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

**Т. И. Коваленко, В. В. Минухин., Е. М. Климова\***

**ИММУНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА НА МОДЕЛИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА.**

**Харьковский национальний медицинский университет**

**(г. Харьков)**

**\*Государственное учреждение Институт общей и неотложной хирургии НАМН Украины (г. Харьков)**

Данное исследование является фрагментом плановой научной работы кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Харьковского национального медицинского университета «Экспериментальное микробиологическое обоснование противомикробной терапии гнойно-воспалительных заболеваний» (номер государственной регистрации темы 0114U003390).

**Вступление.** Научные 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** данного исследования было изучение возрастных особенностей иммунной реакции у экспериментальных животных разного возраста, на модели воспалительного процесса, индуцированного бактериальными взвесями *P.aeruginosa* и *E. соli.*

**Материалы и методы**. 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 соli* № 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 С 3 фрагмента комплемента [8] с помоцью фотометрического метода и интенсивность образования циркулирующих иммунных комплексов (используя прибор спектрофотометр, длинна волны 450 нм), у контрольных животных и после действия антигенов, индуцирующих воспалительный процесс.

**Результаты 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 выраженно 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±0,01 при контроле 3,61±0,03 и ИЗФ - 0,83±0,02 при контрольных значениях 1,14±0,02.

У молодых животных, инфицированных бактериальной взвесью *E. соli,* к 7 суткам снизился показатель ИЗФ, по сравнению со старыми животными и контрольным значением, и составил 0,97±0,01 при контроле 1,45±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±0,09 при 1,80±0,06 в контроле, что свидетельствует о наличии функционального резерва иммунокомпетентных клеток.

После введения бактериальной взвеси *E. соli* 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±0,04 при 2,22±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. соli,* которое составило 0,64 ± 0,1% при контроле 0,45 ± 0,2%.У молодых животных концентрация С 3 фрагмента комплемента в сыворотке крови была максимально снижена на 5 сутки эксперимента и составляла 0,48 ± 0,2% при контроле 0,65 ± 0,1% после действия взвеси *P.aeruginosa* и 0,42 ± 0,2% при контроле 0,65 ± 0,1% после действия бактериальной взвеси *E. соli* **(табл. 1)***.*

Таблица. 1

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

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Возрастные группы экспериментальных животных | Бактериальная взвесь  *P.aeruginosa* | Бактериальная взвесь  *E. соli* |
| 3 день | | |
| 3 мес. n=10 | 0,49±0,2 | 0,55±0,2 |
| 22 мес. n=10 | 0,51±0,1\* | 0,64±0,1\* |
| 5 день | | |
| 3 мес. n=10 | 0,48±0,2\* | 0,42±0,2\* |
| 22 мес. n=10 | 0,49±0,1 | 0,51±0,1 |
| 7 день | | |
| 3 мес. n=10 | 0,49±0,2 | 0,50±0,2 |
| 22 мес. n=10 | 0,46±0,1 | 0,52±0,1 |
| контроль | | |
| 3 мес. n=10 | 0,65±0,1 | |
| 22 мес. n=10 | 0,45±0,2 | |

Примечание:\* - достоверность различия с контролем Р ≤ 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± 6,0 усл. ед. После введения бактериальных взвесей *P.aeruginosa* и *E.coli* на 3 сутки эксперимента интенсивность образования ЦИК была выше в обеих возрастных группах **(табл. 2)**.

Таблица. 2

**Концентрация ЦИК у животных разного возраста с моделью воспаления, индуцированного введением бактериальных взвесей *P.aeruginosa* и *Е.соli*.**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Возрастные группы экспериментальных животных | Бактериальная взвесь  *P.aeruginosa* | Бактериальная взвесь  *E. соli* |
| 3 день | | |
| 3 мес. n=10 | 130,0±12,0\* | 161,0±13,0\* |
| 22 мес. n=10 | 125,0±12,0\* | 138,0±12,0\* |
| 5 день | | |
| 3 мес. n=10 | 120,0±12,0\* | 167,0±13,0\* |
| 22 мес. n=8 | 146,0±13,0\* | 179,0±14,0\* |
| 7 день | | |
| 3 мес. n=10 | 115,0±12,0\* | 140,0±12,0\* |
| 22 мес. n=10 | 94,0±9,0\* | 105,0±10,0\* |
| контроль | | |
| 3 мес. n=10 | 51,0±7,0 | |
| 22 мес. n=10 | 25,0±6,0 | |

Примечание:\* - достоверность различия с контролем Р ≤ 0,05

К 5 суткам интенсивность образования ЦИК была высокой в обеих группах по сравнению с контролем, а у старых животных достоверно более высокой, чем у молодых. К 7 суткам в период реконвалесценции у молодых и старых животных концентрация ЦИК достоверно снижалась по сравнению с первыми сроками исследования, однако у молодых животных связывание микроорганизмов иммуноглобулинами происходило более интенсивно, чем у старых животных, что свидетельствует о более высокой иммунной реактивности.

**Выводы.**

1. На разных этапах индукции воспалительного процесса у молодых и старых животных выявили изменения фагоцитарной активности ферментов гранулоцитарных нейтрофилов, зависящие от возраста экспериментальных животных
2. Изменение концентрации С 3 фрагмента комплемента в сыворотке крови было более выражено у старых экспериментальных животных, у молодых же животных этот показатель был снижен очевидно за счет потребления этого гуморального фактора в элиминации антигена.
3. После действия инфекционных бактериальных взвесей *P.aeruginosa* и *E.coli* интенсивность образования ЦИК была достоверно увеличена в обеих возрастных группах экспериментальных животных, что свидетельствует об активации связывания иммуноглобулинами микроорганизма.
4. Разрешённость воспаления у экспериментальных животных зависит от возрастных особенностей, от функционального состояния факторов врожденного иммунитета, от бактерий разной видовой принадлежности и от стадии воспалительного процесса.

**Перспективы дальнейшего исследованияю.** В ответ на факторы внешней среды (инфекционные бактериальные взвеси *P.aeruginosa* и *E.coli*) адаптивные реакции, определяющие резистентность организма имеют разную стратегию в зависимости от возраста и нуждаются в дальнейшем исследовании. Исследования в данной области будут продолжены и расширены с учётои полученных данных.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В. Н. Анисимов. - СПб: Наука, 2003. – 468 с.
2. Бочков Н.П., Соловьева Д.В., Стрекалов Д.Л., Хавинсон В.Х. Роль молекулярно-генетической диагностики в прогнозировании и профилактике возрастной патологии / Н. П. Бочков, Д. В. Соловьева, Д. Л. Стрекалов, В. Х. Хавинсон // Клинич. медицина. – 2002. - № 2. – С. 4–8.
3. Божков А.И. Возможная роль «метаболической памяти» в формировании ответной реакции на стресс – факторы у молодых и взрослых организмов / А. И. Божков, В. Л. Длубовская, Ю. В. Дмитриев и др. // Успехи геронтологии. – 2009. – Т. 22, №2. – С.259 – 268.
4. Кулимбетов М. Т. Процессы адаптации тиреоидного статуса крыс разного возраста в условиях хронического дефицита йода в питании / М. Т. Кулимбетов, М. М. Рашитов, Т. С. Саатов // Международный эндокринологический журнал. – 2009. - № 2(20) – С. 33 – 37.
5. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммунный ответ и старение / Р. В. Петров, Р. М. Хаитов // Успехи соврем. биол. – 1975. – Т. 79, вып.1. – С. 111–127.
6. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V. Caloric Restriction Diet Induces Specific Epigenotypes Associated with Life Span Extension / A. I. Bozhkov, Yu. V. Nikitchenko // Journal of Nutritional The rapeutics. - 2013. - Vol. 2, № 1. - P. 30-39.
7. Calin-Jageman R. J. Behavioral adaptation of the Aplysia siphonwithdrawal response is accompanied by sensory adaptation / R. J. Calin-Jageman, T. M. Fischer // Behavioral Neuroscience. - 2007. – Vol. 121(1). – P. 200 – 211.
8. Data 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., Funaba M. Activin in humoral immune responses / K. Oqawa, M. Funaba // Vitam Horm. - 2011. – Vol. 85 – P. 235 – 253.

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

**ИММУНОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ РАЗНОГО ВОЗРАСТА НА МОДЕЛИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА.**

**Коваленко Т. И., Минухин В. В., Климова Е. M.**

**Резюме.** В работе было показано, что молодые животные более реагировали на введение бактериальной взвеси *P.aeruginosa*, а старые экспериментальные животные на введение взвеси *Е.соli*. 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 *Е.соli*, возраст экспериментальных животных, клеточный и гуморальный иммунитет, фагоцитарная активность, комплемент, ЦИК.

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

**ІМУНОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН РІЗНОГО ВІКУ НА МОДЕЛІ ГЕНЕРАЛІЗОВАНОГО ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ.**

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

**Резюме.** У роботі було показано, що молоді тварини більш реагували на введення бактеріальної суспензії P.aeruginosa, а старі експериментальні тварини на введення суспензії Е.соli. 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 Е.соli, вік експериментальних тварин, клітинний та гуморальний імунітет, фагоцитарна активність, комплемент, ЦІК.

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

**IMMUNORESISTATION EXPERIMENTAL ANIMALS OF DIFFERENT AGE FOR GENERALIZED MODEL INFLAMMATORY PROCESS.**

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

**Summary:** In the work it was shown 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.

Коваленко Татьяна Игоревна без учёной степени. 61054 г. Харьков, Московский район, пос. Кирова, дом 18. (tasja.80@mail.ru)

Мобильный (096)29-18-523, (050)95-62-631

Служебный 707-73-62

Домашний 710-64-95