

# ИЗМЕНЕНИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ И ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ БЕЛЫХ КРЫС ПРИ ИНТОКСИКАЦИИ АЦЕТАТОМ СВИНЦА И ВВЕДЕНИИ АНТИОКСИДАНТОВ<sup>1</sup>

## CHANGES IN HEMATOLOGICAL AND IMMUNOCYTOCHEMICAL PARAMETERS OF THE BLOOD OF WHITE RATS WITH LEAD ACETATE INTOXICATION AND THE INTRODUCTION OF ANTIOXIDANTS

**O. Komusova**  
**O. Shubina**  
**O. Kirdyashkina**

*Summary.* This study is aimed at studying leukograms and leukocyte indices of blood, subpopulations of T- and B-lymphocytes to assess the state and functioning of cellular and humoral immunity in acute intoxication with lead acetate and subsequent administration of antioxidant drugs. Studies have shown that when lead acetate was administered in animals of the experimental group, changes were noted in the leukogram and leukocyte indices, the content of CD3, CD4, CD8, CD20 lymphocytes, indicating the course of pathological processes, disruption of cellular and humoral immunity, inhibition of immunoreactivity caused by the action of lead acetate. The administration of the drug "Dihydroquercetin Plus" to rats with lead poisoning led to significant changes in hematological and immunocytochemical parameters, compared with the drug "Selmevit".

*Keywords:* blood, lymphocytes, cellular immunity, humoral immunity, leukogram, antioxidant drugs.

**Комусова Ольга Ивановна**

К.б.н., ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический университет имени М.Е. Евсевьева»  
(г. Саранск)  
timoshkina03@mail.ru

**Шубина Ольга Сергеевна**

Д.б.н., профессор, ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический университет имени М.Е. Евсевьева» (г. Саранск)  
os.shubina@mail.ru

**Кирдяшкина Ольга Викторовна**

Аспирант, ФГБОУ ВО «Мордовский государственный педагогический университет имени М.Е. Евсевьева»  
(г. Саранск)  
Sigma.ov@mail.ru

*Аннотация.* Настоящее исследование направлено на изучение лейкограммы и лейкоцитарных индексов крови, субпопуляции Т- и В- лимфоцитов для оценки состояния клеточного и гуморального звена иммунитета при подострой интоксикации ацетатом свинца и последующем введении антиоксидантных препаратов «Дигидрокверцетин Плюс». Исследование показало, что при введении ацетата свинца у животных опытной группы по сравнению с контролем отмечались изменения в лейкограмме и лейкоцитарных индексах, содержании CD3, CD4, CD8, CD20-лимфоцитов, указывающие на нарушение работы клеточного и гуморального звеньев иммунитета, угнетение иммунореактивности, вызванные действием ацетата свинца. Введение крысам со свинцовым отравлением препарата «Дигидрокверцетин Плюс» привело к изменениям гематологических и иммуноцитохимических показателей.

*Ключевые слова:* кровь, лимфоциты, клеточный иммунитет, гуморальный иммунитет, лейкограмма, антиоксидантные препараты.

<sup>1</sup> Исследование выполнено в рамках гранта на проведение научно-исследовательских работ по приоритетным направлениям научной деятельности вузов-партнеров по сетевому взаимодействию (Ульяновский государственный педагогический университет им. И.Н. Ульянова и Мордовский государственный педагогический университет им. М.Е. Евсевьева) по теме «Исследование влияния тяжелых металлов на нервную и сердечно-сосудистую систему животных при введении антиоксидантов: экспериментальное исследование».

## Введение

**И**зучение лейкоцитарного профиля в норме и при различных воздействиях является традиционным и важнейшим направлением современной гематологии [1]. Несмотря на большое число исследований в данном направлении остается актуальным изучение роли экзо- и эндогенных токсикантов на реактивность лейкоцитов периферической крови, а также роль антиоксидантов в восстановлении клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Препарат с антиоксидантными свойствами «Дигидрохверцетин Плюс» применяется при различных видах патологических состояний организма [1,5]. Поэтому, представляется целесообразным изучение количественного содержания субпопуляции Т- и В- лимфоцитов периферической крови для оценки степени эндогенной интоксикации животного организма, вызванной острым отравлением соединениями свинца и восстановление иммунитета при введении препарата «Дигидрохверцетин Плюс».

## Цель выполнения исследования

Выявить закономерности изменений лейкограммы, лейкоцитарных индексов крови, оценить экспрессию субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у крыс при интоксикации ацетатом свинца и последующем введении антиоксидантных препаратов.

## Материалы и методы исследования

Первая группа являлась контрольной. Вторую группу (опыт 1) составили животные, получавших в течение 7 суток перорально ацетат свинца  $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$  в дозе 45 мг/кг/сутки (в пересчете на свинец). Третью группу (опыт 2) составили крысы, получавших в течение 7 суток перорально ацетат свинца  $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$  в дозе 45 мг/кг/сутки (в пересчете на свинец), а затем перорально в течение 7 суток препарат «Дигидрохверцетин Плюс» в дозе 1,78 мг/кг/сутки трехкратно [4,5].

В работе применялись высокоинформативные методы исследования периферической крови: гематологические, иммуноцитохимические, статистические.

Периферическую кровь получали из хвостовой вены крысы под наркозом смеси эфира с хлороформом (1:1) перед декапитацией.

Мазки крови окрашивали по методу Романовского — Гимзы. Лейкоциты подсчитывали в камере Горяева. Относительное содержание лейкоцитов определяли путем цитологического исследования мазков крови [1,3,5].

Расчет индексов производился на основании данных лейкограммы.

Для получения характеристики Т-клеточного звена циркулирующих лимфоцитов оценивалась экспрессия маркеров CD3, CD4, CD8. Для оценки В-системы иммунитета (гуморального звена) определялось количество В-лимфоцитов (CD20).

Согласно инструкции фирмы производителя Dako (Дания) суспензию лимфоцитов раскапывали на стеклах с лунками, предварительно обработанными 0,1% поли-L-лизином (Serva, Германия). В каждую лунку вносили по 20 мкл клеточной взвеси в концентрации  $5 \times 10^6$ /мл. Инкубировали в течение 30 мин во влажной камере. Фиксировали 70% этиловым спиртом 10 мин. После фиксации клетки отмывали в фосфатном буфере (PBS) 3 раза по 5 мин. Далее на подготовленные клетки наносили по 20 мкл специфических моноклональных антител (МКАТ) к CD-маркерам клеток: к CD3, к CD4, к CD8, к CD20 (в разведении 1/100), производства Dako (Дания) и PBS в качестве контроля для исключения прямого иммуномечения (окрашивания) клеток вторичными антителами и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре во влажной камере. Затем стекла трижды отмывали в PBS, после чего на лунки наносили вторые связывающие антитела по 20 мкл с инкубацией 10 мин. Далее проводили трехкратную промывку стекол PBS. Затем на лунки наносили стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой, по 20 мкл с инкубацией 10 мин. Далее трехкратно промывали стекла PBS. Приготовленный ex tempore хромоген (3-диаминобензидин тетрагидрохлорид) наносили по 30 мкл на лунку на 10 мин. и смывали его дистиллированной водой. Стекла подсушивали [5].

Визуализацию и подсчет иммунопозитивных клеток проводили с помощью бинокулярного светового микроскопа (Axioscop «Carl Zeiss», Германия). Увеличение: объектив  $\times 100$ , окуляр  $\times 10$ . CD-позитивные клетки имели отчетливое коричневое окрашивание. Определяли среднее содержание клеток, экспрессирующих CD белки [5].

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 8.0. Для проверки статистических гипотез использовали t-критерий Стьюдента для зависимых и независимых выборок. Результаты представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (s). Критический уровень значимости  $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Исследование лейкограммы опытных животных (опыт 1), получавших ацетат свинца, показало значительные изменения ее от контроля, что свидетельствует о воздействии свинца на клетки крови и органы лейкопоэза и демонстрирует признаки интоксикации (табл. 1).

Таблица 1. Лейкограмма крови у крыс (M±s)

Показатель	Контроль	Опыт 1	Опыт 2
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	6,8±0,3	7,2±0,2*	6,6±0,4 <sup>#</sup>
Палочкоядерные нейтрофилы,%	2,4±1,4	5,6±1,0*	2,75±0,6 <sup>#</sup>
Сегментоядерные нейтрофилы,%	16,2±1,9	17,3±0,9**	16,2±0,8 <sup>#</sup>
Эозинофилы,%	3,1±1,0	9,3±0,9*	3,3±0,7 <sup>#</sup>
Базофилы,%	1,8±0,8	1,0±0,4*	1,3±0,6 <sup>#</sup>
Моноциты,%	4,1±1,5	2,3±0,5*	3,2±0,6* <sup>#</sup>
Лимфоциты,%	72,3±2,6	64,3±1,6*	73,1±1,4 <sup>#</sup>

Примечание: \* — достоверно по отношению к контролю, P≤0,01; \*\* — достоверно по отношению к контролю, P≤0,05; # — достоверно по отношению к опыту 1, P≤0,01.

Таблица 2. Лейкоцитарные индексы крови у крыс (M±s)

Показатель, усл.ед	Контроль	Опыт 1	Опыт 2
Индекс Кребса	0,2±0,04	0,3±0,03*	0,2±0,02 <sup>#</sup>
Лейкоцитарный индекс	3,9±0,5	2,8±0,2*	3,9±0,3 <sup>#</sup>
Лейкоцитарный индекс интоксикации	0,2±0,03	0,3±0,03*	0,2±0,02 <sup>#</sup>
Индекс сдвига лейкоцитов крови	0,3±0,04	0,5±0,04*	0,3±0,02 <sup>#</sup>
Индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов	22,1±9,6	28,1±5,0*	24,3±4,6 <sup>#</sup>

Примечание: \* — достоверно по отношению к контролю, P≤0,01; # — достоверно по отношению к опыту 1, P≤0,01.

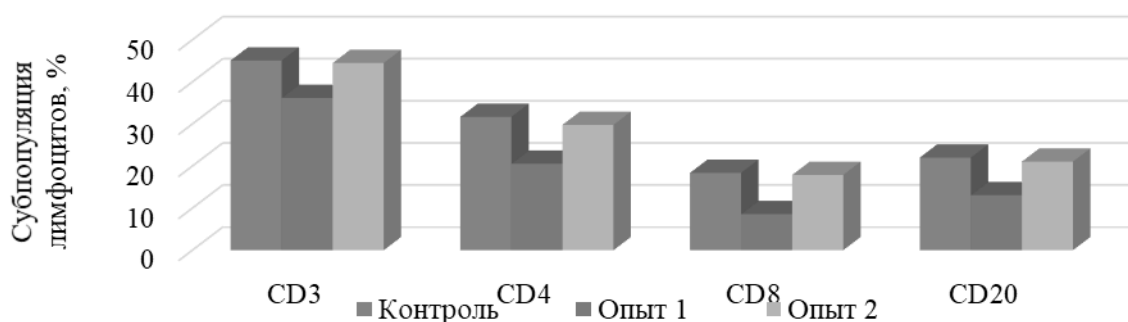


Рис. 1. Содержание субпопуляций лимфоцитов в периферической крови у крыс

В крови животных, получавших ацетат свинца, наблюдался умеренный рост общего количества лейкоцитов, увеличение количества палочкоядерных нейтрофилов, умеренный рост концентрации сегментоядерных клеток, и резкое увеличение содержания эозинофилов при существенном уменьшении количества базофилов, моноцитов, и лимфоцитов (табл. 1). Совокупность изменений индексов отражала выраженную интоксикацию организма опытных животных, сопровождающуюся сбоем в работе иммунной системы (табл. 2). Отмечалось уменьшение содержания CD3, CD4, CD8-лимфоцитов, соответственно на 20 (p≤0,01), 35 (p≤0,01) и 53% (p≤0,01), что свидетельствовало о развитии иммунодефицита по клеточному типу и снижении цитотоксической функ-

ции. В сравнении с показателями контрольной группы, в группе опыт 1 отмечалось снижение содержания CD20-лимфоцитов на 40% (p≤0,01), что указывало на нарушения гуморального иммунитета и продукции антител.

Под влиянием антиоксидантного препарата «Дигидрохверцетин Плюс» (опыт 2) отмечены следующие изменения лейкограммы по сравнению с опытной группой животных, получавшей ацетат свинца (опыт 1): снижение индекса Кребса, лейкоцитарного индекса интоксикации, индекса сдвига лейкоцитов крови, индекса соотношения лимфоцитов и моноцитов; увеличении лейкоцитарного индекса (табл. 2).

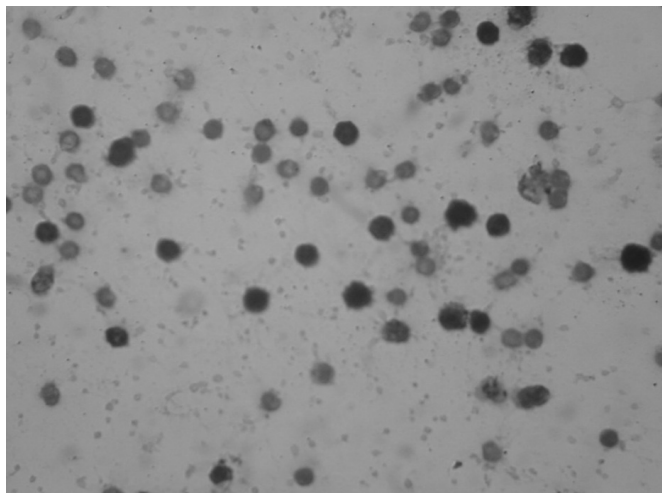


Рис. 2. Субпопуляция Т-лимфоцитов (CD3) в периферической крови у крыс (контроль). Окрашивание (иммуномечение) моноклональными антителами к CD3-маркеру клеток. Об. 100 × ок. 10.

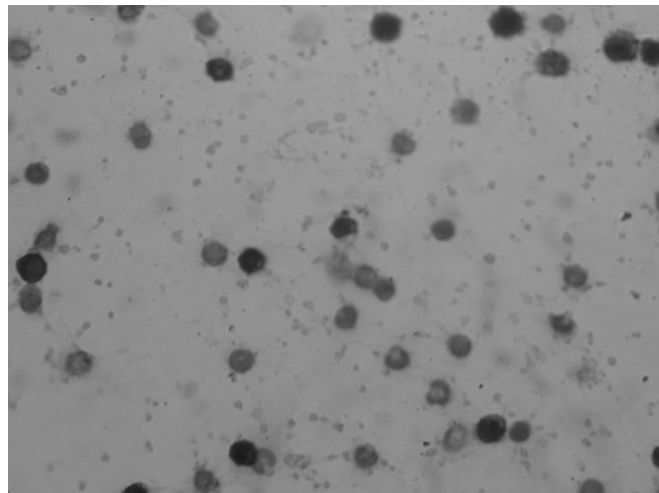


Рис. 3. Субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3) в периферической крови у крыс (опыт 1). Окрашивание (иммуномечение) моноклональными антителами к CD3-маркеру клеток. Об. 100 × ок. 10.

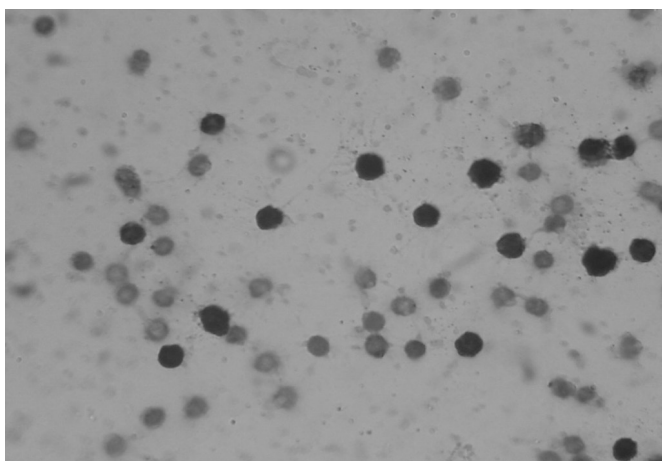


Рис. 4. Субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3) в периферической крови у крыс (опыт 2). Окрашивание (иммуномечение) моноклональными антителами к CD3-маркеру клеток. Об. 100 × ок. 10.

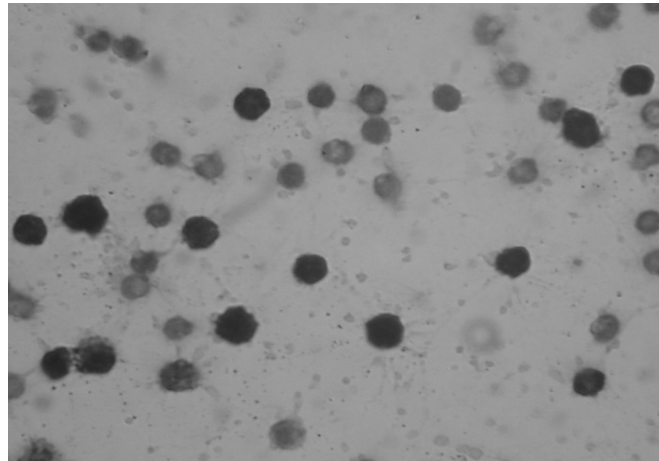


Рис. 5. Субпопуляции Т-лимфоцитов (CD3) в периферической крови у крыс (опыт 3). Окрашивание (иммуномечение) моноклональными антителами к CD3-маркеру клеток. Об. 100 × ок. 10.

Полученные результаты согласовались с данными иммуноцитохимического анализа периферической крови при выявлении маркеров CD3, CD4, CD8, CD20 после введения препарата «Дигидрохверцетин Плюс». При этом выявлено увеличение содержания CD3, CD4, CD8, CD20-лимфоцитов, в сравнении с животными, получавшими ацетата свинца соответственно на 23 ( $p \leq 0,01$ ), 45 ( $p \leq 0,01$ ), 108 ( $p \leq 0,01$ ) и 61% ( $p \leq 0,01$ ). Полученные данные были близки значениям у животных контрольной груп-

пы, что указывало на нормализацию работы клеточного и гуморального иммунитета (рис. 1–5) и положительном действии дигидрохверцетина при восстановлении гематологических показателей крови.

#### Выводы

Получение крысами в течение 7 суток перорально ацетата свинца  $Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$  в дозе 45 мг/кг/

сутки привело к резким изменениям в лейкоцитарной формуле: более чем двукратному росту числа палочкоядерных нейтрофилов и еще более значительному увеличению содержания эозинофилов при существенном снижении относительного содержания базофилов и лимфоцитов.

Так же, у животных опытной группы отмечались изменения, в лейкоцитарных индексах, содержании CD3, CD4,

CD8, CD20-лимфоцитов, указывающие на протекание патологических процессов, нарушение работы клеточного и гуморального звеньев иммунитета, угнетение иммунореактивности, вызванные действием ацетата свинца (рис. 1–5). Использование антиоксидантного препарата «Дигидрокверцетин Плюс» у белых крыс с острой интоксикацией ацетатом свинца приводит к положительной динамике гематологических и иммуноцитохимических показателей крови.

---

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бышевский, А.Ш. Неспецифическая коррекция изменений гемостаза при заболеваниях, протекающих с гиперкоагуляцией / А.Ш. Бышевский, С.И. Галян, В.А. Полякова // *Фундаментальные исследования*. — 2008. — № 2. — С. 29–36.
2. Васильев, Ю.Г. Ветеринарная клиническая гематология / Ю.Г. Васильев // *Учебное пособие*. Гриф УМО вузов России (+ DVD) / Лань, 2020. — 687 с.
3. Дубынин, В.А. Регуляторные системы организма человека: учеб. пособие для студ. вузов / В.А. Дубынин, А.А. Каменский, М.Р. Сапин. — М.: Дрофа, 2010. — 365 с.
4. Кобец, Т.В. Интегральные лейкоцитарные индексы как критерий оценки тяжести течения эндогенной интоксикации и эффективности проводимого лечения у детей с атопическим дерматитом [Электронный ресурс] / Т.В. Кобец [и др.] // *От научных разработок к внедрению в практику: педиатрия и детская хирургия: материалы VI Всерос. науч.-практ. конф., 4–5 окт. 2012 г.* / под ред. Т.И. Текученко; КГМУ им. С.И. Георгиевского. — Алушта, 2012. — Режим доступа: URL: <http://drcobez.narod.ru/st>
5. Комусова, О.И. Изменения нейронов переднетеменной коры головного мозга белых крыс под воздействием ацетата свинца и их коррекция препаратом «Дигидрокверцетин Плюс» / О.И. Комусова, О.С. Шубина, Л.П. Тельцов // *Морфология*, Санкт-Петербург, 2016. — С-Пб.: Эскулап. — т. 149. — № 3. — с. 108.
6. Семченко, В.В. Гистологическая техника: учебное пособие / В.В. Семченко, С.А. Барашкова, В.И. Ноздрин, В.Н. Артемьев. — Омск-Орел: Омская областная типография. — 2006. — 290 с.

---

© Комусова Ольга Ивановна (timoshkina03@mail.ru),  
Шубина Ольга Сергеевна (os.shubina@mail.ru), Кирдяшкина Ольга Викторовна (Sigma.ov@mail.ru).  
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»