

МІКРОБІОЛОГІЧНИЙ ЖУРНАЛ

Том ХХХVI, в. 6

ОКРЕМИЙ ВІДБИТОК

Київ — 1974

УДК 612.017.12

ВПЛИВ МІКРОЕЛЕМЕНТІВ — МІДІ, МАРГАНЦЮ І КОБАЛЬТУ — НА АНТИТІЛОУТВОРЮЮЧУ ФУНКЦІЮ ЛІМФОЇДНОЇ ТКАНИНИ

Ю. І. Бажора, Е. Е. Штефан і В. М. Тимошевський

В даний час велика увага приділяється вивченню механізмів стимуляції імуногенезу і пошуку методів та засобів, які б підвищували імунологічну реактивність організму. В цьому відношенні привертають увагу дані літератури про стимулюючий вплив мікроелементів на окремі показники імунологічної реактивності [1—2].

Відомості про вплив мікроелементів на антитілогенез торкаються головним чином вивчення рівня антитіл в крові [3—5]. В той же час процеси, які відбуваються в лімфоїдній тканині імунізованих тварин при введенні мікроелементів, залишаються маловивченими. Лише в окремих працях відмічено, що залізо, йод і кобальт посилюють плазмоцитарну реакцію в імунізованих тварин [6, 7]; комплексний препарат кобальту Со-30 сприяє збільшенню кількостей антитілоутворюючих клітин в селезінці імунізованих тварин [8].

Проте праці по вивченню механізмів виникнення і розвитку відповідної реакції на антигенне подразнення, особливо участі в них клітинних факторів, при введенні мікроелементів нечисленні. При цьому вивчався вплив на імуногенез лише окремих мікроелементів; відсутні дані про порівняльний вплив різних мікроелементів на реакцію з боку імункомпетентної тканини та ін. У зв'язку з цим в даній праці поставлене завдання вивчити в порівняльному плані вплив найчастіше застосовуваних в медицині мікроелементів — міді, марганцю і кобальту на антитілоутворюючу функцію лімфоїдної тканини.

Матеріали і методи

Досліди були проведені на 180 білих щурах вагою 180—200 г, яких імунізували внутрішньоочеревинно введенням 0,5 мл 50%-ної суспензії еритроцитів барана.

Мікроелементи застосовували у вигляді сольових розчинів сірчаноокислої міді, сірчаноокислого марганцю та хлористого кобальту. Керуючись даними літератури про стимулюючий вплив мікроелементів на різні фактори імунологічної реактивності в дозах 0,1—1,0 мг на 1 кг ваги при їх парентеральному введенні [5, 9, 10], ми застосовували мікроелементи в дозі 0,5 мг на 1 кг ваги.

Для вивчення впливу мікроелементів на окремі фази імуногенезу були проведені такі варіанти досліду: I варіант — мікроелементи вводили протягом 4 днів до імунізації; II варіант — мікроелементи вводили за два дні до імунізації, в день імунізації та один день після імунізації; III варіант — мікроелементи вводили в день імунізації і три дні після імунізації. Така схема введення мікроелементів щодо антигенної стимуляції давала можливість вивчити вплив їх на індуктивну і продуктивну фази розвитку відповідної імунологічної реакції організму.

Всі тварини були розділені на 10 серій по 3 в кожному з вказаних варіантів. Кожній групі щурів вводили відповідно мідь, марганець і кобальт. Окрему групу становили контрольні щури, яким мікроелементи не вводили (лише імунізовані).

Про вплив мікроелементів на антитілоутворюючу функцію лімфоїдної тканини судили по рівню плазмоцитарної реакції, кількості антитілоутворюючих клітин (АУК) і вмісту гемолізинів у сироватці крові.

Тварин забивали на четверту добу після імунізації. Для цитологічного дослідження готували мазки-відбитки з регіонарних лімфовузлів (мезентеріальних) і селезінки. Препарати фіксували метанолом і забарвлювали за Романовським — Гімза. В мазках

враховували кількість незрілих і зрілих плазмоцитів на 5000 підрахованих лімфоїдних клітин.

АУК визначали в регіонарних лімфовузлах і селезінці за методом Коннінґама [11] в модифікації Клемпарської [12]. Органи подрібнювали на холоді в середовищі 199 спеціальними «гребінками», що сприяло прискоренню подрібнення тканини і запобігало руйнуванню клітини. Клітини фільтрували крізь чотиришаровий капрон і відмивали в середовищі 199 центрифугуванням при 3000 об/хв.

Камери для препаратів готували таким чином. В алюмінієвій фользі товщиною 10 мк металевим штампом вибивали отвори. Фольгу наклеювали на предметне скло клеєм такого складу: клей БФ-6, спирт, ефір (1:1:1). Такий склад клею забезпечував швидку і рівномірну фіксацію фольги. На одному предметному склі готували дві камери, одна з яких служила для підрахунку бляшок гемолізу, друга — для підрахунку ядерних клітин.

В кожну камеру вносили рівні об'єми суміші суспензії клітин, комплекменту в розведенні 1:10 і відмитих в розчині комплекменту еритроцитів барана. В одну з камер додавали половинну кількість 5%-ної оцтової кислоти для руйнування еритроцитів, що полегшувало підрахунок ядерних клітин. У другу камеру вносили половинну кількість середовища 199 для зрівноважування об'ємів. Камери накривали покривними стеклами, краї яких заливали розплавленим парафіном. Застосування запропонованої нами камери забезпечувало повну герметичність і рівномірність моношару клітин.

Облік бляшок гемолізу і ядермісних клітин у препаратах здійснювали шляхом підрахунку в 10 полях зору в кожній камері. Вміст бляшкоутворюючих клітин визначали в % до кількості ядерних клітин.

У спеціальних дослідах на 5-у і 10-у доби після імунізації щурів визначали титр гемолізину в сироватці периферичної крові за загальноприйнятною методикою.

Результати досліджень

Як показали результати досліджень (табл. 1, 2, рисунок), додатково введення мікроелементів сприяє посиленню антитілоутворюючої функції лімфоїдної тканини щурів на введення еритроцитів барана, що виявлялось у посиленні плазмоцитарної реакції, підвищенні нагромадження АУК, у збільшенні титру гемолізину в периферичній крові. При цьому мали значення строки введення мікроелементів щодо тест-ін'єкції антигену. Так, в I варіанті дослідів, коли мідь вводили до імунізації, спостерігалось істотне збільшення кількості незрілих і зрілих плазматичних клітин в регіонарних лімфовузлах та селезінці. Паралельно збільшувалась вміст АУК в лімфоїдних утвореннях у порівнянні з контрольними (лише імунізованими) тваринами. Цьому відповідав і більш виражений, ніж у контрольних тварин, рівень антитіл у сироватці крові.



Динаміка вмісту гемолізину в сироватці периферичної крові імунізованих щурів при введенні мікроелементів міді, марганцю і кобальту.

1 — мікроелементи вводили за I варіантом, 2 — за II варіантом, 3 — за III варіантом. К — контроль.

Введення марганцю в даному варіанті також супроводжувалось істотним підвищенням кількості плазматичних клітин і АУК в лімфоїдних органах у порівнянні з тваринами контрольної групи. Збільшення плазмоцитарної реакції відбувалось в основному за рахунок незрілих форм плазматичних клітин. Відповідно збільшувалась вміст АУК. В селезінці відмічалось істотне збільшення як незрілих, так і зрілих плазматичних клітин, проте нагромадження АУК, хоч і мало місць, але було статистично недостовірним. Дослідження, проведені на п'яту добу після введення антигену, показали, що в групі тварин, яким вводили марганець, титри антитіл були вищими, ніж у контролі. Проте на 10 добу рівень їх знижувався і не відрізнявся від контрольних цифр.

Введення кобальту до імунізації щурів не виявляло такого вираженого впливу на клітинні реакції в лімфоїдних утвореннях у порівнянні з міддю і марганцем. Істотне збільшення кількості клітин плазмоцитів

Плазмоцитарна реакція в регіонарних лімфовузлах і селезінці на четверту добу після імунізації щурів при додатковому введенні мікроелементів міді, марганцю і кобальту

Введений мікроелемент	Серія	Кількість плазматичних клітин на 5000 підрахованих клітин			
		Регіонарні лімфовузли		Селезінка	
		Незрілі клітини	Зрілі клітини	Незрілі клітини	Зрілі клітини
Мідь	I	134,6 ± 4,0 p 0,001	34,2 ± 2,3 p 0,01	108,4 ± 7,1 p 0,01	18,0 ± 0,8 p 0,001
	II	137,3 ± 12,2 p 0,001	27,0 ± 2,2 p 0,2	142,5 ± 6,5 p 0,001	22,8 ± 4,8 p 0,05
	III	112,4 ± 10,6 p 0,2	50,7 ± 4,4 p 0,02	105,5 ± 8,7 p 0,02	23,3 ± 4,6 p 0,02
	I	135,9 ± 11,1 p 0,01	27,6 ± 1,3 p 0,1	107,1 ± 4,1 p 0,001	18,1 ± 1,5 p 0,05
Марганець	II	149,6 ± 16,0 p 0,01	29,6 ± 3,6 p 0,1	145,0 ± 12,3 p 0,001	24,0 ± 6,1 p 0,05
	III	160,4 ± 15,8 p 0,01	24,1 ± 2,66 p 0,5	146,8 ± 10,9 p 0,01	32,3 ± 3,3 p 0,001
	I	102,8 ± 2,5 p 0,2	26,5 ± 1,3 p 0,2	94,1 ± 4,0 p 0,05	14,8 ± 0,84 p 0,01
Кобальт	II	82,5 ± 7,0 p 0,5	34,0 ± 1,8 p 0,01	82,6 ± 8,4 p 0,5	24,7 ± 2,6 p 0,001
	III	110,3 ± 6,4 p 0,1	14,8 ± 3,1 p 0,05	109,7 ± 4,2 p 0,001	12,7 ± 1,4 p 0,2
Контроль		96,6 ± 6,6	23,4 ± 2,6	79,1 ± 4,7	11,1 ± 0,87

ного ряду спостерігалось лише в селезінці. Вміст АУК в регіонарних лімфовузлах і селезінці практично не відрізнявся від контрольних показників. Не спостерігалось також достовірного збільшення титрів гемолізинів у сироватці периферичної крові на 5-у добу досліджень. Проте на 10-у добу після імунізації рівень їх перевищував контроль.

У другому варіанті дослідів, коли мікроелементи вводили за два дні до імунізації, в день імунізації і один день після імунізації, були одержані такі результати. При введенні міді істотно збільшувалась кількість незрілих плазматичних клітин в регіонарних лімфовузлах, а також незрілих і зрілих плазмоцитів — у селезінці в порівнянні з контролем. Вміст АУК в регіонарних лімфовузлах достовірно зростав і був більшим, ніж у попередньому варіанті дослідів. Відповідно змінам з боку клітинних реакцій спостерігалось наростання титрів гемолізинів у сироватці крові на 5-у добу після введення антигену. Вищий, у порівнянні з контролем, рівень антитіл визначався і на 10-у добу досліджень.

При введенні марганцю у другому варіанті дослідів, як і при введенні міді, плазмоцитарна реакція в регіонарних лімфовузлах була більш вираженою, ніж у попередньому варіанті дослідів. Причому посилення дії відбувалось за рахунок незрілих форм клітин, в той час як у селезінці — за рахунок незрілих і зрілих плазмоцитів. Поряд з цим збільшувався вміст АУК у досліджуваних лімфоїдних утвореннях у порівнянні з першим варіантом дослідів. Титри гемолізинів на 5-у добу досліджень були значно вищими, ніж у тварин контрольної групи. Знижуючись на 10-у добу, рівень їх все ж істотно перевищував контрольні титри.

Таблиця 2

Вплив міді, марганцю і кобальту на нагромадження антитілоутворюючих клітин в лімфоїдній тканині при імунізації шурів еритроцитами барана

Введений мікроелемент	Серія	Кількість антитілоутворюючих клітин (в % до ядровмісних)	
		Селезінка	Регіонарні лімфовузли
Мідь	I	27,3±1,5 р 0,02	30,6±2,0 р 0,01
	II	22,6±1,4 р 0,2	36,0±2,8 р 0,001
	III	27,1±1,2 р 0,02	36,4±1,9 р 0,001
Марганець	I	23,5±1,5 р 0,1	26,3±1,6 р 0,02
	II	25,0±1,1 р 0,05	29,0±2,4 р 0,01
	III	25,4±1,1 р 0,05	28,7±2,5 р 0,02
Кобальт	I	22,5±1,1 р 0,5	21,0±1,0 р 0,5
	II	21,4±1,1 р 0,2	21,4±2,4 р 0,2
	III	21,6±1,7 р 0,2	20,1±1,9 р 0,5
Контроль		19,2±2,3	19,3±1,7

Стимулюючий ефект при введенні кобальту виявлявся у збільшенні кількості зрілих плазматичних клітин та рівня гемолізинів у крові. Причому реакція підвищення антитіл була короткочасною.

У третьому варіанті дослідів, коли мікроелементи вводили протягом чотирьох днів після імунізації, також спостерігалась стимуляція імунної відповіді. Так, при введенні міді відмічається загальна тенденція до посилення плазмоцитарної реакції. Проте, на відміну від попередніх варіантів дослідів, в регіонарних лімфовузлах і селезінці значно збільшується кількість зрілих плазматичних клітин. Вміст незрілих плазматичних клітин істотно зменшується у порівнянні з другим варіантом дослідів. Кількість АУК в лімфоїдних утвореннях збільшується у порівнянні з контролем і відповідає їх вмісту при введенні мікроелемента у другому варіанті дослідів. Поряд з клітинними зсувами, в лімфоїдній тканині спостерігалось наростання титрів антитіл у сироватці крові на 5-у добу після імунізації. Проте на 10-у добу досліджень титр їх знижувався і був меншим, ніж у другому варіанті дослідів.

При введенні марганцю зсуви з боку плазмоцитарної реакції були приблизно такими ж, як і в другому варіанті дослідів. Не відмічалось істотної різниці і у вмісті АУК у порівнянні з попереднім варіантом дослідів. Рівень гемолізинів на 5-у добу після введення антигену істотно перевищував контрольні дані, але мало відрізнявся від рівня антитіл у попередньому варіанті дослідів. На 10-у добу досліджень титри антитіл знижувались, все ж істотно перевищуючи контрольні показники.

При введенні кобальту після імунізації плазмоцитарна реакція була більш вираженою, ніж у попередніх варіантах введення даного мікроелемента. Так, збільшувався вміст незрілих клітин в регіонарних лімфо-

вузлах і особливо в селезінці, а також кількість зрілих клітин — в регіонарних лімфовузлах. Поряд з більш вираженою плазмоцитарною реакцією, при даному варіанті введення кобальту хоч і мало місце, проте було неістотним збільшення кількості АУК. Рівень гемолізину в сироватці крові на 5-у добу досліджень дещо перевищував показники попередніх варіантів дослідів. Проте на 10-у добу після введення антигену титри антитіл знижувались і практично не відрізнялись від контрольних.

Обговорення результатів

Проведені дослідження показали, що стимулюючий вплив мікроелементів на імунну відповідь великою мірою визначається їх дією на клітинні фактори. Введення мікроелементів у різні строки щодо ін'єкції антигену дозволило визначити, що найбільш оптимальним є введення стимуляторів у період розвитку індуктивної фази імуногенезу (другий і третій варіанти дослідів). Відомо, що індуктивна фаза є найбільш чутливою до впливу різних факторів [13, 14]. В цей час відбувається формування клона антитілоутворюючих клітин, яке супроводжується процесами проліферації і диференціювання клітин, посиленням синтезу ДНК та РНК у клітинах лімфоїдної тканини [15]. Численними дослідженнями встановлено, що різноманітні стимулятори та інгібітори імуногенезу найбільш ефективні саме в цей період [16—19]. Очевидно, мікроелементи впливають на процеси метаболізму в лімфоїдній тканині. Така можливість не виключається, враховуючи високу біологічну активність мікроелементів: участь в обміні нуклеїнових кислот, синтезі білків та інших речовин, взаємодію їх з іншими біологічно активними структурами [20].

Дослідження показали, що більший стимулюючий вплив на імуногенез виявляють мідь і марганець, в той час як введення кобальту істотного впливу на процес антитілоутворення не виявляло. Не виключено, що кобальт за своєю біологічною дією є мікроелементом більш специфічним, впливаючи переважно на кровотворення [21—23]. Поряд з цим мідь та марганець визначаються як мікроелементи широкого спектра дії.

ЛІТЕРАТУРА

1. А. И. Венчиков, Биотика, М., 1962.
2. М. Г. Коломийцева, Р. Д. Габович, Микроэлементы в медицине, М., 1970.
3. Г. А. Бабенко, Микроэлементы в экспериментальной и клинической медицине, К., 1965.
4. С. М. Прегер, Автореф. докт. дисс., Томск, 1969.
5. Ю. Д. Свистун, Автореф. канд. дисс., Ивано-Франковск, 1969.
6. Т. И. Иванова, А. Ф. Гришило, Т. Ф. Кошик, С. Т. Дзюбак, В кн. «Микроэлементы в медицине», в. 1, К., 1968, 48.
7. Л. Я. Фищенко, Е. Г. Ткаченко, В кн. «Микроэлементы в медицине», Ивано-Франковск, 1969, 253.
8. И. К. Мусабаяев, А. И. Николаев, М. Н. Назармахамедов, В кн. «Микроэлементы в медицине», Душанбе, 1972.
9. Ж. М. Сак, В. Н. Сытько, В кн. «Уч. записки Витебск. вет. ин-та», 1969, 21, 68.
10. С. Д. Алиев, В кн. «Матер. конф. посвящ. 50-лет. создания СССР», Баку, 1972.
11. A. Cunningham, Nature, 1965, 207, 5001, 1106.
12. Н. Н. Клемпарская, Ж. микробиол., 1969, 9, 8.
13. F. Dixon, D. Talmage, P. Mauger, J. Immunol., 1952, 68, 6, 693.
14. Р. В. Петров, Ю. М. Зарецкая, Трансплантационный иммунитет и радиационные химеры, М., 1970.
15. М. И. Грутман, Булл. экпер. биол. мед., 1968, 65, 2, 70.
16. И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, Вестн. АМН СССР, 1964, 3, 23.
17. И. Я. Учитель, Э. Л. Хасман, В кн. «Вопр. инфекц. патол. и иммунол., М., 1965.
18. П. Ф. Здродовский, Пробл. инфекц. иммунол. и аллергии, М., 1969.
19. Р. В. Петров, В. М. Манько, Иммунодепрессоры, М., 1971.
20. Г. А. Бабенко, В. М. Витвицкий, М. А. Никольская, В кн. «Микроэлементы в животноводстве и медицине», К., 1965, 142.
21. S. Elvehjem, Physiol. Rev., 1935, 15, 471.
22. N. Berlin, J. Biol. Chem., 1950, 187, 41.
23. В. Я. Шустов, Микроэлементы в гематологии, М., 1967.

З Одеського медичного інституту

Одержано
20.X 1973 р.

ВЛИЯНИЕ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ — МЕДИ, МАРГАНЦА И КОБАЛЬТА — НА АНТИТЕЛООБРАЗУЮЩУЮ ФУНКЦИЮ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ

Ю. И. Бажора, Э. Э. Штефан и В. Н. Тимошевский

Резюме

В опытах на иммунизированных крысах изучалось влияние дополнительного введения меди, марганца и кобальта на процессы иммуногенеза. Было показано, что эти микроэлементы вызывают существенные сдвиги в клеточных реакциях лимфоидной ткани, что выражалось в усилении плазмочитарной реакции, большем накоплении антителообразующих клеток, увеличении титров антител в сыворотке периферической крови. При этом имели значение сроки введения микроэлементов по отношению к инъекции антигена. Большой стимулирующий эффект наблюдался при введении микроэлементов в индуктивную фазу иммуногенеза. Стимуляция антителогенеза была более выраженной при введении меди и марганца, чем при введении кобальта.

EFFECT OF COPPER, MANGANESE AND COBALT TRACE ELEMENTS ON ANTIBODY-FORMING FUNCTION OF LYMPHOID TISSUE

Yu. I. Bazhora, E. E. Shtefan and V. N. Timoshevsky

Summary

In experiments with immunized rats the processes of immunogenesis were studied as affected by additional introduction of copper, manganese and cobalt. These trace elements were shown to evoke essential shifts in the cell reactions of the lymphoid tissue, that manifested in intensification of the plasmocytic reaction, a greater accumulation of the antibody-forming cells, increase in the antibody titres in the peripheral blood serum. The time of trace elements introduction was important with respect to antigen injection. A greater stimulating effect was observed when trace elements were introduced into the inductive stage of immunogenesis. Stimulation of antibodygenesis was more pronounced with introduction of copper and manganese than with that of cobalt.