

ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ОСТРОМ ОТРАВЛЕНИИ ДИХЛОРИДОМ РТУТИ У КРЫС

Стосман К.И.^{1,2}, Сивак К.В.²

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Резюме.

Обоснование. Ртуть является один из самых опасных и высокотоксичных элементов, характеризующимся гемато- и иммунотоксичностью. При острых отравлениях ртутью и ее соединениями снижаются показатели неспецифической реактивности организма, происходят функциональные изменения в периферической крови, нарушения механизмов иммунной защиты.

Цель. Изучение иммуно- и гематотоксического потенциала дихлорида ртути при остром отравлении у крыс.

Материалы и методы. Исследование проведено на 20 крысах самцах линии Wistar с массой тела 200–230 г. Дихлорид ртути вводили однократно внутривенно в дозе 2 мг/кг.

Результаты. Показано, что в крови животных через 4 суток после однократного введения токсиканта (в позднюю токсикогенную и раннюю соматогенную фазы отравления) наблюдались лейкоцитоз, лимфопения, моноцитоз, нейтрофилез. На фоне острого отравления индекс Кребса, лейкоцитарный индекс интоксикации и ядерный индекс Г.Д. Даштаянца увеличивались (на 27 %, 19 % и 37 %, соответственно), а индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов и индекс иммунореактивности уменьшались (на 44 % и 17 %). Выявлено снижение CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов (на 35 % и 16 %), иммунорегуляторного индекса (на 20 %), концентрации IgG и IgM (28 % и 35 %), редукция фагоцитарной активности нейтрофилов (на 20 %), увеличение апоптотической (почти в 2 раза) и некротической гибели (в 3 раза) мононуклеаров, концентрации TNF-α (в 1,5 раза).

Заключение. Показано, что в поздней токсикогенной и ранней соматогенной фазе отравления дихлоридом ртути наблюдаются лейкоцитоз, нейтрофилез, моноцитоз и лимфопения, изменяются интегральные гематологические индексы. Регистрируется снижение содержания в крови субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4⁺ и CD8⁺), иммунорегуляторного индекса, иммуноглобулинов класса G и M, поглотительной

способность нейтрофилов, увеличение мононуклеаров, вступивших в стадию раннего апоптоза, повышение количества клеток, погибших посредством некроза, содержания в крови TNF- α .

Ключевые слова: острое отравление, дихлорид ртути, гематологические индексы, иммунная система

HAEMATOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL PARAMETERS IN ACUTE MERCURY DICHLORIDE POISONING IN RATS

Stosman K.I.^{1,2}, Sivak K.V.²

¹ *The Federal State-Financed Institution Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency*

² *Smorodintsev Research Institute of Influenza*

Resume.

Background. Mercury is one of the most dangerous and highly toxic elements, characterised by haematotoxicity and immunotoxicity. Indicators of nonspecific reactivity of the organism, functional changes occur in peripheral blood, immune defence mechanisms are reduced in acute mercury and mercury compounds poisoning.

The aim. The study of immuno- and haematotoxic potential of mercury dichloride in acute poisoning in rats.

Materials and methods. The study was conducted on 20 male Wistar rats (200-230 g body weight). Mercury dichloride was injected once intraperitoneally at a dose 2 mg/kg.

Results. Leukocytosis, lymphopenia, monocytosis, neutrophilia in 4 days after a single injection of the toxicant (in the late toxicogenic and early somatogenic phases of poisoning) were observed. Krebs index, leukocyte intoxication index and of G.D. Dashtayanets nuclear index increased (by 27 %, 19 % and 37 % respectively), while lymphocyte-monocyte ratio index and immunoreactivity index decreased (44 % and 17 %). A decrease of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes (by 35 % and 16 %), immunoregulatory index (by 20 %), IgG and IgM concentration (by 28 % and 35 %), reduction of neutrophil phagocytic activity (by 20 %), increase of apoptotic (almost twice as much) and necrotic mononuclear cell death (threefold), TNF- α concentration (by a factor of 1,5) were revealed.

Conclusion. Leukocytosis, neutrophilia, monocytosis and lymphopenia, change of integral hematological indexes are marked in late toxicogenic and early somatogenic phase of mercury dichloride poisoning. A decrease of CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes, immunoregulatory index, IgG

and IgM concentration, reduction of neutrophil phagocytic activity, increase of apoptotic and necrotic mononuclear cell death, TNF- α concentration were detected in blood.

Keywords: acute exposure, mercury chloride, hematological indices, immune system

Введение

Ртуть и ее соединения являются широко распространенными загрязнителями окружающей среды и обладают высокой биологической активностью. Ранее в медицине применяли ртутные диуретики (промеран и меркузал), а консервант мертиолят (тиомерсал) до сих пор используется в составе многодозовых флаконов с вакцинными препаратами. По данным агентства по токсическим веществам и системному регистру заболеваний (ATSDR) ртуть – один из трех самых опасных металлов после мышьяка и свинца. Ее токсичность обусловлена способностью нарушать транспорт натрия и калия через мембраны, образовывать стабильные комплексы с сульфгидрильно-цистеиновыми группами белков, таким образом, повреждая белки, инактивируя тиоловые ферменты, например, сукцинатдегидрогеназу, АТФ-азу. Органические соединения ртути оказывают нейротоксическое действие из-за их липофильности, а неорганические – вызывают поражение почек, эпителия желудочнокишечного тракта, печени. Соединения ртути, наряду с выраженной нефротоксичностью, характеризуются высокой иммунотоксичностью, могут приводить к развитию воспаления, системной аутоиммунной патологии [1–3]. При острых отравлениях наблюдается снижение показателей неспецифической реактивности организма, функциональной активности клеток, нарушение механизмов иммунной защиты [10]. Способность разрывать дисульфидные связи в белках и пептидах может объяснить участие этого тяжелого металла в регуляции активности антигенраспознающих структур, расположенных на поверхности лимфоцитов. При ртутной интоксикации снижается активность аденозиндеаминазы и АМФ-деаминазы, а активность 5'-нуклеотидазы остается высокой, что приводит к увеличению концентрации аденозина, оказывающего тормозящее воздействие на степень зрелости В-лимфоцитов, наблюдается уменьшение продукции IgG и IgM [4, 5]. Показано, что ртуть стимулирует синтез провоспалительных цитокинов TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , пролиферацию лимфоцитов, может вызывать как апоптоз, так и некроз клеток, является индуктором клеточной гибели с участием разных сигнальных путей [6, 7]. Существуют наблюдения об ингибирующем влиянии этого тяжелого металла на гибель лимфоцитов и нейтрофилов периферической крови, происходящую по CD95(Fas)/CD95L(Fas-ligand)-зависимому пути [8, 9].

Целью работы явилось изучение иммуно- и гематотоксического потенциала дихлорида ртути при остром отравлении у крыс.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проведено в соответствии с этическими принципами обращения с лабораторными животными [11]. Работа выполнена на 20 крысах самцах линии Wistar с массой тела 200–230 г., полученных из НИЦ «Курчатовский институт» – «ПЛЖ» Рапполово (Ленинградская область). Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ «НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА». Животные были разделены на 2 группы: 1 группа – особи, которым однократно внутрибрюшинно вводили вводу для инъекций (1 мл/кг); 2 группа – особи, которым однократно внутрибрюшинно вводили дихлорид ртути в дозе 2 мг/кг. Каждая группа состояла из 10 крыс. Через 4 дня после введения токсиканта у животных забирали кровь для исследований. Этот срок выбран на основании данных токсикокинетики и захватывает соматогенную и позднюю токсикогенную фазы отравления.

Гематологический анализ крови проводили на анализаторе Abacus Junior Vet (Австрия). Подсчитывали индекс Кребса (ИК, отношение общего количества (%) нейтрофилов к лимфоцитам); лейкоцитарный индекс интоксикации (ЛИИ, отношение (%) суммы палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов к сумме лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов); ядерный индекс Г.Д. Даштаянца (ЯИ, отношение количества (%) моноцитов и палочкоядерных нейтрофилов к уровню сегментоядерных нейтрофилов); индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ); индекс иммунореактивности (ИИР, отношение (%) суммы лимфоцитов и эозинофилов к моноцитам). Для оценки субпопуляционного состава Т-лимфоцитов использовали меченые мышинные моноклональные антитела против CD45, CD3, CD4 и CD8 антигенов крыс (BD Pharmingen, США). Количество апоптотических и некротических клеток оценивали с помощью стандартной процедуры окрашивания с использованием меченного флюоресцеинизотиоцианатом аннексин V и пропидиум йодида в суспензии моноклеарных клеток крови, выделенных в градиенте плотности Lympholite-Rat (Cedarlane, Канада). Цитометрию проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, США). Определение концентрации TNF- α , INF- γ , IgG и IgM в сыворотке крови осуществляли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов (Cusabio, Китай; Cloud-Clone Corp., США). Фагоцитарную активность нейтрофилов оценивали согласно методу [12].

Для обработки результатов использовали пакет статистических программ GraphPad Prism 7.0 (StatSoft Inc., США). Проверку на нормальность распределения проводили методом Шапиро-Уилка. Отличия между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни и считали значимыми при уровне $p < 0,05$. Данные в таблицах представлены в виде среднего арифметического значения (Mean) и его ошибки ($\pm SE$).

Результаты и их обсуждение

Проведенное исследование показало, что однократное введение дихлорида ртути привело к изменению ряда гематологических показателей (таблица 1).

Таблица 1

Влияние острого отравления дихлоридом ртути на гематологические показатели у крыс

Изучаемые показатели	Экспериментальные группы (n=10)/доза	
	Плацебо	Дихлорид ртути, 2 мг/кг
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	14,30 $\pm$ 1,26	19,70 $\pm$ 2,29*
Нейтрофилы, $10^9/\text{л}$	4,30 $\pm$ 0,25	5,73 $\pm$ 0,31*
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	10,76 $\pm$ 0,44	7,52 $\pm$ 0,31*
Палочкоядерные нейтрофилы, %	1,40 $\pm$ 0,16	4,60 $\pm$ 0,50*
Сегментоядерные нейтрофилы, %	15,70 $\pm$ 1,25	26,90 $\pm$ 1,68*
Эозинофилы, %	0,30 $\pm$ 0,15	0,60 $\pm$ 0,16
Базофилы, %	0,20 $\pm$ 0,13	0,50 $\pm$ 0,22
Моноциты, %	3,00 $\pm$ 0,26	5,90 $\pm$ 0,50*
Лимфоциты, %	79,40 $\pm$ 1,28	57,10 $\pm$ 1,69*
Примечание: * – различия между показателями статистически значимы, $p < 0,05$		

У животных наблюдалось увеличение абсолютного числа лейкоцитов, появление молодых незрелых форм (миелоцитов). В лейкограмме отмечали нейтрофилез, лимфоцитопению, моноцитоз. Выявленное повышение содержания нейтрофилов и моноцитов в периферической крови животных через 4 суток после острого отравления, вероятно, является следствием депонирования ионов ртути во внутренних органах, что привело к запуску каскада воспалительных реакций [13]. Наблюдаемое в нашем исследовании снижение числа лимфоцитов может быть результатом токсического влияния дихлорида ртути на лимфопоэз.

Изменение лейкоцитарной формулы свидетельствовало о воспалительном процессе, развивающемся вследствие интоксикации организма, и косвенно указывало на снижение иммунологической реактивности. Высказанное предположение было подтверждено при оценке интегральных гематологических индексов. Увеличение числа нейтрофилов и моноцитов приводило к возрастанию ИК (на 27%), ЛИИ (на 19%) и ЯА (на 37%), что указывало на активацию фагоцитарных реакций и факторов специфического иммунитета, пролиферации нейтрофилов, повышение продолжительности циркуляции клеток в кровяном русле, их участие в поддержании общей реактивности организма (рисунок 1).

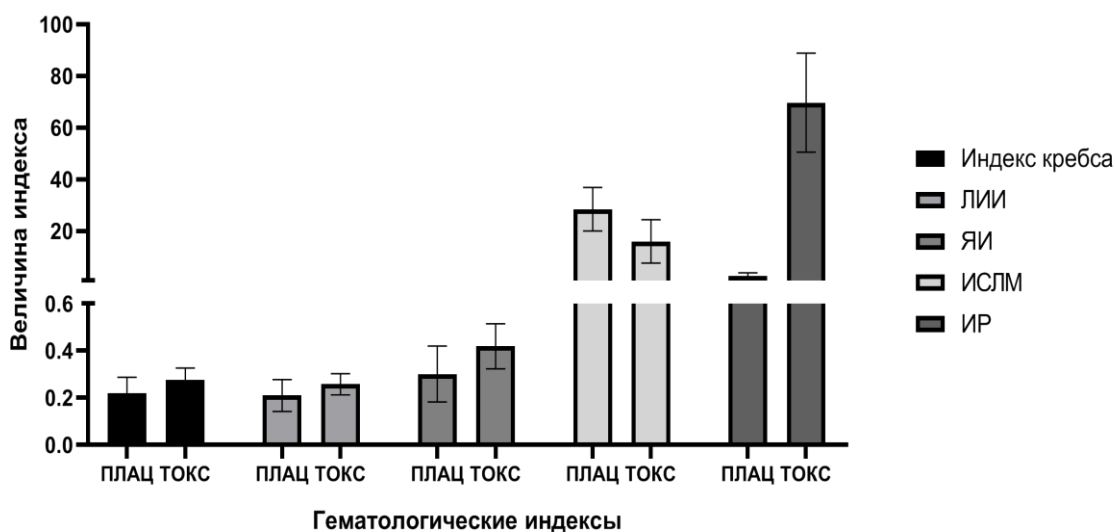


Рисунок 1. Гематологические индексы при остром отравлении дихлоридом ртути у крыс

Величина ИСЛМ, отражающего взаимоотношения аффлекторного и эффекторного звеньев иммунологического процесса, у животных, которым вводили токсикант, была снижена почти на 40 % из-за уменьшения числа лимфоцитов в крови. Лимфопения при ртутной интоксикации, вероятно, является следствием угнетения пролиферативной активности костного мозга. Наблюдаемая в эксперименте небольшая редукция ИИР (на 17 %) отражает возможный дефицит цитокинов лимфоцитарного происхождения и ограниченность резервов адаптации. Все выше описанные изменения свидетельствуют о воздействии токсиканта на клетки крови и органы лейкопоза и доказывают наличие признаков эндогенной интоксикации.

Анализ иммунологических показателей выявил, что в поздней токсикогенной и ранней соматогенной фазах острого отравления формируются определенные иммунологические сдвиги. Введение экспериментальным животным хлорида ртути привело

к редукции содержания в крови основных иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов – хелперов и цитотоксических Т-клеток. Относительное содержание CD4+ Т-лимфоцитов было понижено на 35%, CD8+ цитотоксических Т-лимфоцитов – на 16%, что приводило почти к 20% снижению значения иммунорегуляторного индекса (CD4+/CD8+) (таблица 2). Такой дисбаланс эффекторных и цитотоксических клеток при остром отравлении хлоридом ртути позволяет предположить о неполноценности Т-хелперного звена иммунной защиты и супрессорной активности цитотоксических Т-лимфоцитов.

Таблица 2.

Влияние острого отравления хлоридом ртути на показатели системы иммунитета крыс

Изучаемые показатели	Экспериментальные группы (n=10)/доза	
	Плацебо	Дихлорид ртути, 2 мг/кг
CD3+CD45+CD4+, %	62,80±1,01	41,3±1,2*
CD3+CD45+CD8+, %	31,13±0,92	26,1±1,3*
CD4+/CD8+	2,03±0,08	1,53±0,06*
Мононуклеары в стадии раннего апоптоза, %	5,34±1,02	10,2±2,5*
Мононуклеары в стадии позднего апоптоза, %	17,01±1,81	19,3±2,6
Некроз мононуклеаров, %	1,25 ± 0,34	4,06 ± 0,83*
TNF-α, пг/мл	39,34±3,91	65,9±3,1*
INF-γ, пг/мл	14,72±2,11	17,60±4,10
IgG, мг/мл	7,74±0,83	5,64±0,53*
IgM, мг/мл	0,47±0,04	0,31±0,04*
Фагоцитарная активность нейтрофилов	0,46±0,05	0,37±0,03*
Примечание: * – различия между показателями статистически значимы, p<0,05		

Оценка процентного содержания мононуклеаров, претерпевающих апоптотическую гибель, позволила установить, что при остром отравлении сулемой существенно повышалось число клеток, вступивших в стадию раннего апоптоза. Отсутствие значимого увеличения количества мононуклеаров на поздней стадии программируемой клеточной гибели может быть связано с тем, что начавшийся процесс апоптоза не всегда завершается фрагментацией ДНК с последующим образованием апоптотических телец. В результате ряда причин

возможно переключение с апоптотической гибели клеток на некротическую или гибель путем аутофагии [14], что, возможно, и происходило при отравлении хлоридом ртути. Наблюдаемое в эксперименте увеличение гибели клеток за счет их некроза свидетельствует о прямом цитотоксическом действии токсиканта.

Практически все цитокины, избыточно продуцируемые при воспалительном ответе, могут инициировать апоптоз иммунореактивных клеток. Так, в нашем исследовании было отмечено, что уровень фактора некроза опухоли (TNF- α), принимающего участие в иммунорегуляции и развитии воспаления, повышался более чем в 1,5 раза. В тоже время, нельзя исключать, что токсичное воздействие хлоридом ртути вызывает процессы, приводящие к программируемой клеточной гибели посредством генерации активных форм кислорода и возникновению окислительного стресса. Изменения структуры и активности ферментов, ионных каналов и других белковых молекул ведет к повышению проницаемости мембран для ионов Ca^{2+} , что также является стимулирующим фактором для внутреннего митохондриального пути апоптоза [15]. Содержание другого провоспалительного цитокина интерферона- γ (INF- γ), источником которого служат в основном активированные Т-лимфоциты (как Т-хелперы, так и цитотоксические Т-клетки) у животных из экспериментальных групп статистически значимо не различалось. Учитывая дефицит Т-лимфоцитов в крови нельзя исключить того, что синтез цитокина может быть осуществлен еще и другими популяциями иммунцитов, например, НК-клетками.

При изучении влияния острого отравления хлоридом ртути на гуморальный иммунный ответ было показано, что содержание IgG уменьшалось на 28 %, IgM – на 35 %. Снижение антителопродукции, вероятно, связано с тем фактом, что при ртутной интоксикации происходит увеличение концентрации аденозина, оказывающего тормозящее воздействие на степень зрелости В-лимфоцитов и, соответственно, на их функциональную активность. У животных после однократного введения токсиканта отмечалась редукция поглотительной способности нейтрофилов (около 20 %), что может быть результатом нарушения сигнальных путей, опосредованных интегрином [17].

Все выявленные в нашем исследовании изменения свидетельствуют о нарушении иммунологической реактивности организма, формирующейся в поздней токсикогенной и ранней соматогенной фазе острого отравления хлоридом ртути. Такая картина в целом, если ее рассматривать с позиции химического стресса, характерна для развития многих критических состояний, и острое отравление ртутью не является исключением. При попадании токсиканта в организм происходит активация системы гипоталамус – гипофиз – надпочечники и, как следствие, меняется уровень глюкокортикоидов в крови, что приводит к

лизису чувствительных к кортизолу Т-лимфоцитов, выбросу медиаторов воспаления и усилению клеточных механизмов иммунных реакций для сохранения гомеостаза [16]. Некоторые выявленные токсические эффекты объясняются способностью ртути активировать ферменты метаболизма пуриновых нуклеотидов, что влечет за собой снижение функциональной активности иммуноцитов.

Заключение

Полученные результаты показывают, что в поздней токсикогенной и ранней соматогенной фазе отравления дихлоридом ртути наблюдаются лейкоцитоз, нейтрофилез, моноцитоз и лимфопения. Изменению подвергаются интегральные гематологические индексы, характеризующие иммунореактивность и наличие эндогенной интоксикации. На фоне острого отравления индекс Кребса, лейкоцитарный индекс интоксикации и индекс Г.Д. Даштаянца увеличивались, а индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов, индекс иммунореактивности уменьшались. Анализ иммунологических показателей выявил редукцию содержания в крови основных иммунорегуляторных субпопуляций Т-лимфоцитов (CD4⁺ и CD8⁺), снижение иммунорегуляторного индекса, иммуноглобулинов класса G и M, поглотительной способности нейтрофилов, увеличение мононуклеаров, вступивших в стадию раннего апоптоза, повышение количества клеток, погибших посредством некроза, содержания в крови TNF- α . Не отмечено влияния токсиканта на уровень INF- γ .

Список литературы

1. Зайцева Н.В., Дианова Д.Г., Долгих О.В. Особенности реактивности лимфоцитов в условиях экспозиции тяжелыми металлами. Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. 2012; 10 (2):129–132.
2. Pollarda K.M., Cauvib D.M., Toomeys Ch.B., et al. Mercury-induced inflammation and autoimmunity. BBA – General Subject. 2019; 9. Available at: <http://www.elsevier.com/locate/bbagen>.
3. Bjorklunda G., Peanab M., Dadarc M., et al. Mercury-induced autoimmunity: Drifting from micro to macro concerns on autoimmune disorders. Clinical Immunology. 2020; 7. Available at: <http://www.elsevier.com/locate/yclim>.
4. Тапбергенов С.О., Тапбергенов Т.С., Прозор И.И., Олжаева Р.Р. Сравнительная оценка влияния радиации, гипотиреоза и ртутной интоксикации на активность ферментов обмена пуриновых нуклеотидов, антиоксидантной системы и иммунный статус. Научно-теоретический журнал «Успехи современного естествознания». 2009; 6: 5.
5. Nagwa A.S., Saher A.G., Zeinab Y.M. et al. Protective effects of dietary dates against the toxicity of mercuric chloride in male albino rats. J. Comp. Path. & Clinic. Path. 2008; 21 (4): 29–57.
6. Рукавишников В.С., Шаяхметов С.Ф., Бодиенкова Г.М., Курчевенко С.И. Взаимосвязь между содержанием ртути в биосредах и изменением иммунологических показателей у работающих. Фундаментальные исследования. 2011; 1: 165–170.
7. Нотова С.В., Мирошникова С.А., Лебедев С.В. Изучение уровня тяжелых металлов в организме при различных патологических состояниях, связанных с нарушением функционирования иммунной системы. Вестник ОГУ. 2009; 6: 496–498.
8. Арефьева А.С., Барыгина В.В., Зацепина О.В. Современные представления о влиянии соединений ртути на клеточном и системном уровне (обзор). Экология человека. 2010; 8: 35–41.
9. Винокуров М.Г., Юринская М.М., Садикова Д.Г., и др. Действие ионов ртути на респираторный взрыв и регуляцию апоптоза нейтрофилов человека. Цитокины и воспаление. 2002; 2: 8.
10. Савченков М.Ф., Рукавишников В.С., Ефимова Н.В. Ртуть в окружающей среде и ее влияние на здоровье населения (на примере Байкальского региона). Сибирский медицинский журнал. 2010; 8: 9–11.
11. Директива 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. СПб., 2012.

12. Chereshev V.A., Shilov Ju.I., Cheresheva M.V., et al. Effects of polyoxidonium on phagocytic cell functions. Experimental and clinical estimation of potential inclusion of polyoxidonium in complex therapy in penetrating eye injury. *Rus. J. Immunol.* 2000;5 (1):39–52.
13. Sheikh T.J., Patel B.J., Joshi D.V., et al. Repeated dose oral toxicity of inorganic mercury in Wistar rats: biochemical and morphological alterations. *Vet World.* 2013; 6(8): 563–567. <https://doi.org/10.5455/vetworld.2013.563-567>.
14. Scott R.C., Juhasz G., Neufeld T.P. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth and induces apoptotic cell death. *Curr. Biol.* 2007; 17 (1): 1–11.
15. Глухов А. И., Грызунова Г. К., Усай Л. И., и др. Роль апоптоза в патогенезе некоторых критических состояний. *Общая реаниматология.* 2019; 15 (2): 79–98. <https://doi.org/10.15360/1813-9779-2019-2-79-98>.
16. Лужников Е.А. Неотложная клиническая токсикология (руководство для врачей). М.: Медпрактика, 2007.
17. Worth R.G., Esper R.M., Warra N.S., et al. Mercury inhibition of neutrophil activity: evidence of aberrant cellular signalling and incoherent cellular metabolism. *Scand. J. Immunol.* 2001; 53: 49–55.