

ІМУНОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ВПЛИВУ ХРОМУ

Є.В. Кузенко, А.М. Романюк, М.М. Рудна, О.І. Кузенко, М.А. Левкович

Медицинський інститут СумДУ

Кузенко Є. В., Романюк А. М., Рудна М. М., Кузенко О. І., Левкович М.А. Імунологічні аспекти впливу хрому // Український морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 3. – С. 12-15.

Об'єкт дослідження. Аналіз змін імунної системи щурів під впливом іонів Cr⁶⁺.

Методи дослідження. Тваринам дослідної групи, що налічувала (15 особин) у питну воду додавали біхромат калію в дозі 0,02 моль/л. Щурам контрольної групи (5 тварин) давали звичайну питну воду. По п'ять тварин з дослідної групи виводили з експерименту через 20, 40 і 60 днів після початку вживання біхромату калію. **Матеріалом досліджень** була змішана периферична кров, яку отримували під час забою тварин контрольної і дослідної груп. Кров збирали з аорти у пробірки VACUTAINER фірми «BD Franklin Lakes NJ» USA. Визначення показників імуннограми проводили за стандартними методиками у Сумській обласній клінічній лікарні. Статистичну обробку результатів виконували у програмі Статистика 8.0 з використанням багатofакторного та кластерного аналізу.

Результати. Збільшення споживання хрому призводить до збільшення лімфоцитів, Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, Т-хелперів, Т-супресорів. На підставі негативних кореляційних коефіцієнтів можна припустити вплив мікроелементозу на показники, які належать до фактору 1 (F1). Таким чином, ефективність функціонування даного фактора змінюється зі збільшенням величини окремих показників. Враховуючи негативні коефіцієнти кореляції, які беруть участь у зміні показників фактору (F2) і полярність значень перемінних (великі значення), можна зробити висновок про значний негативний вплив мікроелементозу на ці показники (ЦІК II, ЦІК III, Ig A, IgG, IgM). Третій (F3) та четвертий (F4) фактори відображають окрему чутливість сегментоядерних та палочкоядерних клітин до мікроелементозу. Значення коефіцієнтів кореляції цих факторів наводять на думку про можливий селективний вплив іонів хрому на них.

Висновок. Під впливом надходження іонів хрому зміни в імунній системі розвиваються на клітинному рівні та призводять до компенсаторно-приспосовувальної реакції лімфоцитарного паростку. На гуморальному рівні кластерний та багатofакторний аналізи, свідчать про зв'язок змін між клітинним та гуморальним імунітетом в умовах хромового мікроелементозу.

Ключові слова: іони хрому, клітини імунної системи, ЦІК I, ЦІК II, ЦІК III, Ig A, IgG, IgM, гемоглобін.

Кузенко Е. В., Романюк А. Н., Рудна М.Н., Кузенко Е. И., Левкович М.А. Иммунологические аспекты влияния хрома // Украинский морфологический альманах. – 2013. – Том 11, № 3. – С. 12-15.

Объект исследования. Анализ изменений иммунной системы крыс под влиянием ионов Cr⁶⁺.

Методы исследования. Животным опытной группы (15 особей) в питьевую воду добавляли бихромат калия в дозе 0,02 моль / л. Крысам контрольной группы (5 животных) давали обычную питьевую воду. По пять животных из опытной группы выводили из эксперимента через 20, 40 и 60 суток после начала приема бихромата калия. **Материалом исследований** была смешанная периферическая кровь, которую получали во время забоя животных контрольной и опытной группы. Кровь собирали из аорты в пробирки VACUTAINER фирмы «BD Franklin Lakes NJ» USA. Определение показателей иммунограммы проводили по стандартным методикам в Сумской областной клинической больнице. Статистическую обработку результатов выполняли в программе Статистика 8.0 с использованием многофакторного и кластерного анализов.

Результаты. Увеличение потребления хрома приводит к увеличению лимфоцитов, Т - лимфоцитов, В- лимфоцитов, Т- хелперов, Т- супресоров. На основании отрицательных корреляционных коэффициентов можно предположить влияние микроэлементоза на показатели, которые относятся к фактору 1 (F1). Таким образом эффективность функционирования данного фактора изменяется с увеличением величины отдельных показателей. Учитывая негативные коэффициенты корреляции, участвующих в изменении показателей фактору (F2) и полярность значений переменных (большие значения), можно сделать вывод о значительном негативном влиянии микроэлементоза на эти показатели (ЦИК II, ЦИК III, Ig A, IgG, IgM). Третий (F3) и четвертый (F4) факторы отражают отдельную чувствительность сегментоядерных и палочкоядерных клеток к микроэлементозу. Значения коэффициентов корреляции этих факторов наводит на мысль о возможном селективном влиянии ионов хрома на них.

Вывод: Под влиянием поступления ионов хрома изменения в иммунной системе развиваются на клеточном уровне и приводят к компенсаторно-приспосовительной реакции лимфоцитарного ростка. На гуморальном уровне кластерный и многофакторный анализы свидетельствуют о связи изменений между клеточным и гуморальным иммунитетом в условиях хромового микроэлементоза.

Ключевые слова: ионы хрома, клетки иммунной системы, ЦИК I, ЦИК II, ЦИК III, Ig A, IgG, IgM, гемоглобин.

Kuzenko Y.V., Romaniuk A.M., Rudna M.M., Kuzenko E. I., Levkovych M. A. Immunological aspects of the chromium effect // Украинський морфологічний альманах. – 2013. – Том 11, № 3. – С. 12-15.

The object of the study - analysis of changes in the immune system of rats under the influence ions Cr⁶⁺.

Research methods Animal of experimental group - 15 individuals entered potassium bichromate into drinking water in a dose of 0,02 mol/l. To rats of control group (5 individuals) drank usual drinking water. On five animals from under skilled group brought out of experiment in 20, 40 and 60 days after the beginning of introduction of bichromate of potassium. **Research material** has mixed peripheral blood, which has produced during the slaughter of animals in the control and experimental groups. Blood has collected from the aorta into tubes VACUTAINER firm «BD Franklin Lakes NJ» USA. Defining indicators immunogrammy performed according to standard procedures in the Sumy Regional Hospital. Statistical processing of the results has performed in the program Statistics 8.0 using multivariate and cluster analyzes.

Results: Based on the adverse correlation coefficients possible to assume impact indicators related to factor 1 (F1), on the result of microelementosis. Thus, the efficiency of this factor varies with increasing values of each. Increased intake of chromium leads to increased absolute lymphocyte. T-lymphocyte abs., B-lymphocytes abs., T-helper abs., T suppressor abs. The second factor (F2) is characterized by indicators CEC II, CEC III, Ig A, IgG, IgM, and characterizes the total load. Given the negative correlation coefficients involved in the change of polarity factors and variables (higher values), we can conclude that a significant negative impact indicators related to the factor of two, the result of microelementosis.

Conclusions. Changes take place, respectively, at the cellular level (first stage) and leads to a compensatory adaptive response lymphocytic germ. At the humoral level (second phase), changes demonstrate the connection between cellular and humoral immunity.

Key words: chromium ions, cells of the immune system, the CIC I, CIC II, CIC III, Ig A, IgG, IgM, hemoglobin.

Вступ: Досягнення в галузі сучасної стоматології не знімають проблему ускладнень, після протезування хворих конструкціями, що містять хром [4]. Все це свідчить про те, що вивчення патогенезу впливу хромових сплавів на тканини,

органи і середовища організму є досить актуальним.

Біотрансформація будь-яких ксенобіотиків в організмі людини пов'язана з роботою печінки, легенів, шкіри, нирок, селезінки, наднирників,

клітин імунікомпетентної системи та інших органів та тканин [1]. Дослідниками Тимошенко С. В. та інш. [3] встановлено вплив іонів хрому на підсилення процесів вільного радикального окислення. Значна частота (81,3%) прихованої імунної сенсibiliзації організму людини до хрому доведена дослідженнями Рамазанова Р. М. [2]. Вона пов'язана зі зниженням показників місцевого та загального імунітету (Slg A, Ig A та Ig M). Відсутність достатньої інформації стосовно впливу хрому на імунну систему спонукало нас до проведення відповідних досліджень.

Метою роботи було дослідження впливу іонів хрому на основні показники імунної системи *in vivo*.

Матеріали і методи. Експеримент проводили на білих лабораторних статевозрілих щурах масою 160–180 г, яких утримували на стандартному раціоні віварію. Тваринам дослідної групи, що налічувала 15 особин, у питну воду вводили біхромат калію в дозі 0,02 моль/л. Контрольним щурам (5 тварин) давали звичайну питну воду. По п'ять тварин піддослідних груп забивали через 20, 40 і 60 діб після початку введення іонів хрому.

Експерименти над тваринами проводили згідно положень «Директиви Європейського співтовариства від 24 листопада 1986р. про утримання та використання лабораторних тварин в дослідницьких цілях».

Матеріалом досліджень була змішана периферична кров, яку отримували під час забою

тварин контрольної та піддослідної груп. Кров збирали з аорти у пробірки VACUTAINER фірми «BD Franklin Lakes NJ» USA. Визначення показників імуніграми проводили за протоколами у біохімічній лабораторії Сумської обласної клінічної лікарні. Статистичну обробку результатів виконували у програмі Статистика 8.0 з використанням багатофакторного та кластерного аналізу.

Результати власних досліджень. Визначення кількості білих клітин у крові піддослідних тварин показали, що через 20 діб експерименту кількість лейкоцитів периферичної крові досягла $4,50 \pm 0,62 \times 10^9/\text{л}$, а через 40 та 60 діб $6,18 \pm 0,88 \times 10^9/\text{л}$, $6,88 \pm 1,27 \times 10^9/\text{л}$, відповідно. Збільшення числа лейкоцитів у щурів другої та третьої дослідної групи ми розцінюємо як неспецифічну відповідь на дію іонів хрому та продуктів його метаболізму.

Аналіз лейкоцитарної формули тварин досліджуваних груп показує зменшення кількості паличкоядерних нейтрофілів з $2,20 \pm 0,58\%$ до $0,8 \pm 0,20\%$ у першій групі з наступною нормалізацією до $2,2 \pm 0,66\%$ у другій групі та зменшенням до $0,6 \pm 0,02\%$ у третій групі. Лейкограма досліджуваних тварин характеризувалася значним зменшенням кількості моноцитів у першій групі експериментальних тварин, впродовж спостереження моноцитарні клітини до норми не приходили. Сегментоядерні нейтрофіли характеризувалися зниженням їх кількості у першій групі та подальшим зменшенням у другій (Табл 1).

Таблиця 1. Таблиця імунологічного обстеження досліджуваних груп щурів

Показники	Норма	Перша група	Друга група	Третя група
Лейкоцити $\times 10^9/\text{л}$	$4,75 \pm 0,30$	$4,50 \pm 0,62$	$6,18 \pm 0,88$	$6,88 \pm 1,27$
Гемоглобін г/л	$132,40 \pm 10,16$	$115,8 \pm 17,22$	$143,20 \pm 5,38$	$135,60 \pm 2,13$
ШОЕ мм/ч	$2,0 \pm 0,63$	$1,2 \pm 0,2$	$1,60 \pm 0,40$	$2,60 \pm 0,67$
Лімфоцити абс. ч.	$2286,80 \pm 140,69$	$2871,4 \pm 426,5$	$4196,0 \pm 602,7$	$4396,6 \pm 957,3$
ЦІК I у. о.	$12,80 \pm 2,41$	$11,8 \pm 0,96$	$9,40 \pm 1,40$	$5,80 \pm 0,66$
ЦІК II у. о.	$23,80 \pm 3,00$	$27,8 \pm 1,5$	$19,80 \pm 2,1071$	$15,40 \pm 1,36$
ЦІК III у. о.	$38,00 \pm 3,52$	$69,2 \pm 12,40$	$50,80 \pm 5,6427$	$29,00 \pm 1,09$
Ig G мг/дл	$519,60 \pm 73,53$	$1043,2 \pm 67,3$	$4,70 \pm 0,6253$	$2,58 \pm 0,02$
Ig A мг/дл	$186,20 \pm 40,96$	$343,0 \pm 23,35$	$0,654 \pm 0,0767$	$0,55 \pm 0,01$
Ig M мг/дл	$162,20 \pm 25,75$	$394,8 \pm 64,9$	$0,532 \pm 0,0136$	$0,47 \pm 0,01$
T-лімфоцити CD ₃ абс. ч.	$1271,00 \pm 80,17$	$1633,8 \pm 300,6$	$2488,8 \pm 397,0$	$2170,7 \pm 823,7$
B-лімфоцити CD ₂₂ абс. ч.	$533,00 \pm 33,48$	$762,8 \pm 123,6$	$1176,2 \pm 229,5$	$1045,7 \pm 431,5$
T-хелпери CD ₄ абс. ч.	$856,20 \pm 49,28$	$1065,6 \pm 191,2$	$1615,8 \pm 240,0$	$1377,6 \pm 507,7$
T-супресори CD ₈ абс. ч.	$415,40 \pm 22,81$	$544,2 \pm 103,9$	$867,6 \pm 160,4$	$768,6 \pm 302,2$
IPJ	$2,03 \pm 0,02$	$1,95 \pm 0,0332$	$1,908 \pm 0,069$	$1,88 \pm 0,05$
Палочкоядерні%	$2,20 \pm 0,58$	$0,8 \pm 0,20$	$2,2 \pm 0,66$	$0,6 \pm 0,02$
Сегментоядерні%	$43,20 \pm 3,76$	$31,8 \pm 5,14$	$26,0 \pm 0,148$	$33,6 \pm 4,80$
Еозинофіли%	$1,00 \pm 0,31$	$2,08 \pm 1,9$	$1 \pm 0,45$	$1,0 \pm 0,32$
Моноцити%	$4,80 \pm 0,86$	$2,2 \pm 0,58$	$2,8 \pm 0,86$	$1,6 \pm 0,40$
Лімфоцити%	$48,60 \pm 3,18$	$64,6 \pm 4,95$	$68,0 \pm 1,76$	$63,2 \pm 5,11$
T-лімфоцити%	$55,60 \pm 0,81$	$56,0 \pm 1,55$	$58,8 \pm 0,97$	$59,6 \pm 1,03$
B-лімфоцити%	$23,40 \pm 1,02$	$24,0 \pm 1,48$	$27,4 \pm 1,54$	$28,6 \pm 1,44$
T-хелпери%	$37,00 \pm 0,44$	$36,6 \pm 0,93$	$38,4 \pm 0,24$	$38,6 \pm 0,40$
T-супресори%	$18,20 \pm 0,20$	$18,6 \pm 0,60$	$20,2 \pm 0,86$	$21,4 \pm 1,44$

Абсолютна кількість лімфоцитів також змінювалася і спостерігалася під час дослідження постійна тенденція до збільшення від $2871,4 \pm 426,5$ абс. ч., $4196,0 \pm 602,7$ абс. ч., $4396,6 \pm 957,3$ абс. ч. в експериментальних групах відповідно до терміну в порівнянні з нормою - $2286,80 \pm 140,69$ абс. ч.. Процентне співвідношення між фракціями лімфоцитів практично не змінювалося. Аналіз абсолютних значень числа лімфоцитів показав їх підвищення за рахунок всіх видів лімфоцитарних клітин (Табл. 1).

Імунорегуляторний індекс (ІРІ) у піддослідних щурів у всіх піддослідних групах знижувався, досягаючи мінімального значення $1,88 \pm 0,05$ у щурів третьої групи.

З метою коректної оцінки впливу надлишкового надходження іонів хрому в організм на показники клітинного та гуморального імунітету нами проведений кластерний аналіз отриманих результатів. За допомогою кластерного аналізу виконали розподіл ознак, що дало можливість виявити особливості та характер впливу хрому на імунну систему, враховуючи той факт, що різні показники крові мають різноспрямовану реакцію.

Кластерний аналіз дозволив велику кількість показників отриманих під час експерименту розподілити на більшість об'єктів **G** та **m** кластерів так, що кожен об'єкт **G** належить тільки одному підмножині розбиття. На підставі проведеного кластерного аналізу показників крові отримана дендрограма (Рис 1). Горизонтальна вісь представляє показники, вертикальна вісь – з'єднання між показниками. Таким чином на першому етапі реакції імунної системи були об'єднанні гемоглобін, лімфоцити, Т-лімфоцити, В-лімфоцити, Т-хелпери, Т-супресори, лейкоцити, які мають мінімальні відстані та характеризують клітинні зміни. ЦІК I, ЦІК II, ЦІК III, Ig A, IgG, IgM входять до другого кластеру та свідчать про спорідненість змін гуморального імунітету. У третій кластер об'єдналися найменш значимі елементи.

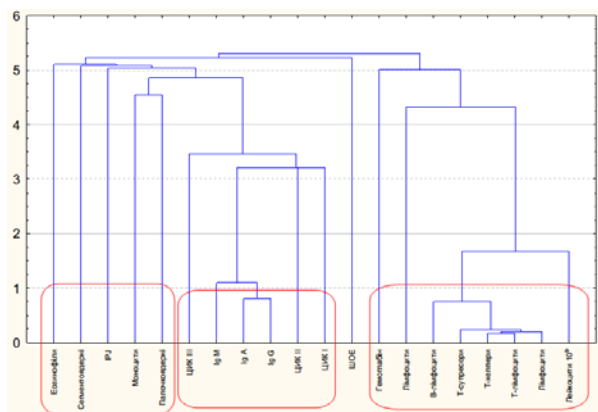


Рис 1. Дендрограма кластеризації показників досліджуваних груп щурів.

Нами був проведений факторіальний аналіз для визначення величин, котрі призводять до з'ясування структури зв'язків між **p** - ознаками, які ми аналізуємо.

Аналіз точкової діаграми (Рис 2) виявив найбільш вагомі показники імунної системи які змінювались в умовах впливу іонів хрому. Така діаграма дає змогу маловажливі фактори відокремити від самих значимих. Ці значимі показники, які входять до першого фактору на графіку, утворюють свого роду вигин, тобто ту частину лінії, яка характеризується крутим підйомом. У наведеній діаграмі такий крутий підйом спостерігається у перших чотирьох факторів, тому ми їх аналізуємо в одній моделі. З графіку видно, що вигин, тобто зона значущих чинників, спостерігається вище п'ятого фактора; шостий, сьомий, восьмий, дев'ятий фактор розташувались у незначимій зоні. Ми провели розрахунок з використанням моделі, яка включає різне число факторів, але доречно зробити модель з урахуванням чотирьох факторів.

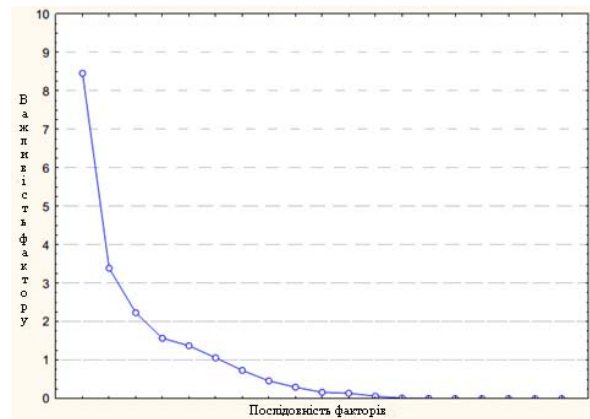


Рис 2. Діаграма важливості факторів.

Варіанти комбінацій величин можна представити у вигляді чотирьох факторів змодельовавши при цьому залежність **F** головних факторів від факторних навантажень значень вектора:

$F1 = (\text{Лейкоцити абс.}) -0,95 + (\text{Лімфоцити абс.}) -0,95 + (\text{ІРІ}) 0,91 + (\text{Т-лімфоцити абс.}) -0,95 + (\text{В лімфоцити абс.}) -0,94 + (\text{Т-хелпери абс.}) -0,94 + (\text{Т-супресори абс.}) -0,96 + \dots$

$F2 = (\text{ЦІК II}) -0,85 + (\text{ЦІК III}) -0,72 + (\text{Ig A}) -0,87 + (\text{IgG}) -0,89 + (\text{IgM}) -0,83 + \dots$

$F3 = (\text{Сегментоядерні}) -0,93 + (\text{Лімфоцити}) -0,92 + \dots$

$F4 = (\text{Паличкоядерні}) -0,84 + \dots$

Тоді узагальнена модель залежності надходження хрому і показників імунної системи периферійної крові прийме наступний вигляд:

$$Y = a_0 + a_1 F1 + a_2 F2 + \dots + a_4 F4,$$

де, a - власні числа головних компонентів

$$Y = 6,92 F1 + 8,35 F2 + 4,35 F3 + 1,7 F4$$

На останньому етапі факторного аналізу

необхідно виявити і описати змістовий зв'язок факторів.

Перший фактор зібрав всі загальні показники білої крові, що характеризують зміни білого паростка крові в організмі. На підставі негативних кореляційних коефіцієнтів можна припустити залежність показників, що належать до фактору 1 (F1), від розвитку мікроелементозу. Таким чином, ефективність функціонування цього фактора зменшується зі збільшенням величини окремих показників. Збільшення споживання хрому призводить до підвищення лімфоцитів абс., Т-лімфоцитів абс., В-лімфоцитів абс., Т-хелперів абс., Т-супресорів абс., що на нашу думку, може бути проявами компенсаторно-приспосувальної реакції імунної системи в умовах мікроелементозу.

Другий фактор (F2) характеризується показниками ЦІК II, ЦІК III, Ig A, IgG, IgM та характеризує сукупне навантаження. Беручи до уваги негативні коефіцієнти кореляції досліджуваних показників, які беруть участь у зміні фактора і полярність значень перемінних (великі значення), можна зробити висновок про значний негативний вплив показників, що належать фактору два (F2), на результат розвитку мікроелементозу.

Третій (F3) та четвертий (F4) фактори відображають окрему чутливість сегментоядерних та паличкоядерних клітин на надлишок іонів хрому, значення коефіцієнтів кореляції цих факторів наводить на думку про можливий селективний вплив хрому.

Висновок: Під впливом надходження іонів хрому зміни в імунній системі розвиваються на клітинному рівні та призводять до компенсаторно-приспосувальної реакції лімфоцитарного паростку. На гуморальному рівні кластерний та багатофакторний аналізи, свідчать про зв'язок змін між клітинним та гуморальним імунітетами в умовах хромового мікроелементозу.

Перспективи подальших досліджень. Дослідити морфологічні зміни в інших органах та тканинах під впливом Cr⁶⁺.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ:

1. Никонов А. Ю. Особенности влияния кобальто-хромовых сплавов металлов на биоэнергетические процессы у экспериментальных животных / А. Ю. Никонов // Современная стоматология. – 2011. - №2. – С.146-148.
2. Рамазанова Р. М. Микробиологическое и иммунологические аспекты влияния хрома на организм: автореф. на соиск. науч. степ. к. биол. н. спец.: 03.00.07 «Микробиология» / Р. М. Рамазанова – Алмаата, 1999г. - 24с.
3. Тимощенко С. В. Влияние хронической интоксикации хромом и бензолом на антиоксидантный статус крыс / С. В. Тимошкинова, Н. В. Парашова, И. В. Михайлова // Весник ОГУ. – 2004. - №4. – С.132-133
4. Di Giampaolo L. “In vitro” comparative immune effects of different titanium compounds / L. Di Giampaolo, M. Di Gioaccino, J. Ponty // Int. J. Immunopathol. Pharmacol. – 2004. – № 17 (2). – P. 115 – 122.

*Надійшла 19.06.2013 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін*