

ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У ЩУРІВ З МОДЕЛЬОВАНИМ ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНИМ СИНДРОМОМ

**Державний вищий навчальний заклад «Тернопільський державний медичний
університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України» (м. Тернопіль)**

Дана робота є фрагментом НДР «Біохімічні механізми токсичності наночастинок різної природи та інших антропогенних і біогенних токсикантів на біологічні системи», № держ. реєстрації 0112U000542.

Вступ. Клітинний імунітет являє собою тип імунної відповіді організму, при якому відсутня участь системи комплементу і антитіл. До клітинних неспецифічних факторів захисту слід віднести дві категорії клітин: фагоцити й природні кілери. Серед фагоцитів слід розрізняти професійні й факультативні фагоцити. Професійні фагоцити – це поліморфноядерні нейтрофіли (мікрофаги), моноцити крові й макрофаги тканин (клітини мікроглії нервової тканини, макрофаги печінки, сполучної тканини, альвеолярні макрофаги легенів, остеобласти кісткової тканини). До клітинних специфічних факторів захисту слід віднести: Т-лімфоцити та В-лімфоцити [4, 2].

Хоча, основа клітинної імунної відповіді представлена **лімфоцитами**, значна роль в імунній відповіді належить і моноклеарним клітинним елементам, здатним до фагоцитозу. Функції макрофагів в організації імунної відповіді дуже різноманітні: фагоцитоз, який забезпечує не лише знищення мікроорганізмів, але і зв'язування та виведення продуктів руйнування власних тканин; участь у клітинному імунітеті – стимуляція життєдіяльності клітин, обробка і презентація антигенного матеріалу, регуляція роботи Т-лімфоцитів; участь у гуморальному імунітеті – презентація АГ, активація В-лімфоцитів; протипухлинний імунітет і цитотоксичність; розвиток запальної реакції; регуляція кінінових системи й гемостазу [1, 6].

Таким чином, клітинний імунітет може реалізуватися різними шляхами, залежно від локалізації патогена, або активацією цитотоксичних клітин з наступним безпосереднім руйнуванням інфікованої клітини, або посиленням макрофагальної активності з наступним фагоцитозом, або синтезом антитіл і знищенням збудника шляхом активації комплементу [1].

Патогенез гепатопульмонального синдрому (ГПС) детально вивчався [14, 16, 18], проте його імунологічна складова залишається недостатньо відомою. Є дані, що суттєвих змін при захворюваннях печінки зазнає й імунна система. Знижується активність неспецифічної реактивності та розвивається явище імунного дистресу [7]. У пацієнтів з цирозом печінки невірусного генезу відмічалися чітко

виражені порушення з боку імунологічного статусу, які можна охарактеризувати як вторинний імунодефіцитний стан [8]. Тому ми вважали доцільним проаналізувати особливості клітинної ланки імунітету при ГПС, що сприятиме поглибленню розуміння суті даного патологічного процесу та дасть можливість патогенетично обґрунтувати нові напрямки терапії.

Метою даної роботи було дослідити основні зміни показників клітинного імунітету в крові та бронхоальвеолярному змиві щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проводили на 56 безпородних щурах-самцях масою 180-220 г. В процесі моделювання патології 8 тварин загинуло. Першу експериментальну модель гепатопульмонального синдрому ми створювали шляхом накладання подвійної лігатури на загальну жовчєвивідну протоку і подальшого її пересічення скальпелем [13]. Тварин анестезували внутрішньочеревинним введенням тіопенталу натрію в дозі 40 мг/кг маси тварини. Виконавши розріз під мечовидним відростком, загальну жовчєвивідну протоку відділяли від розташованих поруч тканин, накладали подвійну лігатуру, вище і нижче місця планованого перетину. Потім загальну жовчєвивідну протоку пересікали скальпелем. В контрольній групі №1 тварин загальна жовчєвивідна протока була відділена від тканин, але не пересікалася. Післяопераційна рана пошарово, наглухо зашивалася. На 31-у добу після операції тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом.

Друга експериментальна модель ГПС була створена шляхом 8-тижневого внутрішньошлункового введення олійного розчину CCl_4 (400 г на 1 л) в дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла тварини в перший день експерименту, 0,3 мл на 100 г на третій день експерименту і далі кожного третього дня до закінчення експерименту 0,3 мл на 100 г. Додатково в раціон щурів було введено суміш кукурудзяної муки, смальцю і холестеролу та розчин алкоголю. Контрольна група тварин №2 перебувала на стандартному раціоні віварію і отримувала внутрішньошлунково оливкову олію в еквівалентній кількості [17].

Утримання тварин та експерименти проводилися у відповідності до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [15].

Таблиця

Показники клітинного імунітету в крові та БАЗ щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом (M±m)

Дослідна група	Контрольна група № 1 (n=12)	Експериментальна група № 1 (n=12)	Контрольна група № 2 (n=12)	Експериментальна група № 2 (n=12)
Кров				
CD3+	43,07±0,52	33,07±1,30 $p_1 < 0,001$	42,05±0,58	34,65±0,96 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
CD4+	25,19±0,72	16,48±0,33 $p_1 < 0,001$	25,06±0,64	17,52±0,40 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
CD8+	13,21±0,32	15,10±0,36 $p_1 < 0,01$	12,92±0,28	14,84±0,43 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$
CD4/CD8	1,91±0,05	1,09±0,02 $p_1 < 0,001$	1,94±0,05	1,19±0,03 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,02$
CD19+	8,91±0,76	6,81±0,27 $p_1 < 0,05$	8,32±0,31	6,89±0,32 $p_1 < 0,01$ $p_2 > 0,05$
БАЗ				
CD3+	35,21±0,55	56,93±1,14 $p_1 < 0,001$	37,02±0,78	54,60±1,01 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
CD4+	20,74±0,64	43,57±0,93 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$	21,02±0,66	40,01±0,59 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,01$
CD8+	11,50±0,44	10,48±0,33 $p_1 > 0,05$	12,08±0,39	11,84±0,58 $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
CD4/CD8	1,82±0,05	4,20±0,14 $p_1 < 0,001$	1,75±0,05	3,49±0,22 $p_1 < 0,001$ $p_2 < 0,02$
CD19+	7,21±0,30	12,27±0,38 $p_1 < 0,001$	7,32±0,27	10,91±0,64 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$

Примітка: p_1 – різниця достовірна у порівнянні з контрольними тваринами;
2. p_2 – різниця достовірна у порівнянні з ураженими тваринами.

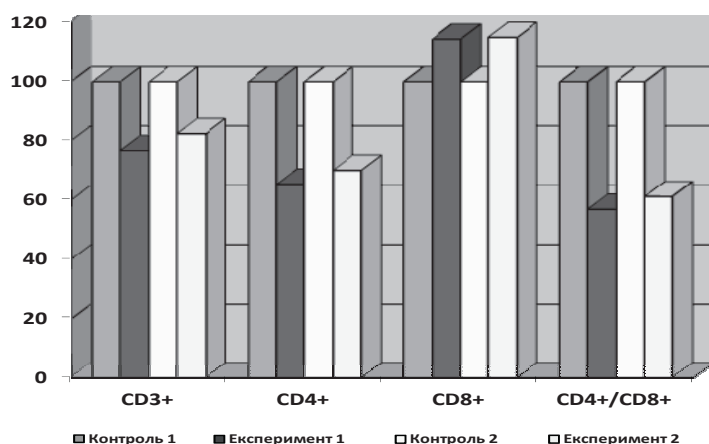


Рис. 1. Зміни показників клітинного імунітету в крові експериментальних тварин у відсотках.

Для дослідження використовували кров та бронхоальвеолярний змив (БАЗ).

Після забою тваринам розкривали грудну клітку і відділяли легенево-серцевий комплекс. З легень отримували БАЗ шляхом п'ятикратного промивання їх через трахею фізіологічним розчином. Отриманий БАЗ в кількості 4,5-5,0 мл центрифугували при 1500 г протягом 15 хв, відбирали супернатант [5].

Дослідження проводили на базі міжкафедральної науково-дослідної лабораторії ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України». Стан клітинного імунітету оцінювали за вмістом CD3+ – Т-лімфоцитів загальних, CD4+ – Т-лімфоцитів-хелперів, CD8+ – Т-лімфоцитів-супресорів, CD19+ – В-лімфоцитів загальних та імунорегуляторного індексу CD4+/CD8+.

Метод дослідження клітинного імунітету ґрунтується на взаємодії моноклональних антитіл, мічених флуоресцентною міткою, з поверхневими антигенами лімфоцитів [12]. Зразки аналізували на проточному цитофлуориметрі Epics-XL виробництва Beckman Coulter (США).

Результати оброблено параметричними методами варіаційної статистики з визначенням t-критерію Стьюдента.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати основних показників клітинного імунітету в крові та БАЗ щурів з модельованим ГПС представлені в таблиці.

Основну роль в імунних реакціях відіграють Т-лімфоцити, які за рахунок клітинних рецепторів розпізнають антигени [10]. У щурів першої експериментальної групи (на 31-шу добу після перев'язки загальної жовчівивідної протоки) нами зафіксовано зниження вмісту загальних Т-лімфоцитів в крові в 1,3 раза ($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів № 1. У щурів другої експериментальної групи (після 8-тижневого введення тетрахлорметану) встановлено зниження вмісту загальних Т-лімфоцитів в крові в 1,2 раза ($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів № 2 (рис. 1).

При порівнянні вмісту загальних Т-лімфоцитів в крові тварин обох експериментальних груп достовірних змін нами не виявлено ($p > 0,05$).

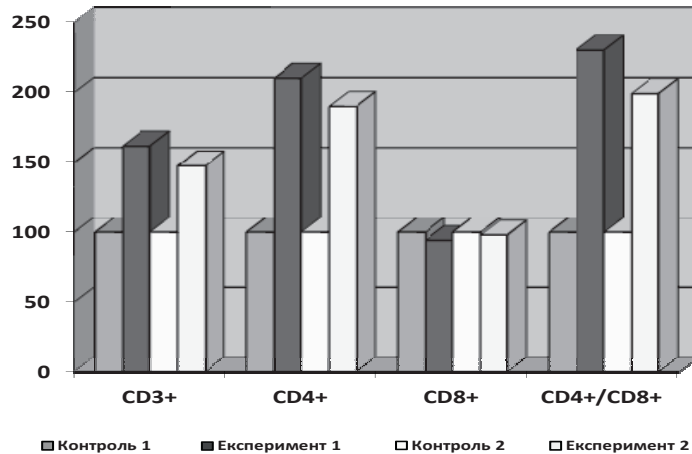


Рис. 2. Зміни показників клітинного імунітету в БАЗ експериментальних тварин у відсотках.

Протилежно направлених змін зазнав вміст загальних Т-лімфоцитів в БАЗ. Так, у щурів першої експериментальної групи, даний показник збільшився в 1,6 раза ($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів №1. У щурів другої експериментальної групи вміст загальних Т-лімфоцитів в БАЗ зріс в 1,5 рази ($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів №2 (**рис. 2**). При порівнянні вмісту загальних Т-лімфоцитів в БАЗ тварин обох експериментальних груп достовірних змін нами не виявлено ($p > 0,05$).

Зменшення вмісту загальних Т-лімфоцитів в крові щурів, ймовірно, зумовлене виснаженням захисних сил організму з одного боку, та міграцією Т-лімфоцитів у легеневу тканину.

Т-хелпери – індуктори імунної відповіді, що регулюють силу імунної відповіді організму на чужерідний антиген. Т-хелпери 1-го типу – беруть участь переважно у регуляції клітинної ефекторної відповіді, продукують ІЛ-2, γ -ІФН гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулювальний фактор та інші; Т-хелпери 2-го типу – беруть участь переважно у регуляції гуморальної ефекторної відповіді, продукують ІЛ-3, -4, -5, -9, -10, -13 та інші [1]. При вивченні хелперної фракції клітинної ланки імунітету встановлені достовірні відмінності у вмісті Т-хелперів в крові тварин обох експериментальних груп. Так, у щурів першої експериментальної групи даний показник зменшився в 1,5 рази ($p < 0,001$), а у щурів другої експериментальної групи – в 1,4 раза ($p < 0,001$) відносно відповідних контрольних груп. При порівнянні вмісту Т-хелперів в крові тварин обох експериментальних груп достовірних змін нами не виявлено ($p > 0,05$). Протилежно направлених змін зазнав вміст Т-хелперів в БАЗ. Так, у щурів першої експериментальної групи, даний показник збільшився в 2,1 раза ($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів №1. У щурів другої експериментальної групи вміст Т-хелперів в БАЗ зріс в 1,9 раза ($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів №2. При порівнянні вмісту Т-хелперів в БАЗ тварин обох експериментальних груп нами виявлено його переважання на 8,9% у

щурів на 31-шу добу після перев'язки загальної жовчєвивідної протоки ($p < 0,01$).

Т-супресори – клітини, що пригнічують активацію клітинного і гуморального імунітету, впливаючи на механізми міжклітинної взаємодії, а також регулюють якісний склад популяцій лімфоцитів, сприяють розвитку толерантності [1]. При вивченні супресорної фракції клітинної ланки імунітету також встановлені достовірні відмінності у вмісті Т-супресорів в крові тварин обох експериментальних груп, але протилежно направлені. Так, у щурів першої експериментальної групи даний показник збільшився на 14,3% ($p < 0,01$), а у щурів другої експериментальної групи – на 14,9% ($p < 0,01$) відносно відповідних контрольних груп. При

порівнянні вмісту Т-супресорів в крові тварин обох експериментальних груп достовірних змін нами не виявлено ($p > 0,05$). При вивченні супресорної фракції клітинної ланки імунітету в БАЗ достовірних змін нами не виявлено ($p > 0,05$).

Зважаючи на зниження вмісту Т-хелперів та підвищення вмісту Т-супресорів, достовірних змін зазнав і імунорегуляторний індекс. Так, у щурів першої експериментальної групи даний показник зменшився в 1,7 раза ($p < 0,001$), а у щурів другої експериментальної групи – в 1,6 раза ($p < 0,001$) відносно відповідних контрольних груп. При порівнянні співвідношення CD4+/CD8+ в крові тварин обох експериментальних груп нами встановлено його переважання на 8,4% ($p < 0,02$) у щурів після 8-тижневого введення тетрахлорметану. Протилежно направлених змін зазнав імунорегуляторний індекс в БАЗ. Так, у щурів першої експериментальної групи, даний показник збільшився в 2,3 раза ($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів №1. У щурів другої експериментальної групи імунорегуляторний індекс в БАЗ зріс в 2 рази ($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів №2. При порівнянні співвідношення CD4+/CD8+ в БАЗ тварин обох експериментальних груп нами виявлено його переважання на 20,3% у щурів на 31-шу добу після перев'язки загальної жовчєвивідної протоки ($p < 0,02$).

Вміст загальних В-лімфоцитів в крові щурів першої експериментальної групи зменшився в 1,3 раза ($p < 0,05$) відносно контрольної групи щурів №1, а у щурів другої експериментальної групи даний показник зменшився в 1,2 раза ($p < 0,01$) відносно контрольної групи щурів №2. При порівнянні вмісту загальних В-лімфоцитів в крові тварин обох експериментальних груп достовірних змін нами не виявлено ($p > 0,05$). Протилежно направлені зміни виявлено в БАЗ. У щурів першої експериментальної групи нами зафіксовано підвищення вмісту загальних В-лімфоцитів в БАЗ в 1,7 раза ($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів №1. У щурів другої експериментальної групи встановлено підвищення вмісту загальних В-лімфоцитів в БАЗ в 1,5 рази

($p < 0,001$) відносно контрольної групи щурів №2. При порівнянні вмісту загальних В-лімфоцитів в БАЗ тварин обох експериментальних груп достовірних змін нами не виявлено ($p > 0,05$).

Зниження В-лімфоцитів у крові і підвищення їх в БАЗ свідчить про посилене залучення В-клітин з крові в легені. Ймовірно, залучені в легені В-лімфоцити під впливом інтерлейкінів стають плазматичними клітинами і набувають здатності синтезувати аутоантитіла проти епітеліальних та ендотеліальних клітин дихальних шляхів та структурного компонента легень – білка еластину [3, 11].

Висновки. У крові щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом спостерігаються виражені порушення з боку клітинної ланки імунітету крові у вигляді Т-лімфоцитопенії, дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним

зменшенням Т-хелперів, зменшення імунорегуляторного індексу та зниження вмісту загальних В-лімфоцитів. У бронхоальвеолярному змиві щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом зсуви з боку вивчених імунологічних показників характеризувалися Т-лімфоцитозом, дисбалансом субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним підвищенням Т-хелперів, збільшенням імунорегуляторного індексу та підвищенням вмісту загальних В-лімфоцитів.

Перспективи подальших досліджень. В перспективі наші дослідження будуть продовжені шляхом вивчення показників гуморального імунітету в крові та бронхоальвеолярному змиві щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом, а також за умов застосування коригувальних чинників.

Література

1. Андрейчин М. А. Клінічна імунологія та алергологія / М. А. Андрейчин, В. В. Чоп'як, І. Я. Господарський – Тернопіль: Укрмедкнига, 2005. – 372 с.
2. Електронний ресурс. Режим доступу: <http://repo.knmu.edu.ua/bitstream/123456789/602/4/662-14.pdf>
3. Кадушкін А. Г. Молекулярно-клітинні механізми розвитку хронічної обструктивної хвороби легких / А. Г. Кадушкін, А. Д. Таганович // Военная медицина. – 2012. – № 1. – С. 132 – 138.
4. Казмірчук В. Є. Клінічна імунологія і алергологія: підруч. для студ. мед. вузів / В. Є. Казмірчук, Л. В. Ковальчук. – Вінниця: Нова Книга, 2006. – 528 с.
5. Кубышкин А. В. Эластолитическая активность бронхоальвеолярного лаважа при моделировании воспалительного процесса в легких / А. В. Кубышкин, И. И. Фомочкина // Укр. біохім. журн. – 2008. – № 1 (80). – С. 89 – 95.
6. Куценко С. А. Основы токсикологии / С. А. Куценко // Санкт-Петербург, 2002 // Режим доступу: <http://www.medline.ru/public/monografy/toxicology/#contents1p>
7. Назар П. С. Особливості змін показників клітинного імунітету у хворих на алкогольне ураження печінки / П. С. Назар, О. І. Осадча, М. М. Левон // Клінічна та експериментальна патологія. – 2012. – Т. XI, № 1(39). – С. 119 – 121.
8. Прудникова І. В. Стан клітинної ланки імунітету у хворих на цироз печінки невірусного генезу на тлі нейроциркуляторної дистонії / І. В. Прудникова // Укр. мед. альманах. – 2008. – Т. 11, № 6. – С. 154.
9. Роль изучения факторов местного иммунитета при патологии дыхательных путей / В. И. Савалкин, Е. И. Алтынова, К. И. Нестерова, А. В. Ломброзо // Фундаментальные исследования. – № 10. – 2011 – С. 151 – 154.
10. Черний В. И. Нарушения иммунитета при критических состояниях: особенности диагностики / В. И. Черний, А. Н. Нестеренко // Внутренняя медицина. – 2007. – № 2. – С. 12 – 22.
11. Autoantibodies in patients with chronic obstructive pulmonary disease / C. A. Feghali-Bostwick [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2008. – Vol. 177, № 2. – P. 156 – 163.
12. Bunders M. Age-related standards for total lymphocyte, CD4+ and CD8+ T cell counts in children born in Europe / M. Bunders, M. Cortina-Borja, M. L. Newell // Pediatr. Infect. Dis. J. – 2005. – Vol. 24, № 7. – P. 595 – 600.
13. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome / M. B. Fallon, G. A. Abrams, J. W. McGrath [et al.] // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 272. – P. 779 – 784.
14. Degano B. Nitric oxide production by the alveolar compartment of the lung in cirrhotic patients / B. Degano // Eur Respir J. – 2009. – Vol. 34. – P. 138 – 144.
15. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – № 123. – 52 p.
16. Fallon M. B. Mechanisms of pulmonary vascular complications of liver disease. Hepatopulmonary syndrome / M. B. Fallon // J. Clin. Gastroenterol. – 2005. – Vol. 39. – P. 138 – 142.
17. Multiple pathogenic factor-induced complications of cirrhosis in rats: A new model of hepatopulmonary syndrome with intestinal endotoxemia / Hui-Ying Zhang, De-Wu Han, Zhong-Fu Zhao, Ming-She Liu, Yan-Jun Wu, Xian-Ming Chen, Cheng Ji // World J. Gastroenterology. – 2007. – Vol. 13 (25). – P. 3500 – 3507.
18. Rodriguez – Roizin R. Hepatopulmonary Syndrome – A Liver-induced Lung Vascular Disorder / R. Rodriguez – Roizin, M. J. Krowka // New England Journal of Medicine. – 2008. – Vol. 358. – P. 2378 – 2387.

УДК 612. 017+611. 018. 1+591. 434:616. 36-002+616. 24-008. 6]-001. 5

ПОКАЗНИКИ КЛІТИННОГО ІМУНІТЕТУ У ЩУРІВ З МОДЕЛЬОВАНИМ ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНИМ СИНДРОМОМ

Криницька І. Я.

Резюме. В експерименті на щурах з модельованим гепатопульмональним синдромом проведено дослідження змін показників клітинного імунітету в крові та бронхоальвеолярному змиві. Результати проведеного дослідження вказують на виражені порушення з боку клітинної ланки імунітету крові у вигляді Т-лімфоцитопенії, дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним зменшенням Т-хелперів, зменшення імунорегуляторного індексу та зниження вмісту загальних В-лімфоцитів. У бронхоальвеолярному змиві зсуви з боку вивчених імунологічних показників характеризувалися Т-лімфоцитозом, дисбалансом субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним підвищенням Т-хелперів, збільшенням імунорегуляторного індексу та підвищенням вмісту загальних В-лімфоцитів.

Ключові слова: клітинний імунітет, кров, бронхоальвеолярний змив, гепатопульмональний синдром.

УДК 612. 017+611. 018. 1+591. 434:616. 36-002+616. 24-008. 6]-001. 5

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА У КРЫС С МОДЕЛИРОВАННЫМ ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ

Криницкая И. Я.

Резюме. В эксперименте на крысах с моделированным гепатопульмональным синдромом проведено исследование изменений показателей клеточного иммунитета в крови и бронхоальвеолярном смыве. Результаты проведенного исследования указывают на выраженные нарушения клеточного иммунитета в крови в виде Т-лимфоцитопении, дисбаланса субпопуляционного состава Т-лимфоцитов с преимущественным снижением Т-хелперов, уменьшения иммунорегуляторного индекса и снижения содержания общих В-лимфоцитов. В бронхоальвеолярном смыве сдвиги со стороны изученных иммунологических показателей характеризовались Т-лимфоцитозом, дисбалансом субпопуляционного состава Т-лимфоцитов с преимущественным повышением Т-хелперов, увеличением иммунорегуляторного индекса и повышением содержания общих В-лимфоцитов.

Ключевые слова: клеточный иммунитет, кровь, бронхоальвеолярный смыв, гепатопульмональный синдром.

UDC 612. 017+611. 018. 1+591. 434:616. 36-002+616. 24-008. 6]-001. 5

The Indexes of Cellular Immunity in Rats with Modulated Hepatopulmonary Syndrome

Krynytska I. Ya.

Summary. In experiments on rats with modulated hepatopulmonary syndrome the changes in the indexes of cellular immunity in blood and bronchoalveolar lavage were studied. Results of the investigation indicate a pronounced imbalance of blood cellular immunity in the form of T-lymphocytopenia, imbalance subpopulation of T-lymphocytes with a predominant decreasing in T-helper cells, reducing the immunoregulatory index and decreasing of total B-lymphocytes. In bronchoalveolar lavage shifts of the studied immunological parameters were characterized by T-lymphocytosis, imbalance subpopulation of T-lymphocytes with a predominant increasing in T-helper cells, increasing of immunoregulatory index and increasing of B-lymphocytes.

Key words: cellular immunity, blood, bronchoalveolar lavage, hepatopulmonary syndrome.

Стаття надійшла 11. 01. 2013 р.

Рецензент – проф. Олійник С. А.