

УДК 613.1:616-056.3:577.083

ІМУННИЙ СТАТУС ТВАРИН ЗА УМОВ ГОСТРОГО ПЕРОРАЛЬНОГО КОМБІНОВАНОГО ВПЛИВУ ХЛОРОФОРМУ ТА ФЕНОЛУ

*Винарська О.І., **Лук'ячук С.В., **Фролова А.В., **Спаська Ю.С.

*Інститут гігієни та медичної екології ім. О.М. Марзєєва

**Національний авіаційний університет

maluwka_555556@mail.ru

У статті наведено результати експериментальних досліджень гострої комбінованої дії хлороформу та фенолу на імунну систему. Виявлено, що при дії хлороформу та фенолу на рівні гігієнічних нормативів у тварин спостерігається розвиток сенсibiliзації вже через місяць після взаємодії. При збільшенні доз досліджуваних хімічних сполук характер та спектр імунотоксичних ефектів розширюється. Встановлено додозалежний ефект.

The results of experimental investigations on one month chloroform and phenol combined influence for immune system are presented in the article. It was revealed that under chloroform and phenol impact on the levels of limited permissible concentrations the development of animal sensitization. The character and spectrum of immune toxic effects rose in dependence with increase of studied chemical substances doses.

Вступ

Одним з відомих методів, які дають можливість зберегти «безпечний рівень» аеробного енергоутворення, що за концепцією саноцентричної стратегії лежить в основі управління здоров'ям, є раціональне водоспоживання [1]. На жаль, якість питної води в Україні залишає бажати кращого. За даними ряду авторів, вміст хлороформу, бромдихлорметану, дибромхлорметану та бромоформу в питній воді водопровідних станцій міст Дніпровського басейну — Києва, Дніпропетровська, Запоріжжя, Нікополя, Миколаєва — становить, відповідно, 10—168,0 мкг/л, 1—2, 0,3—0,8 та 0,01—0,02 мкг/л [2]. Кількість тригалометанів у питній воді міста Донецька перевищує ГДК у 1,5—3,0 та більше разів.

© О.І. Винарська, С.В. Лук'ячук, А.В. Фролова, Ю.С. Спаська, 2009

Результати вивчення хімічного складу питної води міст Харкова і Дніпропетровська [3] свідчать, що вміст хлороформу в окремі періоди в три й більше разів перевищував нормативи.

На сучасному етапі застосування хлору при підготовці води для системи централізованого водопостачання залишається основним способом її знезараження не тільки в Україні, а й у більшості країн світу. Проте він має вагомні недоліки, головний з яких — висока токсичність.

Різноманітність сполук, що утворюються при хлоруванні води, пов'язана з різноманітністю фізико-хімічних характеристик вихідної води і може супроводжуватися утворенням хлорованих індольних сполук та хлорфенолів. Як відомо, концентрація фенолів та їх гомологів у місцях скидів забруднювальних речовин сягає нерідко 3800 мкг/л [4]. І хоча вони розбавляються річковими водами, вміст цих токсикантів у річках навіть на значній відстані від джерела забруднення (15—30 км) часто сягає сотень і тисяч міліграм на 1 л (при ГДК фенолу 0,001 мкг/л).

Результати проведених досліджень хімічного складу поверхневих вод Печенізького водосхо-

вища, яке є джерелом водопостачання міста Харкова, свідчить, що фактичне перевищення ГДК за фенолом становило 2—5 разів. Водопровідна вода більшості районів міста Львова, а також його околиць за вмістом фенолів перевищує гігієнічний норматив [5]. Так, вміст цих речовин у водах селища Великі Грибовичі (околиця Львова) перевищує ГДК від 3 до 25 разів.

Мета роботи. Зважаючи на вищесказане, метою даної роботи було оцінювання імунного статусу тварин в умовах гострого перорального комбінованого впливу хлороформу та фенолу.

Методика експериментів

Дослідження проводилися на 28 статевозрілих безпорідних білих щурах з початковою масою тіла 180—200 г. Експериментальні тварини разом з питною водою в різних комбінаціях отримували протягом місяця хлороформ та фенол у дозах, які відповідають величинам гігієнічних нормативів, а також перевищують їх у 3 та 9 разів. Розрахунок добових доз досліджуваних сполук виконувався так. При розрахунку дози хлороформу виходили з чинної норми його вмісту у воді мережі питного водопостачання [6; 7].

Оскільки ГДК цієї речовини становить 0,06 мкг/л, то при надходженні 25 мл води на добу до організму тварини з масою тіла 200 г надійде хлороформу: $0,06 \text{ мкг/л} \times 0,025 \text{ л/д} = 0,0015 \text{ мкг/д}$, що становитиме на 1 кг маси тіла щурів: $0,0015 \text{ мкг} : 0,2 \text{ кг} = 0,0075 \text{ мкг/кг}$. Тобто для експериментальних тварин, які отримували хлороформ з водою на рівні 1 ГДК, дозове навантаження цією сполукою становило 0,0075 мкг/кг на добу. Дозове навантаження хлороформом за його надходження до організму на рівні 3 та 9 ГДК становило, відповідно, 0,0225 мкг/кг і 0,0675 мкг/кг. При розрахунку дози фенолу також виходили з чинної норми його вмісту у воді централізованого господарськопитного водопостачання [6]. Оскільки ГДК цієї речовини становить 0,001 мкг/л, то за добу до організму тварини надходило фенолу: $0,001$

мг/л \times 0,025 л/д = 0,000025 мг/д. Оскільки щури мали середню масу тіла 200 г, то доза становила: 0,000025 мг: 0,2 кг = 0,000125 мг/кг. Так, для експериментальних тварин, які отримували фенол з водою на рівні 1 ГДК, дозове навантаження цією сполукою становило 0,000125 мг/кг на добу. Отже, дозове навантаження фенолом за його надходження до організму на рівні 3 та 9 ГДК становило, відповідно, 0,000375 мг/кг і 0,001125 мг/кг. При вивченні імунотоксичних ефектів за дії вивчених сполук усі тварини були поділені на чотири групи по сім голів у кожній. Номери груп розподілилися в такій послідовності:

1 група — контроль, інтактні тварини; в дослідних групах тварини отримували питну воду з таким вмістом ксенобіотиків;

2 група — фенол та хлороформ на рівні ГДК кожної речовини;

3 група — фенол та хлороформ на рівні 3 ГДК;

4 група — фенол та хлороформ на рівні 9 ГДК кожної речовини.

Для розв'язування завдань роботи були використані гематологічні та імунологічні методи досліджень, постановку яких здійснювали через місяць від початку затруювання.

При виборі імунотоксичних методів дотримувались рекомендацій ВООЗ [8], а також рекомендацій МОЗ України щодо вивчення імунотоксичної дії хімічних сполук.

Суть рекомендацій полягає у всебічному оцінюванні дії ксенобіотиків на імунну систему через визначення стану всіх її ланок. Виходячи з цієї тези, для оцінювання імунотоксичності дії убиквітарних забруднень водного середовища була обрана оптимальна схема, яка забезпечує характеристику різних складових імунної системи. Для цього було адаптовано комплекс тестів, що характеризуються простотою

виконання, доступністю, інформативністю і потребують малих об'ємів крові. Такий методичний підхід дає можливість провести порівняльний аналіз результатів експериментальних і натурних досліджень.

У дослідженнях застосовували мікрomodифікації імунологічних тестів [9]. Отже, були використані такі основні показники та методи їх визначення: визначення вмісту лейкоцитів у периферичній крові та їх якісного складу методом мікроскопії мазків крові; визначення рецепторної активності *T*- і *B*-лімфоцитів у реакціях спонтаного *E*- та ЕАС-розеткоутворення [9]; реакція фагоцитозу [9]; реакція дегрануляції базофілів периферичної крові (за Шеллі); реакція гальмування розпластування макрофагів. Для постановки імунологічних і алергологічних реакцій як донори сироватки крові (комплементу), еритроцитів, макрофагів і базофільних гранулоцитів були використані миші, морські свинки та барани. При визначенні гіперчутливості негайного типу як антигени використовувались власне гаптени і тканинний антиген. Як останній застосовували водно-сольовий екстракт тканини печінки щурів.

Результати досліджень

Обрахунок і аналіз отриманих даних проводилися з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки результатів медико-біологічних досліджень (з визначенням середньо-ариф-метичних величин показників, стандартної похибки, квадратичного відхилення), параметричних методів перевірки статистичних гіпотез (*t*-критерій Ст'юдента) [10]. Результати експериментальних досліджень, отриманих через місяць комбінованої дії різних доз хлороформу та фенолу наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Гематологічні та імунологічні показники у щурів через місяць комбінованої дії хлороформу та фенолу

Показники	1 група	2 група	3 група	4 група
Лейкоцити, $\times 10^9$ /л	15,29 \pm 1,61	16,14 \pm 0,85	18,17 \pm 0,97	15,00 \pm 0,33
Паличкоядерні нейтрофіли, %	3,00 \pm 0,44	4,43 \pm 0,43	3,00 \pm 0,31	3,71 \pm 0,42
Сегментоядерні нейтрофіли, %	20,86 \pm 1,10	19,57 \pm 1,19	22,29 \pm 1,58	19,29 \pm 1,73
Еозинофіли, %	2,57 \pm 0,57	2,57 \pm 0,43	2,57 \pm 0,48	3,00 \pm 0,49
Моноцити, %	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,14 \pm 0,14	1,00 \pm 0,00
Лімфоцити, %	72,57 \pm 0,78	72,43 \pm 1,21	71,00 \pm 1,53	73,00 \pm 1,94
Лімфоцити, $\times 10^9$ /л	11,13 \pm 1,25	11,66 \pm 0,53	12,87 \pm 0,64	10,96 \pm 0,41
Нейтрофіли, %	23,86 \pm 0,94	24,00 \pm 1,05	25,29 \pm 1,44	23,00 \pm 1,80
Нейтрофіли, $\times 10^9$ /л	3,64 \pm 0,38	3,91 \pm 0,35	4,63 \pm 0,45	3,44 \pm 0,26
<i>T</i> -лімфоцити, %	23,71 \pm 1,60	20,86 \pm 1,50	20,83 \pm 0,75	16,86 \pm 1,26*
<i>T</i> -лімфоцити, $\times 10^9$ /л	2,69 \pm 0,43	2,44 \pm 0,23	2,65 \pm 0,20	1,85 \pm 0,15

<i>B</i> -лімфоцити, %	15,00 ± 0,58	15,86 ± 1,30	15,67 ± 1,58	14,57 ± 1,43
<i>B</i> -лімфоцити, ×10 ⁹ /л	1,64 ± 0,14	1,82 ± 0,12	1,97 ± 0,20	1,62 ± 0,20
Активно фагоцитуючі нейтрофіли, %	80,00 ± 1,51	81,57 ± 5,80	94,43 ± 0,84*	87,43 ± 2,21*
Активно фагоцитуючі нейтрофіли, ×10 ⁹ /л	2,92 ± 0,32	3,21 ± 0,38	4,36 ± 0,41*	3,03 ± 0,27

Примітка. * Вказана достовірна різниця показників порівняно з 1-ою (контрольною) групою ($p < 0,05$)

Аналіз одержаних результатів дав можливість встановити, що у щурів 2-ї групи, які вживали воду з вмістом хлороформу та фенолу на рівні ГДК, не відбувалося змін гематологічних показників. Не встановлено й відхилень в окремих ланках імунітету та неспецифічних факторів захисту організму порівняно з контролем.

Між тим комбінована дія хлороформу з фенолом на рівні гігієнічних нормативів сприяла розвитку сенсibiliзації до фенолу. Сироватки крові тварин цієї групи за наявності гаптenu підсилювали де грануляцію базофільних гранулоцитів: ступінь дегрануляції базофільних гранулоцитів становила (11,43 ± 1,36)%, а хлороформу — (10,86 ± 1,14)%.

У тварин 3 групи, які підлягали дії двокомпонентної суміші досліджуваних хімічних речовин (фенолу та хлороформу на рівні 3 ГДК кожної зі сполук), не виявлено достовірних відмінностей у кількості паличко- та сегментоядерних нейтрофілів, еозинофілів та моноцитів порівняно з контролем. Разом з тим у тварин цієї групи спостерігалися зрушення в системі неспецифічних факторів резистентності організму, про що свідчить збільшення як відносного, так і абсолютного чисел активно фагоцитуючих нейтрофільних гранулоцитів (відповідно, у 3-ї групі — (94,43 ± 0,84)% та (4,36 ± 0,41)×10⁹/л, в контролі — (80,00 ± 1,51)% та (2,92 ± 0,32)×10⁹/л). Загальний вміст лімфоцитів у крові тварин 3-ї групи також не відрізнявся від контрольних величин. Про відсутність змін у клітинній та гуморальній ланках імунітету експериментальних щурів цієї групи свідчить кількість *T*- та *B*-лімфоцитів, які не мали вірогідних відмінностей від таких у інтактних тварин (табл. 1).

Після першого місяця комбінованої дії хлороформу та фенолу у щурів 3-ї групи виникала слабо виражена аутосенсibiliзація та сенсibiliзація, про що свідчить підвищення дегрануляції базо-фільних гранулоцитів у присутності тканинного антигену та гаптenu (хлороформу). Відсоток дегранульованих базофілів становив відповідно, (10,29 ± ± 0,36)% та (13,71 ± 1,48)%.

У щурів, які перебували під впливом перорального навантаження досліджуваних хімічних сполук на рівнях 9 ГДК (4 група), не було виявлено відхилень загальної кількості лейкоцитів, абсолютного та відносного числа нейтрофільних гранулоцитів, відсотка

сегментоядерних, паличкоядерних нейтрофілів, еозинофілів та моноцитів порівняно з показниками 1 групи (див. табл. 1).

Однак слід відмітити, що хоча у тварин цієї групи вміст нейтрофільних гранулоцитів перебував у межах норми, функціональна активність їх була підвищена. У 4-ї групі відсоток активно фагоцитуючих клітин складав (87,43 ± 2,21)%, у контролі — (80,00 ± 1,51)%.

Це може свідчити про активацію системи неспецифічних факторів захисту організму.

Дослідження комбінованої дії ксенобіотиків на окремі ланки імунітету дали змогу встановити у тварин цієї групи пригнічення здатності лімфоцитів до *E*-розеткоутворення — показник складав (16,86 ± 1,26)%, тоді як у контролі він був (23,71 ± 1,60)%.

Кількість *B*-лімфоцитів не відрізнялася від контрольних величин.

Так, аналіз результатів імунологічних досліджень після місяця комбінованої дії хлороформу та фенолу в різних дозах та комбінаціях дав можливість виявити зрушення в системі неспецифічних факторів захисту організму в 3-й і 4-й групах. Результати реакції Шеллі свідчать про розвиток аутосенсibiliзації у тварин, які отримували фенол та хлороформ у комбінаціях на рівнях 3 та 9 ГДК. У 3-й і 4-й групах вона супроводжувалася ще й сенсibiliзацією.

У непрямому макрофагальному тесті через місяць перорального впливу ксенобіотиків не було встановлено інгібувальної дії сироваток усіх дослідних тварин на функціональну активність макрофагів, зокрема, їх здатність до розпластування, що свідчить про відсутність розвитку гіперчутливості сповільненого типу.

Таким чином, у тварин за умов гострого перорального комбінованого впливу хлороформу та фенолу на рівнях ГДК виявлено розвиток сенсibiliзації.

При підвищенні доз обох сполук у тричі, крім виникнення гіперчутливості негайного типу, спостерігалась активація неспецифічних факторів захисту організму. За перевищення гранично-допустимої дози у 9 разів відбувалась імуносупресія за *T*-клітинним типом, активація неспецифічних факторів резистентності та прояви як сенсibiliзації, так і слабо вираженої аутосенсibiliзації.

Висновки. Отже, встановлено, що характер та спектр імуноотоксичних ефектів за

комбінованої дії хлороформу і фенолу залежать від дози.

Виявлено, що за комбінованої дії хлороформу і фенолу навіть на рівні гігієнічних нормативів у тварин виникає слабо виражена сенсibiliзація організму. При підвищенні доз характер та спектр зрушень в імунній системі розширюються.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Апанасенко Г.Л.* Концепция саногцентрической стратегии здравоохранения (20 лет украинской школе санологии) // Журнал АМН України. — 2006. — Т. 12. — № 2. — С. 341—347.
2. *Сова Р.Е., Карякина Н.А., Сноз С.В., Шилина В.Ф.* Международные и национальные стандарты качества питьевой воды в Украине. Токсиколого-гигиенические аспекты. Сообщение 1. Тригалометаны // Современные проблемы токсикологии. — 2001. — № 3. — С. 64—66.
3. *Кратенко И.С.* Результаты изучения химического состава питьевой воды, подаваемой населению г. Харькова, и его возможного влияния на заболеваемость населения / И.С. Кратенко, Т.М. Колпакова, Л.Н. Мельник и др. // Гігієнічна наука та практика на рубежі століть: мат. XIV з'їзду гігієністів України. — Дніпропетровськ: АРТ-ПРЕС, 2004. — Т. I. — С. 359—362.
4. *Янович Л.М., Стадниченко А.П.* Влияние фенолов на содержание глюкозы в органах перловицы (MOLLUSCA: BIVALVIA: UNIONIDAE) // Гидробиологический журнал. — 2005. — Т. 41. — № 2. — С. 52.
5. *Василечко В.О.* Оцінка якості вод Львова / В.О. Василечко, Л.О. Лебединець, Г.В. Гришук та ін. // Довкілля та здоров'я. — 2003. — № 2 (25). — С. 47—52.
6. *ГОСТ 2874-82.* Вода питьевая. Методы анализа. — М.: Государственные стандарты Союза СССР, 1984. — 239 с.
7. *Державні санітарні правила і норми «Вода питна. Гігієнічні вимоги до якості води централізованого господарсько-питного водопостачання»* (Затверджено наказом МОЗ України 23.12.1996 р. № 383). — К., 1996. — 20 с.
8. *Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals.* — Geneva: WHO, 1996. — 390 p.
9. *Оценка влияния факторов окружающей среды на иммунологическую реактивность организма: Методические рекомендации / НИИ общей и коммунальной гигиены им. А.Н. Марзеева.* — К., 1988. — 23 с.
10. *Лакин Г.Ф.* Биометрия / Г.Ф. Лакин. — М.: Высш. шк., 1980. — С. 96—110, 142—220.

Стаття надійшла до редакції 09.02.09