

УДК 616-002-092.9:615.37:612.017.11

<https://doi.org/10.24959/ubphj.17.132>

Т. І. КОВАЛЕНКО

Харківський національний медичний університет

ВРОДЖЕНА КЛІТИННА ІМУННА ВІДПОВІДЬ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ НА ТЛІ ЗАПАЛЕННЯ І ВВЕДЕННЯ ІМУНОКОРЕКТОРІВ

Актуальність. Недостатньо висвітлена в світовій науковій літературі проблема зміни регуляторних механізмів імунної відповіді в залежності від віку. Мало вивчені молекулярні події та клітинні взаємодії, що лежать в основі механізмів імунореактивності, які забезпечують розвиток адаптації на різних етапах онтогенезу.

Метою нашої роботи було вивчення особливостей зміни фагоцитуючої активності нейтрофілів та оцінка їх ферментативної активності в експериментальних тварин різного віку на тлі запального процесу і застосування імунокоректорів поліоксидонію та міксфактора.

Матеріали та методи. Під час роботи проводились дослідження клітинної ланки вродженого імунітету в експериментальних тварин різного віку на тлі введення суспензії *E. coli* та застосування імунокоректорів на різних етапах експерименту за допомогою мікроскопічного методу.

Результати та їх обговорення. В результаті дослідження виявлено, що поліоксидоній слід застосовувати після активації запальної реакції, так як цей препарат має виражену антиоксидантну активність, що є негативним для забезпечення фагоцитозу нейтрофілів за допомогою активних форм кисню, що забезпечує ендцитоз бактеріальних антигенів.

Висновки. Введення експериментального композитного препарату міксфактора призвело до стимуляції активності фагоцитозу, що свідчить про адаптивний зв'язок процесів реактивності і резистентності експериментальних тварин різного віку.

Ключові слова: експериментальні тварини; вік; фагоцитоз; запалення; імунокоректори

Т. Kovalenko

Innate cellular immune responses in experimental animals of different age on the background of inflammation and the introduction of immunomodulators

Topicality. Insufficient light in the world scientific literature the problem of changing the regulatory mechanisms of the immune response depending on age. Little-studied molecular events and cellular interactions underlying the mechanisms of immunoreactivity for the development of adaptation at different stages of ontogenesis.

Aim. To study peculiarities of changes of phagocytic activity of neutrophils and evaluation of their enzymatic activity in the experimental animals of different ages on the background of inflammatory process and the use of immunocorrectors polioksidonium and mixfactor.

Materials and methods. In the course of work conducted the study of the cellular component of innate immunity in experimental animals of different ages on the background of the introduction of a suspension of *E. coli* and the use of immunomodulators at different stages of the experiment by microscopic method.

Results and discussion. The study revealed that polioksidonium should be applied after the activation of the inflammatory response since this drug has a pronounced antioxidant activity, which is negative to ensure the phagocytosis of neutrophils through reactive oxygen species, which provides endocytosis bacterial antigens.

Conclusions. The introduction of an experimental composite preparation mixfactor resulted in stimulation of phagocytosis activity, which is evidence about adaptive interaction processes of reactivity and resistance of experimental animals of different age.

Key words: experimental animals; age; phagocytosis; inflammation; immune correctors

Т. И. Коваленко

Врожденный клеточный иммунный ответ у экспериментальных животных разного возраста на фоне воспаления и введения иммунокорректоров

Актуальность. Недостаточно освещена в мировой научной литературе проблема изменения регуляторных механизмов иммунного ответа в зависимости от возраста. Мало изучены молекулярные события и клеточные взаимодействия, лежащие в основе механизмов иммунореактивности, обеспечивающие развитие адаптации на разных этапах онтогенеза.

Целью нашей работы было изучение особенностей изменения фагоцитирующей активности нейтрофилов и оценка их ферментативной активности у экспериментальных животных разного возраста на фоне воспалительного процесса и применение иммунокорректоров полиоксидония и миксфактора.

Материалы и методы. В ходе работы проводились исследования клеточного звена врожденного иммунитета у экспериментальных животных разного возраста на фоне введения взвеси *E. coli* и применения иммунокорректоров на разных этапах эксперимента с помощью микроскопического метода.

Результаты и их обсуждение. В ходе исследования выявлено, что полиоксидоний следует применять после активации воспалительной реакции, так как этот препарат имеет выраженную антиоксидантную активность, что является негативным для обеспечения фагоцитоза нейтрофилов с помощью активных форм кислорода, который обеспечивает эндцитоз бактериальных антигенов.

Выводы. Введение экспериментального композитного препарата миксфактора привело к стимуляции активности фагоцитоза, что свидетельствует об адаптивном взаимодействии процессов реактивности и резистентности экспериментальных животных разного возраста.

Ключевые слова: экспериментальные животные; возраст; фагоцитоз; воспаление; иммунокорректоры

ВСТУП

На першому етапі забезпечення захисту від чужорідних антигенів здійснюється за допомогою бар'єрної функції антигенпрезентуючих клітин, знищення антигену залежить від їхньої здатності до фагоцитозу [1-2]. Важливим є також наступний каскад індивідуальних реакцій, що забезпечують імунний захист на всіх етапах онтогенезу [3-4].

Порушення бар'єрної захисної функції може відбуватися через недостатність ендоцитозу антигенів у фагоцитуючих клітинах, що може сприяти створенню осередків інфекції в організмі, хронічної сенсibiliзації інших факторів імунітету [5]. Це супроводжується накопиченням в організмі великої кількості цитотоксичних чинників різної природи, які можуть формувати локальні або системні запальні процеси [6-7].

Актуальним є розробка і обґрунтування різних підходів для усунення прискорення старіння і вікової патології, що спрямовані на збільшення середньої тривалості життя, збереження активного довголіття і досягнення видової межі життя [8]. Для розуміння особливостей імунофізіологічних процесів важливим є комплексний підхід при аналізі результатів, які свідчать про порушення функцій фагоцитуючих клітин і зміну гуморальних реакцій імунітету у віковому аспекті.

Вивчення особливостей імуногенезу на тлі індукованого запалення на експериментальних моделях тварин різного віку дозволить обґрунтувати підходи до адресної імунокорекції та імунопрофілактики в різних вікових групах [9].

Метою даного дослідження було вивчення особливостей зміни фагоцитуючої активності нейтрофілів та оцінка їх ферментативної активності в експериментальних тварин різного віку на тлі запального процесу і застосування імунокоректорів поліоксидонію та міксфактора.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

У дослідженні використовувалися білі щури самці 3-місячного віку («молоді») масою 100-140 г і 22-місячні («старі») з масою тіла 200-240 г. Контрольним ($n = 48$) та експериментальним ($n = 8$) тваринам вводили препарат, що містить маніт та природний антиоксидант бета-каротин – поліоксидоній (ПО). Двом віковим групам тварин із запаленням, індукованим введенням внутрішньоочеревинно добової агарової культури *Escherichia coli* № 25592 (F-50) ATCC (вводили 1,5 мл суспензії бактерій, яка містила 10^9 КУО/мл), вводили ПО по 0,5 мл – 3-місячним щурам і 1 мл – 22-місячним щурам. Порівняно з поліоксидонієм іншій групі тварин вводили експериментальний композитний препарат, що складається з амінокислот, нуклеотидів, ферментів, вітамінів і олігопептидів – міксфактора (МФ) ($n = 8$). Двом віковим групам тварин вводили внутрішньоочеревинно добову агарову культуру *Escherichia coli* № 25592 (F-50) ATCC (вводи-

ли 1,5 мл суспензії бактерій, яка містила 10^9 КУО/мл) ($n = 48$), а також вводили МФ по 20 мкл – 3-місячним щурам і 40 мкл – 22-місячним щурам. Доза препаратів розраховувалась відповідно до терапевтичної дози по масі тіла тварин. Дані препарати вводили експериментальним тваринам *per os*: одній частині групи превентивно за 48 годин до зараження експериментальних тварин, а іншій частині групи – через 24 години після введення суспензії *E. coli* (після активації запального процесу). Контрольних та інфікованих тварин виводили з експерименту шляхом декапітації на 3 і 7 добу. Отримували біоматеріал для оцінки активності фагоцитуючих клітин.

Матеріалом для дослідження служили форменні елементи крові контрольних та експериментальних тварин різного віку. Під час експерименту в крові визначали фагоцитарну активність нейтрофілів, утворювали визначення загальної окисно-відновлювальної активності нейтрофілів у тесті відновлення нітросинім тетразолієм (НСТ-тест).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин старшої групи на тлі запалення і введення поліоксидонію в різні терміни експерименту виявили достовірне зниження індексу завершеності фагоцитозу (ІЗФ) на 7 добу експерименту, який склав $0,98 \pm 0,20$ ум. од. при контролі $1,37 \pm 0,04$ ум. од.

Індекс завершення фагоцитозу (ІЗФ) у 3-місячних щурів із запаленням та введенням імунокоректора поліоксидонію після запального процесу був достовірною вище за контрольні величини на 7 добу експерименту ($1,61 \pm 0,08$ ум. од. проти $1,44 \pm 0,04$ ум. од. у контролі) (рис. 1).

У 22-місячних тварин з моделлю запалення та застосування препарату поліоксидонію на завершальному етапі експерименту показник перетравлюючої функції нейтрофілів був нижче, ніж у контрольних щурів впродовж усього експерименту – $1,11 \pm 0,15$ ум. од. проти $1,37 \pm 0,04$ ум. од. у контролі, що свідчить про незадовільний стан фагоцитуючих клітин у тварин старшої вікової групи на тлі застосування поліоксидонію в період реконвалесценції.

Впродовж дослідження кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів спостерігали у 22-місячних експериментальних тварин зниження індексу стимуляції (ІС) на 3 добу експерименту при застосуванні поліоксидонію превентивно до індукції запалення.

При введенні імунокоректора ПО через 24 години активації запального процесу у 3- та 22-місячних тварин виявили збільшення ферментативної активності нейтрофілів (ІС) порівняно з контрольною групою тварин та з групою експериментальних тварин, яким вводили препарат ПО превентивно до індукції запалення, що свідчить про наявність функціонального резерву цих імунокомпетентних клітин.

Максимальне збільшення ІС спостерігалось у молодих тварин на 3 добу експерименту, яке складало

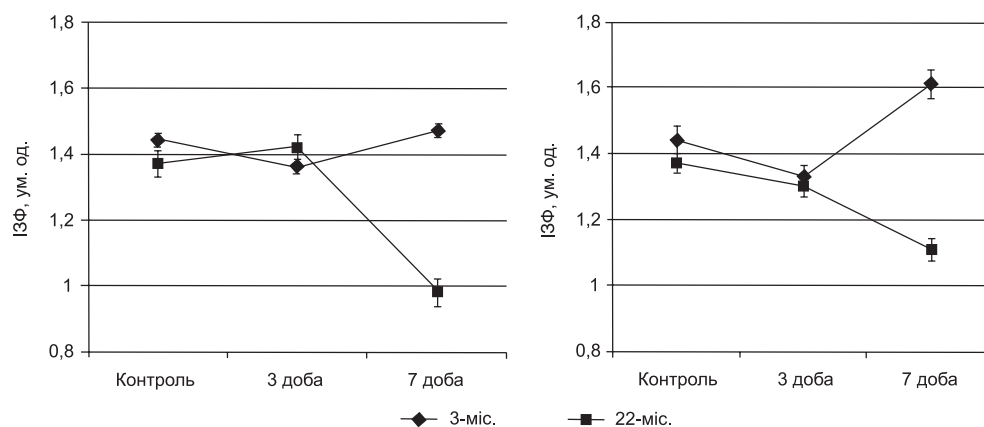


Рис. 1. Показники індексу завершення фагоцитозу під дією поліоксидонію на тлі запалення. Превентивно до запалення після системного запального процесу

$3,60 \pm 0,08$ ум. од. при контролі $2,00 \pm 0,04$ ум. од. (рис. 2).

Таким чином, у експериментальних тварин двох вікових груп із запаленням, індукованим введенням антигену *E. coli* і застосуванням препарату поліоксидонію, превентивно за 48 годин до запалення виявили зниження показника ІС порівняно з контрольною групою тварин на 3 добу експерименту, що свідчить про виснаження функціонального резерву фагоцитуючих клітин на ранньому етапі запалення.

Іншій групі експериментальних тварин різного віку вводили експериментальний композитний препарат міксфактор (МФ).

Індекс завершеності фагоцитозу у 3-місячних контрольних тварин дещо вище порівняно зі старшою групою, вочевидь, за рахунок імунореактивності молодих тварин. Показник індексу завершеності фагоцитозу був збільшений лише у 22-місячних експериментальних тварин впродовж усього експерименту і був максимальним на 3 добу експерименту при застосуванні імунокоректора міксфактора через 24 години активації запального процесу – $1,35 \pm 0,09$ % при $1,01 \pm 0,01$ % у контролі.

Таким чином, на моделі індукованого запального процесу після введення *E. coli* та застосування експе-

риментального імунокорегуючого препарату міксфактора на різних етапах експерименту спостерігали пригнічення клітинної ланки імунітету тільки у 3-місячних експериментальних тварин (рис. 3).

Стимуляція фагоцитозу (ІЗФ) відбувалася більш інтенсивно у тварин старшої групи при дії імунокоректора міксфактора до та після запального процесу, індукованого введенням *E. coli*. З цього можна зробити висновок, що прооксидантну дію міксфактора більше відчувають 22-місячні експериментальні тварини.

Також в експерименті було виявлено, що інтенсивність ферментативної активності нейтрофілів у контрольних молодих тварин у 2 рази перевищувала показники індексу стимуляції порівняно зі старшими контрольними тваринами, що свідчить про високу імунореактивність 3-місячних тварин.

В експериментальних тварин старшого віку на всіх етапах експерименту виявили збільшення ферментативної активності фагоцитуючих клітин (рис. 4).

У період реконвалесценції (7 доба) спостерігали достовірне збільшення показника ІС у двох вікових групах експериментальних тварин. Максимальне збільшення ІС було у 3-місячних тварин при введенні МФ превентивно до індукції запалення – $2,90 \pm 0,05$ %, а при контролі – $2,21 \pm 0,07$ % у 22-місячних.

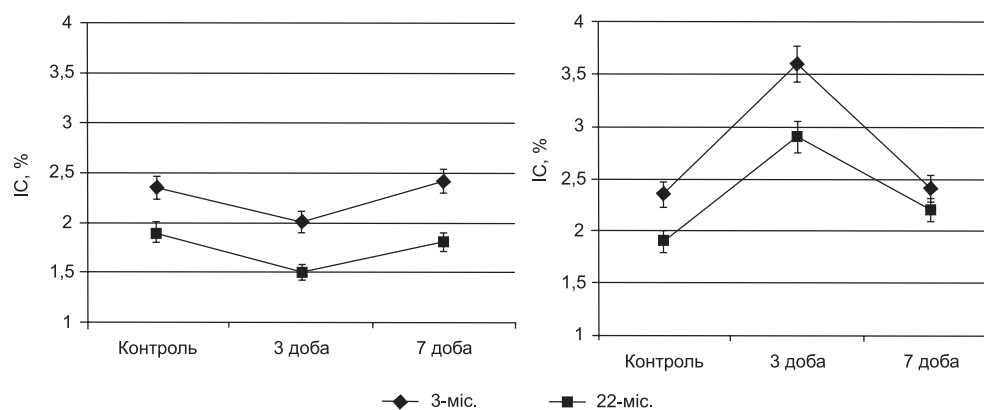


Рис. 2. Показники індексу стимуляції під дією поліоксидонію на тлі запалення. Превентивно до запалення після системного запального процесу

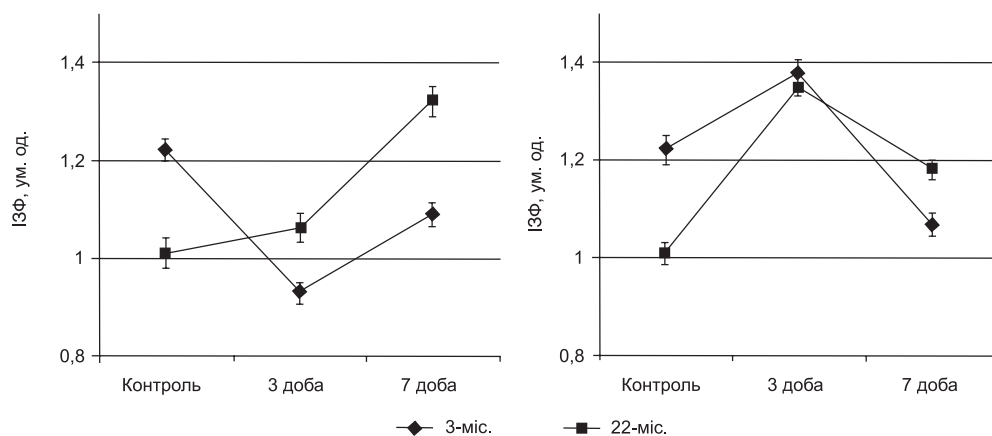


Рис. 3. Показники індексу завершеності фагоцитозу під дією міксфактора на тлі запалення. Превентивно до запалення після системного запального процесу

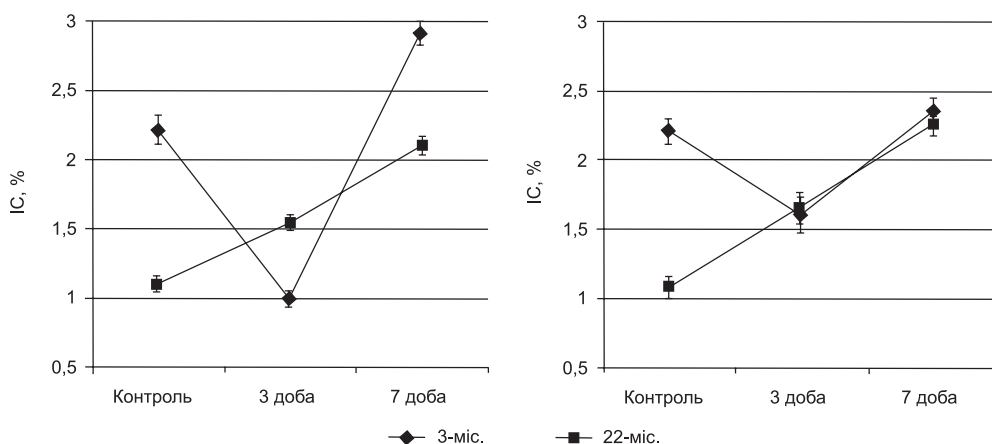


Рис. 4. Показники індексу стимуляції під дією міксфактора після запального процесу. Превентивно до запалення після системного запального процесу

У 3-місячних тварин на тлі експериментального запального процесу та застосування міксфактора після активації системного запального процесу, індукованого введенням *E. coli*, показник ІС був достовірно знижений лише на 3-ю добу експерименту, що свідчить про виснаження функціонального резерву фагоцитуючих клітин, а також про зниження метаболічного резерву фагоцитів на ранньому етапі запалення.

ВИСНОВКИ

Під час дослідження було виявлено, що на тлі запального процесу, індукованого введенням *E. Coli*, та застосування імунокоректора поліоксидонію через 24 години після активації запалення інфекційним антигеном у експериментальних тварин двох вікових груп достовірно збільшувалася індукційна ферментативна активність нейтрофілів у НСТ-тесті, особливо на ранніх термінах запалення, а застосування поліоксидонію превентивно до введення антигену *E. coli*, навпаки, викликало інгібування кисневозалежного фагоцитозу. Таким чином, поліоксидоній слід застосову-

вати після активації запальної реакції, так як цей препарат має виражену антиоксидантну активність, що є негативним для забезпечення фагоцитозу нейтрофілів за допомогою активних форм кисню, який забезпечує ендоцитоз бактеріальних антигенів.

Після застосування композитного експериментального препарату міксфактора на тлі дії патогену *E. coli* у тварин двох вікових груп спостерігали іншу реакцію у вигляді стимуляції активності фагоцитозу, що свідчить про адаптивний зв'язок процесів реактивності і резистентності експериментальних тварин різного віку. Застосування імунокоректора міксфактора превентивно до інфікування *E. coli* у молодих експериментальних тварин призводило до достовірного зниження активності фагоцитозу, особливо на 3 добу експерименту, але в старшій віковій експериментальній групі тварин на тлі бактеріального зараження *E. coli* відбувається активація кисневонезалежного і кисневозалежного фагоцитозу нейтрофілів впродовж усього експерименту.

Конфлікт інтересів: відсутній.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Воробьева, Н. В. Молекулярные механизмы фагоцитоза / Н. В. Воробьева // Рос. иммунол. журн. – 2015. – Т. 9 (18), № 2. – С. 5–13.
2. Гариб, Ф. Ю. Взаимодействие патогенных бактерий с врожденными иммунными реакциями хозяина / Ф. Ю. Гариб, А. П. Ризопулу // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 3. – С. 581–596.
3. Sokolova, E. V. Carrageenans effect on neutrophils alone and in combination with LPS in vitro / E. V. Sokolova, Y. Karetin, V. N. Davydov // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2016. – Vol. 104, Issue 7. – P. 1603–1609. doi: 10.1002/jbm.a.35693
4. Fialkow, L. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function / L. Fialkow, Y. Wang, G. P. Downey // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – Vol. 42, Issue 2. – P. 153–164. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030
5. Потاپнев, М. П. Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого / М. П. Потاپнев // Иммунол. – 2014. – № 2. – С. 95–100.
6. Беспалова, И. Д. Системное воспаление в патогенезе метаболического синдрома и ассоциированных с ним заболеваний / И. Д. Беспалова, Н. В. Рязанцева, В. В. Калюжин // Сибирский мед. журн. (Иркутск). – 2013. – № 2. – С. 5–9.
7. Черешнев, В. А. Иммунологические и патофизиологические механизмы системного воспаления / В. А. Черешнев, Е. Ю. Гусев // Мед. иммунол. – 2012. – Т. 14, № 1–2. – С. 9–20.
8. Pavlova, T. V. Correcting programmes of biological age for people with chronic somatic pathology / T. V. Pavlova, K. L. Prashchaeu // Problem of aging and longevity. – 2012. – Vol. 21, Issue 3. – P. 316–327.
9. Авдеева, М. В. Специфика верификации факторов риска и организационные аспекты первичной профилактики с учетом возрастного фактора / М. В. Авдеева, В. В. Войтенков // Успехи геронтол. – 2013. – Т. 26, № 3. – С. 481–486.

REFERENCES

1. Vorobeve, N. V. (2015). *Rossiiskii immunologicheskii zhurnal*, 9 (18(2)), 5–13.
2. Garib, F. Yu., Rizopulu, A. P. (2012). *Infektsiya i immunitet*, 2 (3), 581–596.
3. Sokolova, E. V., Karetin, Y., Davydova, V. N., Byankina, A. O., Kalitnik, A. A., Bogdanovich, L. N., Yermak, I. M. (2016). Carrageenans effect on neutrophils alone and in combination with LPS in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104 (7), 1603–1609. doi: 10.1002/jbm.a.35693
4. Fialkow, L., Wang, Y., Downey, G. P. (2007). Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. *Free Radical Biology and Medicine*, 42 (2), 153–164. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.09.030
5. Potapnev, M. P. (2014). *Immunologiya*, 2, 95–100.
6. Bespalova, I. D., Riazantseva, N. V., Kaliuzhyn, V. V. (2013). *Sibirskii meditsinskii zhurnal (Irkutsk)*, 2, 5–9.
7. Chereshev, V. A., Gusev, E. Yu. (2012). *Meditsinskaia immunologiya*, 14 (2), 9–20.
8. Pavlova, T. V., Prashchaeu, K. L. (2012). Correcting programmes of biological age for people with chronic somatic pathology. *Problema aging and longevity*, 21 (3), 316–327.
9. Avdeeva, M. V., Voitenkov, V. V. (2013). *Uspekhi gerantologii*, 26 (3), 481–486.

Відомості про авторів:

Коваленко Т. І., асистент кафедри мікробіології, вірусології та імунології імені Д. П. Григоровича, Харківський національний медичний університет. E-mail: tasja.80@ukr.net

Information about authors:

Kovalenko T. I., assistant of the department of microbiology, virology and immunology D. P. Grinivova, Kharkiv National Medical University. E-mail: tasja.80@ukr.net

Сведения об авторах:

Коваленко Т. И., ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии имени Д. П. Григоровича, Харьковский национальный медицинский университет. E-mail: tasja.80@ukr.net

Рекомендована д. біол. н., професором О. І. Набокою

Надійшла до редакції 13.09.2017 р.