

УДК [579.841.11+579.842.11]:616-002-092.9-053:612.017.1

Т. И. Коваленко, В. В. Мишухин, Е. М. Климова
Харьковский национальный медицинский университет, Государственное учреждение
Институт общей и неотложной хирургии НАМИ Украины, г. Харьков

ИММУНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА НА МОДЕЛИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

В работе было показано, что молодые животные более реагировали на введение бактериальной взвеси *P.aeruginosa*, а старые экспериментальные животные на введение *E.coli*. Первичный гуморальный фактор иммунного ответа был снижен только у молодых экспериментальных животных. Так же пришли к выводу, что исход воспаления у экспериментальных животных зависит от возрастных особенностей, от функционального состояния факторов врожденного иммунитета, от бактерий разной видовой принадлежности и от стадии воспалительного процесса.

Ключевые слова: *P.aeruginosa* и *E.coli*, возраст экспериментальных животных, клеточный и гуморальный иммунитет, фагоцитарная активность, комплемент, ЦИК.

Работа является фрагментом НДР «Экспериментальное микробиологическое обоснование противомикробной терапии гнойно-воспалительных заболеваний» (№ государственной регистрации 0114U003390).

Научный интерес представляет пока недостаточно исследованная реакция первичных врождённых факторов иммунитета у экспериментальных животных различного возраста, так как в процессе онтогенеза взрослые особи претерпевают постоянные контакты с антигенами различной природы, в том числе и инфекционными [1].

В последнее десятилетие достижения в теоретической и практической геронтологии позволило осуществить целенаправленную регуляцию возрастных изменений [2, 6]. Исходя из этого, одной из приоритетных задач современной геронтологии является профилактика ускорения старения и возрастной патологии, направленная на увеличение средней продолжительности жизни, сохранение активного долголетия и достижение видового предела жизни человека [5, 9].

Животные разного возраста в ответ на действие инфекции по-разному изменяют интенсивность и направленность метаболических реакций [3]. Однако к настоящему времени не ясны причины этих различий. Возможно, что ответ на данный вопрос поможет не только понять молекулярные механизмы формирования адаптивных приспособлений, но прояснить причины старения организмов [4, 7].

Целью работы было изучение возрастных особенностей иммунной реакции у экспериментальных животных разного возраста, на модели воспалительного процесса, индуцированного бактериальными взвесями *P.aeruginosa* и *E. coli*.

Материал и методы исследования. Материалом для эксперимента служили белые крысы-самцы 3-х месячного возраста («молодые») массой 100 -140гр. (n=40) и 22-х месячные («старые») с массой тела 200 -240 гр.(n=40). Первая n=10 (3-х месячные самцы, животным этой группы внутрибрюшинно вводили 1,5 мл стерильного физиологического раствора) и вторая n=10 (22-х месячные животные, которым внутрибрюшинно вводили 1,5 мл стерильного физиологического раствора) группы крыс служили контролем. Третьей n=15 и четвёртой n=15 группе животных вводили внутрибрюшинно суточную агаровую культуру *Pseudomonas aeruginosa* № 27835 АТСС (вводили 1,5 мл взвеси бактерий, которая содержала 10⁹ КОЕ/мл). Пятой n=15 и шестой n=15 группе животных вводили внутрибрюшинно суточную агаровую культуру *Escherichia coli* № 25592 АТСС (вводили 1,5 мл взвеси бактерий, которая содержала 10⁹ КОЕ/мл).

Инфицированных животных выводили из эксперимента путём декапитации на 3 день - n=28, 5 день - n=26 и 7 день - n=26 эксперимента. У экспериментальных животных забирали кровь. В процессе данного эксперимента в крови изучали фагоцитарные функции нейтрофильных гранулоцитов, фагоцитарную активность нейтрофилов, образовывали определение общей окислительно - восстановительной активности гранулоцитарных нейтрофилов в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) с помощью световой микроскопии.

Так же в сыворотке крови изучали изменения концентрации С3 фрагмента комплемента [8] с помощью фотометрического метода и интенсивность образования циркулирующих иммунных комплексов (используя прибор спектрофотометр, длина волны 450 нм), у контрольных животных и после действия антигенов, индуцирующих воспалительный процесс.

Результаты исследования и их обсуждение. При исследовании первичного врождённого клеточного иммунитета наблюдали снижение индекса завершённости фагоцитоза (ИЗФ) у молодых и у старых животных инфицированных бактериальной взвесью *P.aeruginosa* к 5 суткам, причём снижение ИЗФ было более выражено у молодых животных. Таким образом, молодые животные оказались более чувствительны к *P.aeruginosa*. У молодых животных на 7 сутки выявили некоторую стабилизацию фагоцитарного числа (ФЧ), а у старых животных и ФЧ и ИЗФ были снижены и составляли, ФЧ - $1,82 \pm 0,01$ при контроле $3,61 \pm 0,03$ и ИЗФ - $0,83 \pm 0,02$ при контрольных значениях $1,14 \pm 0,02$.

У молодых животных, инфицированных бактериальной взвесью *E. coli*, к 7 суткам снизился показатель ИЗФ, по сравнению со старыми животными и контрольным значением, и составил $0,97 \pm 0,01$ при контроле $1,45 \pm 0,06$.

В ходе эксперимента выявили, что интенсивность ферментативной активности у молодых контрольных животных в 1,5 раза превышало показатели индекса стимуляции (ИС) такового у старых контрольных животных. При введении взвеси *P.aeruginosa* на 3 сутки эксперимента у молодых животных увеличился показатель спонтанного теста по сравнению с контролем и старшей группой. У старшей группы выявили увеличение стимулированного теста. У молодых показатель ИС снижается на всех этапах эксперимента, что свидетельствует о неудовлетворительном состоянии бактерицидной системы клеток.

У старых животных после введения взвеси *P.aeruginosa* ИС в НСТ-тесте во все сроки эксперимента был немного увеличен, особенно на раннем этапе эксперимента (3 сутки) и составил $2,13 \pm 0,09$ при $1,80 \pm 0,06$ в контроле, что свидетельствует о наличии функционального резерва иммунокомпетентных клеток.

После введения бактериальной взвеси *E. coli* к 5 суткам эксперимента у 22-х месячных старых животных наблюдали выраженное снижение ИС, по сравнению с 3-х месячными молодыми животными, который составил $1,29 \pm 0,04$ при $2,22 \pm 0,08$ % у молодых животных, что свидетельствует о возрастных отличиях показателей, зависящих от стадии воспалительного процесса.

При исследовании первичного врождённого гуморального звена иммунитета выявили, что концентрация С 3 фрагмента комплемента была увеличена на протяжении всего эксперимента (3-7 сутки) у старых животных. Максимальное увеличение данного показателя выявили на 3 сутки эксперимента у старых животных после индукции взвесью *E. coli*, которое составило $0,64 \pm 0,1\%$ при контроле $0,45 \pm 0,2\%$. У молодых животных концентрация С 3 фрагмента комплемента в сыворотке крови была максимально снижена на 5 сутки эксперимента и составляла $0,48 \pm 0,2\%$ при контроле $0,65 \pm 0,1\%$ после действия взвеси *P.aeruginosa* и $0,42 \pm 0,2\%$ при контроле $0,65 \pm 0,1\%$ после действия бактериальной взвеси *E. coli* (табл. 1).

Таблица 1

Интенсивность образования С 3 фрагмента комплемента у животных разного возраста с моделью воспаления, индуцированного введением бактериальных взвесей *P.aeruginosa* и *E.coli*

Возрастные группы экспериментальных животных	Бактериальная взвесь <i>P.aeruginosa</i>	Бактериальная взвесь <i>E. coli</i>
3 день		
3 мес. n=10	$0,49 \pm 0,2$	$0,55 \pm 0,2$
22 мес. n=10	$0,51 \pm 0,1^*$	$0,64 \pm 0,1^*$
5 день		
3 мес. n=10	$0,48 \pm 0,2^*$	$0,42 \pm 0,2^*$
22 мес. n=10	$0,49 \pm 0,1$	$0,51 \pm 0,1$
7 день		
3 мес. n=10	$0,49 \pm 0,2$	$0,50 \pm 0,2$
22 мес. n=10	$0,46 \pm 0,1$	$0,52 \pm 0,1$
контроль		
3 мес. n=10	$0,65 \pm 0,1$	
22 мес. n=10	$0,45 \pm 0,2$	

Примечание: * - достоверность различия с контролем $P \leq 0,05$

Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в контрольной группе у молодых животных соответствовал норме, а у животных старшего возраста (22-х мес.) была в 2 раза ниже и составила $25,0 \pm 6,0$ усл. ед. После введения бактериальных взвесей *P.aeruginosa* и

E.coli на 3 сутки експеримента інтенсивність утворення ЦИК була вище в обох вікових групах (табл. 2).

Таблиця 2

Концентрація ЦИК у живих тварин різного віку з моделлю запалення, індукованого введенням бактеріальних взвесей *P.aeruginosa* і *E.coli*

Вікові групи експериментальних тварин	Бактеріальна взвець <i>P.aeruginosa</i>	Бактеріальна взвець <i>E. coli</i>
3 день		
3 міс. n=10	130,0±12,0*	161,0±13,0*
22 міс. n=10	125,0±12,0*	138,0±12,0*
5 день		
3 міс. n=10	120,0±12,0*	167,0±13,0*
22 міс. n=8	146,0±13,0*	179,0±14,0*
7 день		
3 міс. n=10	115,0±12,0*	140,0±12,0*
22 міс. n=10	94,0±9,0*	105,0±10,0*
контроль		
3 міс. n=10	51,0±7,0	
22 міс. n=10	25,0±6,0	

Примечание: * - достовірність відмінності з контролем $P \leq 0,05$

К 5 суткам інтенсивність утворення ЦИК була високою в обох групах порівняно з контролем, а у старих тварин достовірно більш високою, ніж у молодих. К 7 суткам в період реконвалесценції у молодих і старих тварин концентрація ЦИК достовірно знижувалася порівняно з первими термінами дослідження, однак у молодих тварин зв'язування мікроорганізмів імуноглобулінами відбувалося більш інтенсивно, ніж у старих тварин, що свідчить про більш високу імунну реактивність.

Висновки

1. На різних етапах індукції запального процесу у молодих і старих тварин виявили зміни фагоцитарної активності ферментів гранулоцитарних нейтрофілів, залежні від віку експериментальних тварин.
2. Зміна концентрації С3 фрагмента комплементу в сироватці крові була більш вираженою у старих експериментальних тварин, у молодих же тварин цей показник був знижений очевидно за рахунок вживання цього гуморального фактора в елімінації антигену.
3. Після дії інфекційних бактеріальних взвесей *P.aeruginosa* і *E.coli* інтенсивність утворення ЦИК була достовірно збільшена в обох вікових групах експериментальних тварин, що свідчить про активацію зв'язування імуноглобулінами мікроорганізму.
4. Розрешеність запалення у експериментальних тварин залежить від вікових особливостей, від функціонального стану факторів вродженого імунітету, від бактерій різної видової належності і від стадії запального процесу.

Перспективи подальшого дослідження. В відповідь на фактори зовнішнього середовища (інфекційні бактеріальні взвесі *P.aeruginosa* і *E.coli*) адаптивні реакції, що визначають резистентність організму, мають різну стратегію в залежності від віку і потребують подальшого дослідження. Дослідження в цій області будуть продовжені і розширені з урахуванням отриманих даних.

Список літератури

1. Anisimov V. N. Molekulyarnye i fiziologicheskie mehanizmy stareniya / V. N. Anisimov // SPb.: Nauka. – 2003. – 468 s.
2. Bochkov N. P. Rol molekulyarno-geneticheskoy diagnostiki v prognozirovanii i profilaktike vozrastnoy patologii / N. P. Bochkov, D. V. Soloveva, D. L. Strekalov [i dr.] // Klinich. meditsina. – 2002. – No. 2. – S. 4–8.
3. Bozhkov A. I. Vozmozhnaya rol «metabolicheskoy pam'yati» v formirovanii otvetnoy reaktsii na stress – faktory u molodykh i vzroslykh organizmov / A. I. Bozhkov, V. L. Dlubovskaya, Yu. V. Dmitriev [i dr.] // Uspehi gerontologii. – 2009. – T.22, No.2. – S. 259 – 268.
4. Kulimbetov M. T. Protsessy adaptatsii tireoidnogo statusa kryis raznogo vozrasta v usloviyah hronicheskogo defitsita yoda v pitanii / M. T. Kulimbetov, M. M. Rashitov, T. S. Saatov // Mezhdunarodnyy endokrinologicheskyy zhurnal. – 2009. – No. 2(20) – S. 33 – 37.
5. Petrov R. V. Immunnyy otvet i starenie / R. V. Petrov, R. M. Haitov // Uspehi sovrem. biol. – 1975. – T. 79, vyp.1. – S. 111–127.
6. Bozhkov A. I. Caloric Restriction Diet Induces Specific Epigenotypes Associated with Life Span Extension / A. I. Bozhkov, Yu. V. Nikitchenko // Journal of Nutritional Therapeutics. - 2013. Vol. 2, No 1. P. 30-39.
7. Calin-Jageman R. J. Behavioral adaptation of the Aplysia siphon withdrawal response is accompanied by sensory adaptation / R. J. Calin-Jageman, T. M. Fischer // Behavioral Neuroscience. - 2007. – Vol. 121(1). – P. 200 – 211.

8. Datta P. K. HIV and complement hijacking an immune defense / P. K. Datta, J. Rappaport // Biomedicine and Pharmacotherapy. – 2006. – Vol. 60 (9). – P. 561 – 568.
9. Oqawa K. Activin in humoral immune responses / K. Oqawa, M. Funaba // - 2011 – Vol. 85 – P. 235 – 253.

Реферати

ІМУНОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ НА МОДЕЛІ ГЕНЕРАЛІЗОВАНОГО ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ

Коваленко Т. І., Мінухін В. В., Клімова О. М.

У роботі було показано, що молоді тварини більш реагували на введення бактеріальної суспензії *P.aeruginosa*, а старі експериментальні тварини на введення суспензії *E.coli*. Первинний гуморальний фактор імунної відповіді був знижений тільки у молодих експериментальних тварин. Також прийшли до висновку, що результат запалення у експериментальних тварин залежить від вікових особливостей, від функціонального стану факторів вродженого імунітету, від бактерій різної видової приналежності та від стадії запального процесу.

Ключові слова: *P.aeruginosa* та *E.coli*, вік експериментальних тварин, клітинний та гуморальний імунітет, фагоцитарна активність, комплемент, ЦІК.

Стаття надійшла 15.05.2015 р.

IMMUNORESISTATION OF EXPERIMENTAL ANIMALS OF DIFFERENT AGE IN SIMULATED GENERALIZED INFLAMMATORY PROCESS

Kovalenko T. I., Minukhin V. V., Klimova Ye. M.

The paper presented that young animals are more responsive to the introduction of the bacterial suspension *P.aeruginosa* and old experimental animals to the introduction of a suspension of *E. coli*. The primary humoral immune response factor was reduced in young experimental animals. Just come to the conclusion that outcome of inflammation in experimental animals depends on the age characteristics, the functional state of the factors of innate immunity, against bacteria of different types of accessories and the stage of the inflammatory process.

Key words: *P.aeruginosa* and *E.coli*, age of the experimental animals, cellular and humoral immunity, phagocytic activity, complement, CIC.

Рецензент Старченко І.І.

УДК 612.115:615.831

О. В. Коковська

ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія», м. Полтава

ВПЛИВ ПОЛЯРИЗОВАНОГО СВІТЛА НА ЗГОРТАННЯ КРОВІ ТА ФІБРИНОЛІЗ

В роботі показано, що під впливом поляризованого світла (Біоптрон-1) в умовах *in vitro* сповільнюється час фібринолізу у тромбоцитарній (з 202,50±14,50 хв. до 266,25±12,50 хв., $p<0,05$) та безтромбоцитарній плазмі (з 240,00±41,90 хв. до 361,25±31,50 хв., $p<0,05$).

У досліджах *in vivo* поляризоване світло не тільки гальмувало фібриноліз, але і активувало коагуляційний гемостаз, про що свідчить зменшення загального часу зсідання крові з 487,3 с до 360,0 с ($p<0,05$), прискорення часу рекальцифікації безтромбоцитарної плазми з 137,0 с до 99,0 с ($p<0,05$), зменшення АЧТЧ з 27,4 с до 23,7 с ($p<0,05$).

Ключові слова: поляризоване світло, фібриноліз, гемостаз.

Робота є фрагментом НДР за номером держ. реєстрації 0101U005504.

Відомо, що поляризоване світло, проникаючи на глибину 2-3 мм, може безпосередньо впливати на кров в судинах. Зокрема, під впливом поляризованого світла відбуваються структурні зміни мембран еритроцитів, в результаті чого змінюється їх форма [2, 7], що може суттєво впливати на в'язкість крові та її реологічні властивості [3, 4].

Такі впливи поляризованого світла на кров не можуть не вплинути й на її згортання. Так, нами показано, що в умовах *in vitro* в крові людей поляризоване світло, змінюючи активність тромбопластину та плазміну, посилює гемостатичні властивості крові та гальмує фібриноліз [11, 12]. Поляризоване світло застосовується в клініці для зупинки кровотеч, лікування поверхневих ран, запальних процесів [3, 4]. Можна припустити, що значною мірою це зумовлено впливом саме на коагуляційний гемостаз та фібриноліз. Але остаточно механізми такого впливу не з'ясовані. Не відомо також, чи зберігається вплив поляризованого світла, виявлений нами *in vitro*, в умовах *in vivo*.

Метою роботи було вивчення впливу поляризованого світла на згортання крові та фібриноліз в умовах цілісного організму.

Матеріал та методи дослідження. Експериментальні дослідження проведені на безпородних котах вагою 2,5 – 4 кг. У 10 тварин (1 серія дослідження) в умовах гексеналового наркоза (100 мг/кг ваги) отримували кров з лівої яремної вени, змішували її з 3,8% цитратом натрію у співвідношенні 9:1. В подальшому розділяли кров на 2 рівні частини, які розміщали в однакові пластикові чашечки. В одній з них кров опромінювали поляризованим світлом за