

УДК 612.017.062:[615.849.114+616.594.171.2]

*О.Н. Коляда, Н.А. Клименко*

*Харьковский национальный медицинский университет*

## **ВЛИЯНИЕ ФРАКЦИОНИРОВАННОГО РЕНТГЕНОВСКОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКТИВНОСТИ КРЫС НА МОДЕЛИ ОСТРОГО ГЕНЕРАЛИЗОВАННОГО КАНДИДОЗА**

В эксперименте на крысах на модели острого диссеминированного кандидоза показано депрессивное воздействие выбранного режима облучения на противоифекционную защиту: угнетение фагоцитарной активности макрофагов и нейтрофилов, повышение уровня циркулирующих иммунных комплексов, снижение клеточной активности сыворотки крови, углубление дисбаланса цитокинов.

**Ключевые слова:** фракционированное рентгеновское излучение, диссеминированный кандидозный сепсис, антиинфекционная резистентность.

Известно, что при воздействии ионизирующего излучения нарушения в организме касаются в первую очередь критических органов и систем, в том числе клеточного и гуморального иммунитета. В связи с этим исследование влияния ионизирующего излучения на состояние иммунной системы представляет особую важность. Известно, что разные типы клеток иммунной системы по-разному реагируют на воздействие ионизирующего излучения. Изменения экспрессии поверхностных молекул и секреции цитокинов между клетками иммунной системы сопровождаются индукцией соответствующих генов и экспрессией белков [1–4].

По данным, касающимся параметров иммунной системы при воздействии ионизирующего излучения в зависимости от дозы и особенностей влияния радиации, пришли к заключению, что в целом ответная реакция биологических объектов представляет собой сложный процесс [5].

На фоне скомпрометированной иммунологической реактивности развивается патологическое функционирование защитных систем, когда механизмы компенсации не сработали из-за определенных причин, и система, оказавшись несбалансированной, не может адекватно реагировать на чужеродное, что приводит к генерализации или хронизации процесса. Важный теоретический и практический интерес представляет вопрос об особенностях радиационно индуцированных изменений иммунологической

реактивности, которые составляют патогенетическую основу развития аутоиммунных и инфекционных процессов [6].

Можно допустить, что индукция длительного изменения иммунореактивности будет иметь определенные последствия в условиях функциональной нагрузки механизмов специфического иммунного ответа, поэтому целесообразным является изучение ряда патогенетических механизмов нарушений антиинфекционной резистентности под влиянием фракционированного рентгеновского излучения [7].

Целью нашего исследования было определение состояния антиинфекционной резистентности под влиянием фракционированного рентгеновского излучения на модели острого генерализованного кандидоза крыс линии Вистар.

**Материал и методы.** Опыты проведены на 114 крысах-самцах линии Вистар массой 180–200 г. Фракционированное тотальное облучение самцов крыс проводили ежедневно по 0,5 Gy в течение 3 суток (суммарная доза 1,5 Gy). Инфицирование животных проводили с применением штамма *Candida albicans* ATCC 885-653 0,5 мл в концентрации  $5 \cdot 10^6$  КОЕ/мл на протяжении первых суток после прекращения облучения. Животные были распределены на четыре группы: I — облученные крысы; II — инфицированные крысы; III — облученные и инфицированные крысы; IV — интактные крысы. Исследование проводили в динамике на

© О.Н. Коляда, Н.А. Клименко, 2011

1-е, 2-е, 3-и, 10-е, 17-е, 28-е сутки после облучения.

В качестве тестов использовали фагоцитарную активность перитонеальных нейтрофилов и макрофагов по отношению к *Candida albicans*: процент фагоцитирующих клеток — фагоцитарный индекс (ФИ) и количество поглощенных ими микробных частиц — фагоцитарное число (ФЧ). Уровень циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), комплементарную активность сыворотки крови (СН<sub>50</sub>, гем. ед.), концентрацию цитокинов IFN-γ, IL-4, IL-10, IL-17 определяли с использованием диагностических тест-систем (ELISA kit, Biosources, San Jose, CA, USA) [8].

Статистическую обработку данных проводили с использованием программы Bio-stat 4.0 для Windows.

**Результаты и их обсуждение.** После облучения крыс линии Вистар в выбранном режиме наблюдалась тенденция к снижению фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов и нейтрофилов на протяжении первых десяти суток (табл. 1). Так, минимальное количество фагоцитирующих макрофагов (ФИ мф) облученных крыс составляло на 10-е сутки (41,7±3,9) % при показателе у интактных крыс (52,8±5,1) % (p<0,01). Достоверное снижение поглотительной способности (ФЧ мф) выявлено уже на 3-и сутки, когда ФЧ мф составлял (3,9±0,3) ед., а на 10-е сутки — (3,2±0,4) ед. против (9,5±0,8) ед. у интактных крыс (p<0,01).

Отмечается статистически достоверное снижение фагоцитарной активности перитонеальных нейтрофилов: на 3-и сутки

ФИ нф составлял (53,6±4,4) %, ФЧ нф — (5,7±2,3) ед., на 10-е сутки ФИ нф — (44,7±4,1) %, ФЧ нф — (5,2±0,4) ед. К 17-м и 28-м суткам эксперимента указанные показатели восстанавливались до контрольных.

Недостаточный уровень функционирования отразился и на механизмах элиминации патогена, что проявилось в повышении уровня циркулирующих иммунных комплексов с достоверным максимумом на 3-и [(97,8±9,6) МЕ], 10-е [(95,0±4,5) МЕ] и 17-е сутки [(110,5±15,3) МЕ] относительно показателя у крыс интактной группы [(85,0±5,3) МЕ].

Колебания комплементарной активности сыворотки крови в течение всего периода наблюдений имели лишь характер тенденций и были статистически недостоверными по сравнению с данными у крыс интактной группы, за исключением показателя на 3-и сутки — (74,3±7,6) гем. ед. против (96,6±8,1) гем. ед. (p<0,01).

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, существенных различий уровня цитокинов у облученных крыс и интактных животных на протяжении всего эксперимента отмечено не было. Исключением явилось снижение уровня IFN-γ до (10,6±6,6) пг/мл на 3-и сутки против (20,3±8) пг/мл у интактных крыс, а для IL-4 пик угнетения наблюдался на 10-е сутки — соответственно (21,1±5,9) и (35,8±4,2) пг/мл.

Представленные результаты о влиянии фракционированного тотального рентгеновского излучения свидетельствуют о признаках функциональной декомпенсации неспецифической реактивности у облученных животных. При дополнительной функцио-

Таблица 1. Влияние фракционированного тотального рентгеновского излучения на показатели иммунологической реактивности самцов крыс линии Вистар (M±m)

Показатель	Контроль	Сутки эксперимента					
		1-е	2-е	3-и	10-е	17-е	28-е
ФИ мф, %	52,8±5,1	48,6±4,2	43,2±9,6	46,8±4,5	41,7±3,9 <sup>#</sup>	49,3±2,3	51,9±4,7
ФЧ мф, ед.	9,5±0,8	9,1±0,7	8,3±1,2	3,9±0,3 <sup>#</sup>	3,2±0,4 <sup>#</sup>	7,7±1,3	8,5±0,9
ФИ нф, %	62,8±5,4	57,4±6,1	55,8±8,3	53,6±4,4 <sup>#</sup>	44,7±4,1 <sup>#</sup>	57,6±5,9	60,4±4,2
ФЧ нф, ед.	8,5±0,9	7,3±1,2	6,8±2,3	5,7±2,3 <sup>*</sup>	5,2±0,4 <sup>#</sup>	7,4±1,5	8,3±1,3
ЦИК, МЕ	85,0±5,3	91,3±10,1	96,2±12,6	97,8±9,6 <sup>*</sup>	95,0±4,5 <sup>#</sup>	110,5±15,3 <sup>*</sup>	87,2±5,4
Комплемент, гем. ед.	96,6±8,1	85,6±9,2	78,9±17,9	74,3±7,6 <sup>#</sup>	94,8±8,1	88,9±10,2	94,7±6,9
IFN-γ, пг/мл	20,3±8,5	18,8±6,7	16,4±7,2	10,6±6,6 <sup>*</sup>	16,1±5,3	19,6±5,4	23,8±7,7
IL-4, пг/мл	35,8±4,2	32,6±4,7	29,7±5,8	29,1±6,7	21,1±2,6 <sup>#</sup>	32,6±4,3	33,2±5,1

Примечание. Различия достоверны при сравнении с показателем группы животных, не подвергавшихся облучению: \* p<0,05; # p<0,01.

нальной нагрузке, в качестве которой нами выбрана модель экспериментального диссеминированного кандидозного сепсиса, возрастает функциональный дефект антиинфекционной резистентности различной степени выраженности.

Как видно из данных, приведенных в табл. 2, в группе необлученных животных, которым моделировали генерализованный кандидозный сепсис (II группа), наблю-

поглотительной активности фагоцитов, так и их количества у необлученных крыс на фоне диссеминированной кандидозной инфекции в течение первых десяти дней. Относительная недостаточность активации фагоцитоза нейтрофилов наблюдалась у облученных и инфицированных животных (III группа) относительно аналогичных показателей у необлученных инфицированных крыс (II группа).

Таблица 2. Влияние фракционированного тотального рентгеновского излучения на модели острого

Группа крыс	Срок эксперимента, сутки	ФИ мф, %	ФЧ мф, ед.	ФИ нф, %
II (инфицированные)	1-е	69,6±7,2 <sup>#</sup>	11,3±2,6	69,8±3,5 <sup>#</sup>
	2-е	75,4±8,3 <sup>#</sup>	12,5±1,8 <sup>#</sup>	76,8±8,5 <sup>#</sup>
	3-и	91,2±11,1 <sup>#</sup>	14,8±2,3 <sup>#</sup>	83,4±8,1 <sup>#</sup>
	10-е	74,7±7,1 <sup>#</sup>	13,4±1,5 <sup>#</sup>	73,4±6,5 <sup>#</sup>
	17-е	57,8±6,1	15,7±1,6 <sup>#</sup>	69,5±6,8
	28-е	40,3±4,3 <sup>#</sup>	9,1±0,8	58,1±5,7
III (облученные и инфицированные)	1-е	37,4±5,6 <sup>*#</sup>	4,2±0,7 <sup>*#</sup>	61,8±7,3 <sup>*</sup>
	2-е	53,2±6,9 <sup>*</sup>	5,9±1,2 <sup>*#</sup>	70,7±6,6 <sup>*#</sup>
	3-и	57,1±7,4 <sup>*</sup>	6,8±1,5 <sup>*#</sup>	79,7±8,2 <sup>*#</sup>
	10-е	55,8±4,6 <sup>*</sup>	7,4±0,6 <sup>*#</sup>	65,4±5,6 <sup>*</sup>
	17-е	49,7±5,4 <sup>*</sup>	7,9±0,9 <sup>*#</sup>	62,2±6,4
	28-е	47,3±4,7 <sup>*</sup>	8,2±0,6 <sup>*#</sup>	51,4±5,5 <sup>*#</sup>
IV (интактные)		52,8±5,1	9,5±0,8	62,8±5,4

Примечание.  $p < 0,05$ ; различия достоверны при сравнении с показателем: \* инфицированных

далась резкая активация фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов по сравнению с таковой у крыс интактной группы на протяжении 17 суток эксперимента и достигла максимума для ФИ на 3-и сутки [(91,2±11,1) %], а для ФЧ — на 17-е [(15,7±1,6) ед.]. В группе облученных и инфицированных животных (III группа) наблюдалось уменьшение процента активных макрофагов с первых же суток наблюдения относительно показателя у необлученных инфицированных крыс (II группа). Еще более заметными были изменения со стороны поглотительной способности макрофагов, показатели которых были ниже показателей не только группы сравнения (II группы) — (4,2±0,7) ед. против (11,3±2,6) ед., но и группы интактных животных — (4,2±0,7) ед. против (9,5±0,8) ед.

Аналогичная динамика прослеживалась и для функциональной активности нейтрофилов: закономерное нарастание как

На фоне диссеминированного кандидозного сепсиса у необлученных инфицированных животных наблюдалось увеличение уровня циркулирующих иммунных комплексов со 2-х суток и на протяжении всего периода наблюдения. У облученных и инфицированных крыс наблюдалось статистически значимое отличие уровня циркулирующих иммунных комплексов от показателя группы сравнения с максимальными значениями на 10-е и 17-е сутки, что связано с нарушением функции элиминации со стороны фагоцитарных клеток и системы комплемента. Так, на 10-е сутки в III группе облученных и инфицированных животных уровень циркулирующих иммунных комплексов составил (154,0±7,1) МЕ, во II группе необлученных инфицированных крыс — (131,0±8,4) МЕ, а в IV группе интактных крыс — (85,0±5,3) МЕ.

Комплементарная активность сыворотки крови снижалась в обеих группах инфици-

цированных животных за счет усиленного потребления на фоне, возможно, накопления циркулирующих иммунных комплексов, а также элиминации патогена по альтернативному пути. Минимальные значения комплемента наблюдались на 10-е сутки эксперимента и составляли (39,8±2,9) гем. ед. в III группе, (58,8±4,7) гем. ед. во II группе и (96,6±8,1) гем. ед. в группе интактных крыс.

нее выраженным: на 3-и сутки содержание IL-4 составило (92,1±10,3) пг/мл, на 10-е — (57,91±3,3) пг/мл.

Таким образом, фракционированное тотальное рентгеновское облучение самцов крыс линии Вистар привело к относительной недостаточности фагоцитарной функции макрофагов и нейтрофилов, что проявилось в повышении уровня циркулирующих иммунных комплексов и усилении по-

*на показатели иммунологической реактивности самцов крыс линии Вистар диссеминированного кандидоза (M±m)*

ФЧ нф, ед.	ЦИК, МЕ	Комплемент, гем. ед.	IFN-γ, пг/мл	IL-4, пг/мл
10,8±1,6 <sup>#</sup>	88,0±9,3	91,4±8,7	95,8±25,2 <sup>#</sup>	90,5±10,5 <sup>#</sup>
13,3±1,8 <sup>#</sup>	97,0±8,8 <sup>#</sup>	74,3±7,8 <sup>#</sup>	176,4±91,7 <sup>#</sup>	99,1±12,2 <sup>#</sup>
14,1±1,7 <sup>#</sup>	110,0±10,5 <sup>#</sup>	62,6±6,9 <sup>#</sup>	426,2±212,8 <sup>#</sup>	148,3±16,4 <sup>#</sup>
12,4±1,4 <sup>#</sup>	131,0±8,4 <sup>#</sup>	58,8±4,7 <sup>#</sup>	181,7±48,9 <sup>#</sup>	102,1±2,5 <sup>#</sup>
9,2±1,1	142,0±13,2 <sup>#</sup>	68,7±7,8 <sup>#</sup>	23,8±16,4	88,4±3,6 <sup>#</sup>
8,8±0,7	105,0±9,4 <sup>#</sup>	89,4±9,4	7,5±4,5 <sup>#</sup>	62,3±6,6 <sup>#</sup>
9,8±1,2	105,0±9,8* <sup>#</sup>	78,1±8,1* <sup>#</sup>	47,7±19,7* <sup>#</sup>	51,4±14,5* <sup>#</sup>
10,1±1,0* <sup>#</sup>	129,0±11,6* <sup>#</sup>	63,5±6,6* <sup>#</sup>	78,7±49,6* <sup>#</sup>	85,6±6,4* <sup>#</sup>
11,4±1,3* <sup>#</sup>	145,0±14,9* <sup>#</sup>	54,4±5,4* <sup>#</sup>	99,5±24,9* <sup>#</sup>	92,1±10,3* <sup>#</sup>
7,2±0,7* <sup>#</sup>	154,0±7,1* <sup>#</sup>	39,8±2,9* <sup>#</sup>	116,6±30,9* <sup>#</sup>	57,9±3,3* <sup>#</sup>
10,4±0,9* <sup>#</sup>	166,0±15,7* <sup>#</sup>	48,5±5,6* <sup>#</sup>	85,6±23,9* <sup>#</sup>	82,7±2,5* <sup>#</sup>
9,3±0,5	149,0±16,9* <sup>#</sup>	69,7±7,7* <sup>#</sup>	63,8±26,3* <sup>#</sup>	79,3±7,1* <sup>#</sup>
8,5±0,9	85,0±5,3	96,6±8,1	20,3±8,5	35,8±4,2

животных, не подвергавшихся облучению (II группы); <sup>#</sup> интактных крыс (IV группы).

При исследовании уровней цитокинов IFN-γ и IL-4 (табл. 2) были определены различия в процессах индукции Th-эффекторных механизмов в формировании специфического иммунного ответа у крыс различных групп. Если у необлученных животных на фоне кандидозного сепсиса уровень IFN-γ прогрессивно увеличивался на протяжении первой недели с максимальными значениями на 3-и сутки (426,2±212,8) пг/мл, на 10-е — (181,7±48,9) пг/мл, то у облученных крыс увеличение уровня IFN-γ было менее выраженным — соответственно (99,5±24,9) и (116,6±30,9) пг/мл.

Что касается динамики уровня IL-4, то у необлученных животных на фоне кандидозного сепсиса данный показатель также прогрессивно увеличивался на протяжении первой недели с максимальными значениями на 3-и сутки — (148,3±16,4) пг/мл, на 10-е — (102,1±2,5) пг/мл. В группе облученных крыс увеличение уровня IL-4 было ме-

требления комплемента в данный период наблюдений. На фоне инфекционного процесса функциональная декомпенсация неспецифической реактивности у облученных крыс нарастала, что усугубило имеющийся дисбаланс в цитокиновом соотношении IFN-γ/IL-4, и может привести к негативным последствиям — диссеминации процесса и усугублению клинической картины.

**Выводы**

1. Фракционированное тотальное облучение самцов крыс линии Вистар привело к угнетению фагоцитарной активности макрофагов и нейтрофилов, повышению уровней циркулирующих иммунных комплексов и снижению комплементарной активности сыворотки крови.

2. У необлученных животных на фоне кандидозного сепсиса концентрации цитокинов IL-4 и IFN-γ прогрессивно нарастали на протяжении первой недели. В группе облученных крыс их повышение было менее

выраженным, что, вероятно, указывает на депрессивное воздействие выбранного режима облучения на противоионфекционную защиту.

3. У облученных и инфицированных крыс наблюдались гораздо более высокие уровни циркулирующих иммунных комплексов, чем у необлученных животных, что связано с нарушением функции элиминации со стороны фагоцитарных клеток и системы комплемента.

#### Список литературы

1. Augmentation of innate immunity by low-dose irradiation / H. Ren, J. Shen, C. Tomiyama-Miyaji [et al.] // Cell. Immunol. — 2006. — V. 244, № 1. — P. 50–56.
2. Kojima S. Induction of glutathione and activation of immune functions by low-dose, whole-body irradiation with gamma-rays / S. Kojima // Yakugaku Zasshi. — 2006. — V. 126, № 10. — P. 849–857.
3. Inhibition of the iNOS pathway in inflammatory macrophages by low-dose X-irradiation in vitro / G. Hildebrandt, G. Loppnow, J. Jahns [et al.] // Strahlentherapie und Onkologie. — 2003. — V. 179, № 3. — P. 158–166.
4. Gamma-ray irradiation impairs dendritic cell migration to CCL19 by down-regulation of CCR7 and induction of cell apoptosis / Cong Liu, Jin Lin, Luqian Zhao [et al.] // Internat. J. Biological Sciences. — 2011. — V. 7 (2). — P. 168–179.
5. Shu-Zheng Liu. Nonlinear dose-response relationship in the immune system following exposure to ionizing radiation: mechanisms and implications / Shu-Zheng Liu // Nonlinearity in Biology, Toxicology, and Medicine. — 2003. — V. 1, № 1. — P. 71–92.
6. Radiobiological mechanisms in inflammatory diseases of low-dose radiation therapy / F. Radel, L. Keilholz, M. Herrmann [et al.] // Int. J. Radiat. Biol. — 2007. — V. 83, № 6. — P. 357–366.
7. Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal *Candida albicans* / P. Bonifazi, T. Zelante, C. D'Angelo [et al.] // Mucosal. Immunol. — 2009. — V. 2, № 4. — P. 362–374.
8. Караулов А. В. Клиническая иммунология / А. В. Караулов. — М. : Мед. информ. агентство, 1999. — 650 с.

*О.М. Коляда, М.О. Клименко*

#### ВПЛИВ ФРАКЦІОНОВАНОГО РЕНТГЕНІВСЬКОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ПОКАЗНИКИ ІМУНОЛОГІЧНОЇ РЕАКТИВНОСТІ ЩУРІВ НА МОДЕЛІ ГОСТРОГО ДИСЕМІНОВАНОГО КАНДИДОЗУ

В експерименті на щурах на моделі гострого дисемінованого кандидозу показано депресивний вплив обраного режиму опромінення на антиінфекційний захист: пригнічення фагоцитарної активності макрофагів і нейтрофілів, збільшення рівня циркулюючих імунних комплексів, зниження комплементарної активності сироватки крові, поглиблення дисбалансу цитокінів.

**Ключові слова:** фракціоноване рентгенівське випромінювання, дисемінований кандидозний сепсис, антиінфекційна резистентність.

*О. N. Kolyada, N. A. Klimenko*

#### INFLUENCE OF FRACTIONATED X-RAY RADIATION ON INDICATORS OF IMMUNE RESISTANCE OF THE RATS ON MODEL OF ACUTE DISSEMINATED CANDIDOSIS

In the experiment on rats on the model of acute disseminated *Candida* infection it has been shown the depressive effects of radiation on the anti-infectious defense: inhibition of phagocytic activity of macrophages and neutrophils, increased of circulating immune complexes level, decreased of complement activity of blood serum, a deepening of cytokines imbalance.

**Key words:** fractionated X-ray radiation, disseminated *Candida* infection, anti-infectious resistance.

Поступила 14.10.11