

Н.М. Дмитруха, к.б.н., Т.М., Покровська к.б.н.

ТОКСИЧНА ДІЯ СВИНЦЮ ТА КАДМІЮ НА ІМУНОКОМПЕТЕНТНІ КЛІТИНИ КРОВІ ЩУРІВ В УМОВАХ *IN VITRO*

Інститут медицини праці АМН України, м. Київ

Важкі метали відносяться до небезпечних забруднювачів навколишнього середовища. В індустріально розвинутих країнах за рахунок широкого промислового використання металів, розвитку автомобільної індустрії, хімізації побуту забруднення довкілля (повітря, водойми, ґрунт, харчові продукти) важкими металами становить загрозу для здоров'я населення [1,2].

Висока токсичність важких металів, здатність накопичуватись в організмі людини та спричиняти шкідливий вплив навіть у порівняно низьких концентраціях потребують вирішення низки гігієнічних та медико-біологічних проблем. У зв'язку з цим проводиться пошук критеріїв ранньої діагностики їхнього патогенного впливу на організм людини та тварин.

В сучасних токсикологічних дослідженнях, поряд з традиційними експериментами на лабораторних тваринах, приділяється увага розробці альтернативних методів *in vitro* оцінки токсичності ксенобіотиків з використанням різних об'єктів — безхребетних тварин, мікроорганізмів, культур клітин [3-5].

Цитотоксичні ефекти важких металів вивчали на еритроцитах, лімфоцитах, культурах клітин печінки, нирок. Доведено, що вони можуть пошкоджувати мембрани клітин, змінювати їх проникність, знижувати стійкість до осмотичного шоку, порушувати біоенергетичні процеси в клітинах [6-10]. Важкі метали здатні впливати на імунну систему, пригнічувати неспецифічну резистентність і стійкість організму до інфекцій, стимулювати аутоімунні реакції [11-13], проте механізми їх імунотоксичної дії до кінця нез'ясовані.

Метою даної роботи було

дослідження токсичних ефектів свинцю та кадмію на імунокомпетентні клітини периферичної крові білих нелінійних щурів в умовах *in vitro*.

Для досліджень були обрані нейтрофіли та лімфоцити крові — важливі елементи імунної системи. Від ефективної дії нейтрофілів значною мірою залежить рівень неспецифічної резистентності організму, оскільки вони приймають активну участь у процесі фагоцитозу — видаленні з організму патогенних мікроорганізмів, різних сторонніх речовин та власних злویкісних клітин. Нейтрофіли є універсальним індикатором будь яких змін гомеостазу і важливою ланкою в ініціації імунних реакцій. Лімфоцити, як відомо, виконують головну роль у формуванні клітинних та гуморальних імунних реакцій (рисунк).

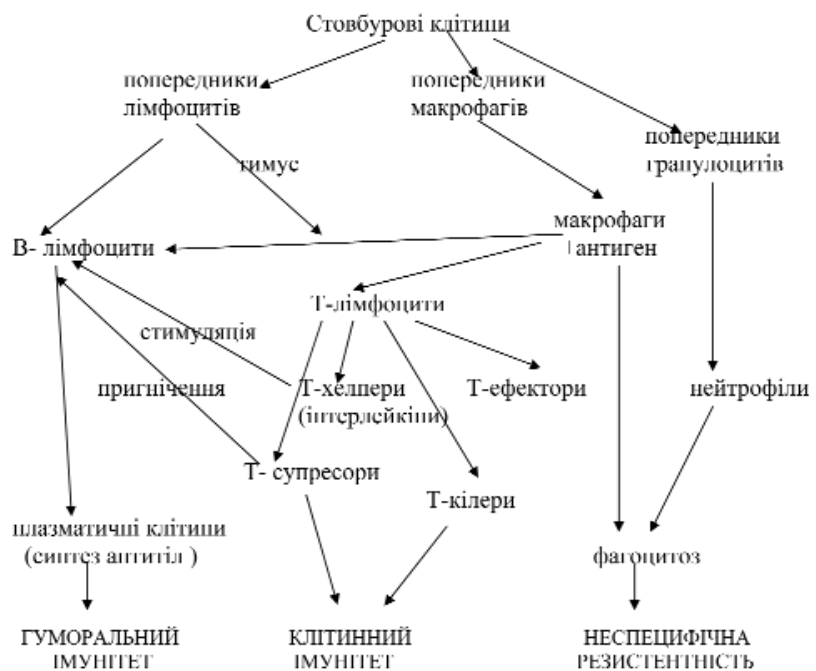


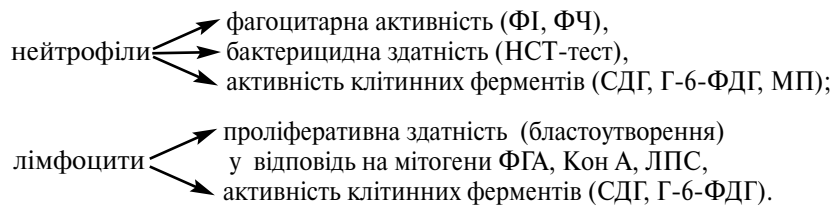
Рисунок. Схема кооперації та участі клітин крові в імунній відповіді [14].

Матеріали та методи дослідження.

Дослідження проведені на клітинах периферичної крові інтактних білих нелінійних щурів масою 190-230 г, які утримувались у звичайних умовах віварію на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до питної води.

В експерименті використовували цільну кров тварин, що дозволяло наблизити умови створеної *in vitro* моделі до аналогічних у живому організмі. Кров забирали на гепарин (10 МО/мл) під час декапітації тварин під ефірним наркозом. В дослідних пробах до 1 мл крові додавали 1 мл розчину ацетату свинцю або сульфату кадмію в кінцевих концентраціях по катіону металу $1 \cdot 10^{-11}$, $1 \cdot 10^{-9}$, $1 \cdot 10^{-7}$, $1 \cdot 10^{-6}$, $1 \cdot 10^{-5}$, $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л. В контрольній пробі до 1 мл крові додавали 1 мл 0.9% розчину NaCl, pH 7.2. Контрольні і дослідні проби інкубували 30 хв в термостаті при 37°C. Після інкубації клітини крові в пробах двічі відмивали середовищем Хенкса без фенолового червоного центрифугуванням 10 хв при 1500 об./хв і ним же доводили до попереднього об'єму. В дослідних та контрольних пробах оцінювали функціональну активність клітин крові.

Фагоцитарну активність нейтрофілів — фагоцитарний індекс (ФІ) та фагоцитарне число (ФЧ)) визначали за методом [15]. В якості тест об'єкта використовували час-



точки полістиролового латексу ($d=1.5$ мкм). Окисно-відновний потенціал (бактерицидність) та функціональні резерви нейтрофілів досліджували за допомогою тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест спонтанний та стимульований) [15]. Дослідження впливу катіонів свинцю та кадмію на проліферативну активність лімфоцитів крові проводили в реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ). Оцінювали спонтанну бласттрансформацію та у присутності клітинних мітогенів — фітогемаглютиніну (ФГА), конканаваліну А (КонА), бактеріального ліпополісахариду (ЛПС) [15]. Активність внутрішньоклітинних ферментів в клітинах крові: сукцинатдегідрогенази (СДГ), глюкозо-6-фосфатази (Г-6-ФДГ) і мієлопероксидази (МП) визначали цитохімічними методами [16, 17].

Результати дослідження обраховані статистично на комп'ютері за допомогою стандартного пакету програм Excel з визначенням середніх величин та їхніх похибок ($M \pm m$), t -критерію Ст'юдента.

Результати дослідження та їх обговорення.

Проведені дослідження показали, що катіони свинцю на рівні $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л значно пригнічували фагоцитарну та бактерицидну здатність нейтрофілів, активність в них ферментів СДГ, Г-6-ФДГ, МП; стимулювали спонтанне бластоутворення лімфоцитів та їхню відповідь на мітоген ЛПС, пригнічували — на Кон А, знижували активність ферменту СДГ. Свинець у концентрації $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л також знижував бактерицидність та функціональні резерви фагоцитів, активність в них ферменту СДГ. Для лімфоцитів було визначено пригнічення бластоутворення спонтанного та у відповідь на мітоген Кон А. Активність ферментів в лімфоцитах не змінювалась по відношенню до контрольної проби.

Концентрація свинцю $1 \cdot 10^{-7}$ моль/л не викликала змін з боку функції нейтрофілів, проте пригнічувала проліферативну активність лімфоцитів — спонтанну та на мітогени ФГА і Кон А, підсилювала їхню відповідь на ЛПС, при цьому активність ферментів в лімфоцитах не відрізнялась від контрольних значень. Зменшення концентрації катіонів свинцю до $1 \cdot 10^{-9}$ моль/л стимулювало поглинаючу і бактерицидну здатність нейтрофілів крові, спонтанне бластоутворення лімфоцитів та у відповідь на мітогени ФГА і ЛПС, але пригнічувало на Кон А, активність внутрішньоклітинних ферментів також не змінювалась. Найменша з використаних в дослідженнях концентрація катіонів свинцю 10^{-11} моль/л при додаванні до крові щурів не впливала на функціональну активність нейтрофілів, тоді як спонтанна проліферація лімфоцитів та їх відповідь на ЛПС були підвищені, а на Кон А — знижені. Зміни активності внутрішньоклітинних ферментів в нейтрофілах і лімфоцитах за дії даної концентрації свинцю не відбувались (табл. 1).

Додавання до крові щурів катіонів кадмію у концентраціях $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л та $1 \cdot 10^{-5}$ моль/л сприяло пригніченню ФАН, зниженню відсотка НСТ- позитивних клітин, активності ферментів СДГ, Г-6-ФДГ, МП, підвищенню спонтанної проліферації лімфоцитів та пригніченню їхньої відповіді на мітогени. При інкубації клітин крові з катіонами кадмію у концентрації 10^{-6} моль/л виявлялись низькі значення ФІ та НСТ — спонтанного, підвищена відповідь лімфоцитів на ФГА. Активність клітинних ферментів в обох популяціях лейкоцитів крові не відрізнялась від контролю. Катіони кадмію у концентрації 10^{-9} моль/л сприяли тільки зниженню бластоутворення лімфоцитів у відповідь на мітоген Кон-А, а у найменшій концентрації (10^{-11} моль/л)

катіони даного металу, також як і катіони свинцю, не змінювали функціональну активність імуні-компетентних клітин крові щурів (табл. 2).

Результати проведених досліджень дозволяють констатувати, що інкубація периферичної крові нелінійних білих щурів з розчинами солей свинцю і кадмію призводила до порушення фагоцитарної функції нейтрофілів, проліферативної здатності лімфоцитів та метаболічних процесів в цих клітинах зі зміною активності внутрішньоклітинних ферментів. Виявлені порушення були обумовлені прямою токсичною дією металів на клітини крові і залежали від їх концентрації у інкубаційному середовищі. Відносно високі концентрації катіонів металу знижували фагоцитарну активність нейтрофілів та проліферацію лімфоцитів крові щурів у відповідь на клітинні мітогени, ФГА, КонА та ЛПС, тоді як низькі концентрації металів підвищували фагоцитарну функцію нейтрофілів і стимулювали окисно-відновні реакції в них за показниками НСТ-тесту. Отримані дані дозволяють припустити, що лімфоцити крові більш чутливі до токсичної дії катіонів свинцю і кадмію ніж нейтрофіли.

Порівняння результатів досліджень *in vitro* з даними, отриманими в попередніх субхронічних експериментах *in vivo* [13], дозволило встановити однакову спрямованість змін функціональної активності нейтрофілів і лімфоцитів та їх залежність від концентрації катіонів металів у крові тварин (табл. 3.).

Отримані нами результати доповнюють відомі дані літератури [8,9,11,18] стосовно цитотоксичних і імунотоксичних властивостей важких металів.

Таким чином, проведені *in vitro* експерименти свідчать про перспективність використання периферичної крові тварин і людини в якості альтернативної моделі для дослідження токсичних властивостей важких металів. Запропонована модель є виправданою з етичної та економічної точок зору, оскільки не потребує великої кількості тварин та коштовного обладнання, всі дослідження здійснюються в короткостроковий термін.

Вплив катіонів свинцю на функціональну активність нейтрофілів та лімфоцитів периферичної крові щурів (M±m)

Концентрація свинцю, в пробі, моль/л	Фагоцитарна активність нейтрофілів		НСТ-тест, %		Активність ферментів у нейтрофілах, ум. од.			Реакція бластної трансформації лімфоцитів, %				Активність ферментів у лімфоцитах, ум.од.	
	ФІ, %	ФЧ, ум.од	спонтанний	стимульований	СДГ	Г-6-ФДГ	МП	спонтанна	ФГА	Кон-А	ЛПС	СДГ	Г-6-ФДГ
Контроль	22.0±1.4	2.0±0.1	11.5±0.4	17.6±0.8	17.5±0.5	18.4±0.2	2.5±0.1	21.3±1.4	6.0±0.6	9.3±0.6	5.0±0.4	12.9±0.2	2.5±0.3
1x10 ⁻¹¹	21.7±1.7	2.2±0.1	10.0±0.8	18.3±0.6	17.4±0.1	18.1±0.1	2.4±0.1	27.7±2.9*	6.7±0.8	4.1±0.6*	9.0±0.8*	12.8±0.2	12.4±0.3
1x10 ⁻⁹	38.0±0.9*	3.9±0.1*	14.0±0.8*	18.4±2.3	17.3±0.3	18.2±0.4	2.5±0.1	28.0±1.1*	12.5±1.1*	3.3±0.6*	7.8±0.8*	12.7±0.4	12.3±0.5
Контроль	21.3±1.6	2.1±0.1	10.3±0.8	17.0±0.5	17.9±0.3	18.7±0.3	2.6±0.1	23.0±1.7	6.3±0.4	9.3±0.8	5.3±0.4	13.1±0.2	12.8±0.3
1x10 ⁻⁷	25.3±3.0	2.3±0.1	9.0±0.6	15.6±0.8	17.4±0.4	17.9±0.3	2.4±0.1	12.3±0.6*	1.8±0.3*	4.3±0.6*	8.5±0.8*	12.6±0.2	12.1±0.4
1x10 ⁻⁵	17.0±2.6	2.3±0.2	7.2±1.3*	14.2±0.7*	17.2±0.2*	18.1±0.5	2.4±0.1	9.8±0.8*	6.3±2.1	1.3±0.6*	6.5±1.0	12.9±0.5	12.5±0.2
1x10 ⁻³	13.3±2.5*	1.4±0.1*	6.0±1.1*	13.5±0.8*	16.6±0.2*	17.3±0.4*	2.3±0.1*	30.7±2.5*	5.3±1.3	2.3±1.3*	9.7±1.7*	12.4±0.3*	12.0±0.4

Примітка: в цій та табл.2 * — P<0.05 по відношенню до контролю.

Таблица 2

Вплив катіонів кадмію на функціональну активність нейтрофілів та лімфоцитів периферичної крові щурів (M±m)

Концентрація кадмію, в пробі, моль/л	Фагоцитарна активність нейтрофілів		НСТ-тест, %		Активність ферментів у нейтрофілах, ум. од.			Реакція бластної трансформації лімфоцитів, %				Активність ферментів у лімфоцитах, ум.од.	
	ФІ, %	ФЧ, ум.од	спонтанний	стимульований	СДГ	Г-6-ФДГ	МП	спонтанна	ФГА	Кон-А	ЛПС	СДГ	Г-6-ФДГ
Контроль	37.5±0.9	2.1±0.8	10.8±0.7	17.0±1.0	17.8±0.3	18.3±0.3	2.7±0.1	25.0±4.5	17.5±1.5	9.0±1.0	15.0±2.0	12.9±0.2	12.1±0.2
1x10 ⁻¹¹	38.0±0.5	1.8±0.4	10.3±0.5	17.3±1.0	17.9±0.3	18.2±0.2	2.6±0.1	26.5±2.0	21.7±1.8	8.0±0.5	15.8±3.0	12.8±0.4	12.2±0.2
1x10 ⁻⁹	38.0±0.8	1.9±0.4	9.8±0.7	16.2±0.5	17.5±0.2	18.3±0.3	2.6±0.1	21.8±1.5	17.8±2.0	4.3±0.5*	12.8±2.5	12.6±0.2	12.1±0.3
Контроль	34.0±1.4	2.4±0.1	12.5±1.8	19.0±3.5	17.8±0.3	18.3±0.3	2.7±0.1	24.0±0.9	20.3±1.2	3.0±0.7	12.5±0.9	12.9±0.2	12.2±0.2
1x10 ⁻⁶	17.0±0.8*	3.1±0.1*	6.5±0.6*	20.5±1.8	17.1±0.4	17.7±0.3	2.5±0.1	26.0±1.0	23.0±0.9*	-3.6±0.9*	8.2±1.2*	12.1±0.2	12.3±0.2
1x10 ⁻⁵	16.0±0.8*	2.0±0.1*	5.0±0.7*	8.0±1.2*	16.9±0.2*	17.5±0.2*	2.6±0.1	36.2±1.0*	15.3±0.3*	-6.3±0.8*	-4.9±1.1*	11.6±0.4	11.9±0.2
1x10 ⁻³	10.3±0.9*	1.3±0.1*	5.0±0.8*	5.2±0.9*	16.5±0.1*	17.3±0.2*	2.4±0.1*	38.0±5.0*	9.2±0.8*	-5.8±1.0*	-4.1±0.9*	11.9±0.4	11.7±0.1

Порівняльна характеристика токсичних ефектів катіонів свинцю та кадмію на клітини крові білих нелінійних щурів в дослідах in vivo та in vitro

Показники	IN VIVO Кількість введень / концентрація катіонів в крові, моль/л						IN VITRO Концентрація катіонів, моль/л									
	Pb			Cd			Pb					Cd				
	5 / 0,9 x 10 ⁻⁵	10 / 1,2 x 10 ⁻⁵	25/2, 9 x 10 ⁻⁵	5 / 1,0 x 10 ⁻⁶	10 / 1,8 x 10 ⁻⁶	25 / 3,0 x 10 ⁻⁶	10 ⁻¹¹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻³	10 ⁻¹¹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷	10 ⁻⁵	10 ⁻³
НЕЙТРОФІЛИ																
ФІ	↓	↓	↓	↓	↓	↓	К	↑	К	К	↓	К	К	↓	↓	↓
ФЧ	↓	↓	↓	К	К	К	К	↑	К	К	↓	К	К	↓	↓	↓
НСТ спонт.	К	К	↓	К	↓	↑	К	↑	К	К	↓	К	К	↓	↓	↓
НСТ стим.	К	К	↓	К	↓	↓	К	К	К	↓	↓	К	К	К	↓	↓
СДГ	↓	↓	К	К	↓	↓	К	К	К	↓	↓	К	К	К	↓	↓
Г-6-ФДГ	К	↓	К	↑	К	К	К	К	К	К	↓	К	К	К	↓	↓
МП	↓	К	К	К	К	К	К	К	К	К	↓	К	К	↓	К	↓
ЛІМФОЦИТИ																
РБТЛ спонт	↑	↓	К	↑	К	↑	↑	↑	↓	↓	↑	К	К	К	↑	↑
ФГА	↓	К	К	К	К	↓	К	↑	↓	К	К	К	К	К	↓	↓
Кона	↓	К	↑	↓	К	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
ЛПС	↓	К	К	↓	К	↓	↑	↑	↑	К	↑	К	К	↓	↓	↓
СДГ	↓	↓	↓	К	↓	К	К	К	К	К	К	К	К	К	К	К
Г-6-ФДГ	↓	↓	↓	↑	↓	К	К	К	↓	К	К	К	К	К	К	К

Примітки : 1. К — значення показників на рівні контролю;

2. ↑ — підвищення або активація; 3. ↓ — зниження або пригнічення.

ЛІТЕРАТУРА

- Трахтенберг И.М. Тяжелые металлы как химические загрязнители производственной и окружающей среды // Довкілля та здоров'я. — 1997. — №2. — С. 48-51.
- Гильденскиольд Р.С., Новиков Ю.В., Хамидули Р.С. Тяжелые металлы в окружающей среде и их влияние на организм (обзор) // Гигиена и санитария. — 1992. — №5-6. — С.6-9.
- Трахтенберг И.М., Резников А.Г. Альтернативные методы и принцип научной целесообразности в медико-биологических исследованиях / Сб. доповідей Міжнар.наук.конф. "Етичні проблеми медицини праці та гігієни довкілля", 9-10 грудня 2003. -Київ, 2003. — С.8-9.
- Дядищев Н.Д., Рыбалкин С.П., Марченко А.И. Биологические модели in vitro в токсикологии / Сб.тезисов докл. 1-го съезда токсикологов 17-20 ноября 1998. — Москва, 1998. —С.276.
- Завьялов Н.В., Червонская Г.П., Панкратова Г.П. и др. Ускоренное изучение цитотоксического действия в экспресс-тестах in vitro / Там же. — С.279.
- Габулгамова Р.А., Соколов В.В. Использование эритроцита для оценки воздействия химических соединений на организм работающих // Гиг.труда и проф.забол. -1988. — №7. — С.28-30.
- Естернюк Г.М. Біохімічні механізми пошкодження еритроцитів за умов експериментальної інтоксикації кадмієм / Автореф. дис... док.мед.наук. — Київ, 2004. — 35 с.
- Прокопенко В.В., Набока Ю.Н., Метелица Л.А. и др. Чувствительность молекулярных, надмолекулярных и клеточных биообъектов к катионам тяжелых металлов // Соврем. проблемы токсикол. — 1999. — №3. — С.18-21.
- Дейнека С.Е. Токсиколого-гігієнічні аспекти застосування методу культури клітин при комплексному вивченні солей важких металів та оцінці засобів цитопротекції / Автореф. дис... док.мед.наук. — Чернівці, 1999. — 35 с.
- Трахтенберг И.М., Иванова Л.А. Тяжелые металлы и клеточные мембраны (обзор литературы) // Медицина труда и пром. экология. — 1999. — №11. — С.28-32.
- Jung D., Bolm-Audorff U., Faldum A. et al. Immunotoxicity of co-exposures to heavy metals: In vitro studies and results from occupational exposure to cadmium, cobalt and lead // EXCLI Journal. — 2003. — N2. — P.31-44.
- Стежка В.А., Дмитруха Н.Н., Покровская Т.Н. и др. Влияние соединений тяжелых металлов из окружающей среды на состояние иммунной системы у механизаторов сельского

- хозяйства // Довкілля та здоров'я. — 2002. — №1 (20). — С.6-11.
13. *Дмитруха Н.М.* Експериментальне дослідження впливу важких металів (свинцю та кадмію) на неспецифічну резистентність організму білих шурів // Современные проблемы токсикологии. — 2004. — №4. — С.27-31.
14. *Куценко С.А.* Основы токсикологии. — СПб.: Наука, 2002. — 415 с.
15. *Сениашивили Р.И.* Введение в иммунологию. — Цхалтубо-Кутаиси, 1987. — 230 с.
16. Лабораторные методы исследования в клинике. /Под ред. Меньшикова В.В. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
17. *Бутенко З.А., Глушман Д.Ф., Зак К.П.* Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. — Киев, 1974. — 74 с.
18. *Забродский П.Ф.* Механизмы токсического действия металлов и их влияние на иммунную систему //Токсикологический вестник. — 1998. — №6. — С.9 — 15.

Н.Н. Дмитруха, Т.Н. Покровская

ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ СВИНЦА И КАДМИЯ НА ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫЕ КЛЕТКИ КРОВИ КРЫС В УСЛОВИЯХ IN VITRO

В работе представлены результаты исследований *in vitro* влияния свинца и кадмия на фагоцитарную активность нейтрофилов и пролиферативную способность лимфоцитов крови белых нелинейных крыс. Инкубация крови животных с растворами ацетата свинца и сульфата кадмия в концентрациях 10^{-3} — 10^{-11} моль/л приводила к нарушению функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Высокие концентрации катионов металлов подавляли поглотительную способность нейтрофилов и пролиферацию лимфоцитов в ответ на клеточные митогены, низкие концентрации данных металлов, наоборот, их стимулировали. Лимфоциты были более чувствительны к повреждающему действию катионов металлов, чем нейтрофилы.

N.N. Dmytrukha, T.M. Pokrovska

LEAD AND CADMIUM TOXIC EFFECTS ON RAT IMMUNE BLOOD CELLS IN VITRO

This paper presented results of *in vitro* studies of lead and cadmium effects on phagocyte and bactericidal activity of rat neutrophils and lymphocyte proliferation to mitogens. The incubation of rat blood with lead acetate and cadmium sulfate

in vitro in concentrations of 10^{-3} — 10^{-11} M/l resulted in the change of the functional activity of immunocompetent cells. High concentrations of lead and cadmium depressed the neutrophilic phagocyte activity and the lymphocyte proliferation to mitogens. Low concentrations of metals caused stimulated effects on neutrophils and lymphocyte functional activity.

According to the obtained data lymphocytes are likely to be more vulnerable cells to harmful effect of metals than neutrophils.