

УДК: 612.017+546.48+546.81

## ДОСЛІДЖЕННЯ УЧАСТІ ІМУННИХ ПРОЦЕСІВ У ПРОЯВІ ТОКСИЧНОЇ ДІЇ АЦЕТАТУ СВИНЦЮ НА НИРКИ БІЛИХ ШУРІВ

Дмитруха Н.М.<sup>1</sup>, Луговський С.П.<sup>2</sup><sup>1</sup> Інститут медицини праці АМН України, м. Київ,<sup>2</sup> Український НДІ промислової медицини, м. Кривий ріг

У білих шурів-самців моделювали свинцеву інтоксикацію. Стан неспецифічної резистентності організму шурів визначали після внутрішньоочеревинного введення ацетату свинцю у дозі 2,5 мг/кг маси тіла протягом 25 днів. У піддослідних тварин виявлено порушення фагоцитарної активності нейтрофілів крові та окисно-відновних процесів у них, підвищення кількості циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щодо контрольної групи. При гістологічному дослідженні нирок у піддослідних шурів було відмічено зміни структурних компонентів цього органу порівняно з контролем з відкладенням імунних комплексів у порожнині капсули ниркових тілець, у стінках капілярів ниркових клубочків та артерій мозкового шару.

Виявлені зміни імунологічних показників периферичної крові шурів, експонованих свинцем, можуть розглядатись як ранні критерії токсичної дії свинцю на організм експериментальних тварин і бути підтвердженням участі імунних процесів у формуванні патології нирок за свинцевої інтоксикації.

**Ключові слова:** ацетат свинцю, імунотоксичність, свинцева інтоксикація

Серед важких металів, що забруднюють навколишнє середовище, свинець та його сполуки є найбільш розповсюдженими [3, 6, 16]. Висока біологічна активність свинцю, здатність накопичуватися у організмі та політропність дії створюють загрозу для здоров'я людини. З літератури відомо, що при свинцевій інтоксикації в першу чергу уражаються органи кровотворення, нервова та серцево-судинна системи, шлунково-кишковий тракт, нирки [1, 10, 23]. Свинець може також проявляти імунотоксичну дію, знижувати резистентність організму до інфекцій, підвищувати ризик розвитку онкологічних та автоімунних патологій [4, 11, 20, 22].

У попередніх дослідженнях нами було встановлено, що свинець за умови моделювання інтоксикації у піддослідних шурів викликав зміни показників неспецифічної резистентності та імунологічної реактивності організму — пригнічення фагоцитарної функції нейтрофілів крові, зменшення титру комплексу та підвищення рівня циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові [15]. За даними літератури, утворені імунні комплекси антиген-антитіло (АГ-АТ) при порушенні процесу їх виведення можуть відкладатись у судинах, суглобах, нирках, стимулювати розвиток ускладнених запальних реакцій та подальших патологічних змін. Відкладення комплексів АГ-АТ багатьма авторами розцінюється як основний патогенетичний фактор органоспецифічних автоімунних захворювань [5, 9, 13]. У роботі [18] показано участь імунних механізмів

у розвитку контактного дерматиту та гломерулонефриту за дії ртуті. Що стосується свинцевих нефропатій, то цей процес перебігає дещо приховано, і патогенез їх остаточно не вивчено.

Метою цієї роботи було дослідження змін окремих показників неспецифічної резистентності та імунологічної реактивності організму, їхньої участі у прояві токсичної дії свинцю на нирки білих шурів.

Представлені дані є фрагментом наукових досліджень з вивчення токсичних властивостей низьких концентрацій важких металів, які виконуються в лабораторії промислової токсикології та гігієни праці при використанні хімічних речовин.

### Матеріали та методи дослідження

Дослідження проведено на білих шурах-самцях масою 150–200 г з дотриманням загальних етичних принципів щодо експериментів на тваринах, ухвалених I Національним конгресом з біоетики (Київ, 2000).

Тваринам щодня внутрішньоочеревинно 5 разів на тиждень (усього 25 днів) вводили розчин ацетату свинцю у дозі 2,5 мг/кг маси тіла. Піддослідні та контрольні (інтактні) тварини утримувались у загальноприйнятих умовах віварію на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної води. Периферичну кров та нирки у тварин забирали після декапітації під легким ефірним наркозом.

Стан неспецифічної резистентності організму шурів оцінювали за показниками фагоцитарної ак-

тивності нейтрофілів крові (ФАН), включаючи фагоцитарний індекс (ФІ) – відсоток нейтрофілів, які беруть участь у процесі фагоцитозу; фагоцитарне число (ФЧ) – кількість часточок полістиролового латексу, поглинутих одним фагоцитом. Бактерицидну здатність фагоцитів та інтенсивність окисно-відновного процесу в них визначали за допомогою тесту відновлення нітросинього тетразолію до формазану (НСТ-тест спонтанний та стимульований латексом) [14]. Загальні опсонізуючі властивості сироватки крові досліджували за показниками фагоцитарної активності нейтрофілів (ФІ, ФЧ) контрольних тварин у присутності сироватки крові піддослідних щурів за вищевказаним методом. У сироватці крові також визначали титр комплексу за 50% гемолізом еритроцитів барана [12] та рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦК) у реакції преципітації з поліетиленгліколем (ПЕГ)  $M=6000$  [21].

У роботі також виконано гістологічні дослідження нирок контрольних і піддослідних щурів з використанням стандартних гістохімічних і імуноморфологічних методів. Шматочки органу розміром  $1 \times 1 \times 0,5$  см протягом 72 годин фіксували 4% розчином параформу у 0,1 М фосфатному буфері (рН – 7,2–7,4), тричі промивали у буфері, зневоднювали в етанолі, просвітляли у ксилолі і заливали у парафін. Парафінові зрізи товщиною 7–10 мкм, які виготовляли за допомогою мікротому, фарбували гематоксиліном і еозином за методом Шиф-йодна кислота (PAS-реакція) [7]. Для виявлення відкладень імунних комплексів у структурах нирок *in situ* на парафінових зрізах проводили непряму реакцію за [17]. Для цього використовували комерційні антисироватки з антитілами проти Ig щура та сироватки з антивидовими антитілами, міченими ФІТЦ (НДІ ім. М.Ф.Гамалії РАМН, Москва). Морфологічні дослідження проводили за допомогою світлового і люмінесцентного мікроскопів (ЛЮМАМ Р-8, «ЛОМО», Росія).

Результати проведених досліджень обрховано статистично з обчисленням t-критерію Ст'юдента [8].

### Результати дослідження та їх обговорення

Введення піддослідним щурам ацетату свинцю у дозі 2,5 мг/кг протягом 25 діб викликало зміни як клітинних, так і гуморальних показників неспецифічної резистентності та імунологічної реактивності їхнього організму (таблиця). Так, після 5-денного введення щурам ацетату свинцю спостерігалось різ-

Таблиця

Показники неспецифічної резистентності та імунологічної реактивності організму щурів за умови моделювання свинцевої інтоксикації ( $M \pm m$ )

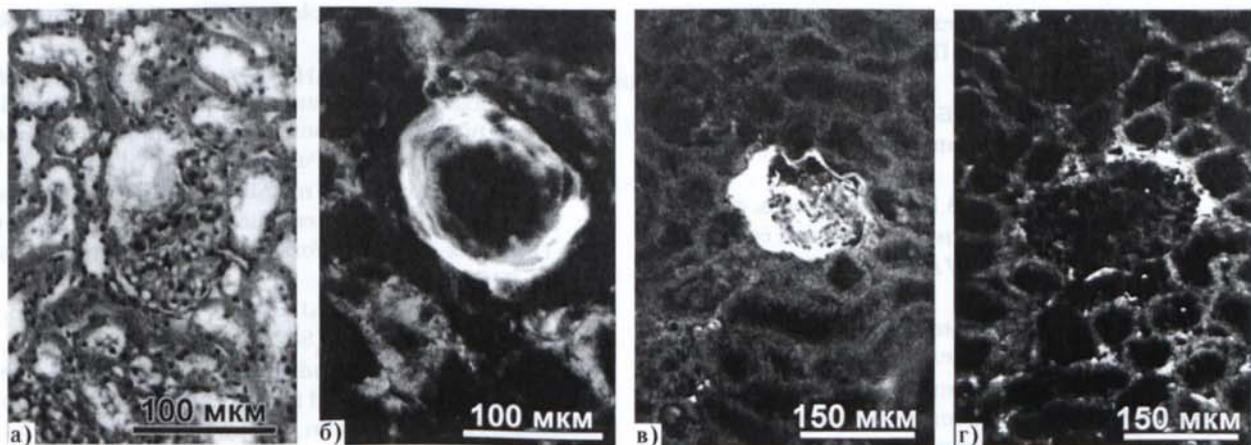
| Серія досліду | Фагоцитарна активність нейтрофілів |            | Опсонізуючі властивості сироватки крові |            | НСТ-тест, % |               | ЦК, од. огт. піл. |                   | Титр комплексу, СН 50 |
|---------------|------------------------------------|------------|---|------------|-------------|---------------|-------------------|-------------------|-----------------------|
|               | ФІ, %                              | ФЧ, ум.од. | ФІ, %                                   | ФЧ, ум.од. | спонтанний  | стимульований | високомолекулярні | низькомолекулярні |                       |
| Контроль      | 26,5±2,0                           | 2,4±0,2    | 35,2±0,8                                | 3,3±0,1    | 12,2±1,1    | 22,8±1,7      | 0,014±0,02        | 0,066±0,01        | 155,2±21,1            |
| 5 введення    | 13,4±0,5*                          | 1,5±0,2*   | 24,0±0,8*                               | 1,8±0,1*   | 14,2±1,2    | 20,4±0,9      | 0,028±0,01*       | 0,135±0,02*       | 149,4±15,1            |
| Контроль      | 23,2±1,7                           | 1,9±0,2    | 33,7±0,6                                | 3,0±0,2    | 17,2±0,1    | 26,0±1,7      | 0,014±0,01        | 0,069±0,01        | 111,7±8,7             |
| 25 введення   | 33,4±1,2*                          | 3,4±0,1*   | 8,8±0,3*                                | 2,1±0,2*   | 10,6±0,6*   | 12,4±0,9*     | 0,032±0,01*       | 0,161±0,01*       | 93,4±3,5 <sup>+</sup> |

\* –  $p < 0,05$ ; + –  $p < 0,1 - 0,2$  – вірогідність щодо контролю.

ке пригнічення фагоцитарної функції нейтрофілів крові, що, можливо, було пов'язано з мембранотоксичною дією металу та зниженням опсонізуючих властивостей сироватки крові. Показники НСТ-тесту в нейтрофілах не відрізнялися від контрольних значень, тобто свинець у даній дозі не впливав на окисно-відновні процеси в цих клітинах. Титр комплекменту також не змінювався, проте зростав вміст високо- і низькомолекулярних ЦК. Більш тривале надходження свинцю до організму щурів протягом 25 діб стимулювало поглинаючу здатність фагоцитів (ФІ та ФЧ), тоді як опсонізуюча властивість сироватки крові, навпаки, знижувалася. Субхронічна експозиція свинцем призводила до пригнічення окисно-відновних реакцій у нейтрофілах, зменшуючи таким чином їхню бактерицидну властивість. У сироватці крові піддослідних тварин порівняно з контролем та щурами попередньої серії експерименту ще більше зростав рівень ЦК та зменшувалася титр комплекменту. Виявлену активацію фагоцитарної функції нейтрофілів крові в даному випадку можна вважати компенсаторною реакцією організму піддослідних тварин на зниження інших показників неспецифічної резистентності та підвищене утворення ЦК. Залежно від розмірів ЦК можуть видалятися з організму або відкладатися в органах та тканинах. У сучасній літературі добре вивчена природа імунокомплексного гломерулонефриту [2]. У роботі [19] показано, що вісцеральна мембрана епітеліальних клітин клубочків ниркового тільця містить рецептор до С3b, що відіграє важливу роль при фіксації ЦК. Відкладаючися в клубочках ниркових тілець та інших судинах ЦК активують медіатори тканевого ушкодження нирок.

При гістологічному дослідженні нирок у тварин, що отримували ацетат свинцю, порівняно з контролем було виявлено серозний набряк клубочків, який супроводжувався ектопією капілярів та розширенням порожнин ниркових тілець. В останніх спостерігалися відкладення дрібно-глобулярних ацидофільних мас (рисунок, а). У піддослідних тварин, які зазнавали впливу свинцю, за допомогою імуноморфологічних методів з використанням антитіл до Ig щура, мічених ФІТЦ, виявляли інтенсивну флюоресценцію дрібно-глобулярних преципітатів імунних комплексів у порожнині капсули ниркових тілець та в стінках капілярів ниркових клубочків (рисунок, в). У щурів контрольної групи відмічали лише незначну, на рівні фону, флюоресценцію стінки капсули ниркових клубочків (рисунок, г). У стінках артерій мозкового шару нирок піддослідних тварин спостерігали відкладення аналогічних комплексів в медії та їх інтимі (рисунок, б). При цьому в медії артерій люмінесценція імунних комплексів була виразнішою, ніж в інтимі.

Враховуючи дані літератури [2, 5, 20], збільшення вмісту ЦК у сироватці крові щурів під час субхронічного експерименту можна розцінювати як відповідь імунної системи на постійне надходження до організму екзогенного подразника – ацетату свинцю. Накопичення ЦК у крові щурів за умови моделювання свинцевої інтоксикації пов'язано не тільки з посиленням синтезу антитіл та утворенням комплексів АГ-АТ, а й з порушенням механізмів їхнього виведення з організму. Відкладення імунних комплексів у нирках піддослідних тварин може спричинити розвиток запальних процесів, формування склерозу судин з подальшим погіршенням мікроциркуляції та порушенням функції даного органу.



**Рис.** Гістологічні зміни у експериментальних тварин:

а, б, в – дослід, г – контроль;

а – гематоксилін і еозин; б-г – реакція за Соопс з антитілами проти Ig щурів, люмінесцентна мікроскопія.

Таким чином, виявлені імунологічні зсуви та морфологічні зміни в нирках можуть бути свідченням того, що, з одного боку, вони беруть участь у процесі елімінації з організму імунних комплексів, які утворюються внаслідок тривалого впливу малих доз свинцю, а з іншого – можуть бути мішенню для реалізації токсичних ефектів цього металу за безпосередньої участі імунних процесів.

На підставі отриманих результатів можна зробити такі висновки:

1. Внутрішньоочеревинне введення тваринам ацетату свинцю у дозі 2,5 мг/кг протягом 25 днів спричиняло зміни клітинних та гуморальних показників, що беруть участь у процесі фагоцитозу

## Література

1. Білецька Е.М. Гігієнічні аспекти важких металів у навколишньому середовищі // Буковинський мед. вісн. – 1999. – Т.3, №2. – С. 207–211.
2. Ганджа И.М., Мягкая И.П., Сахарчук В.М. и др. Система иммунитета при заболеваниях внутренних органов. – К.: Здоров'я, 1985. – 280 с.
3. Пильденскиольд Р.С., Новиков Ю.В., Хамидули Р.С. Тяжелые металлы в окружающей среде и их влияние на организм (обзор) // Гиг. и сан. – 1992. – №5–6. – С. 6–9.
4. Забродский П.Ф. Механизмы токсического действия металлов и их влияние на иммунную систему // Токсикол. вестн. – 1998. – №6. – С. 9–15.
5. Иванова М.М., Насонова Е.Л., Соловьев С.К. и др. Циркулирующие иммунные комплексы (ПЭГ-тесты) при системной красной волчанке // Терапевт. арх. – 1982. – №6. – С. 63–68.
6. Кундиев Ю.И., Трахтенберг И.М. Эколого-гигиенические аспекты проблемы тяжелых металлов как техногенных загрязнителей // Гигиена труда. – К., 1991. – Вып.27. – С. 3–8.
7. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Д.С.Саркисова, Ю.Л.Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
8. Минцер О.П., Угаров Б.Н., Власов В.В. Методы обработки медицинской информации. – К.: Вища шк., 1991. – 271 с.
9. Насонов Е.Л., Сура В.В. Взаимосвязь аутоиммунной и иммунокомплексной патологии: современное состояние проблемы // Терапевт. арх. – 1984. – Т.ЛVI, №10. – С. 4–9.
10. Общая токсикология / Под ред. Б.А.Курляндского, В.А.Филова. – М.: Медицина, 2002. – 608 с.
11. Паранько Н.М., Белицкая Э.Н., Карнаух Н.Г. и др. Тяжелые металлы внешней среды и их влияние на иммунный статус населения. – Днепропетровск: Поліграфіст, 2002. – 143 с.
12. Пастер Е.У., Овод В.В., Позур В.К. Иммунология. – К.: Вища шк., 1989. – 284 с.
13. Рудык Б.И., Барановский П.В. Сравнительная оценка изучения содержания иммунных комплексов при инфаркте миокарда, бронхиальной астме и ревматоидном артрите // Терапевт. арх. – 1984. – Т.ЛVI, №10. – С. 17–19.
14. Сепиашвили Р.И. Введение в иммунологию. – Цхалтубо-Кутаиси, 1987. – 230 с.
15. Стежка В.А., Дмитруха Н.Н., Покровская Т.Н. и др. Сравнительная оценка иммунотоксического действия свинца на нейтрофильные лейкоциты и лимфоциты периферической крови крыс в опытах in vivo и in vitro // Проблемы медицины праці. – К., 1998. – С. 149–159.
16. Трахтенберг И.М. Тяжелые металлы как химические загрязнители производственной и окружающей среды // Докл. та здоров'я. – 1997. – №2. – С. 48–51.
17. Угрюмов М.В. Современные методы иммуноцитохимии и гистохимии. Итоги науки и техн. ВИНТИ. Сер. Морфология. – 1991. – Т.15. – 115 с.
18. Bellon B. et al. Mercuric chloride induced autoimmune disease in Brown-Norway rats: sequential search for anti-basement membrane antibodies and circulating immune complexes // Eur. J. Clin. Invest. – 1982. – №12. – P. 127–133.
19. Carlo J.R., Ruddy S., Conwey A.F. Localization of the receptors activated complement on the visceral epithelial cells of the human renal glomerulus by immunoenzymatic microscopy // Am. J. Clin. Pathol. – 1981. – №1. – P. 23–27.
20. Immunotoxicity of metals and immunotoxicology. Proceedings of an International Workshop / Ed. by A.D.Deyan et al. – New York, London: Plenum press, 1990. – 316 p.
21. Haskova V., Kaslik J., Riha I. et al. // Z. Immun.-Forsch. – 1978. – Bd.154. – S. 399–406.
22. Lawrence D.A., Mudzinsky S., Rudovsky U. Mechanisms of metal-induced immunotoxicity in immunotoxicology / Ed. by A.Berlin, J.Dean, M.N.Draper et al., 1987. – P. 293–303.
23. Toxicological Profile for Lead. Draft for Public Comment / Comment Period Ends: February 17, 1998. – 483 p.

## ИССЛЕДОВАНИЕ УЧАСТИЯ ИММУННЫХ ПРОЦЕССОВ В ПРОЯВЛЕНИИ ТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ АЦЕТАТА СВИНЦА НА ПОЧКИ БЕЛЫХ КРЫС

Дмитруха Н.Н.<sup>1</sup>, Луговской С.П.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Институт медицины труда АМН Украины, г. Киев,

<sup>2</sup> Украинский НИИ промышленной медицины, г. Кривой Рог

У белых крыс-самцов моделировали свинцовую интоксикацию. Состояние неспецифической резистентности организма оценивали после внутрибрюшинного введения ацетата свинца в дозе 2,5 мг/кг массы тела в течение 25 дней. Было обнаружено изменение фагоцитарной способности и окислительно-восстановительных процессов в нейтрофилах крови, повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови подопытных животных по сравнению с контрольной группой. При гистологическом исследовании почек у подопытных крыс по сравнению с контролем выявлено поражение структурных компонентов этого органа с отложением иммунных комплексов в полости капсулы почечных телец, в стенках капилляров почечных клубочков и артерий мозгового слоя.

Выявленные изменения иммунологических показателей периферической крови крыс, экспонированных свинцом, могут рассматриваться как ранние критерии токсического действия свинца на организм экспериментальных животных, а также являются подтверждением участия иммунных процессов в формировании патологии почек при свинцовой интоксикации.

**Ключевые слова:** ацетат свинца, иммунотоксичность, свинцовая интоксикация

## INVESTIGATION OF IMMUNE PROCESSES INVOLVING INTO DEVELOPMENT OF LEAD ACETATE TOXIC EFFECT ON THE KIDNEYS OF WHITE RATS

Dmytrukha N.N.<sup>1</sup>, Lugovskyj S.P.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Occupational Health of AMS of Ukraine, Kyiv,

<sup>2</sup> Institute of Industrial Medicine Kryvyj Rig

The lead intoxication was simulated in male white rats. The state of body nonspecific resistance was assessed in rats after 25 intraperitoneal injections of lead acetate at the dose of 2.5 mg/kg body weight. It was established the change of the phagocytic activity and oxidative-reduction processes in blood neutrophiles, high level of immune complexes in blood serum of experimental animals as compared with the control. Histological studies show changes in kidney structural components with immune complexes deposits in the capsule cavity of kidney bodies, on the walls of capillaries of kidney balls and in arteries of the cerebral layer. The changes of immunological indexes of the peripheral blood in the rats exposed to lead is likely to be considered as early criteria of lead toxic effect on the body and also be acknowledge of the participation immune processes in formation of kidney pathology in lead intoxication.

**Key words:** lead acetate, immunotoxicity, lead intoxication

Надійшла 23.05.2005

**Контактна особа:** Дмитруха Н.Н., Інститут медицини праці АМН України