**УДК** 612.017.11:615.27:616-002-092.9

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

**ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИТНОГО ПРЕПАРАТА НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ.**

**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.** Из данных литературы известно, что нейтрофильные гранулоциты обеспечивают неспецифическую иммунную защиту организма, т.е. реализовывают свой активный потенциал для поддержания гомеостаза [4]. Фагоцитирующие клетки обеспечивают инактивацию различных антигенов и лигандов с помощью активированных форм кислорода и ферментов [7,8].

Однако формирования иммунного ответа в присутствии микроорганизмов в зависимости от возраста изучены недостаточно. Существует мнение, что при старении нарушается функция ферментов обеспечивающих различные биологические процессы в следствии эпигиномных изменений этих биологических катализаторов [1]. Многие ферменты могут претерпевать конфармационные изменения, а значит, и изменять функциональные способности [6].

Для оценки возможных механизмов формирования первичного иммунного ответа у животных разного возраста на фоне индуцированного воспалительного процесса необходимо исследовать стимулированную и индуцированную ферментативную активность гранулоцитарных нейтрофилов в НСТ-тесте на фоне образования активных форм кислорода АФК [2,3]. Активность ферментов гранулоцитарных нейтрофилов в процессе фагоцитоза при кислородзависимом киллинге микроорганизмов [5].

**Целью** данной работы было исследование механизмов, обеспечивающих активность фагоцитирующих клеток у экспериментальных животных разного возраста на модели генерализованного воспалительного процесса, индуцированного бактериальной суспензией *Е.соli* и корекции при помощи композитного препарата.

**Материалы и методы.** Материалом для эксперимента служила кровь белых крыс-самцов 3-х месячного возраста («молодые») массой 100 -140гр. (n=18) и 22-х месячные («старые») с массой тела 200 - 240 гр.(n=18). I группа (n=6) (3-х месячные самцы, животным этой группы вводили per os МФ по 20 мкл) и II группа (n=6) (22-х месячные животные, которым вводили per os МФ по 40 мкл) служили контролем.

Двум возрастным группам животных с воспалением, индуцированным бактериальной суспензией *Е.соli* вводили экспериментальный композитный препарата, состоящий из аминокислот, нуклеотидов, ферментов и витаминов (МФ) по 20 мкл – 3-х месячным крысам (III-IV группы n=12) и 40 мкл – 22-х месячным крысам (V-VI группы n=12). Данный препарат вводили экспериментальным животным per os одной части группы (n=3) за 48 часов до заражения экспериментальных животных, а другой части группы (n=3) после 24 часов введения бактериальной суспензии *Е.соli*.

 Контрольных животных выводили из эксперимента путём декапитации на 3 сутки - n=12. Инфицированных животных выводили из эксперимента путём декапитации на 3 сутки - n=12 и 7 сутки - n=12.

У экспериментальных животных забирали кровь в которой определяли общую окислительно-восстановительную активность гранулоцитарных нейтрофилов в тесте восстановления нитросинего тетразолия (НСТ-тест) по стандартной методике [2].

Для статистической обработки данных использовали интегрированную систему комплексного анализа BIOSTAT. Экспериментальные данные обрабатывались с помощью интегрированной системы для комплексного статистического анализа STATISTICA – 6. Выводы статистических гипотез проводили на уровне значимости Р≤ 0,05.

**Результаты и их обсуждение.** В ходе эксперимента выявили, что интенсивность ферментативной активности у молодых животных в 2 раза превышало показатели индекса стимуляции (ИС) такового у старых животных и составил 2,21±0,07 % у молодых и 1,09±0,05 % у старых животных **(табл)**.

Таблица

**Показатели НСТ – теста у экспериментальных животных разного возраста с моделью воспаления, индуцированного введением *Е.соli* и иммунокоректора.**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №группы | Возрастные группы животных | %СП | %СТ | ИС | СЦК СП | СЦК СТ |
| контроль |
| I | 3 мес. n=6 | 47±2,50 | 63±3,50 | 2,21±0,07 | 0,82±0,02 | 1,03±0,04 |
| II | 22 мес. n=6 | 61±3,60 | 70±3,70 | 1,09±0,05 | 0,99±0,03 | 0,84±0,03 |
| 3 сутки |
| III | 3 мес. до n=3 | 80±7,50\* | 78±4,70\* | 0,97±0,04\* | 1,03±0,02\* | 1,17±0,07\* |
| IV | 3 мес. послеn=3 | 31±3,60\* | 49±1,10\* | 1,61±0,02\* | 0,51±0,01 | 0,76±0,03\* |
| V | 22 мес. до n=3 | 36±8,30\* | 56±3,70\* | 1,53±0,03 | 0,55±0,04 | 0,84±0,01 |
| VI | 22мес.после n=3 | 47±5,20\* | 77±1,10 | 1,65±0,09 | 0,67±0,09 | 1,33±0,09\* |
| 7 сутки |
| III | 3 мес. до n=3 | 52±1,10\* | 76±4,50\* | 2,90±0,05\* | 0,30±0,04\* | 1,46±0,15\* |
| IV | 3 мес. послеn=3 | 30±3,60\* | 57±1,60\* | 2,35±0,01 | 0,57±0,01 | 0,90±0,04 |
| V | 22 мес. до n=3 | 34±8,00\* | 63±1,50 | 2,10±0,13\* | 0,51±0,03\* | 0,86±0,01 |
| VI | 22мес.после n=3 | 38±9,10\* | 75±1,10 | 2,25±0,16\* | 0,52±0,03 | 1,24±0,07\* |

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

После воспаления, индуцированного введением бактериальной суспензии *Е.соli* и применения экспериментального препарата МФ до индукции воспаления выявили на 3 сутки у молодых животных увеличение показателя спонтанного теста в 1,7 раза и стимулированного теста в 1,2 раза. Но показатель индекса стимуляции (ИС) снижался, что свидетельствует о неудовлетворительном состоянии бактерицидной системы клеток.

У экспериментальных животных старшего возраста на 3 сутки эксперимента наоборот выявили увеличение ИС, которые составило 1,65±0,09 % при контроле 1,09±0,05.

В период реконвалесценции (7 сутки) наблюдали достоверное увеличение показателя ИС в двух возрастных группах экспериментальных животных. Максимальное увеличение ИС было у 3-х месячных животных при введении МФ до индукции воспаления (2,90±0,05 % при контроле 2,21±0,07), а у 22-х месячных животных при введении МФ после индукции воспаления, которое составило 2,25±0,16 % при контроле 1,09±0,05 %.

**Выводы.**

1. Индукция барьерных врождённых факторов иммунитета зависит от функционального состояния внутриклеточных ферментов фагоцитирующих клеток. У молодых контрольных животных выявлен в 2 раза более высокий показатель ИС по сравнению с этим показателем у старых котрольных животных.
2. У 3-х месячных животных на фоне экспериментального воспалительного процессапоказатель ИС был достоверно снижен лишь к 3 суткам эксперимента, что свидетельствует об истощении функционального резерва фагоцитирующих клеток на раннем этапе воспаления.
3. В старшей группе животных на фоне воспаления и при введении экспериментального композитного препарата МФ ИС фагоцитирующих клеток в НСТ-тесте во все сроки эксперимента был увеличен, особенно на 7 сутки наблюдения, что свидетельствует о наличии функционального резерва этих иммунокомпетентных клеток.
4. На разных этапах индукции воспалительного процесса и введении иммунокоректора у животных выявили возрастые изменения активности ферментов гранулоцитарных нейтрофилов.

**Перспективы дальнейшего исследования.** Реактивность показателя первичного клеточного звена иммунитета на фоне экспериментального воспалительного процесса и действия иммуномодулятора у животных старшей группы была более выраженной, чем у молодых животных. Возможно это связано с приобретённым адаптивным иммунитетом у старых экспериментальных животных.В ответ на факторы внешней среды (бактериальные взвеси, иммуномодуляторы) адаптивные реакции, определяющие резистентность организма имеют разную стратегию в зависимости от возраста и нуждаются в дальнейшем исследовании.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения / В. Н. Анисимов. - СПб: Наука, 2003. – 468 с.
2. Виксман М.Е. Способ оценки функциональной активности нейтрофилов человека по реакции восстановления нитросинеого тетразолия: Метод. Рекомендации / М.Е. Виксман, А.Н Маянский // Казань: Казанский НИИЭМ, 1979. – 11 с.
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. Дранник Г.Н. Клиническая иммунология и алергология / Г. Н. Дранник. – К., 2010. – 552с.
5. Кузьменко О.В. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови крыс с различной реакцией на стресс / О.В. Кузьменко, Н.А. Никифорова, М.О. Иваненко // Весник Харьковского национального университета им. В.Н. Каразина. Серия: биология. – 2010. – Вип. 11. – С. 173 – 177.
6. Anand R.J. A role for connexin43 in macrophage phagocytosis and host survival after bacterial peritoneal infection / R. J. Anand, S. Dai, S. C. Gribar [et al.] // Journal Immunol. – 2008. – Vol.181. - P. 8534 - 8543.
7. Bastian N. R. Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase / N. R. Bastian, J. B. Hibbs // Curr. Opion. Immunol. – 1994. – Vol. 6. – P. 131 – 139.
8. Dubois D. Cyclomodulins in urosepsis strains of Escherichia coli / D. Dubois, J. Delmas, A. Cady [et al.] // Journal Clin Microbiol. – 2010. - № 48 (6). - P. 2122 - 2129.

**УДК** 612.017.11:615.27:616-002-092.9

**ВЛИЯНИЕ КОМПОЗИТНОГО ПРЕПАРАТА НА ФЕРМЕНТАТИВНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ У КРЫС РАЗНОГО ВОЗРАСТА ПРИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ПРОЦЕССЕ.**

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

**Резюме.** В работе было показано, что на разных этапах генерализованного воспалительного процесса, индуцированного введением бактериальной суспензии *Е.соli,* и применения экспериментального композитного препарата, состоящего из аминокислот, нуклеотидов, ферментов и витаминов (МФ), у животных выявили возрастые изменения ферментативной активности гранулоцитарных нейтрофилов, зависящие от срока введения иммуномодулятора.

**Ключевые слова:** *Е.соli*, возраст животных, миксфактор (МФ), НСТ-тест, индекс стимуляции.

**УДК** 612.017.11:615.27:616-002-092.9

**ВПЛИВ КОМПОЗИТНОГО ПРЕПАРАТУ НА ФЕРМЕНТАТИВНУ АКТИВНІСТЬ НЕЙТРОФІЛІВ У ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ ПРИ ГЕНЕРАЛІЗОВАННОМУ ЗАПАЛЬНОМУ ПРОЦЕСІ.**

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

**Резюме:** У роботі було показано, що на різних етапах генералізованого запального процесу, індукованого введенням бактеріальної суспензії *Е.соli* і застосування експериментального композитного препарату, що складається з амінокислот, нуклеотидів, ферментів і вітамінів (МФ) у тварин виявили вікові зміни ферментативної активності гранулоцитарних нейтрофілів, що залежать від терміну введення імуномодулятора.

**Ключові слова:** *Е.соli*, вік тварин, міксфактор (МФ), НСТ-тест, індекс стимуляції.

**UDC** 612.017.11:615.27:616-002-092.9

**INFLUENCE COMPOSIT DRUG ON THE ENZYMATIC ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN RATS OF DIFFERENT AGE WITH GENERALIZED INFLAMMATORY PROCESS.**

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

**Summary:** In the work it was shown that at different stages of generalized inflammatory process induced by introduction of bacterial suspensions of *E. coli* and using of experimental composite preparation consisting of amino acids, nucleotides, enzymes and vitamins (MF) have revealed in animals age-related changes of enzymatic activity granulocytic neutrophils, depending on the duration of introducing an immunomodulator.

**Key words:** *E.coli*, age of animals, mixfactor (MF), NBT-test, stimulation index.

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

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

Служебный 707-73-62

Домашний 710-64-95