

РІВЕНЬ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ІМУННИХ КОМПЛЕКСІВ ПРИ ДЕРМАТИТАХ РІЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У ЩУРІВ

Національний фармацевтичний університет

(м. Харків)

Зв'язок роботи з НДР університету: робота виконана в рамках науково-дослідної програми Національного фармацевтичного університету «Фармакологічні дослідження біологічно-активних речовин і лікарських засобів синтетичного та природного походження, їх застосування в медичній практиці», № держ. реєстрації 0103U000478.

Вступ. Поява у сироватці крові циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) може бути пов'язана як з порушенням циркуляції крові в ураженій ділянці, так і опосередкована імунокомпетентними клітинами. В нормі імунні комплекси, що утворилися в кровотоці, фагоцитуються та руйнуються [1]. Посиленню продукції ЦІК в сироватці крові тварин можуть сприяти порушення в системній та локальній імунній відповіді [11]. Рівень ЦІК в сироватці крові є одним із діагностичних тестів для визначення ступеню важкості та активності імунопатологічного процесу, а також є важливим фактором при оцінці ефективності проведеного лікування [4].

Мета роботи – дослідити рівень циркулюючих імунних комплексів в сироватці крові щурів при дерматитах різної етіології та визначити їх роль в патогенезі захворювання.

Об'єкт і методи дослідження. Експерименти виконані на 30 нелінійних щурах-самцях, масою 180,0-200,0 г, поділених на 3 групи: перша група – інтактний контроль, друга – щури з контактним дерматитом, третя – тварини з алергічним дерматитом.

Для моделювання контактного дерматиту (КД) [3] тваринам на депільовану ділянку шкіри спини розміром 3x3 см² щодня, протягом 10 днів, наносили по п'ять крапель живичного скипидару, який потім ретельно втирали у шкіру за допомогою скляної палички. На 10-й день експерименту у тварин стан шкірного покрыву оцінювали в балах, за ступенем розвитку дерматиту: 0 балів – видимих ушкоджень не спостерігалось; 1 бал – слабо виражена гіперемія з дрібнолускатим пошархненням; 2 бали – помірно виражена гіперемія, злущення, точкові крововиливи; 3 бали – виражена гіперемія, виразки шкіри; 4 бали – різка еритема з явищами геморагій, вираженою інфільтрацією, виразками.

Алергічний дерматит (АД) викликали у щурів, сенсibilізованих за методом Залкан П. М. [5]

2,4-дінітрохлорбензолом (ДНХБ). 3 краплі 5% розчину ДНХБ одноразово у вигляді аплікації наносили на місце сенсibilізації (поверхня спини) з додатковим нанесенням на 7 інших ділянок шкіри по 1 краплі 1% розчину. У розвитку сенсibilізації у щурів за клінічною та морфологічною картиною шкіри розрізняли 2 етапи. Перший етап – первинно-контактна реакція (через 24 години) у вигляді обмеженого набряку та гіперемії. Ця реакція має риси неспецифічного запалення з деякими ознаками початку розвитку сенсibilізації. Другий етап (на 8 добу) – спонтанна запальна реакція (реакція спалахування) з тотальним некрозом епідермісу та утворенням великих субепідермальних міхурів. Ця реакція розвинулася на імунній основі та обов'язковим компонентом при цьому була інфільтрація з наявністю базофілів. Про важкість алергічного дерматиту судили за загальним станом та поведінкою тварин, оцінювали за теми ж балами, що і контактний дерматит.

Циркулюючі імунні комплекси виділяли за допомогою преципітації з поліетіленгліколем 6000 (PEG) при кінцевій концентрації у 3,5%. Преципітація ЦІК у вказаній концентрації PEG дозволяє визначити рівень середньомолекулярних комплексів, які вважаються найбільш патогенними [7, 9]. Визначення рівня ЦІК в сироватці крові кожної тварини (в розрахунок на 100 мкл) проводили спектрофотометрично (СФ-46) при довжині хвилі 450нм.

Рівень функціональної активності перитонеальних макрофагів та спленоцитів (респіраторний вибух (РВ)) визначали за здатністю відновлювати нітросиній тетразолій (НСТ) за стандартною методикою [10]. Для цього отримані клітини вносили у 96-луночний планшет в кількості 1x10⁵ в лунку. В дослідні проби для визначення спонтанної активності клітин вносили 0,1 мл 0,2% нітросинього тетразоля (НСТ), після чого клітини інкубували 1 годину при 37°C в присутності 5% CO₂. Після інкубації суспензію клітин центрифугували 10 хв. при 1000 об/хв. Надосадову рідину видаляли і до осаду додавали 0,2 мл метанолу. Повторно центрифугували за подібними умовами. Потім, після видалення надосадової рідини, у всі лунки додавали 0,1 мл 0,1н КОН та 0,1 мл ДМСО. Оптичну щільність формазама, що утворився, визначали на спектрофотометрі (СФ-46)

Таблиця
Рівень середньомолекулярних ЦІК в сироватці крові тварин з дерматитами (M ± m)

Показник	Групи тварин		
	Інтактні шури (контроль)	Щури з контактним дерматитом	Щури з алергічним дерматитом
Рівень ЦІК (ум. од. /100 мкл сироватці)	0,06 ± 0,01	0,09 ± 0,01*	0,13 ± 0,02*

Примітка: * – $p < 0,05$ у порівнянні з інтактними контролем, $n = 10$ в кожній групі тварин.

при довжині хвилі 540 нм. Спонтанну активність перитонеальних макрофагів і спленоцитів виражали в умовних одиницях.

Усі дослідження проводили у відповідності з національними «Загальноетичними принципами експериментів на тваринах» (Україна, 2011), які узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), та схвалені 1-им Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Усі маніпуляції, які викликали біль, проводили під барбаміловим наркозом [2].

Статистичну обробку даних здійснювали за допомогою пакета програм Statistica for Windows 6. 0 з використанням t-критерію Ст'юдента та кореляційного аналізу [8]. Результати вважали дійсними при $p < 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведених досліджень було визначено достовірне збільшення рівня загальних ЦІК у щурів обох експериментальних груп в порівнянні з групою інтактного контролю: в 1,5 рази у тварин з

контактним дерматитом і в 2,2 рази у щурів з алергічним дерматитом (табл.).

Відомо, що ЦІК можуть відкладатися у периваскулярний простір, корковий шар наднирників, шкіру, інші органи та викликати активацію комплементу і запальні процеси [6]. Патологічні реакції на імунні комплекси обумовлені перевищенням швидкості їх утворення над швидкістю елімінації, дефіцитом одного або декількох компонентів комплементу, або функціональними дефектами фагоцитарної системи. Нас цікавила система фагоцитозу. Тому, наступним етапом наших експериментів було визначення рівня функціональної активності фагоцитів (перитонеальних макрофагів і спленоцитів).

Як видно із наведених даних (рис.), рівень спонтанної активності перитонеальних макрофагів був підвищений на 30,1% у щурів з контактним дерматитом і на 85% ($p < 0,05$) у щурів з алергічним дерматитом, тобто в 2,82 рази.

Отримані результати прямо корелювали з рівнем середньомолекулярних ЦІК в сироватці крові. При визначенні фагоцитуючої активності спленоцитів різниці між експериментальними групами і групою інтактного контролю не виявлено. Це свідчить про те, що рівень фагоцитуючої активності спленоцитів зворотно пропорційно рівню середньомолекулярних ЦІК в сироватці крові (табл., рис.) та може служити діагностичним критерієм при визначенні важкості захворювання і ефективності лікування, що проводиться.

Підвищення рівня ЦІК в крові більш ніж в 2 рази, за даними літератури, має велике значення в патогенезі захворювання: вони відкладаються в стінках мікросудин, активують систему комплементу за альтернативним шляхом, та тому сприяють підвищенню порозності мікросудин і порушенням мікрогемодинамики [7]. Це є несприятливою обставиною, оскільки підвищують ймовірність подальшого прогресування патологічного процесу, який потребує

своєчасного призначення раціональної фармакотерапії.

Висновки.

1. Значне підвищення рівня циркулюючих імунних комплексів в крові у щурів з алергічним дерматитом в 2,2 рази свідчить про виразну сенсibiliзацію організму тварин.

2. Виявлена прямопропорційна залежність між рівнем циркулюючих імунних комплексів і рівнем спонтанної активності перитонеальних макрофагів при алергічному дерматиті.

3. Визначення фагоцитуючої активності спленоцитів при дерматитах не має діагностичного значення.

Перспективи подальших наукових досліджень: поглиблене вивчення механізмів порушення імунної системи при алергічних захворюваннях.



Рис. Рівень спонтанної активності перитонеальних макрофагів і спленоцитів щурів, визначений за включенням нітросинього тетразолія.

Література

1. Абелев Г. И. Основы иммунитета / Г. И. Абелев // Сорковский образовательный журнал. – 1996. – № 5. – С. 4-10.
2. Біотична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах: метод. рекомендації / О. Г. Резніков, А. І. Соловійов, Н. В. Добреля, О. В. Стефанов // Вісник фармакології та фармації. – 2006. – № 7. – С. 47-61.
3. Вивчення протизапальної активності мазі з амікацином на моделі скипидарного дерматиту у щурів / С. М. Дроговоз, О. В. Доровський, Я. О. Бутко, А. В. Горкавчук // Ліки. – 2006. – № 3-4. – С. 43-46.
4. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология и аллергология: пособие / Г. Н. Дранник. – К.: Полиграф плюс, 2010. – 547 с.
5. Залкан П. М. Влияние синтетических моющих средств на реактивность кожи морских свинок / П. М. Залкан, Е. А. Иевлева // Актуальные вопросы дерматологии. – М., 1965. – С. 106-112.
6. Фролов В. М. Диагностическое и прогностическое значение циркулирующих иммунных комплексов у больных / В. М. Фролов, Н. А. Пересадин, П. К. Бойченко // Врачебное дело. – 1990. – № 6. – С. 116-118.
7. Фролов В. М. Циркулирующие иммунные комплексы и фагоцитарная активность моноцитов у больных хроническим бронхитом при проведении дифференцированной иммунокоррекции / В. М. Фролов, Я. А. Соцкая // Укр. пульмонологічний журнал. – 2003. – № 3. – С. 28-30.
8. Юнкеров В. И. Математико-статистическая обработка данных медицинских исследований / В. И. Юнкеров, С. Т. Григорьев. – СПб.: ВМедА, 2005. – 292 с.
9. Chose T. Localization of immunoglobulin and complement in pulmonary sarcoid granulomas / T. Chose, P. Landigan, A. Asif // Chest. – 1974. – Vol. 66. – P. 264.
10. Muller L. R. Nitroblue tetrazolium reduction in monocytes and monocyte derived macrophages / L. R. Muller, A. Rollag, S. S. Froland // Immun. Today. – 1989. – Vol. 97. – P. 490-496.
11. Systemic Inflammation in Asthma and COPD // T. Wouters, K. Reynaert, K. Dentener et al. // Proc. Am. Thorac. Soc. – 2009. – Vol. 6. – P. 638-647.

УДК 616. 831-005-599. 323

РІВЕНЬ ЦИРКУЛЮЮЧИХ ІМУННИХ КОМПЛЕКСІВ ПРИ ДЕРМАТИТАХ РІЗНОЇ ЕТІОЛОГІЇ У ЩУРІВ **Черемісіна В. Ф.**

Резюме. У роботі представлені результати дослідження рівня циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові у щурів при дерматитах різної етіології. Було встановлено, що у щурів з алергічним дерматитом рівень циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові підвищений в 2,2 рази в порівнянні з групою інтактного контролю, а в групі щурів з контактним дерматитом в 1,5 рази. Рівень спонтанної активності перитонеальних макрофагів у тварин з алергічним дерматитом перевищувала аналогічний показник щурів з контактним дерматитом в 2,82 рази. Отримані результати свідчили про виражену сенсibiliзацію організму щурів. Визначена прямопропорційна залежність між рівнем циркулюючих імунних комплексів і рівнем спонтанної активності перитонеальних макрофагів при алергічному дерматиті. Достовірних відмінностей у фагоцитарної активності спленоцитів у експериментальних групах не виявлено.

Проведені дослідження свідчать про те, що однією з ланок патогенезу алергічного дерматиту є підвищення вмісту циркулюючих імунних комплексів в крові і спонтанної активності перитонеальних макрофагів. Визначення фагоцитарної активності спленоцитів при дерматитах принципового значення не має.

Ключові слова: циркулюючі імунні комплекси, фагоцитарна активність, макрофаги, спленоцити, дерматити.

УДК 616. 831-005-599. 323

УРОВЕНЬ ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ИМУННЫХ КОМПЛЕКСОВ ПРИ ДЕРМАТИТАХ РАЗНОЙ ЭТИОЛОГИИ **У КРЫС**

Черемисина В. Ф.

Резюме. В работе представлены результаты исследования уровня циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови у крыс при дерматитах разной этиологии. Было установлено, что у крыс с аллергическим дерматитом уровень циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови повышен в 2,2 раза по сравнению с группой интактного контроля, а в группе крыс с контактными дерматитом в 1,5 раза. Уровень спонтанной активности перитонеальных макрофагов у животных с аллергическим дерматитом превышала аналогичный показатель крыс с контактными дерматитом в 2,82 раза. Полученные результаты свидетельствовали о выраженной сенсибилизации организма крыс. Определена прямопропорциональная зависимость между уровнем циркулирующих иммунных комплексов и уровнем спонтанной активности перитонеальных макрофагов при аллергическом дерматите. Достоверных различий в фагоцитарной активности спленоцитов в экспериментальных группах не выявлено.

Проведенные исследования свидетельствуют о том, что одним из звеньев патогенеза аллергического дерматита является повышение содержания циркулирующих иммунных комплексов в крови и спонтанной активности перитонеальных макрофагов. Определение фагоцитарной активности спленоцитов при дерматитах принципиального значения не имеет.

Ключевые слова: циркулирующие иммунные комплексы, фагоцитарная активность, макрофаги, спленоциты, дерматиты.

UDC 616. 831-005-599. 323

Level of Circulating Immune Complexes under the Dermatitis of Various Etiologies in Rats Cheremisina V. F.

Abstract. Occurrence of circulating immune complexes (CIC) in blood serum can be connected with blood circulation disorder in the affected areas and mediated by the immunocompetent cells. Normally, immune complexes, generated in blood flow, are phagocytized and destroyed. Failures of systemic and local immune response can provoke the increased CIC production in blood serum. Serum CIC is one of the diagnostic tests to identify the level of severity and activity of immunopathological process and the important factor in the assessment of effectiveness of conducted therapy.

The purpose of the work is to study the level of circulating immune complexes in the rats' blood serum under the dermatitis of various etiologies and identify their role in the disease process.

Materials and methods of research. The experiments have been done on 30 nonlinear male rats of 180,0-200,0 g weight, divided into 3 groups: the first group – intact control, the second group – rats with contact dermatitis, and the third group – rodents with allergic dermatitis.

Results and discussions. As a result of conducted research it was identified the reliable increase of total CIC level in rats from both experimental groups as compared with intact control group: 1,5 times as much in rodents with contact dermatitis and 2,2 times as much in rats with allergic dermatitis.

It is known that CIC may be cumulated in the perivascular space, cortex of adrenal glands and other organs, and provoke activation of complement and inflammatory processes. Immune complexes pathological reactions are caused by the overrated speed of its formation over the speed of elimination, deficit of one or several complement components or functional defects of phagocytic system. We were interested in phagocytic system; consequently, the next step of our experiments was to determine the level of functional activity of phagocytes (peritoneal macrophages and splenocytes).

The findings were directly correlated with the level of medium- molecular CIC in blood serum. While determining the ingestion rate of splenocytes, the difference between experimental groups and group of intact control was not detected. This identifies that the level of ingestion rate of splenocytes is inversely proportional to the level of medium- molecular CIC in blood serum. It can be serving as the diagnostic criterion while determining the severity of the disease and effectiveness of conducted therapy.

The increase of the blood CIC 2 times as much, according to the reports, is crucial in the disease process: they are cumulated in the walls of microvessels, activate the complement system alternatively and, thus, facilitate the increase of microvessels porosity and microhaemodynamics dysfunction. This is unfavorable condition as it increases the possibility of further progress of pathological process, which requires timely prescription of effective pharmacotherapy.

Conclusion. The significant increase of blood circulating immune complexes in rats with allergic dermatitis 2,2 times as much indicates about evident sensitization of rodents organism. The direct relation between the level of circulating immune complexes and level of spontaneous activity of peritoneal macrophages in allergic dermatitis has been detected. Designation of ingestion rate of splenocytes in dermatitis is of no diagnostic meaning.

Prospects of further scientific research: advanced study of mechanisms of immune system disorder in allergic diseases.

Key words: circulating immune complexes, ingestion rate, macrophages, splenocytes, dermatitis.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 20. 12. 2013 р.