

Ніколенко О. Ю.,
кандидат медичних наук,
асистент кафедри мікробіології, вірусології та імунології
Донецького національного медичного університету імені Максима Горького

ВПЛИВ ДВОРАЗОВОГО ЗАПИЛЕННЯ НА РОЗВИТОК ПОРУШЕНЬ В ІМУННІЙ ТА ОКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНІЙ СИСТЕМАХ У ЩУРІВ ІЗ МОДЕЛЛЮ ХРОНІЧНОГО ОБСТРУКТИВНОГО ЗАХВОРЮВАННЯ ЛЕГЕНЬ

Анотація. У моделі ХОЗЛ на щурах спостерігалися порушення в лейкоцитарній формулі крові, зниження фагоцитарної активності нейтрофілів у НСТ-тесті та зі стафілококом штаму 209. Підвищувалась активність оксидантної системи і знижувалась антиоксидантна. Розвиток захворювання мав вплив на деякі показники лейкоцитарної формули, на всі показники фагоцитарної активності нейтрофілів, на показники оксидантної системи й деякі показники антиоксидантної системи.

Ключові слова: модель ХОЗЛ, щури, клітинний імунітет, оксидантно-антиоксидантні системи.

Постановка проблеми. Хронічне обструктивне захворювання легень (ХОЗЛ) – це єдина хвороба, смертність від якої продовжує збільшуватися. Летальність від ХОЗЛ посідає 4 місце серед усіх причин смерті в загальній популяції [1, с. 79]. За останнє десятиріччя показники захворюваності хронічними обструктивними захворюваннями в Україні виросли в 1,6 рази, хоча більшість дослідників вказує на неповну реєстрацію цієї патології. «Великий вклад» у формування пульмонологічної патології у вигляді пилових захворювань легень (ПЗЛ) вносить вугледобувна галузь. ПЗЛ є тяжкими професійними хворобами, котрі характеризуються незворотністю перебігу, часто призводять до втрати працездатності та значно скорочують тривалість життя хворих. На їх долю припадає до 37% усіх професійних захворювань. Приріст кількості хворих ХОЗЛ пилової етіології у 2 рази перевищує приріст хворих пневмоконіозом (Пн) (6,9 разів проти 3,4) [2, с. 65; 3, с. 31].

Причиною змін у легенях і бронхіальному дереві за тривалої дії фіброгенного пилу є цитотоксичні властивості вільного двоокису кремнію, які обумовлюють продукцію помірної кількості активних форм кисню. Під дією фіброгенного пилу дисбаланс процесів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та антиоксидантного захисту в легенях обумовлює токсичну дію продуктів ПОЛ на клітинні елементи легень і на активність антиоксидантних ферментів [4, с. 40].

Імунологічні дослідження при хронічних бронхітах професійного генезу використовують для оцінки важкості захворювання, з'ясування причин, які часто виникають, і довгостроково поточних патологічних процесів. Особливо значення набувають дослідження, спрямовані на з'ясування стану різних ланок імунної системи, виявлення порушень у них і визначення можливої їх корекції [5, с. 16].

За хронічних захворювань легень однією з причин, котра призводить до виникнення загострень, може бути недостатність функціональної активності нейтрофілів. У літературі є дані про участь нейтрофілів у патогенезі ХОЗЛ. Оксидативний стрес розцінюється як одне з центральних ланок патогенезу ХОЗЛ, у тому числі із причини інактивації оксидантами антипротеаз, таким чином, усі фактори в сукупності, включаючи протеази й оксиданти нейтрофілів, викликають ушкодження епітелію легеневої тканини [6, с. 58].

Метою нашого дослідження було виявлення порушень у клітинній ланці імунітету, а також в оксидантно-антиоксидантних системах у щурів у створеній моделі ХОЗЛ. А також виявити, на які показники імунної системи та оксидантно-антиоксидантних систем впливає розвиток ХОЗЛ.

Матеріал і методи. В експерименті використані дві групи білих щурів – самців із масою тіла 200–250 г: 1 група – здорові тварини (25 щурів), 2 група – тварини з моделлю ХОЗЛ (25 щурів), яка отримана шляхом дворазового, з інтервалом 7 днів, інтратрахеального введення зависі вугільно-порідного пилу. Для додаткового пошкодження бронхів експериментально було підібрано 40-відсотковий розчин етилового спирту, який не є токсичним у такій дозі, проте викликає додаткові пошкодження й запалення бронхів. Це потенціє шкідливий вплив вугільно-порідного пилу, а також прискорює розвиток ХОЗЛ і скорочує час для створення моделі. Для створення аутоімунних порушень різного напрямку в організмі щурів використовували ад'ювант Фрейнда, цитостатик та імуностимулятор. Усі експерименти на тваринах проводилися згідно з «Положенням про використання тварин у біомедичних дослідках».

Забір крові проводили при декапітації тварин. Із крові готували мазки, які фіксували в метанолі та фарбували фарбою Романовського. У мазках підраховували лейкоцитарну формулу на 200 лейкоцитів. У камері Горяєва підраховували загальну кількість лейкоцитів. Враховуючи це, визначали відносний та абсолютний вміст лімфоцитів у крові. Для визначення фагоцитарної активності нейтрофілів периферичної крові хворих використовували добову тест-культуру стафілококу штаму 209. Під час мікроскопічного дослідження (рахували не менше 200 клітин) проводили розрахунок фагоцитарного індексу через 30 та 90 хв. [7, с. 123, 124, 125, 310, 311]. Киснезалежний метаболізм нейтрофілів вивчали за допомогою тесту з нітросинім те-

тразолієм (НСТ). Під час зіткнення з активізованим нейтрофілом НСТ оновлювався в диформаза, який у вигляді гранул, нерозчинних у воді та органічних розчинниках, відкладається всередині та на поверхні клітин. Кількість диформаза, що випав, була критерієм інтенсивності реакції. Після мікроскопії підраховували відсоток нейтрофілів, що містять диформаза, а також індекс активації нейтрофілів (ІАН) [8, с. 215, 216].

Для оцінки фізіологічної активності перекисів в організмі, які утворюються в результаті функціонування ксантиноксидази, визначали у крові продукти перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) – дієнові кон'югати ненасичених вищих жирних кислот шляхом їх екстракції гептан-ізопропіловою сумішшю та вимірювання екстинції при 223 нм [9, с. 34, 35].

Малоновий діальдегід визначали за допомогою нагрівання в кислому середовищі та взаємодією з тіобарбітуровою кислотою (ТБК) і вимірювали екстинцію при довжині хвилі 532 нм [10, с. 65].

У модельних тварин також визначали каталазу методом, заснованим на спроможності перекису водню утворювати окрашений комплекс жовтого кольору з розчином молібдату амонія. Інтенсивність окраски пропорційна вмісту перекису водню в розчині. Екстинцію вимірювали при 410 нм [11, с. 17].

Вміст сечової кислоти (СК) у плазмі крові визначали уніфікованим методом із фосфорновольфрамовим реактивом [8, с. 101, 102].

Активність ксантиноксидази визначали за підвищенням екстинції при двох довжинах хвиль 290 нм (специфічна область поглинання сечової кислоти) та 330 нм (неспецифічна опалесценція розчину) [8, с. 29, 30].

Для обробки результатів дослідження використовували кореляційний та регресійний методи аналізу, з оцінкою середнього значення ($\bar{x}$), їх помилки (S), критерія Ст'юдента (S), медіанного критерію (Mt), Манна-Уїтні (MW), Крускала-Уолліса (kKW), достовірності статистичних показників (p) на комп'ютері SAMSUNG (R 20) за допомогою ліцензійного пакету «Statistica 5,5» (Start Soft Rus) [12, с. 342-383].

Виклад основного матеріалу дослідження. У тварин із моделлю ХОЗЛ із подвійним запиленням середня кількість лейкоцитів була статистично значно меншою ($6,14 \pm 0,31 \times 10^9$ /л порівняно з контролем ($9,07 \pm 0,39 \times 10^9$ /л ($kMW=4,61$, $p<0,001$, $St=5,78$, $p<0,001$ відповідно). Спостерігалось в модельних тварин статистично вірогідне підвищення абсолютного й відносного вмісту паличкоядерних форм нейтрофілів – ($0,32 \pm 0,03 \times 10^9$ /л та $5,00 \pm 0,35\%$ на відміну від контролю – ($0,24 \pm 0,03 \times 10^9$ /л та $2,52 \pm 0,20\%$ ($kMW=1,72$, $p=0,0084$ відповідно та $kMW=4,70$, $p<0,001$, $St=6,12$, $p<0,001$ відповідно); зменшення абсолютної кількості лімфоцитів ($4,33 \pm 0,22 \times 10^9$ /л, на відміну від контролю ($6,24 \pm 0,29 \times 10^9$ /л ($kMW=4,43$, $p<0,001$, $St=5,25$, $p<0,001$), спостерігалось достовірне зменшення абсолютної кількості сегментоядерних нейтрофілів ($0,88 \pm 0,04 \times 10^9$ /л, в контролі – ($1,66 \pm 0,19 \times 10^9$ /л ($kMW=2,47$, $p=0,013$, $St=4,10$, $p=0,00015$ відповідно), зменшення абсолютної кількості еозинофілів ($0,15 \pm 0,02 \times 10^9$ /л в експериментальних тварин, контроль – ($0,26 \pm 0,04 \times 10^9$ /л ($kMW=2,11$, $p=0,03$, $St=2,26$, $p=0,028$), відмічалось зменшення абсолютної кількості моноцитів в

експериментальних тварин ($0,39 \pm 0,06 \times 10^9$ /л на відміну від контролю – ($0,61 \pm 0,05 \times 10^9$ /л ($kMW=2,90$, $p=0,0037$, $St=3,03$, $p=0,0038$ відповідно).

Розвиток ХОЗЛ впливав на кількість лейкоцитів у модельних тварин ($KW=21,33$, $p<0,001$; $Mk=9,68$, $p=0,0019$), а також на відносну кількість паличкоядерних нейтрофілів ($KW=23,006$, $p<0,001$; $Mk=18,11$, $p<0,001$) та абсолютну кількість сегментоядерних нейтрофілів ($KW=6,12$, $p=0,013$; $Mk=6,48$, $p=0,010$), еозинофілів ($KW=4,48$, $p=0,034$; $Mk=3,92$, $p=0,047$), лімфоцитів ($KW=19,66$, $p<0,001$; $Mk=9,68$, $p=0,0019$) та моноцитів ($KW=8,41$, $p=0,0037$; $Mk=6,48$, $p=0,0109$).

Результати фагоцитарної функції нейтрофілів крові за НСТ-тестом у щурів із моделлю хронічного обструктивного захворювання легень із подвійним запиленням та в контролі наведені в табл. 1.

Таблиця 1

Результати фагоцитарної функції нейтрофілів крові за НСТ-тестом у щурів із моделлю хронічного обструктивного захворювання легень із подвійним запиленням і в контролі ($\pm S$)

Показники	Групи	
	Модельні тварини $n=25$	Контроль $n=25$
НСТ-тест, %	$25,88 \pm 1,59^{**}$	$34,04 \pm 2,08$
Спонтанний ІАН	$0,42 \pm 0,03^*$	$0,57 \pm 0,06$

* – вірогідність різниці між групами та контролем ($p<0,05$).

** – вірогідність різниці між групами та контролем ($p<0,01$).

Як видно з табл. 1, у модельних тварин відмічається зменшення кількості нейтрофілів, які виявляють фагоцитарну активність у спонтанному НСТ-тесті порівняно з контролем $34,04 \pm 2,08\%$ ($S=3,11$, $p=0,003$, $MW=2,82$, $p=0,0047$). Індекс активації нейтрофілів без стимуляції був нижчим і відрізнявся від контролю ($S=2,50$, $p=0,015$, $MW=2,27$, $p=0,022$). Таким чином, зменшення ІАН у модельних тварин при спонтанному фагоцитозі свідчить, що фагоцити мають низьку резервну активність внутрішньоклітинних ферментів і під час активації можуть призводити до значної загибелі нейтрофілів та розвитку недостатності фагоцитарної ланки імунітету.

Розвиток ХОЗЛ у тварин впливав на фагоцитарну активність нейтрофілів у спонтанному НСТ-тесті ($KW=7,98$, $p=0,0047$; $Mk=4,02$, $p=0,044$), а також значно впливав на індекс активації нейтрофілів без стимуляції ($KW=5,20$, $p=0,022$; $Mk=3,92$, $p=0,047$).

Фагоцитарна активність нейтрофілів через 30 хв. становила у модельних тварин $18,40 \pm 0,71\%$ відрізняючись від контролю $42,20 \pm 2,26\%$ ($S=10,03$, $p<0,001$; $MW=6,01$, $p<0,001$) (рис. 1).

Фагоцитарне число через 30 хв. становило в модельних тварин $3,01 \pm 0,04$, відрізняючись від контролю $8,10 \pm 0,34$ ($S=14,75$, $p<0,001$, $MW=6,06$, $p<0,001$), фагоцитарна активність нейтрофілів через 90 хв. становила в модельних тварин $28,12 \pm 0,81$, відрізняючись від контролю $46,42 \pm 1,29$ ($S=11,98$, $p<0,001$, $MW=6,01$, $p<0,001$), фагоцитарне число через 90 хв. становило в модельних тварин $3,41 \pm 0,08$, відрізняючись від контролю $7,85 \pm 0,29$ ($S=14,40$, $p<0,001$, $MW=6,06$, $p<0,001$) (рис. 1).

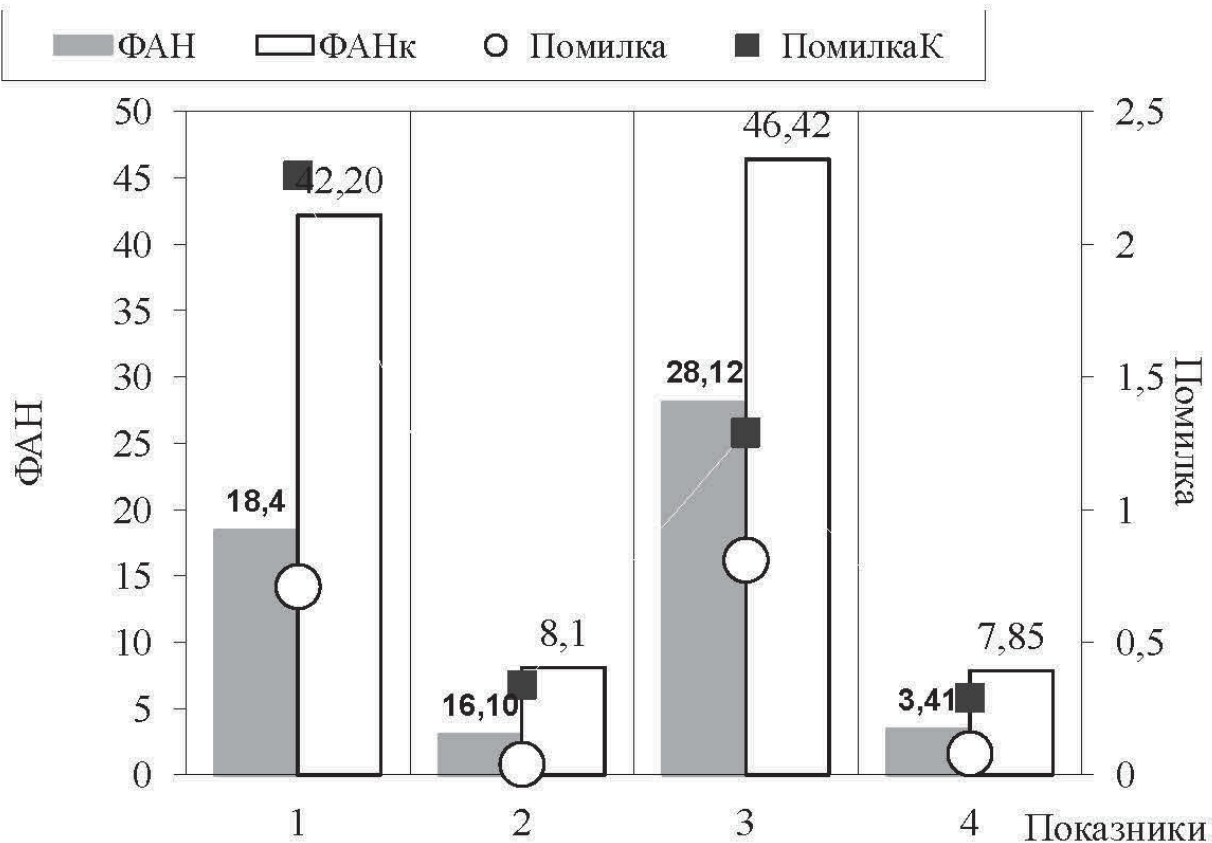


Рис. 1. Фагоцитарна функція нейтрофілів крові за фагоцитозом стафілокока 209 у щурів із моделлю хронічного обструктивного захворювання легень із подвійним запиленням і в контролі (К)

Примітка: 1 – фагоцитарна активність нейтрофілів через 30 хв. (%), 2 – фагоцитарне число через 30 хв. (стафілококів), 3 – фагоцитарна активність нейтрофілів через 90 хв. (%), 4 – фагоцитарне число через 90 хв. (стафілококів).

Розвиток ХОЗЛ у тварин впливав на фагоцитарну активність нейтрофілів зі стафілококом 209 через 30 хв. ($kKW=36,22$, $p<0,001$; $Mk=42,32$, $p<0,001$), фагоцитарне число через 30 хв. ($kKW=36,79$, $p<0,001$; $Mk=50,00$, $p<0,001$), на фагоцитарну активність нейтрофілів зі стафілококом 209 через 90 хв. ($kKW=36,22$,

$p<0,001$; $Mk=42,32$, $p<0,001$), фагоцитарне число через 90 хв. ($kKW=36,80$, $p<0,001$; $Mk=50,00$, $p<0,001$).

Дослідження окисдантної системи проводили шляхом визначення вмісту дієнових кон'югатів і малонового діальдегіду в модельних тварин (табл. 2).

Таблиця 2

Порівняння результатів дослідження окисдантної системи в дослідних щурів із моделлю хронічного обструктивного захворювання легень (подвійне запилення) і в контролі ($\pm S$)

Показники	Групи		Результати різних критеріїв	
	Модель хронічного обструктивного захворювання легень (подвійне запилення) $n=25$	Контроль $n=25$	Критерій Ст'юдента (St) і p	Манна-Уїтні (MW) і p
	1	2		
Дієнові кон'югати, у.о./мл	$3,68 \pm 0,21$	$2,59 \pm 0,23$	$St=3,43$, $p=0,0012$	$kMW=3,30$, $p=0,00094$
Малоновий діальдегід мкмоль/г білка	$1,98 \pm 0,15$	$1,15 \pm 0,15$	$St=3,79$, $p=0,00041$	$kMW=3,50$, $p=0,00046$

Як видно з таблиці, в щурів із моделлю хронічного обструктивного захворювання легень із подвійним запиленням достовірно підвищені рівні дієнових кон'югатів та малонового діальдегіда.

Розвиток хронічного обструктивного захворювання легень мав вплив на дієнові кон'югати ($kKW=10,95$, $p=0,0009$; $Mk=6,48$, $p=0,01$), а також впливав на рівень

малонового діальдегіду ($kKW=12,29$, $p=0,0005$; $Mk=6,48$, $p=0,01$).

Дослідження антиоксидантної системи проводили шляхом визначення вмісту в модельних тварин каталази, ксантиноксидази, кількості сечової кислоти, яку розцінювали як природний антиоксидант, що виробляється в організмі ксантиноксидазою (табл. 3).

Таблиця 3

Порівняння результатів дослідження антиоксидантної системи в дослідних щурів із моделлю хронічного обструктивного захворювання легень (подвійне запилення) і в контролі ($\pm S$)

Показники	Групи		Результати різних критеріїв	
	Модель хронічного обструктивного захворювання легень (подвійне запилення) $n=25$	Контроль $n=25$	Критерій Ст'юдента (St) і p	Манна-Уїтні (MW) і p
Каталаза, мкат/л	$7,94 \pm 0,67$	$10,25 \pm 0,57$	$St=2,61$, $p=0,0119$	$kMW=2,44$, $p=0,014$
Ксантиноксидаза, мкмоль/л	$7,02 \pm 0,65$	$5,13 \pm 0,49$	$St=2,32$, $p=0,024$	$kMW=1,82$, $p=0,068$
Сечова кислота, ммоль/л	$0,252 \pm 0,020$	$0,095 \pm 0,005$	$St=7,43$, $p<0,001$	$kMW=5,83$, $p<0,001$

Рівень каталази в сироватці крові модельних тварин із подвійним запиленням достовірно був знижений порівняно з контролем, рівень ксантиноксидази в щурів із моделлю ХОЗЛ (подвійне запилення) достовірно був підвищений порівняно з контролем, рівень сечової кислоти в модельних тварин із подвійним запиленням був підвищений порівняно з контролем, що можливо спостерігати в таблиці.

Розвиток хронічного обструктивного захворювання легень мав вплив на вміст сечової кислоти в сироватці крові ($kKW=34,06$, $p<0,001$; $Mk=35,28$, $p<0,001$) й активність каталази ($kKW=5,97$, $p=0,015$; $Mk=6,48$, $p=0,01$) та не мав впливу на активність ксантиноксидази ($kKW=3,32$, $p=0,068$; $Mk=3,92$, $p=0,048$) в модельних тварин.

Висновки. Під час дослідження клітинного імунітету в модельних щурів було виявлено зниження кількості лейкоцитів і зсув лейкоцитарної формули. Фагоцитарна активність нейтрофілів була знижена в НСТ-тесті і зі стафілококом штам 209.

У щурів із моделлю ХОЗЛ під час дослідження оксидантної системи спостерігалася підвищення малонового діальдегіда й дієнових кон'югатів. В антиоксидантній системі спостерігалася зниження активності каталази і підвищення активності ксантиноксидази. Вміст сечової кислоти був підвищений.

Розвиток захворювання впливав на кількість лейкоцитів та деякі показники лейкоцитарної формули, на всі показники фагоцитарної активності нейтрофілів у НСТ-тесті і зі стафілококом штам 209, а також на вміст сечової кислоти й активність ксантиноксидази.

Створена модель ХОЗЛ на щурах дає можливість дослідження різних реабілітаційних заходів, спрямованих на корекцію порушень в імунній системі та дисбалансу в оксидантно-антиоксидантній системі, для подальшої рекомендації їх використання в клініці у хворих ХОЗЛ.

Література:

1. Крахмалова О.О. Системне запалення як фактор розвитку поза легневих ускладнень ХОЗЛ / О.О. Крахмалова, Л. С. Воєйкова, І. В. Талалай // Укр.терапевт.журн. – 2011. – № 2. – С. 79-83.
2. Реабилитация больных с пылевыми болезнями легких (обзор) / Г.А. Бондаренко, Т.П. Бодаченко, С.Б. Канюка [и др.] // Вестник гигиены и эпидемиологии. – 2006. – Т. 10. – № 1. – С. 65–70.
3. Мингазова С.Р. Роль ферментов биотрансформации ксенобиотиков при пылевой патологии органов дыхания / С.Р. Мингазова, Т.В. Викторова, Л.З. Ахмадишина // Мед. труда и пром. экология. – 2009. – № 11. – С. 30–33.
4. Пылевые болезни легких: чем определяется диагностическая и экспертная трудности (Обзор) / Т.П. Бодаченко, Г.А. Бондаренко, А.Ф. Такташова [и др.] // Вестник гигиены и эпидемиологии (Приложение). – 2009. – Т. 13. – № 1. – С. 40–43.
5. Крушевский В.Д. Нетрадиционная коррекция содержания и размеров иммунных комплексов при экспериментальном токсико-пылевом бронхите / В.Д. Крушевский // Доклад та здоров'я. – 2008. – № 1. – С. 16–19.
6. Функциональная активность нейтрофилов у больных хронической обструктивной болезнью легких / Л.А. Колодкина, Т.П. Сесь, Н.И. Александрова [и др.] // Пробл. туберк. и бол. легких. – 2003. – № 7. – С. 58–60.
7. Лабораторные методы исследования в клинике: справ. / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая [и др.] ; Под ред. В.В. Меньшикова. – М. : Медицина, 1987. – 368 с.
8. Справочник медицинские лабораторные технологии / под ред. А.И. Карпищенко. – СПб. : Интермедика, 2002. – Т. 2. – 600 с.
9. Гаврилов В.П. Спектрофотометрическое определение гидроксипероксидов липидов в плазме крови / В.П. Гаврилов, М.И. Мишкородная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33–36.
10. Стальная И.Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / И.Д. Стальная, Т.Г. Гаришвили // Современные методы в биохимии. – М. : Медицина, 1977. – С. 66–68.
11. Метод определения активности каталазы / М.А. Корольюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова [и др.] // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16–19.
12. Боровиков В.П. STATISTICA / В.П. Боровиков, И.П. Боровиков. – М. : Б. и., 1998. – 583 с.

Николенко О. Ю. Влияние двухразового запыления на развитие нарушений в иммунной и оксидантно-антиоксидантной системах у крыс с моделью хронического обструктивного заболевания легких

Аннотация. В модели ХОЗЛ на крысах наблюдались нарушения в лейкоцитарной формуле крови, снижение фагоцитарной активности нейтрофилов в НСТ-тесте и со стафилококком штамм 209. Повышалась активность оксидантной системы и снижалась антиоксидантной. Развитие заболевания имело влияние на некоторые показатели лейкоцитарной формулы, на все показатели фагоцитарной активности нейтрофилов, на показатели оксидантной системы и некоторые показатели антиоксидантной системы.

Ключевые слова: модель ХОЗЛ, крысы, клеточный иммунитет, оксидантно-антиоксидантные системы.

Nikolenko O. The influence of double dusting on the development of disorders in the immune and oxidant-antioxidant system in a rat model of chronic obstructive pulmonary disease

Summary. In the model of COPD in the rat violations in leukocyte formula blood, decline of the phagocytic activity of neutrophils in NST-test and with Staphylococcus strain 209 were observed. Activity of the oxidant system was increasing and activity of the antioxidant system was decreasing. The disease had influence on the indices of leukocyte formula, on all indicators of neutrophils phagocytic activity, on the indices of the oxidant system and some parameters of the antioxidant system.

Key words: model of COPD, rats, cellular immunity, oxidant-antioxidant system.