

КОМБІНОВАНА ДІЯ МАЛИХ РІВНІВ ЗАБРУДНЕНЬ ВОДНОГО СЕРЕДОВИЩА НА ІМУННУ СИСТЕМУ

*О. І. Винарська, **Ю. О. Франчук, *Л. Є. Григоренко, *С. В. Лук'янчук

*Інститут гігієни та медичної екології ім. О. М. Марзєєва
Академії медичних наук України

**Національний авіаційний університет
maluwka_555556@mail.ru

Установлено, що за ізольованої дії нітрату натрію на рівні 0,5 ГДК у щурів спостерігалось підвищення фагоцитарної активності нейтрофілів, а за дії тільки нітриту натрію на рівні 0,5 ГДК — напруження в клітинній ланці імунітету. Показано, що встановлені зміни мали транзитивний характер, а виявлені ефекти можна характеризувати як адаптаційну реакцію організму на дію чинників малої інтенсивності. Комбінована дія нітросполук і хлороформу за їх перорального надходження в організм протягом місяця на рівнях, нижчих за ГДК не викликала істотних зрушень в імунному статусі тварин.

It has been observed that in the isolated actions of sodium nitrate at 0,5 LPC in rats reported increases phagocyte activity neutrophils, but only actions with sodium nitrite at 0,5 LPC — stress at the cellular level managers cells. It has been shown that the observed changes were transitory, and the effects could be identified described as adaptive response of the body's effect on low-intensity factors. The combined effect of powder and chloroform in their oral flow in the body within a month at levels below the LPC did not cause significant irregularities in the immune status of animals.

Вступ

Дотепер залишається недостатнім рівень знань щодо впливу на здоров'я людей комплексу хімічних чинників, характерних для сучасного оточуючого середовища. Передусім, це стосується комбінованої дії низьких рівнів чинників довкілля, які сприяють розвитку біологічних ефектів, що за своїм характером та наслідками можуть суттєво відрізнитися від таких за ізольованої дії окремих чинників [1; 2].

Про своєрідність реакцій організму на комбінований вплив чинників малої інтенсивності свідчать наведені в літературі результати фундаментальних досліджень останніх десятиріч. Вони вказують, що при зниженні концентрації діючого чинника змінюється не тільки виразність реакцій організму, окремих його систем та органів, але й характер цих реакцій [2; 3]. Тому під час оцінювання реальної небезпеки дії екзогенних чинни-

комбінованої дії таких поширених забруднень водного середовища, як нітрит, нітрат натрію та хлороформ.

Матеріали та методи досліджень

В експерименті використано 42 аутбредних статевозрілих щура, які були поділені на шість груп по сім голів у кожній:

- 1 група — контроль, інтактні тварини;
- 2 група — з питною водою отримувала хлороформ на рівні 0,5 ГДК;
- 3 група — NaNO_2 на рівні 0,5 ГДК;
- 4 група — NaNO_3 на рівні 0,5 ГДК;
- 5 група — NaNO_2 та NaNO_3 на рівнях 0,5 ГДК кожної зі сполук;
- 6 група — хлороформ, NaNO_2 та NaNO_3 на рівнях 0,33 ГДК кожної зі сполук.

Постановку імунно-алергологічних тестів здійснювали через 1 місяць від початку затруєння тварин. При виборі методів дослідження

© О.І. Винарська, Ю.О. Франчук, Л.Є. Григоренко, С.В. Лук'янчук, 2009

дотримувались рекомендацій ВООЗ та МОЗ України щодо вивчення імунотоксичної дії хімічних сполук [5; 6].

квів останнім часом все частіше використовують показники, які характеризують донозологічні зміни в організмі.

Ураховуючи роль імунної системи у підтримці гомеостазу, оцінка її стану набуває все більш важливого значення під час вирішення питань збереження здоров'я населення в умовах техногенного забруднення довкілля [4]. У світлі сучасних знань вивчення закономірностей комбінованої дії антропогенних забруднень на окремі ланки імунної системи дає змогу оцінити ступінь шкідливого впливу вже на його ранніх стадіях, прогнозувати наслідки та вчасно здійснювати профілактичні заходи.

Мета цієї роботи — оцінювання стану імунної системи лабораторних тварин за пероральної

У роботі було використано наступні методи дослідження: визначення загального вмісту лейкоцитів та їх клітинного складу; визначення вмісту Т- і В-лімфоцитів [7]; реакція фагоцитозу [7]; реакція гальмування розпластування макрофагів — для визначення гіперчутливості сповільненого типу [8]; реакція дегрануляції базофілів (за Шеллі) — для визначення гіперчутливості негайного типу [9].

Під час визначення гіперчутливості негайного типу як антигени використовувались власне гаптени і тваринний антиген [10].

Для встановлення стійкості зрушень в імунному гомеостазі та їх глибини за комбінованої дії

хімічних плютанів проводилася додаткова постановка тестів після антигенного навантаження зависиною баранячих еритроцитів — *T*-залежним антигеном [10]. Вибір антигену був зумовлений його здатністю формувати імунну відповідь за участю всіх ланок імунної системи.

Розрахунок та аналіз отриманих даних здійснювались з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки результатів медико-біологічних досліджень (з визначенням середньоарифметичних величин показників, стандартної похибки, квадратичного відхилення), параметричних методів перевірки статистичних гіпотез (*t*-критерій Ст'юдента).

Результати досліджень та їх обговорення

Аналіз результатів експерименту, отриманих через місяць ізольованої та комбінованої пероральної дії на організм щурів нітриту, нітрату натрію та хлороформу в дозах, нижчих ГДК, свідчить про відсутність достовірних відмінностей показників лейкоцитограми при їх порівнянні з контролем (табл. 1).

Так, у крові щурів другої групи (експозиція хлороформу на рівні 0,5 ГДК) загальний лейкоцитів, кількість еозинофілів та моноцитів, рівні лімфоцитів і нейтрофілів не виходили за межі коливання цих показників у інтактних тварин (табл. 1).

Зрушення у клітинній та гуморальній ланках імунної системи тварин цієї групи також не реєструвались (табл. 2).

Таблиця 1

Показники лейкоцитограми у щурів після ізольованої та комбінованої дії нітрату, нітриту натрію та хлороформу

Група дослідних тварин	Лейкоцити	Лімфоцити		Нейтрофіли	
	×10 ⁹ /л	%	×10 ⁹ /л	%	×10 ⁹ /л
Через 1 місяць впливу					
1 група (контроль)	2,23±0,88	76,50±1,84	16,96±0,73	18,50±0,67	4,12±0,24
2 група	24,92±1,70	74,33±1,45	18,52±1,42	21,33±1,31	5,29±0,47
3 група	24,23±1,91	76,71±1,29	18,63±1,63	19,29±1,19	4,57±0,29
4 група	24,07±1,52	76,67±1,67	18,38±1,08	19,83±1,70	4,80±0,57
5 група	21,46±0,90	75,80±1,32	16,20±0,69	21,00±1,14	4,51±0,33
6 група	24,03±1,18	76,86±1,60	18,33±0,68	19,00±1,29	4,63±0,50
Після антигенного навантаження					
1 група (контроль)	17,51±1,84	78,00±1,27	13,60±1,43	19,14±1,44	3,31±0,45
2 група	16,86±0,80	74,29±1,02	12,44±0,48	21,43±1,13	3,66±0,31
3 група	17,00±1,16	76,00±0,98	12,91±1,0	20,43±1,02	3,40±0,23
4 група	15,03±1,29	79,00±0,63	11,83±1,05	16,67±0,95	2,60±0,22
5 група	17,16±1,05	78,43±0,90	13,40±0,81	18,57±0,75	3,13±0,24
6 група	17,34±0,80	76,57±0,97	13,27±0,48	19,29±1,04	3,35±0,32

Таблиця 2

Імунологічні показники у щурів після ізольованої дії та комбінованої нітрату, нітриту натрію та хлороформу

Група дослідних тварин	<i>T</i> -лімфоцити		<i>B</i> -лімфоцити		Кількість фагоцитуючих клітин	
	%	×10 ⁹ /л	%	×10 ⁹ /л	%	×10 ⁹ /л
Через 1 місяць впливу						
1 група (контроль)	19,00±1,37	3,20±0,23	20,17±1,56	3,38±0,21	91,67±0,84	3,87±0,27
2 група	20,00±0,45	3,64±0,33	20,00±2,30	3,66±0,57	87,00±2,08	4,58±0,38
3 група	*23,29±1,15	4,33±0,43	19,00±1,05	3,58±0,40	92,0±1,29	4,15±0,27
4 група	18,67±3,08	3,47±0,66	16,5±2,26	2,99±0,41	92,67±1,80	*4,46±0,56
5 група	22,20±1,59	3,63±0,42	18,80±1,07	3,06±0,26	93,20±0,97	4,20±0,33

6 група	**15,43±1,43	2,81±0,24	16,86±1,49	3,11±0,33	**94,57±0,84	4,36±0,45
Після антигенного навантаження						
1 група (контроль)	19,43±1,04	2,68±0,37	18,14±0,94	2,41±0,30	93,71±1,11	3,04±0,42
2 група	22,00±1,77	2,73±0,24	20,43±2,79	2,56±0,38	92,86±1,52	3,34±0,29
3 група	17,17±1,22	2,33±0,40	14,33±2,09	1,89±0,29	95,00±1,20	3,19±0,19
4 група	18,33±1,41	2,12±0,13	15,50±1,84	1,83±0,29	94,33±1,33	2,43±0,22
5 група	17,57±1,56	2,32±0,21	14,00±0,62	1,88±0,16	96,43±1,33	2,99±0,22
6 група	21,29±1,19	2,80±0,14	14,43±1,29	1,92±0,20	95,14±1,10	3,14±0,28

Примітки: * — вказана достовірна різниця показників порівняно з першою (контрольною) групою;
** — вказана достовірна різниця показників порівняно з другою групою ($p < 0,05$).

У щурів, які разом з питною водою отримували нітрит натрію на рівні 0,5 ГДК (3 група), виявлялося збільшення відсотку *T*-клітин ((23,29 ± 1,15) %, у контролі — (19,00 ± 1,37) %), що може вказувати на напруження у клітинній ланці імунітету. При цьому загальна популяція лімфоцитів не зазнавала суттєвих змін. Крім того, в третій групі не спостерігалось відмінностей загальної кількості лейкоцитів, їх клітинного складу, фагоцитарної активності нейтрофілів порівняно з показниками першої групи (див. табл. 1 та 2). Не зазнавала кількісних змін і гуморальна ланка імунітету, про що свідчить відсутність різниці вмісту *B*-лімфоцитів порівняно з контролем.

Про зміни в системі неспецифічних факторів захисту організму тварин четвертої групи (вплив нітрату натрію на рівні 0,5 ГДК) свідчить підвищення фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів, абсолютна кількість яких становила $(4,46 \pm 0,56) \times 10^9$ /л, у той час як в контролі цей показник відповідав значенню $(3,87 \pm 0,27) \times 10^9$ /л.

Достовірних відмінностей інших показників лейкоцитограм виявлено не було. Не було зареєстровано і зрушень у популяціях *T*- і *B*-лімфоцитів (див. табл. 1, 2).

Імунологічне обстеження тварин, які підлягали дії трикомпонентної суміші досліджуваних хімічних речовин у дозах, що відповідають зна-

ченню 0,33 ГДК кожної речовини, не виявило зрушень у системі неспецифічних факторів резистентності організму. Вміст лімфоцитів та загальна кількість лейкоцитів також суттєво не відрізнялись від контрольних величин.

Не зазнали змін і кількісні показники клітинного та гуморального імунітету – вміст популяцій *T*- та *B*-лімфоцитів не відрізнявся від такого у інтактних тварин (див. табл. 1 та 2).

Таким чином, оцінка імунного статусу експериментальних тварин дала можливість виявити деякі зрушення у клітинній ланці імунної системи щурів, які отримували з питною водою нітрит натрію на рівні 0,5 ГДК (3 група), а також зміни у системі неспецифічних факторів захисту організму тварин, що підлягали навантаженню нітратом натрію (4 група).

Результати постановки реакції Шеллі через місяць ізольованої та комбінованої дії досліджуваних хімічних речовин не виявили ознак сенсibiliзації та аутосенсibiliзації у дослідних групах (табл. 3).

До межі слабкопозитивної алергічної реакції за гіперчутливістю негайного типу до нітриту та нітрату натрію наближались результати у 5 та 6 групах.

Таблиця 3

Ступінь де грануляції базофільних гранулоцитів через один місяць після ізольованої та комбінованої дії нітрату, нітриту натрію та хлороформу

Групи дослідних тварин	Дегранульовані базофіли (тканинний антиген)*, %	Дегранульовані базофіли (гаптен – нітрит натрію)*, %	Дегранульовані базофіли (гаптен – нітрат натрію)*, %	Дегранульовані базофіли (гаптен – нітрит, нітрат натрію)*, %	Дегранульовані базофіли (гаптен – хлороформ)*, %
1 група (контроль)	6,29±1,48	5,33±0,84	4,00±1,63	6,67±0,84	5,3±1,98
2 група	9,33±0,84	—	—	—	8,67±0,67
3 група	8,00±1,63	9,33±0,84	—	—	—
4 група	8,00±1,23	—	5,71±1,48	—	—

5 група	6,86±1,68	—	—	12,00±1,79	—
6 група	8,00±1,46	—	—	10,67±1,33	9,33±0,84

Примітка: * Від 10 до 20 % — реакція слабопозитивна; від 20 до 30 % — реакція позитивна; менше 30 % — реакція різко позитивна.

Реакція гіперчутливості сповільненого типу (ГСГ) через один місяць перорального впливу досліджуваними ксенобіотиками була відсутня в усіх дослідних групах тварин.

Під час порівняння імунологічних показників тварин, які вживали з питною водою комбінацію з 2-х чи 3-х ксенобіотиків, з такими у щурів, що підлягали ізольованій дії досліджуваних сполук, спостерігалися деякі відмінності. Зокрема, у тварин шостої групи, які разом нітросполуками перорально отримували хлороформ, відмічався менший відсоток *T*-лімфоцитів ((15,43 ± 1,43)%), ніж у щурів, які ізольовано вживали з питною водою хлороформ ((20,00 ± 0,45)%), а також порівняно з тваринами, котрі підлягали навантаженню комбінацією лише нітриту та нітрату натрію ((22,20 ± 1,59)%).

Крім цього, у шостій групі визначалося більша відносна кількість активно фагоцитуючих нейтрофільних гранулоцитів порівняно з таким показником у другій групі ((94,57 ± 0,84)% та (87,00 ± 2,08)% відповідно).

Таким чином, аналіз результатів досліджень комбінованого впливу нітриту, нітрату натрію та хлороформу протягом одного місяця показав, що дія вивчених речовин на рівнях, нижчих гігієнічних регламентів, не викликала суттєвих змін показників клітинного складу білої крові експериментальних тварин. Здійснені імунологічні дослідження встановили, що при цьому в щурів, які з питною водою отримували нітрат натрію на рівні 0,5 ГДК, було виявлено стимуляцію фагоцитарної активності нейтрофілів. У щурів, які зазнавали ізольованої дії нітриту натрію у дозі, що відповідала значенню 0,5 ГДК, спостерігалася активація клітинної ланки імунітету. Разом з цим у жодній з дослідних груп не було виявлено ознак розвитку гіперчутливості сповільненого типу, а також яскраво виражених ознак сенсibiliзації та аутосенсibiliзації за гіперчутливістю негайного типу.

Отже, порівняльний аналіз показників лейкоцитогам та імунограм щурів, які зазнали ізольованого впливу досліджуваних ксенобіотиків із такими за дії дво- і трикомпонентних їх комбінацій на рівнях, нижчих гігієнічних регламентів кожного з компонентів, виявив деякі відмінності імунного статусу тварин після одного місяця експозиції, які залежали від доз діючих чинників та якісного складу сумішей.

Для визначення стійкості та глибини зрушень імунного гомеостазу за комбінованої дії протя-

гом місяця нітриту і нітрату натрію та хлороформу у відновний період додатково проведено навантажувальний тест *T*-залежним антигеном. Після нього була здійснена постановка імуноалергологічних тестів.

У результаті аналізу отриманих даних було встановлено, що розвиток імунної відповіді у тварин майже всіх дослідних груп не відрізнявся від такого у інтактних тварин: не було встановлено відмінностей ні в системі неспецифічних факторів захисту, ні в клітинній та гуморальній ланках імунної системи щурів усіх дослідних груп (див. табл. 1, 2). Визначення ступеня де грануляції базофільних гранулоцитів у реакції Шеллі також не виявило ознак сенсibiliзації та ауто сенсibiliзації у щурів жодної з дослідних груп, що свідчить про відсутність алергічної реакції за негайним типом у експериментальних тварин. Після навантажувального тесту не виявлено також і ознак позитивної реакції гіперчутливості сповільненого типу.

У результаті співставлення показників імунного статусу тварин за ізольованої та комбінованої дії досліджуваних хімічних речовин, проведеного після антигенного навантаження, не було відзначено відмінностей показників імуно- та лейкоцитогам між відповідними групами (див. табл. 1, 2).

Отже, дослідження імунологічних ефектів після антигенного навантаження вказувало на відсутність суттєвих відмінностей в імунному статусі тварин дослідних груп.

Із загально біологічного погляду, виявлення тих чи інших змін в імунній системі ще не є критерієм для гігієнічної оцінки шкідливості дії факторів довкілля. Лише визначення значущості для організму цих зрушень дає можливість диференціювати нормальну імунну відповідь від імунотоксичного ефекту.

Саме використання навантажувального тесту *T*-залежним антигеном дало змогу встановити, що ізольований та комбінований вплив вивчених плютантів водного середовища на рівнях, нижче гігієнічних нормативів не призводив до пошкодження функцій імунної системи.

Виявлені зміни після місяця експозиції в третій і четвертій групах мали транзиторний характер і їх можна трактувати як адаптаційну реакцію організму на екзогенну дію чинників довкілля.

Висновки

1. Встановлено, що комбінована дія нітриту, нітрату натрію та хлороформу за їх перорального надходження до організму протягом місяця на рівнях, нижчих гігієнічних регламентів, не викликає суттєвих зрушень в імунному статусі експериментальних тварин.

2. У щурів, які підлягали ізольованій дії нітрату натрію на рівні 0,5 ГДК протягом місяця, спостерігалось підвищення фагоцитарної активності нейтрофілів; за ізольованої дії нітриту натрію на рівні 0,5 ГДК визначалося напруження в клітинній ланці імунітету.

Показано, що зміни, які спостерігалися в імунній системі, мали транзиторний характер, а виявлені ефекти можна характеризувати як адаптаційну реакцію організму на дію чинників малої інтенсивності.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Винарская Е. И.* Научные основы гигиенической оценки воздействия химических и биологических факторов среды при их совместном поступлении в организм на основе иммунологического критерия вредности: Дис. ... д. м. н.: 14.02.01 / Украинский научный гигиенический центр МЗ Украины. — Киев, 2000. — 390 с.

2. *Виноградов Г. И.* Реакция дегрануляции базофилов как метод выявления аллергии и аутоаллергии к простым химическим соединениям // Лабораторное дело / Г. И. Виноградов, Е. И. Винарская, Г. М. Науменко. — 1989. — № 6. — С. 339—341.

3. *Коршун М. М.* Проблема комбінованої дії на організм пріоритетних хімічних забруднювачів ґрунту (огляд вітчизняної літератури і результати

особистих досліджень) // Довкілля та здоров'я / М. М. Коршун. — 2002. — № 4. — С. 51—56.

4. *Омирбаева С. М.* Риск развития экологически обусловленных заболеваний (обзор литературы) // Медицина труда и промышленная экология / С. М. Омирбаева. — 2004. — № 11. — С. 28—31.

5. *Рахманин Ю. А.* Научные основы диагностики донозологических нарушений гомеостаза при хронических химических нагрузках // Гигиена и санитария / Ю. А. Рахманин, Н. Н. Литвинов. — 2004. — № 6. — С. 48—51.

6. *Трахтенберг И. М., Горбань Л. Н.* Современные тенденции в теории и практике гигиенического регламентирования // Гігієнічна наука та практика на рубежі століть: мат. XIV з'їзду гігієністів України. — Дніпропетровськ: АРТ-ПРЕС, 2004. — Т. I. — С. 50—54.

7. *Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals.* — Geneva: WHO, 1996. — 390 p.

8. *Дослідження імунотоксичної дії потенційно небезпечних хімічних речовин при їх гігієнічній регламентації: метод. реком.* / Ін-т екогієни і токсикології ім. Л. І. Медведя МОЗ України // Зб. нормативних документів з охорони здоров'я. — К., 2003. — № 8 (31). — С. 149—168.

9. *Макрофагальный тест* в диагностике аллергических состояний / [А. Д. Адо, Е. М. Кипервасер, Т. А. Алексеева и др.] // Клиника и лабораторная диагностика аллергических заболеваний: мат. науч. конф. — Ужгород, 1974. — С. 4—5.

10. *Оценка влияния факторов окружающей среды на иммунологическую реактивность организма: метод. реком.* / НИИ общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Марзеева. — К., 1988. — 23 с.

Стаття надійшла до редакції 1.12.09.