

**О. С. Воронкова, Т. М. Полішко, О. А. Сірокваша, А.І. Вінніков**

Дніпропетровський національний університет,  
просп. Гагаріна, 72, Дніпропетровськ, 49050, Україна,  
тел.: 8 (0562) 46 92 52, e-mail: voronkova\_olga@inbox. ru

## **ДЕЯКІ ПОКАЗНИКИ ІМУНІТЕТУ БІЛИХ ЛАБОРАТОРНИХ МИШЕЙ В НОРМІ ТА ПРИ РІЗНИХ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНАХ**

*Проведено вивчення показників імунітету лабораторних мишей за фізіологічного та різних патологічних станів. Порівняльний аналіз показників імунітету здорових вагітних та невагітних самиць мишей показав, що при фізіологічній вагітності спостерігається достовірне зниження кількості лейкоцитів та лімфоцитів. При вивченні показників імунітету за умов патологічних станів (екзогенне мікробне навантаження, екстрагенітальна патологія, антибіотичне навантаження) визначено, що при більшості досліджуваних станів спостерігаються зміни переважно таких показників як: загальна кількість лейкоцитів, кількість циркулюючих імунних комплексів та показник НСТ-тесту. Аналіз показників при патологічних станах порівняно із нормою визначив, що найбільш значне пригнічення імунітету відбувається в групі тварин з екстрагенітальною патологією.*

*К л ю ч о в і с л о в а: імунітет, мікробне навантаження, вагітність, екстрагенітальна патологія, антибіотики, миші.*

Імунна система є однією з найбільш складнорегульованих систем організму. Сукупність взаємозв'язків імунітету досить складна і до того ж не до кінця вивчена. Здебільшого розповсюджені дані про стан показників імунного статусу, що характерні для фізіологічної норми, водночас вони мають певні варіації, зумовлені багатьма факторами, наприклад, станом навколишнього середовища, віком досліджуваної групи та місцевістю її проживання тощо [10]. Загальновідомою є інформація про головні тенденції змінення показників імунітету при різних захворюваннях: при інфекційному ураженні, онкопатології тощо. Слід констатувати, що ці дані здебільшого відображають картину імунітету при розвинутому захворюванні, тобто на тому етапі, коли пацієнт потрапляє до лікаря. Водночас відомостей про формування саме такої, а не іншої картини немає, бо ведення пацієнта починається з моменту початку клінічної маніфестації хвороби, що не включає спостереження в інкубаційний період.

З огляду на це, метою наших досліджень було визначення змін у показниках імунітету при дослідженні фізіологічних (здорові невагітні та вагітні тварини) та відтворенні деяких патологічних станів на початкових етапах після дії ряду факторів із проведенням порівняльного аналізу змін вивчених показників по відношенню до норми.

### **Матеріали і методи**

Об'єктом досліджень була вибірка самиць білих лабораторних мишей. Всі дослідження на тваринах проводилися згідно до норм, встановлених законом України

© О. С. Воронкова, Т. М. Полішко, О. А. Сірокваша, А.І. Вінніков, 2008



№ 3447-IV “Про захист тварин від жорстокого поводження” та норм, прийнятих в Європейській конвенції по захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей від 20.09.1985 [8].

Тварин було поділено на групи: група 1 – здорові миші (n=10); група 2 – тварини, яким вводили суспензію добової культури клітин золотистого стафілококу (n=24); група 3 – тварини, яким вводили суспензію добової культури клітин кишкової палички, (n=24); група 4 – тварини, яким вводили розчин антибіотика доксіцикліна у максимальній дозі, (n=24); група 5 – тварини з фізіологічним перебігом вагітності (n=8); група 6 – тварини зі спонтанною екстрагенітальною патологією, (n=7).

Для дослідження стану показників імунного статусу при вагітності було відібрано 8 самиць мишей із фізіологічним перебігом вагітності. Відстеження показників проводили на 2-му тижні вагітності тварин.

Для створення екзогенного навантаження мікроорганізмами інтравагінально вводили 50 мкл суспензії добової культури золотистого стафілококу або кишкової палички із вмістом клітин  $1 \times 10^9$  клітин/мл.

Для створення антибіотичного навантаження доксіциклін вводили тваринам у максимальній добовій дозі, яка для першого дня введення становить 0,08 мг; для 2 – 5-го днів введення становить 0,054 мг, пропорційно до ваги тварин.

Тварин з екстрагенітальною патологією відбирали із загальної маси утримуваних тварин за умов наявності у них абсцесів на кінцівках та черевці, з матеріалу яких робили висів на агар із додаванням крові (3 %). Вірогідно абсцеси могли бути наслідками укусів іншими тваринами.

Кров від тварин отримували шляхом декапітації. Загальну кількість лейкоцитів підраховували у камері Горяєва-Тома (використовували ацетатну кров); загальну кількість лімфоцитів [3, 5] та відсоток клітин із морфологічними ознаками апоптозу [7] підраховували на мазках. Загалом для кожної тварини готували 3 препарата крові (мазки): два з яких використовували для підрахування клітин крові (їх фіксували фіксатором Май-Грюнвальда та фарбували барвником Романовського-Гімзи) та вивчення їх морфології (всі клітини в полі зору розглядали на наявність ознак апоптозу), а третій – для вивчення активності нейтрофілів (НСТ-тест). Кількість циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) визначали за методом Діжон із застосуванням поліетиленгліколя [3]. В якості антикоагулянту використовували розчин цитрату натрію (масова частка 3,8 %).

Статистичну обробку результатів проводили за методикою, запропонованою Лакінім [6], використовуючи критерій Стьюдента при рівні значущості 0,05.

### Результати та їх обговорення

У таблиці 1 представлено дані по змінам показників імунітету в динаміці дії досліджуваних факторів. Показники знімали на 2-й та 10-й день відповідно: для груп 2 – після введення суспензії клітин золотистого стафілококу, 3 – після введення суспензії кишкової палички та 4 – після припинення курсу введення доксіцикліну. Дані, отримані для тварин експериментальних груп, представлені у порівнянні із даними для тварин контрольної групи 1.

З отриманих даних очевидним є, що екзогенне мікробне (2-й день після введення мікроорганізмів – групи 2 і 3) чи антибіотичне (2-й день після припинення введення антибіотика – група 4) інтравагінальне навантаження не викликає помітних пору-



шень у досліджуваних ланках імунітету. Так, кількість лейкоцитів та лімфоцитів у експериментальних групах тварин (яким створювали навантаження бактеріями та антибіотиком) близька до показнику норми, тобто, вірогідно, на даному етапі відбуваються латентні процеси або такі, що не пов'язані зі згаданими показниками. Близька також до норми і кількість клітин з морфологічними ознаками апоптозу, кількість ЦІК та відсоток активних нейтрофілів.

Таблиця 1

## Показники імунної системи в динаміці впливу досліджуваних факторів

Table 1

## Immune system markers in the dynamics of investigated factors influence

Показник		Лейкоцити, x10 <sup>6</sup> клітин/мл	Лімфоцити, %	Кількість апопто- тичних клітин, %	Показник НСТ-тесту, %	ЦІК, од. опт. густ.
Група мишей	Група 1, (контроль), n=10	9,53±0,95	36,8±1,61	19,3±2,43	18,1±2,59	0,72±0,12
День 2-й	Група 2, n=8	8,63±1,82	33,7±2,35	19,8±2,17	18,1±2,59	0,72±0,03
	Група 3, n=8	10,2±0,40	34,3±1,89	18,9±1,00	17,5±3,78	0,73±0,04
	Група 4, n=8	7,16±1,02*	33,4±0,74	18,5±1,45	16,9±2,59	0,73±0,05
День 10-й	Група 2, n=16	16,6±0,50*	67,1±8,22*	19,6±2,78	12,5±2,67*	1,72±0,06*
	Група 3, n=16	13,1±0,80*	35,6±4,72	20,1±1,80	18,1±3,72	1,46±0,04*
	Група 4, n=16	6,73±1,11*	34,1±1,37	20,4±1,24	13,1±3,72*	1,28±0,18*

\* – встановлено статистичну різницю по відношенню до даних групи 1.

На відміну від 2-го дня на 10-й день кількість лейкоцитів зростає порівняно із нормою по групах тварин, яким вводили суспензії клітин стафілокока та кишкової палички (у 1,74 рази та у 1,37 рази, відповідно), а в групі тварин, яким інтравагінально вводили доксіциклін навпаки, зменшується у 1,42 рази порівняно із контролем.

Вибір трьох останніх показників, наведених у таблиці, зумовлений тим, що існують дані про їх взаємозв'язок. Так, відомо, що рештки клітин, які загинули шляхом апоптозу (а такий шлях загибелі типовий для імунних клітин крові [4]), мають бути утилізовані шляхом фагоцитозу, і здійснення цього може відбуватися лише за умов наявності у сироватці фактора  $\beta_2$ -глікопротеїна-1 та антифосфоліпідних антитіл [12, 13]. Недостатня активність фагоцитозу може призвести до накопичення ЦІК, що в свою чергу може призвести до розвитку захворювань імунних комплексів [3]. Зниження активності макрофагів може бути зумовлене наявністю всередині них паразита. Так, відомо, що за умов наявності стафілококу відбувається не лише інгібування ферментних систем макрофагів, але й можлива ініціація апоптозу (опосередкована дією пептидоглікану та тейхоевих кислот грампозитивних бактерій) [2, 9, 11].



З отриманих на 10-й день даних очевидним є певне пригнічення активності фагоцитуючих клітин у групі тварин, яким вводили стафілокок. Водночас відбувається значне зростання рівня ЦІК у групах 2 та 3 більше, ніж у 2 рази. Підвищений рівень ЦІК в умовах інфекційного процесу до певної межі є нормальним явищем, що свідчить про активацію імунної системи. Але перевищення більше, ніж у 2 рази може також вказувати на недостатність системи комплементу та активності нейтрофілів, а також про можливість розвитку аутоімунної патології [10].

При інтравагінальному введенні доксіцикліна відбувається зниження відсотку активних нейтрофілів в 1,38 рази, що, однак, не виходить за межі статистичної помилки. Водночас рівень клітин з ознаками апоптозу лишається близьким до значень у контрольній групі, а тому саме зниження активності нейтрофілів, вірогідно, може опосередковувати збільшення кількості ЦІК (до  $1,28 \pm 0,18$  од. опт. густини, при показникові норми  $0,72 \pm 0,12$  од. опт. густини).

У таблиці 2 представлено дані для груп тварин із фізіологічним перебігом вагітності (група 5) та з екстрагенітальною патологією (група 6) у порівнянні із даними для контрольних тварин (група 1). Дані для тварин цих груп отримані на окремих вибірках та не досліджувалися в динаміці.

За результатами висіву матеріалу з абсцесів тварин групи 6 (екстрагенітальна патологія) визначено наявність мікроорганізмів, що належать до стафілококів та псевдомонад.

Таблиця 2

**Показники імунної системи тварин із фізіологічним перебігом вагітності та екстрагенітальною патологією у порівнянні із здоровими тваринами**

Table 2

**Animals immune system markers with physiological pregnancy and extragenital pathology in comparison with healthy animals**

Показник Група мишей	Лейкоцити, $\times 10^6$ клітин/мл	Лімфоцити, %	Апоптичні клітини, %	Показник НСТ-тесту, %	ЦІК, од. опт. густ.
Група 1, n=10	9,53 $\pm$ 0,95	36,8 $\pm$ 1,61	19,3 $\pm$ 2,43	18,1 $\pm$ 2,59	0,72 $\pm$ 0,12
Група 5, n=8	7,27 $\pm$ 0,95*	25,8 $\pm$ 2,18*	21,3 $\pm$ 1,51	21,7 $\pm$ 1,25	0,63 $\pm$ 0,11
Група 6, n=7	6,73 $\pm$ 0,50*	28,7 $\pm$ 1,69*	16,6 $\pm$ 1,80	8,14 $\pm$ 1,35*	1,71 $\pm$ 0,08*

\* – встановлено статистичну різницю по відношенню до даних групи 1.

Досліджувані показники в групах тварин 5 (фізіологічна вагітність) та 6 (екстрагенітальна патологія) значно відрізняються від стану норми. Здебільшого це може бути зумовлено станом тварин та строками спостережень. Так, аналіз відповідних показників встановив, що кількість лейкоцитів та лімфоцитів в обох групах (5 та 6) є дещо нижчою за норму (у 1,31 рази та у 1,42 рази, відповідно). Нижчою за норму є також відносна кількість лімфоцитів, яка в нормі в середньому становить  $36,8 \pm 1,61$  %, а в групах 5 –  $25,8 \pm 2,18$  % і 6 –  $28,7 \pm 1,69$  %. Взагалі, в літературі існують дані про те, що коливання норми відносної кількості лімфоцитів можливі від 20 до 80 % [1]. Кількість клітин, в яких визначено морфологічні ознаки апоптозу в нормі становить  $19,3 \pm 2,43$  %, що в 1,1 рази нижче, ніж у групі 5, та у 1,28 рази вище, ніж у групі 6, і що не виходить за межі припустимої статистичної похибки.



Показник активності нейтрофілів в групі 5 вищий за норму у 1,19 рази, а в групі 6 нижчий за норму у 2,22 рази, що може бути зумовлено постійною персистенцією стафілококу в організмі тварини (мікроорганізм було висіяно з матеріалу абсцесу), а продукти життєдіяльності останнього, як відомо [2], можуть виступати в якості інгібітора активності фагоцитарних клітин.

Кількість ЦІК в групі 5 також близька до значень норми (яка становить  $0,63 \pm 0,11$  одиниць оптичної густини), а от в групі 6 кількість ЦІК перевищує норму більше, ніж в 2 рази, що є однією з ознак розвитку патологічного стану.

Підсумовуючи проведені дослідження, слід відзначити, що зміни, які відбуваються із показниками імунітету при вагітності, є значними порівняно із нормою лише для кількості лейко- та лімфоцитів. Найбільш значні зміни у показниках імунної системи відзначено при розвитку екстрагенітальної патології: відбувається зростання кількості ЦІК більше, ніж в 2 рази, при одночасному зниженні порівняно із нормою всіх інших показників. На ранніх строках після створення екзогенного мікробного навантаження стафілококом та кишковою паличкою і при введенні антибіотика не фіксується значних змін у вивчених показниках імунітету (відповідно групи 2, 3 та 4). На 10-й день досліджень зміни показників імунітету мають подібні тенденції, що проявляється у зростанні кількості ЦІК і зниженні показнику НСТ-тесту для груп 2 і 3. Однак, є і відмінності, що виражаються у значному зниженні кількості лейкоцитів у групі тварин, яким вводили антибіотик, і значному зростанні цього показника у групах тварин, яким вводили стафілокок та кишкову паличку.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Ахметов И. З. Лабораторные и дикие грызуны. Содержание, разведение и использование в опытах. — Ташкент: ФАН, 1981. — 124 с.
2. Гайдаш І. С., Флегонтова В. В., Суглобов Є. В., Салманова О. М., Потьомкін Є.І Апоптозіндукуюча активність пептидогліканів та тейхоевих кислот грампозитивних збудників гнійно-запальних захворювань у хірургічних хворих // Вестник гигиены и эпидемиологии — 2001. — №1. — С. 70 — 72.
3. Иммунный статус, принципы его коррекции и оценки иммунных нарушений: Монография / В. Г. Передерий, А. М. Земсков, Н. Г. Бычкова, В. М. Земсков. — К: Здоров'я, 1995. — 211с.
4. Їльїнська І. Ф. Апоптоз, апоцитоз та їх роль в імунній відповіді // Лабораторна діагностика. — 2002. — № 3. — С. 66 — 72.
5. Кашы Г. Д., Коюда Л. И. Методы оценки защитных систем организма млекопитающих // Учебно-методическое пособие. — Луганск: Элтон-2, 2003. — 95 с.
6. Лакин Г. Ф. Биометрия. — М: Высшая школа, 1980. — 293 с.
7. Лушников Е. Ф., Абросимов А. Ю. Гибель клетки (апоптоз). — М: Медицина, 2001. — 192 с.
8. Резніков О. Проблеми етики при проведенні експериментальних медичних і біологічних досліджень на тваринах // Вісник НАНУ. — 2001. — № 1. — С. 5-7.
9. Швембергер И. Н., Гинкул Л. Б. Апоптоз: роль в нормальном онтогенезе и патологии // Вопросы онкологии. — 2002. — № 2. — с. 153 — 157.
10. Якобисяк В. Імунологія. Вінниця: Нова книга, 2005. — 748с.
11. Behnia M., Robertson K. A., Martin W. J. Role of Apoptosis in Host Defense and pathogenesis of disease // Chest. — 2000. — № 117. — P. 1771 — 1777.
12. Manfredi A. A., Rovere P., Galati G., oth. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. I. Opsonization by antiphospholipide antibodies // Arthritis Rheumatology. — 1998. — Feb. 41(2). — p. 205-214.
13. Manfredi A. A., Rovere P., Heltai S., oth. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. II. Role of Я<sub>2</sub>-glycoprotein-1 // Arthritis Rheumatology. — 1998. — Feb. 41(2). — p. 215-223.



**О. С. Воронкова, Т. Н. Полишко, Е. А. Сирокваша, А. И. Винников**

Днепропетровский национальный университет,  
просп. Гагарина, 72, Днепропетровск, 49050, Украина,  
тел.: 8 (0562) 46 92 52, e-mail: voronkova\_olga@inbox.ru

## **НЕКОТОРЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНИТЕТА БЕЛЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МИШЕЙ В НОРМЕ И ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ**

### **Реферат**

Проведено изучение показателей иммунитета лабораторных мышей при физиологическом и различных патологических состояниях. Сравнительный анализ показателей иммунитета здоровых небеременных и беременных самок мышей показал, что при физиологической беременности происходит достоверное снижение количества лейкоцитов и лимфоцитов. При изучении показателей иммунитета при развитии патологических состояний (экзогенная микробная нагрузка, экстрагенитальная патология, антибиотическая нагрузка) определено, что в большинстве исследованных случаев изменяются такие показатели как: общее количество лейкоцитов, количество ЦИК и показатель НСТ-теста. Анализ показателей при патологических состояниях в сравнении с нормой показал, что наиболее значимое угнетение иммунитета происходит в группе животных с экстрагенитальной патологией.

**Ключевые слова:** иммунитет, микробная нагрузка, беременность, экстрагенитальная патология, антибиотики, мыши.

**O. S. Voronkova, E. A. Sirokvasha, T. N. Polishko, A. I. Vinnikov**

Dnipropetrovsk National University  
Gagarina av., 72, Dnipropetrovsk, Ukraine, 49050; tel.: 8 (0562) 46 92 52,  
e-mail: voronkova\_olga@inbox.ru

## **SOME IMMUNOLOGICAL PARAMETERS OF WHITE LABORATORY MICE IN HEALTH AND UNDER SOME PATHOLOGICAL CONDITIONS**

### **Summary**

Immunological parameters of laboratory mice in health and under different pathological statuses were investigated. The comparative analysis of immunological parameters of nonpregnant and pregnant mice showed, that statistical decreasing of leucocytes and lymphocytes amount was fixed under physiological pregnancy. The investigation of immunity parameters under pathological statuses (exogenous microbial load, extragenital pathology and antibiotic load) showed mostly the changing of next parameters: full amount of leucocytes, the amount of circulating immune complexes and data of NST-test. The comparative analysis of data received under pathological statuses showed that the most efficient depression caused by extragenital pathology.

**Key words:** immunity, microbial pressure, pregnancy, extragenital pathology, antibiotics, mice.

