

Получена: 05.02.2024/Принята: 01.03.2024/Опубликована online: 30.03.2024

УДК 616-021.4:616.94-07:615.777.9

DOI: [10.26212/2227-1937.2024.66.50.020](https://doi.org/10.26212/2227-1937.2024.66.50.020)

Кайранбаева Г.К. ^{1*}, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9337-7728>

Балабекова М.К. ¹, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3238-9893>

Edgaras Stankevicius², ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2210-708X>

¹Казахский Национальный Медицинский Университет имени С.Д. Асфендиярова,
Алматы, Казахстан,

* автор-корреспондент

²Литовский университет наук о здоровье, Каунас, Литва

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА СЕЛЕЗЕНОЧНЫХ ИММУНОЦИТОВ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ, ВЫЗВАННОМ НА ФОНЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ КАДМИЯ И СВИНЦА

Резюме: работа выполнена с целью изучения влияния хлорида кадмия (ХК) и ацетата свинца (АС) на течение асептического воспаления (АВ), а также возможность иммунной модуляции течения АВ. В настоящей работе исследована активность (CD4⁺ (Th), CD8⁺ (CTL), CD4⁺CD25⁺ (активированные Т-клетки), CD4⁺CTLA-4⁺ (Т-регуляторные клетки)) с помощью проточной цитофлуориметрии. Исследование проводили на 3 группах животных, в эксперимент взяты 42 беспородных крыс-самцов массой 180-220±20г, содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. У опытных животных интоксикацию вызывали введением ХК и АС в дозе по 2,5 мг/кг м.т. перорально в течение двух недель, по окончании чего у животных моделировали асептическое воспаление. Было установлено, что соли кадмия и свинца оказывали системное иммунотоксическое действие на животных, выражающееся в снижении уровня эффекторных иммунных популяций CD4⁺ Th-клеток. Хлорид кадмия и ацетат свинца приводили к дисрегуляции воспалительного процесса, выражающейся в снижении доли CTL, а также в повышении доли Treg-клеток, что свидетельствует о повышенном иммуносупрессорном фоне.

Ключевые слова: CD4⁺, CD8⁺ (CTL), CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, Treg, асептическое воспаление, кадмий, свинец, эксперимент, крысы.

Кайранбаева Г.К. ^{1*}, Балабекова М.К. ¹, Edgaras Stankevicius²

¹С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті,
Алматы, Қазақстан,

*корреспондент-автор

²Литва денсаулық ғылымдары университеті, Каунас, Литва

КАДМИЙ МЕН ҚОРҒАСЫННЫҢ ӘСЕРІНЕН ТУЫНДАҒАН ҚАБЫНУ КЕЗІНДЕГІ КӨКБАУЫР ИММУНОЦИТТЕРІН ЭКСПЕРИМЕНТТІК БАҒАЛАУ

Түйін: Кадмий хлориді (КХ) және қорғасын ацетатының (ҚА) асептикалық қабыну (АҚ) ағымына әсерін, сондай-ақ АҚ ағымының иммундық модуляциясының мүмкіндігін зерттеу бойынша жұмыс жүргізілді. Бұл жұмыста ағындық цитометрия көмегімен (CD4⁺ (Th), CD8⁺ (CTL), CD4⁺CD25⁺ (белсендірілген Т жасушалар), CD4⁺CTLA-4⁺ (Т реттеуші жасушалар)) белсенділігі зерттелді. Зерттеу жануарлардың 3 тобында жүргізілді, экспериментке қалыпты диетада стандартты виварий жағдайында ұсталған салмағы 180-220±20 г болатын 42 аталық егеуқұйрықтар алынды. Тәжірибелік жануарларға интоксикация КХ және ҚА 2,5 мг/кг д.с. дозада екі апта бойы пероральді енгізуден туындаған, содан кейін жануарларда асептикалық қабыну үлгіленді. Кадмий мен қорғасын тұздарының жануарларға жүйелі иммунотоксикалық әсері бар екені анықталды, бұл CD4⁺ Th жасушаларының эффекторлық иммунды популяцияларының деңгейінің төмендеуімен көрінеді. Кадмий хлориді және қорғасын ацетаты қабыну процесінің реттелуінің бұзылуына әкелді, бұл CTL үлесінің төмендеуімен, сондай-ақ иммуносупрессиялық фонның жоғарылауын көрсететін Treg жасушаларының үлесінің жоғарылауымен байқалады.

Түйінді сөздер: CD4⁺, CD8⁺ (CTL), CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, Treg, асептикалық қабыну, кадмий, қорғасын, эксперимент, егеуқұйрықтар.

G.K. Kairanbayeva^{1*}, M.K. Balabekova ¹, Edgaras Stankevicius²

¹Asfendiyarov Kazakh National Medical University,
Almaty, Kazakhstan,

*corresponding author

²Lithuanian University of Health Sciences, Kaunas, Lithuania

EXPERIMENTAL EVALUATION OF SPLENIC IMMUNOCYTES IN INFLAMMATION CAUSED BY EXPOSURE TO CADMIUM AND LEAD

Resume: the work was carried out to study the effect of cadmium chloride (CC) and lead acetate (LA) on the course of aseptic inflammation (AI), as well as the possibility of immune modulation of the course of AI. In this work, the activity (CD4⁺ (Th), CD8⁺ (CTL), CD4⁺CD25⁺ (activated T cells), CD4⁺CTLA-4⁺ (T regulatory cells)) was studied using flow cytometry. The study was carried out on 3 groups of animals, the experiment included 42 outbred male rats weighing 180-220±20g, kept under

standard vivarium conditions on a normal diet. In experimental animals, intoxication was caused by the administration of CC and LA at a dose of 2.5 mg/kg b.w. orally for two weeks, after which aseptic inflammation was modeled in animals. It was found that cadmium and lead salts had a systemic immunotoxic effect on animals, expressed in a decrease in the level of effector immune populations of CD4⁺ Th cells. Cadmium chloride and lead acetate led to dysregulation of the inflammatory process, expressed in a decrease in the proportion of CTL, as well as an increase in the proportion of Treg cells, which indicates an increased immunosuppressive background.

Key words: CD4⁺, CD8⁺ (CTL), CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CTLA-4⁺, Treg, aseptic inflammation, cadmium, lead, experiment, rats.

Введение: Загрязнение почвы, воды и воздуха тяжелыми металлами становится глобальной проблемой по мере быстрого промышленного развития и модернизации. Кадмий и свинец относят к наиболее токсичным загрязнителям окружающей среды [1]. Накопление кадмия и свинца в организме вызывает побочные эффекты, приводящие к различным заболеваниям [2]. Предполагается, что повышенный риск развития заболеваний может быть обусловлен иммунотоксическим эффектом свинца и кадмия и их способностью вызывать окислительный стресс [3].

Одним из основных звеньев регуляторного пула иммуноцитов являются Treg-клетки. Treg-клетки подавляют иммунный ответ, снижая пролиферацию, дифференцировку, активацию, продукцию провоспалительных цитокинов, функциональную активность широкого спектра эффекторных клеток, как адаптивного, так и врожденного иммунитета, и, тем самым, контролируют иммунный гомеостаз [4]. Натуральные Treg-клетки созревают в тимусе в ходе нормального биогенеза Т-лимфоцитов и, после выхода на периферию, участвуют в обеспечении периферической иммунологической толерантности. Натуральные Treg-клетки идентифицируют в периферической крови и вторичных лимфоидных органах по их конститутивной экспрессии CD4, CD25 и Foxp3. Одной из наиболее значимых молекул, опосредующих иммуносупрессию Treg, является белковый рецептор класса check-point – CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Associated Protein 4) [5].

В норме Treg-клетки контролируют качество и силу противомикробных иммунных реакций для защиты организма от патогенных микробов, избегая при этом развития побочных иммунопатологий или неадекватных ответов на комменсальные патогены [6]. В то время как их аккумуляция в опухолевом микроокружении вносит значительный вклад в создание толерогенного микроокружения и содействует развитию опухоли [7]. Деплеция натуральных Treg-клеток не только вызывает аутоиммунные заболевания, но и усиливает иммунные ответы на аллоантигены. Так, деплеция Treg-клеток у мышей приводит к воспалительному заболеванию кишечника, что, вероятно, является результатом чрезмерного иммунного ответа на комменсальные бактерии в кишечнике [8].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в исследовании механизмов токсического влияния ксенобиотиков, до сих пор остается малоизученным влияние кадмия и свинца на течение воспалительного процесса и механизмы регуляции иммунного ответа, в частности, отсутствуют данные о связи между воздействием кадмия и свинца и активностью Treg-клеток.

Цель исследования: Изучить влияние хлорида кадмия (ХК) и ацетата свинца (АС) на течение асептического воспаления (АВ), а также возможность

иммунной модуляции течения АВ на фоне введения солей металлов.

Методы исследования:

Исследование проводили на 3 группах животных, в эксперимент взяты 42 беспородных крыс-самцов массой 180-220±20 г, содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе. Первая группа представляла собой интактных животных, не подвергавшихся никакому воздействию (контрольные животные, К). Вторая группа получала перорально смесь хлорид кадмия (ХК) и ацетат свинца (АС) в течение двух недель ежедневно из расчета 2,5 мг/кг массы тела перорально (Ме). Третьей группе вводили скипидар после двухнедельного курса введения солей тяжелых металлов (Ме+АВ). В каждой группе проводили оценку количества основных популяций Т-лимфоцитов (CD4⁺ (Th), CD8⁺ (CTL), CD4⁺CD25⁺ (активированные Т-клетки), CD4⁺CTLA-4⁺ (T-регуляторные клетки)) в селезенке в динамике наблюдения через 7 и 14 суток после последнего введения солей металлов или инъекции скипидара. Экспериментальное воспаление индуцировали путем подкожного введения 0,3 мл скипидара на вазелиновом масле в межлопаточную область. Эксперименты одобрены этическим комитетом Казахского национального медицинского университета им. С. Д. Асфендиярова (протокол №3 (94) от 25.03.2020 г.). Животных выводили из эксперимента под анестезией Золетил-Ксилазином [9]. Исследования проводили через 7, 14 суток от начала моделирования воспаления (в каждой серии было не менее 6 крыс), производя забор селезенки.

Определение маркеров проводили с помощью проточной иммуноцитофлуориметрии согласно [10] на базе Института молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина.

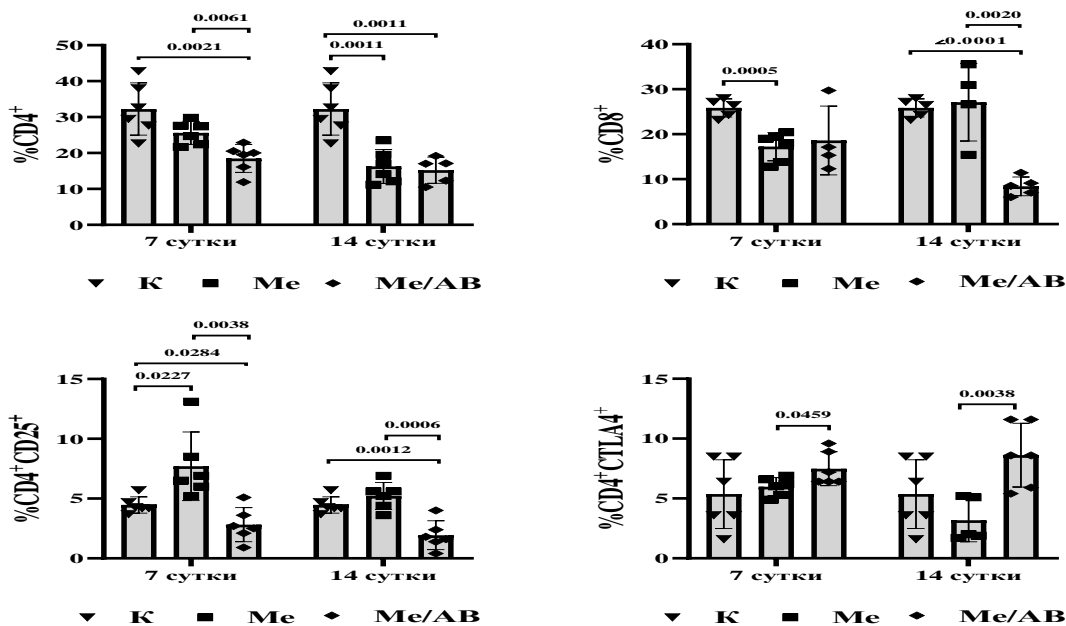
Статистический анализ. Все эксперименты проводили не менее чем в 6-кратной повторности. Используя прикладную программу Excel, вычисляли среднее арифметическое значение (М) и стандартное отклонение (SD). Графики и таблицы содержат информацию в виде средних арифметических величин (М)±стандартное отклонение (SD). Достоверность различия средних значений между двумя опытами рассчитывали с помощью программы TTEST. Для сравнения более чем двух групп проводили однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующим Tukey тестом. Различия считали несущественными, если вероятность нуль-гипотезы не превышала 5% (p<0,05). GraphPad Prism 4 использовался для создания и проектирования графики данных.

Результаты и обсуждение:

Имунотоксическое действие ХК и АС проявлялось при оценке основных эффекторных популяций Т-клеток (рисунок 1). Так, через 14 суток происходило двукратное снижение содержания CD4⁺ Th-клеток в группе Ме (16,2±4,7%) по сравнению с К (32,2±7,3%,

$p=0,0011$) и в группе Me/AB через 7 суток ($18,5\pm 3,9\%$) и далее через 14 суток ($15,2\pm 3,6\%$) наблюдения по

сравнению с К ($32,2\pm 7,3\%$, $p=0,0021$ и $p=0,0011$, соответственно).



Показаны результаты исследований CD4+, CD8+, CD4+CD25+, CD4+CTLA4+, для групп К – контроль; Me – хлорид кадмия и ацетат свинца; Me/AB – хлорид кадмия и ацетат свинца + асептическое воспаление: 1 – через 7 и 14 суток.

Примечание: показаны средние значения (M) и стандартные отклонения (CO). Значения статистически значимы при $p \leq 0,05$: * - к контролю, ** - к Me.

Рисунок 1 - Доля CD4+, CD8+, CD4+CD25+, CD4+CTLA4+ - спленцитов экспериментальных животных после воздействия солей кадмия, свинца и скипида в динамике наблюдения

Ранними исследованиями было показано, что Т-клетки наиболее подвержены токсическому действию кадмия и свинца среди всех популяций лимфоцитов [2].

Дальнейший анализ Т-клеточных популяций показал, что предварительная затравка крыс тяжелыми металлами приводила к еще большему снижению доли CD8+ Т-клеток в группе Me/AB при сравнении с К ($p=0,0011$) через 14 суток. Исследование доли CD4+CD25+ активированных Т-клеток показало ее двукратное увеличение в группе Me ($7,7\pm 2,9\%$, $p=0,0027$) по сравнению с Контролем ($4,5\pm 0,7\%$). Роль Трег-клеток в воспалительных состояниях неоднозначна. Считается, что активация Трег-клеток необходима во время острой инфекции для поддержания гомеостаза в ткани и сохранения целостности тканей от чрезмерной активности эффекторных иммуноцитов. Между тем, при асептическом воспалении, вызванном на фоне предварительной интоксикации ХК и АС в группе Me/AB, доля Трег-клеток с фенотипом CD4+CD25+ оказалась ниже контроля в 2 и более раза, как через 7 суток ($2,8\pm 1,4\%$, $p=0,0284$), так и через 14 суток ($1,9\pm 1,2\%$, $p=0,0006$). Однако, расширение пула Трег-клеток при хроническом воспалении предотвращает подавление ответных реакций против инфекции и подавляет резолюцию воспаления. В норме острое воспаление вызывает активацию эффекторных Т-клеток и переход Трег-клеток в эффекторные Т-

клетки, через потерю экспрессии Foxp3 и приобретение способности продуцировать IFN- γ . На более поздних сроках воспалительной реакции пул Трег-клеток расширяется и способствует восстановлению гомеостаза [11]. В данном исследовании идентификацию Трег-клеток проводили по фенотипу CD4+CTLA-4+ (рисунок 1). Предварительное введение ХК и АС животным с воспалением приводило к повышению содержания Трег-клеток через 7 суток в группе Me/AB, на 38,5% ($7,5\pm 1,4\%$) превышавшем долю CD4+CTLA-4+ группы Me ($5,9\pm 0,7\%$, $p=0,0459$), и на 168,8% ($8,6\pm 2,7\%$) по сравнению с Me ($3,2\pm 1,8\%$, $p=0,0038$) через 14 суток. Полученные данные свидетельствуют о том, что соединения свинца и кадмия нарушали нормальное течение воспалительного процесса, индуцируя повышенный иммуносупрессорный фон, предотвращающий адекватный ответ эффекторных иммуноцитов на антиген. Можно предположить, что снижение содержания CD8+ клеток, наблюдаемое нами в группе Me/AB через 14 суток эксперимента, было обусловлено именно расширением пула Трег-клеток, чья способность ингибировать дифференцировку и функции CTL была многократно продемонстрирована ранее [12].

Выводы:

1. Установлено, что введение хлорида кадмия и ацетата свинца ежедневно в течение двух недель из расчета по 2,5 мг/кг массы тела крыс оказывало

системное иммунотоксическое действие на животных, выражающееся в снижении уровня эффекторных иммунных популяций CD4⁺ Th-клеток.
 2. Хлорид кадмия и ацетат свинца приводили к дисрегуляции воспалительного процесса, выражающейся в снижении доли CTL, а также в повышении доли Treg-клеток, что свидетельствует о повышенном иммуносупрессорном фоне и Th2-направленности иммунного ответа.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES:

1 Kampa M., Castanas E. Human health effects of air pollution // Environmental pollution. 2008;151(2):362-367. DOI: 10.1016/j.envpol.2007.06.012.
 2 Ebrahimi M., Khalili N., Razi S., Keshavarz-Fathi M., Khalili N., Rezaei N. Effects of lead and cadmium on the immune system and cancer progression. Journal of Environmental Health Science and Engineering. Eng. 2020;18(1):335-343. DOI: 10.1007/s40201-020-00455-2.
 3 Ahamed M., Siddiqui M.K. Low level lead exposure and oxidative stress: current opinions (Review). Clinica chimica acta. 2007;383:57-64. DOI: 10.1016/j.cca.2007.04.024.
 4 Shevach E.M. Mechanisms of Foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. Immunity. 2009;30(5):636-45. DOI: 10.1016/j.immuni.2009.04.010
 5 Turley A.E., Zagorski J.W., Kennedy R.C., Freeborn R.A., Bursley J.K., Edwards J.R., Rockwell C.E. Chronic low-level cadmium exposure in rats affects cytokine production by activated T cells. Toxicology research. 2019;8(2):227-237. DOI: 10.1039/c8tx00194d
 6 Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. Regulatory T Cells and Immune Tolerance. Cell. 2008;133(5):775-787. DOI: 10.1016/j.cell.2008.05.009

7 Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. Nature review immunology. 2006;6(4):295-307. DOI: 10.1038/nri1806
 8 Singh B., Read S., Asseman C., Malmstrom V., Mottet C., Stephens L.A., Stepankova R., Tlaskalova H., Powrie F. Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. Immunol. Rev. 2001;182:190-200. DOI: 10.1034/j.1600-065x.2001.1820115.x
 9 Sutunkove, M.P.; Ryabova, Y.V.; Minigalieva, I.A.; Bushueva, T.V.; Sakhautdinova, R.R.; Bereza, I.A.; Shaikhova, D.R.; Amromina, A.M.; Chemezov, A.I.; Shelomencev, I.G.; et al. Features of the response to subchronic low-dose exposure to copper oxide nanoparticles in rats. Sci. Rep. 2023;13:11890. DOI: 10.1038/s41598-023-38976-z
 10 Yu, V.K.; Sycheva, Y.S.; Kairanbayeva, G.K.; Dembitsky, V.M.; Balabekova, M.K.; Tokusheva, A.N.; Seilkhanov, T.M.; Zharkynbek, T.Y.; Balapanova, A.K.; Tassibekov, K.S. Naphthaleneoxypropargyl Containing Piperazine as a Regulator of Effector Immune Cell Populations upon an Aseptic Inflammation. Molecules. 2023;28:7023. https://doi.org/10.3390/molecules28207023.
 11 Chaudhry A., Rudensky A.Y. Control of inflammation by integration of environmental cues by regulatory T cells. J. Clin. Invest. 2013;123(3):939-944. DOI: 10.1172/JCI57175
 12 McNally A., Hill G.R., Sparwasser T., Thomas R., Steptoe R.J. CD4+CD25+ regulatory T cells control CD8+ T-cell effector differentiation by modulating IL-2 homeostasis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2011;108(18):7529-7534. DOI: 10.1073/pnas.1103782108

Вклад авторов: Все авторы принимали равносильное участие при написании данной статьи

Конфликт интересов – не заявлен.

Данный материал не был заявлен ранее, для публикации в других изданиях и не находится на рассмотрении другими издательствами. При проведении данной работы не было финансирования сторонними организациями и медицинскими представительствами. Финансирование – не проводилось.

Авторлардың үлесі. Барлық авторлар осы мақаланы жазуға тең дәрежеде қатысты.

Мүдделер қақтығысы – мәлімделген жоқ. Бұл материал басқа басылымдарда жариялау үшін бұрын мәлімделмеген және басқа басылымдардың қарауына ұсынылмаған. Осы жұмысты жүргізу кезінде сыртқы ұйымдар мен медициналық өкілдіктердің қаржыландыруы жасалған жоқ. Қаржыландыру жүргізілмеді.

Authors' Contributions. All authors participated equally in the writing of this article.

No conflicts of interest have been declared. This material has not been previously submitted for publication in other publications and is not under consideration by other publishers. There was no third-party funding or medical representation in the conduct of this work. Funding - no funding was provided.

Сведения об авторах:

№	ФИО (полностью)	Должность, место работы	Телефон	Эл.почта
1	Кайранбаева Гульгуль Кайранбаевна	Лектор кафедры патологической физиологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова	87786090306	kairanbayeva.g@kaznmu.kz
2	Балабекова Марина Казыбаевна	Заведующий кафедрой патологической физиологии КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова	87074402502	balabekova.m@kaznmu.kz
3	Edgaras Stankevicius	Директор Института физиологии и фармакологии Литовского университета наук о здоровье	+37068748989	edgaras.stankevicius@ismuni.lt