**УДК: 579.841.11:579.842.11:612.017:616-053-092.9**

**Формирование гуморального ответа после действия антигенов P.aeruginosa и Е.coli** **у экспериментальных животных разного возраста.**

**Коваленко Татьяна Игоревна**

**Харковский национальный медицинский университет**

Определённый интерес представляет изучение особенностей реакций первичного и вторичного гуморального иммунитета на инфекционные антигены[1,2],. Важным связующим звеном между формированием врождённых иммунных реакций и специфического адаптивного иммунитета являются белки системы комплемента [3], а так же реакции вторичного гуморального иммунитета формирующиеся за счёт образования специфических антител[4].

Порог реактивности молодых и старых экспериментальных животных может определять соответствующие изменения первичных и вторичных гуморальных факторов иммунорезистентности в ответ на инфекционные антигены [5,6,7,8].

До конца не изученной остаётся проблема взаимовлияния реактивности и резистентности в зависимости от возраста[9].

**Целью** данного исследования было выявление отличий между реакциями первичного и вторичного гуморального звена иммунитета (С 3 фрагмент комплемента и иммуноглобулины классов (Ig) А, М, G) у экспериментальных животных разного возраста на модели воспалительного процесса, после действия инфекционных антигенов *P.aeruginosa* и *Е.coli*.

**Материалы и методы исследования.** Материалом для эксперимента служили белые крысы-самцы 3-х месячного возраста («молодые») массой 100 -140гр. (n=60) и 22-х месячные («старые») с массой тела 200 -240 гр.(n=60). Первая (3-х месячные самцы, животным этой группы внутрибрюшинно вводили 1,5 мл стерильного физиологического раствора) и вторая (22-х месячные животные, которым внутрибрюшинно вводили 1,5 мл стерильного физиологического раствора) группы крыс служили контролем. Третьей и четвёртой группе животных вводили внутрибрюшинно суточную агаровую культуру *Pseudomonas aeruginosa* № 27835 АТСС (вводили 1,5 мл взвеси бактерий, которая содержала 109 КОЕ/мл). Пятой и шестой группе животных вводили внутрибрюшинно суточную агаровую культуру *Escherichia соli* № 25592 (F-50) АТСС (вводили 1,5 мл взвеси бактерий, которая содержала 109 КОЕ/мл).

Инфицированных животных выводили из эксперимента путём декапитации на 3, 5, 7 сутки. У экспериментальных животных забирали кровь. В процессе данного эксперимента в сыворотке крови изучали изменения концентрации С 3 фрагмента комплемента, а также показатели иммуноглобулинов (Ig) A, M, G у интактных контрольных животных и после действия антигенов, индуцирующих воспалительный процесс ( синегнойная и кишечная палочка).

Активность белков системы комплемента определяли по потреблению его компонентов на реакцию антигена с соответствующими комплементсвязывающими антителами с помощью фотометрического метода (метод основан на изменение цвета). Активность системы комплемента определяли по соотношению оптической плотности образца и контрольной пробы, и выражали в условных единицах.

Для определения концентрации иммуноглобулинов (Ig) А, М, G использовали стандартный набор моноспецифических сывороток против иммуноглобулинов человека и стандартных сывороток с известной концентрацией IgА, IgМ, IgG (ФГБУ «НИИЭМ» им. Н. Ф. Гамалеи, Медгамал, Россия) с помощью метода турбометрии.

Для статистической обработки данных использовали интегрированную систему комплексного анализа BIOSTAT. Экспериментальные данные обрабатывались общепринятыми методами вариационной статистики.

**Результаты и их обсуждения.** В ходе исследования мы выявили отличия сывороточных показателей гуморального звена иммунного ответа между молодыми и старыми экспериментальными животными. У молодых интактных животных концентрация С 3 фрагмента комплемента составила 0,65±0,1% а у старых – 0,45±0,2%. Концентрация Ig А тоже отличалась между двумя возрастными группами и составила у 3-х мес. - 4,9±0,11 г/л и у 22-х мес. – 5,8±0,23 г/л. Сывороточные концентрации Ig М и G не отличались у молодых и старых животных.

Таблица 1.

**Изменение показателей первинного и вторичного иммунитета в сыворотке крови у контрольных животных разного возраста.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Возрастные группы контрольних животных (крысы) | | Сывороточные показатели | | | |
| Концентрация белков системы комплемента, % | Ig A, г/л | Ig M, г/л | Ig G, г/л |
| I | 3-х мес.n=10 | 0,65±0,1 | 4,9±0,11 | 3,2±0,38 | 70,4±1,2 |
| II | 22-х мес.n=10 | 0,45±0,2 | 5,8±0,23 | 3,2±0,38 | 70,7±1,2 |

В группе экспериментальных животных которым вводили антигены *P.aeruginosa*, чем и индуцировали воспалительный процесс выявили отличия показателей гуморального иммунитета по сравнению с контролем.

Таблица 2.

**Изменение показателей первинного и вторичного иммунитета в сыворотке крови у экспериментальных животных разного возраста с моделью воспаления, индуцированного введеним инфекционного антигена *P.aeruginosa*.**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Возрастне группы животных с моделью воспаления, индуцированного *P.aeruginosa***.** | | Изменение концентрации белков системы комплемента, % | Показатели Ig A, г/л | Показатели Ig M, г/л | Показатели Ig G, г/л |
| 3 сутки | | | | | |
| III | 3-х мес.n=10 | 0,49±0,2 | 6,4±0,34\* | 3,7±0,40 | 72,4±1,2 |
| IV | 22хмес.n=10 | 0,51±0,1\* | 6,3±0,33\* | 3,8±0,40 | 73,4±1,3 |
| 5 сутки | | | | | |
| III | 3-х мес.n=10 | 0,48±0,2\* | 3,9±0,10 | 3,7±0,40 | 89,7±3,8\* |
| IV | 22хмес.n=10 | 0,49±0,1 | 4,9±0,31 | 4,1±0,42 | 101,7±5,2\* |
| 7 сутки | | | | | |
| III | 3-х мес.n=10 | 0,49±0,2 | 5,2±0,25 | 4,1±0,42\* | 84,8±3,8 |
| IV | 22хмес.n=10 | 0,46±0,1 | 6,1±0,13 | 4,4±0,44\* | 81,6±3,2 |

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

Как видно из таблицы 2 после внутрибрюшного введения суспензии *P.aeruginosa* объемом 1,5 мл, содержащую 109 КОЕ / мл. выявили достоверные изменения в исследуемых группах экспериментальных животных. У молодых экспериментальных животных концентрация С 3 комплемента была снижена на протяжении всего эксперимента, у старых же животных наоборот этот показатель был выше контрольных значений, на 3 сутки эксперимента был максимальным и составлял – 0,51±0,1%, при контроле 0,45±0,2%.

Концентрация Ig А была сниженной у экспериментальных животных обеих возрастных групп лишь на 5 сутки эксперимента, на 3 и 7 сутки эксперимента уровень Ig А был выше контрольных значений как у старых так и у молодых животных.

Концентрация Ig М у двух возрастных группах животных увеличивалась во все сроки эксперимента (3-7 сутки), а максимальное увеличение показателей мы наблюдали на 7 сутки.

У молодых и старых экспериментальных животных мы выявили достоверные увеличения сывороточных показателей Ig G, особенно на 5 сутки эксперимента Ig G был самым высоким и составлял у 3-х мес. – 89,7±3,8% и у 22-х мес. – 101,7±5,2%.

В таблице 3 представлены результаты после влияния другого инфекционного фактора. После однократного внутрибрюшного введения суспензии *E.coli* экспериментальным животным объемом 1,5 мл, содержащую 109 КОЕ / мл. наблюдали изменения исследуемых показателей различной направленности. Концентрация С 3 фрагмента комплемента была повышена на протяжении всего эксперимента (3-7 сутки) у старых животных на 15% по сравнению с контрольной группой, у молодых животных концентрация С 3 фрагмента комплемента в сыворотке крови была максимально снижена на 5 сутки эксперимента и составляла 0,42 ± 0,2% при контроле 0,65 ± 0,1%.

Таблица 3.

**Изменение показателей первинного и вторичного иммунитета в сыворотке крови у экспериментальных животных разного возраста с моделью воспаления, индуцированного введеним инфекционного антигена *E.coli.***

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Возрастне группы животных с моделью воспаления, индуцированного *E.coli*. | | Изменение концентрации белков системы комплемента, % | Показатели Ig A, г/л | Показатели Ig M, г/л | Показатели Ig G, г/л |
| 3 сутки | | | | | |
| V | 3-х мес.n=10 | 0,55±0,2 | 5,7±0,28 | 3,9±0,40 | 75,3±1,5 |
| VI | 22хмес.n=10 | 0,64±0,1\* | 6,6±0,29 | 4,2±0,42 | 73,6±1,3 |
| 5 сутки | | | | | |
| V | 3-х мес.n=10 | 0,42±0,2\* | 5,9±0,32\* | 5,7±0,50\* | 93,9±4,5\* |
| VI | 22хмес.n=10 | 0,51±0,1 | 5,3±0,10 | 4,9±0,44\* | 97,1±4,7\* |
| 7 сутки | | | | | |
| V | 3-х мес.n=10 | 0,50±0,2 | 5,6±0,31 | 5,1±0,45 | 93,5±4,5\* |
| VI | 22хмес.n=10 | 0,52±0,1 | 7,4±0,58\* | 4,9±0,43\* | 89,6±3,9 |

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

Концентрация Ig А у 22-х месячных старых экспериментальных животных максимально была увеличена на 7 сутки эксперимента и составляла 7,4 ± 0,58 г / л, при контроле 5,8 ± 0,23 г / л.

На всех этапах эксперимента наблюдалось увеличение концентрации Ig М у старых и у молодых экспериментальных животных. Максимальный показатель Ig М выявили на 5 сутки эксперимента у молодых экспериментальных животных, концентрация этого фактора увеличилась до 5,7 ± 0,50 г / л при контроле 3,2 ± 0,38 г \ л.

Сывороточная концентрация Ig G также возрастает во все сроки эксперимента у двух возрастных групп животных, и максимальное увеличение этого показателя выявили на 5 сутки, которое составляло 93,9 ± 4,5 г / л у молодых и 97,1 ± 4,7 г / л у старых экспериментальных животных при контроле 70,7 ± 1,2 г / л.

**Выводы.** Выявленны отличия в формировании звеньев первичного и вторичного иммунитета у молодых и старых животных после действия антигенов *P.aeruginosa* и *E.coli*.

Увеличение концентрации С 3 фрагмента комплемента в сыворотке крови (0,64±0,1%) по сравнению с контролем (0,45±0,2%) выявили у старых экспериментальных животных, у молодых же животных этот показатель был снижен после воздействия антигенов *P.aeruginosa* и *E.coli.* Однако у молодых животных выявили значительное увеличение концентрации Ig М на фоне снижения показателя С3 фрагмента комплемента, очевидно за счет потребления этого гуморального фактора в элиминации антигена. У старых же экспериментальных животных более выраженными были реакции вторичного изменение иммунитета (концентрация Ig G 101,7±5,2 г/л при контроле 70,7±1,2 г/л), возможно за счет гуморального звена иммунного ответа.

**Перспективность исследования.** Реактивность показателя первичного звена иммунитета после внутрибрюшинного введения различных антигенов у старых животных была более выраженной, чем у молодых животных. Возможно это связано с приобретённым адаптивным иммунитетом у старых экспериментальных животных.В ответ на факторы внешней среды (инфекционные антигены *P.aeruginosa* и *E.coli*) адаптивные реакции, определяющие резистентность организма имеют разную стратегию в зависимости от возраста и нуждаются в дальнейшем исследовании.

**Список литературы**

1. Терехин А.Т., Будалова Е.В. Сетевые механизмы физиологической регуляции// Математика и реальность: конфронтация строгости и сложности. М.: Солитон, 2012. - С. 224-257.

2. Hirokawa K., Utsuyama M. Animal models and possible human application of immunological restoration in the elderly // Mech. Ageing Dev. — 2002. — Vol 123. — P. 1055–1063.

3. Кузнецова Л.Н. Участие системы комплемента в регуляции организма человека // Аспирант и соискатель. - 2003. - N 2. - С. 218-221.

4. Кузнецова Л.Н. Участие иммуноглобулинов в регуляции процессов организма // Естественные и технические науки. - 2003. - N 2.- С. 86-87.

5. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения // СПб. : Наука. – 2003. – 468 с.

6. Божков А. И. Эпигенотип, принципы современной организации метаболизма и старения // Проблемы старения и долголетия. - 2010. - Т. 19. - N 3. - С. 223-224.

7. Божков А. И., Климова Е. М., Дмитриев Ю. В., Длубовская В. Л. Реакция иммунной системы крыс разного возраста на сдерживающие рост диеты. «Пробл. Старения и долголетия», 2006. - Т.15. - N 2. – С. 93-103.

8. Bozhkov A. I., Nikitchenko Yu. V. Caloric Restriction Diet Induces Specific Epigenotypes Associated with Life Span Extension // Journal of Nutritional Th

erapeutics. 2013. - Vol. 2, N 1. P. 30-39.

9. Оценка клеточных и гуморальных факторов иммунорезистентности на экспериментальной модели воспалительного процесса у животных разного возраста / Т.И. Коваленко, Е.М. Климова, В.В. Минухин, А.Н. Агаркова. Журнал «Лабораторная диагностика» N4(70). - 2014. - С.36-41.

**Формирование гуморального ответа после действия антигенов P.aeruginosa и Е.coli** **у экспериментальных животных разного возраста.**

**Коваленко Татьяна Игоревна**

**Харковский национальный медицинский университет**

Охарактеризованы отличия реакций гуморального звена иммунитета у экспериментальных животных разного возраста контрольной группы и после действия инфекционных антигенов *P.aeruginosa* и *Е.coli*. У контрольных животных двух возрастных групп отличались только показатели С 3 фрагмента комплемента и концентрация Ig А. После индукции воспаления антигенами*P.aeruginosa* и *Е.coli* у старых экспериментальных животных содержание С 3 фрагмента комплемента в сыворотке крови было более выраженным, а у молодых животных этот показатель был снижен на 10%. У молодых животных изменение вторичного иммунитета характеризовалось более значительным повышением Ig М на воздействие инфекционных антигенов.

**Ключевые слова:** первичный и вторичный гуморальный иммунитет, *P.аeruginosa* и *Е.coli*, возрастные категории экспериментальных животных.

**Формування гуморальної відповіді після дії антигенів P.aeruginosa і Е.coli у експериментальних тварин різного віку.**

**Коваленко Тетяна Ігорівна**

**Харківський національний медичний університет**

Охарактеризованні відмінності реакцій гуморального ланки імунітету у експериментальних тварин різного віку контрольної групи та після дії інфекційних антигенів P.aeruginosa і Е.coli. У контрольних тварин двох вікових груп відрізнялися лише показники С 3 фрагмента комплементу і концентрація Ig А. Після індукції запалення антигенами P.aeruginosa і Е.coli у старих експериментальних тварин вміст С 3 фрагмента комплементу в сироватці крові був більш вираженим, а у молодих тварин цей показник був знижений на 10%. У молодих тварин зміна вторинного імунітету характеризувалося більш значним підвищенням Ig М на дію інфекційних антигенів.

**Кючові слова:** первинний і вторинний гуморальний імунітет, *P.аeruginosa* і *Е.coli*, вікові категорії експериментальних тварин.

**Formation of the humoral response after the action of P.aeruginosa and E. coli antigens in experimental animals of different ages.**

**Kovalenko Tatiana Igorevna**

**Kharkiv National Medical University**

Сharacterized the differences between the reactions of humoral immunity in experimental animals of different ages сontrol groups and after exposure of infectious antigens *P.aeruginosa* and *E.coli*. Only indicators of complement fragment C 3 and the concentration of Ig A differed in control animals of the two age groups. After induction of inflammation of antigens *P.aeruginosa* and *E.coli* antigens in old experimental animals content C3 fragment of complement in blood serum was more pronounced than in younger experimental animals. And its rate was reduced by 10%. In young animals change of secondary immunity characterized by a significant increase in Ig M to impact infectious antigens.

**Key words :** primary and secondary humoral immunity, *P.aeruginosa* and  *E. coli*, ages inflammation experimental animals.

Коваленко Татьяна Игоревна.

Харьковский национальный медицинский университет. Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии.

Ассистент.

г. Харьков, Московский район, пос. Кирова, ул. Планетная, дом 18.

дом. 710-64-95, моб. 096-291-85-23.

tasja.80@mail.ru