяющим оценить состояние иммунологической реактивности, является воспаление. Течение асептического воспаления может усугубляться иммунодефицитным состоянием, вызванным действием ксенобиотиков [6,7]. В связи с вышеизложенным, наши исследования были посвящены изучению гематологических показателей крови при асептическом воспалении, вызванном на фоне интоксикации соединениями ванадия и хрома

Материал и методы исследования

Работа выполнена в рамках проекта «Молекулярно-биологические особенности течения асептического воспаления, ассоциированного с экологенной иммунодепрессией» (сроки реализации: 2015-2017 гг.) при финансовой поддержке Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Эксперименты выполнены на 100 белых крысах-самцах массой 180-240 г., содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Проведены 4 серии экспериментов: 1 серия – контроль; 2 серия – половозрелые крысы с асептическим воспалением; 3 серия – крысы, затравленные ванадатом аммония (ВА) и бихроматом калия (БК); 4 серия – половозрелые крысы + асептическое воспаление + ВА и БК. Животных 2-4 серий делили по 3 подгруппы по 10 крыс в каждой. Асептическое воспаление моделировали путем подкожного введения в межлопаточную область 0,3 мл скипидара на вазелиновом масле. Перед этим у крыс в межлопаточной области выстригали шерсть и подкожно вводили 0,5 мл воздуха. Комбинированную затравку ванадатом аммония и бихроматом калия производили ежедневно (кроме воскресенья) в течение двух недель из расчета по 5 мг/кг м.т. перорально при помощи металлического зонда. Сразу после двухнедельной затравки ВА и БК у крыс моделировали асептическое воспаление. Исследования крови проводили через 1, 7 и 14 суток от начала моделирования асептического воспаления.

Исследования проводились с соблюдением норм и правил проведения экспериментов с участием животных (заявка №166, решение ЛЭК КазНМУ им. С.Д.Асфендиярова, протокол № 3 от 01.04.2015).

Результаты и обсуждение

Исследованиями, проведенными через 1 сутки после моделирования асептического воспаления, в крови у крыс установлено резкое уменьшение форменных элементов крови, о чем свидетельствовало статистически значимое снижение гематокрита крови (НСТ) на 13,3% ($p=0,022$, $z=-2,286$) (таблица 1).

Таблица 1

Распределение среднего содержания лейкоцитов, эритроцитов и НСТ в крови у крыс с асептическим воспалением в сравнении с контролем (через 1 сутки)

Элементы крови *	Контроль				Воспаление				Mann-Whitney U - Test
	N	Mean (SD)	95% ДИ		N	Mean (SD)	95% ДИ		
WBC, ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	8,9(1,3)	7,7	10,0	6	3,0(1,3)1,6	1,6	4,4	0,003** $z=3,0$
RBC, ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10	8,3(0,9)	7,5	9,1	6	7,1(0,5)	6,36	7,7	0,038** $z=2,071$
НСТ, %	10	42,1(4,1)	38,3	45,8	6	36,5(2,0)	34,3	38,6	0,022** $z=-2,286$
НФ (abs) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	1,5(0,3)	1,2	1,7	6	0,4(0,3)	0,1	0,7	0,003* * $z=3,0$
ЛФ (abs) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	6,6(1,0)	5,7	7,5	6	2,3(1,0)	1,3	3,4	0,003** $z=3,0$
Мн (abs) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	0,6(0,1)	0,5	0,7	6	0,2(0,1)	0,1	0,3	0,003** $z=3,0$

Примечание: *- WBC (общее число лейкоцитов), RBC (общее число эритроцитов), HGB (концентрация гемоглобина), НСТ (показатель гематокрита), MCV (сред. объем эритроц. в общем объеме пробы), MCH (средний объем гемоглобина в эритроците), MCHC (средняя конц. Нв в эритроците), НФ (нейтрофилы), Мн (моноциты); **- по Mann-Whitney U Test статистическая значимость по отношению к контролю

Так, среднее содержание лейкоцитов и его подмножеств, таких как нейтрофилы, лимфоциты и моноциты статистически значимо отставало от показателей контроля на 33,7% ($p=0,003$, $z=3,0$), 26,7% ($p=0,003$, $z=3,0$), 34,8% ($p=0,003$, $z=3,0$) и 33,3% ($p=0,003$, $z=3,0$) соответственно. Уменьшение содержания эритроцитов (M(CO)) с 8,3 (0,9) до 7,1 (0,5) носило статистически значимый характер ($p=0,038$, $z=2,071$). По-видимому, такое снижение форменных элементов крови носило перераспределительный или транзитный характер и расценивалась нами как стресс-реакция в ответ на введение скипидара.

Гематологическими исследованиями, проведенными через 7 суток, было установлено восстановление общего количества лейкоцитов в периферической крови у крыс с асептическим воспалением, статистически значимо превышавшее как показатели контроля

на 27,6% ($p=0,003$, $z=3,0$), так и показатели предыдущего срока в 4,1 раза ($p=0,011$, $z=-2,558$) (таблица 2).

Таблица 2

Распределение среднего содержания лейкоцитов в крови у крыс с асептическим воспалением в сравнении с контролем (через 7 суток)

Элементы крови	Контроль				Воспаление				Mann-Whitney U - Test
	N	Mean (SD)	95% ДИ		N	Mean (SD)	95% ДИ		
WBC, ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	8,9(1,3)	7,7	10,0	6	12,3(1,0)	10,7	14,0	0,003* $z=3,0$ 0,011** $z=-2,558$
НФ (abs) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	1,5(0,3)	1,2	1,7	6	3,6(1,2)	1,8	5,0	0,008* $z=-2,646$ 0,011** $z=-2,558$
ЛФ (abs) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	6,6(1,0)	5,7	7,5	6	7,4(1,5)	5,0	10,0	0,257* 0,011** $z=-2,558$
Мн (abs) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	0,6(0,1)	0,5	0,7	6	1,1(0,4)	0,5	2,0	0,030* $z=-2,173$ 0,011** $z=-2,558$
Примечание: *- по Mann-Whitney U Test статистическая значимость по отношению к контролю; ** - по отношению к 1 суткам									

К данному сроку исследования среднее (СО) абсолютного содержания нейтрофилов и моноцитов крови составило 3,6 (1,2) и 1,1 (0,4), что оказалось статистически значимо выше показателей контроля в 2,4 ($p=0,008$, $z=-2,646$) и 1,8 раза ($p=0,030$, $z=-2,173$), а также показателей предыдущего срока исследования в 9 ($p=0,011$, $z=-2,558$) и 5,5 раз ($p=0,011$, $z=-2,558$) соответственно. По сравнению с предыдущим сроком исследования возрастало и абсолютное содержание лимфоцитов с 2,3 предыдущего срока до 7,4, статистически значимая разница которой составила 68,9% ($p=0,011$, $z=-2,558$). По сравнению с контролем отмечался незначительный прирост лимфоцитов на 10,8% ($p=0,257$) (таблица 2).

К 14 суткам эксперимента картина крови приближалась к показателям контроля. Так, средние значения лейкоцитов, лимфоцитов и моноцитов значительно приближались к контрольному уровню. Между тем, отмечалось незначительное напряжение гранулоцитарного ростка гемопоэза, о чем судили по среднему содержанию нейтрофилов крови, которое продолжало превышать показатели контроля на 73,3% ($p=0,053$) и первых суток исследований в 6,5 раз ($p=0,020$, $z=-2,324$) соответственно. Между тем, по сравнению с 7 сутками исследования количество нейтрофилов снижалось на 27,8% ($p=0,157$).

Таким образом, развитие асептического воспаления в крови у опытных крыс вызывало транзиторное уменьшение лейкоцитарного пула и эритроцитов в первый срок исследования. В последующий срок исследования наблюдалось восстановление красной крови, повышение лейкоцитарного пула за счет лимфоцитов, моноцитов и нейтрофилов, что соответствовало разворачивающейся картине асептического воспаления. К 14 сроку отмечалось угасание нейтрофильной реакции крови, что полностью отражало динамику заживающего воспаления.

Исследованиями, проведенными через 1 сутки после моделирования асептического воспаления, установлено, что в картине крови у крыс, затравленных ВА и БК, наблюдалось резкое снижение лейкоцитов (таблица 3). Так, общее содержание лейкоцитов в крови у опытных крыс по сравнению с контролем оказалось статистически значимо сниженным на 57,3% ($p=0,001$, $z=3,240$). Причиной тому послужило почти двукратное статистически значимое снижение абсолютного содержания лимфоцитов ($p=0,008$, $z=2,662$), моноцитов ($p=0,015$, $z=2,430$) и эозинофилов ($p=0,043$, $z=2,025$).

Таблица 3

Распределение среднего содержания лейкоцитов в крови у опытных крыс с асептическим воспалением, в сравнении с контролем (через 1 сутки)

Элементы крови *	Контроль				Металлы+воспаление (опыт)				Mann-Whitney U - Test
	N	Mean (SD)	95% ДИ		N	Mean (SD)	95% ДИ		
WBC, ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	8,9(1,3)	7,7	10,0	8	3,8(2,0)	2,1	5,4	0,001* $z=3,240$
ЛФ (abs) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	6,6(1,0)	5,7	7,5	8	3,6(1,9)	2,1	5,2	0,008* $z=2,662$
Мн(abs) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	0,6(0,1)	0,5	0,7	8	0,3(0,2)	0,1	0,5	0,015* $z=2,430$
Э (abs) ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10	0,2(0,1)	0,1	0,2	8	0,1(0,1)	0	0,2	0,043* $z=2,025$

Примечание: *- по Mann-Whitney U Test статистическая значимость по отношению к контролю

Также, у опытных крыс с асептическим воспалением развивалась анемия. Среднее содержание гемоглобина (М, 95% ДИ) снижалось с 143,9 (95% ДИ от 135,8 до 151,9) контроля до 121,9 (95% ДИ от 117,2 до 126,5), что составило статистически значимую разницу в 15,3% ($p=0,001$, $z=3,240$). К 7 суткам исследования тенденция к снижению гематологических параметров крови у опытных крыс с асептическим воспалением сохранялась. Так, по сравнению с предыдущим сроком исследования, также как и по сравнению с группой животных, получавших ВА и БК, содержание эритроцитов снижалось на 6,5% ($p=0,074$) и 7,7% ($p=0,074$) соответственно (таблица 4). Между тем, от контроля

параметры среднего содержания эритроцитов и их среднего объема (MCV) статистически значимо отставали на 13,2% ($p=0,021$, $z=2,315$) и 7,8% ($p=0,008$, $z=2,662$) соответственно.

Таблица 4

Распределение среднего содержания эритроцитов и гемоглобина в крови у опытных крыс с асептическим воспалением, в сравнении с контролем и группой животных, затравленных тяжелыми металлами (через 7 суток)

Элементы крови *	Контроль		Металлы		Металлы+воспаление (опыт)		Mann-Whitney U - Test
	N	Mean (SD)	N	Mean (SD)	N	Mean (SD)	
RBC, ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	10	8,3 (0,9)	11	7,8 (0,5)	8	7,2 (0,5)	0,021* $z=2,315$
HGB, (g/L)	10	143,9 (8,7)	11	125,7 (7,3)	8	111,4 (9,9)	0,001* $z=3,240$ 0,031** $z=2,153$
HCT, %	10	42,1 (4,1)	11	36,9 (1,9)	8	32,0 (2,7)	0,002* $z=3,125$ 0,027** $z=2,205$
MCV, fL	10	48,5 (1,8)	11	46,8 (3,3)	8	44,7 (2,4)	0,008* $z=2,662$
MCH, pg	10	16,9 (0,6)	11	15,1 (1,2)	8	15,6 (0,9)	0,011* $z=2,546$
Примечание: *- по Mann-Whitney U Test статистическая значимость по отношению к контролю; ** - по отношению к металлам							

К этому сроку исследования установлено прогрессирующее снижение уровня гемоглобина на 22,6% ($p=0,001$, $z=3,240$) по сравнению с контролем и на 11,4% ($p=0,031$, $z=2,153$) по сравнению с металлами. Средний объем гемоглобина в эритроците (MCH) также оказался сниженным на 7,7% ($p=0,011$, $z=2,546$) по сравнению с контрольными показателями. В крови опытных животных по сравнению с контролем отмечалась потеря общего содержания лейкоцитов на 29,2% ($p=0,009$, $z=2,604$) преимущественно за счет снижения абсолютного содержания лимфоцитов на 41% ($p=0,002$, $z=3,125$) (рисунок 1).

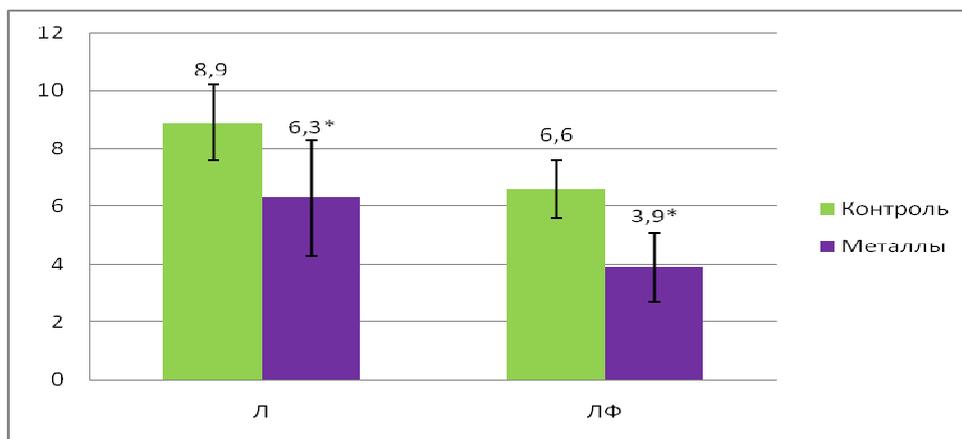


Рис. 1. Распределение среднего содержания лейкоцитов и лимфоцитов в крови у опытных крыс с асептическим воспалением в сравнении с контролем (через 7 суток)

Исследованиями, проведенными через 14 суток, установлено статистически значимое увеличение абсолютного содержания нейтрофилов на 73,3% ($p=0,001$, $z=-3,334$) по сравнению с уровнем контроля, на 30% ($p=0,006$, $z=-2,752$) по сравнению с животными, затравленными ВА и БК, и на 53% ($p=0,021$, $z=-2,309$) по сравнению с предыдущим сроком. Остальные параметры крови от показателей предыдущего срока исследования практически не отличались.

Заключение

На основании приведенных экспериментальных данных можно заключить, что реакция периферической крови крыс, затравленных ВА и БК, на воспаление характеризовалась в первые сутки исследования резким снижением лейкоцитарного пула, развитием анемии, которые к последующему сроку исследования лишь прогрессировали. На 14 сутки исследования показатели крови не восстанавливались, за исключением развившегося нейтрофильного лейкоцитоза. В результате проведенных исследований крови установлено развитие иммунодепрессии у крыс, затравленных соединениями тяжелых металлов, что существенно усугубило течение асептического воспаления.

Список литературы

1. Стежка В.А., Дмитрух Н.Н., Покровская Т.Н. и др. К вопросу об иммуотоксическом действии соединений тяжелых металлов //Совр.пробл.токсикол.– 2003.–№1. – С. 22-25.
2. Boscolo P., Gioacchino M., Giau N. Work, environment, immune system and humane health // Int .J. Immunopathol.Pharmacol. -2004. -V.17, N3. -P. 1-2.

3. Brubaker A.L., Rendon J.L., Ramirez L., Choudhry M.A., Kovacs E.J. Reduced neutrophil chemotaxis and infiltration contributes to delayed resolution of cutaneous wound infection with advanced age // *J. Immunol.* 2013. - №15.-P.1746–1757.
4. Depault Fran~Ecois, Cojocar Marilena, Fortin Flechere, Chakrabarti Saroj, Lemieux Nicole. Genotoxic effects of chromium(VI) and cadmium(II) in human blood lymphocytes using the electron microscopy in situ end-labeling (EM-ISEL) assay // *Toxicol. in Vitro* [ЭИ]. - 2006. - 20, № 4. - С. 513-518.
5. *Freifeld A.G., Walsh T. J., Pizzo P.A.* Clinical approaches to infections in the compromised host. *Hematology // Basic Principles and Practice.* 2000. Vol. 79. P. 1443–1500.
6. Nishio N., Okawa Y., Sakurai H., Isobe K. Neutrophil depletion delays wound repair in aged mice // *AGE.* – 2008. - №30. – P.11–19.
7. Reinke J.M., Sorg H. Wound repair and regeneration // *Eur Surg Res.* – 2012. - №49. – P.35–43.

Рецензенты:

Ералиева Л.Т., д.м.н., профессор, директор НИИ ФиПМ им. Б.А. Атчабарова, г. Алматы;
Абишева З.С., д.м.н., профессор модуля валеологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова,
г. Алматы.