

MEDICAL SCIENCE

Оцінка імунотоксичного впливу нітроксоліну в умовах експерименту на лабораторних тваринах

Г. І. Яськів

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів, Україна
Corresponding author. E-mail: annajaskiv@ukr.net

Paper received 22.06.2016; Accepted for publication 05.07.2016.

Анотація. Проведено дослідження впливу нітроксоліну на імунну систему мурчаків. Вивчали неспецифічну резистентність організму за формулою крові, за фагоцитарним показником. Клітинний імунітет оцінювали за вмістом Т-лімфоцитів, їх субпопуляцій. Гуморальний імунітет - вмістом імуноглобулінів IgA, IgM, IgG та ЦКів. Нітроксолін впливає на імунну систему і викликає алергенну перебудову організму. Підвищує кількість еозинофілів, лімфоцитів, активує фагоцитарну активність нейтрофілів. Діє на клітинну ланку імунітету: підвищує CD₈; IP1; CD₃, NK-клітини. Порушує гуморальну відповідь адаптивного імунітету, підвищує рівень ЦК у крові, чим сприяє виникненню аутоімунних захворювань.

Ключові слова: нітроксолін, імунотоксичний вплив, клітинний та гуморальний імунітет.

Вступ. В даний час, як і раніше для лікування інфекції нирок і сечових шляхів застосовують похідне хінолонової кислоти – нітроксолін, який ефективний щодо широкого спектра грампозитивних, грамнегативних бактерій і грибів. Багаточисельні дані наукової літератури свідчать про те, що довготривале застосування нітроксоліну супроводжується розвитком алергічних реакцій [1, 2]. В умовах виробництва агрегатний стан нітроксоліну – аерозоль дезінтеграції, тому в організм працівників речовина може потрапити через дихальні шляхи та шкірні покриви і викликати алергенну перебудову організму.

Короткий огляд публікації по темі. Хімічні речовини здатні викликати стан підвищеної чутливості дихальних шляхів, що призводить до виникнення респіраторної алергії, несприятливих наслідків для здоров'я, що настають в результаті стимуляції адаптивного імунітету.

Хімічна респіраторна алергія визначається як імуноопосередкована реакція гіперчутливості до екзогенних хімічних речовин [3]. Експериментальні дослідження показують, що внутрішньошкірний або місцевий вплив алергену на організм мурчаків призводить до ефективної сенсibilізації дихальних шляхів.

При сенсibilізації відбувається зміна імунологічного статусу після першого контакту з алергеном, який зазвичай не дає будь-яких клінічних проявів. В результаті повторного впливу алергену відбувається прискорена та більш агресивна імунна відповідь, що клінічно проявляється симптомами алергії [3].

Мета. Оцінити вплив нітроксоліну на імунну систему лабораторних тварин в рамках проведення токсикологічного експерименту з розробки гігієнічного регламенту допустимого вмісту речовини у повітрі робочої зони на хіміко-фармацевтичних підприємствах.

Матеріали та методи. Дослідження на лабораторних тваринах проводилися згідно методичних рекомендацій [4] при дотриманні принципів біоетики у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986 р.), Директиви Ради Європи 2010/63/EU, Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження».

Для проведення експерименту було сформовано 2 групи мурчаків світлої масті масою 300-350 г по 8 особин кожна (контрольна та сенсibilізована), які утримувалися у віварію згідно санітарно-гігієнічних норм.

Сенсibilізацію проводили за методом О. Г. Алексеевої, А. І. Петкевич [5] шляхом внутрішньошкірного введення 200 мкг (в 0,02 мл) препарату в зовнішню поверхню вуха. Тваринам з контрольної групи вводили по 0,02 мл 0,9% NaCl. Ступінь сенсibilізації встановлювали після постановки внутрішньошкірних проб в розведеннях: 1 : 100, 1 : 1000. Реакцію організму оцінювали шляхом візуального огляду поверхні шкіри на місці введення проб через 24 год. після введення і за результатами клінічних та імунологічних тестів.

Стан неспецифічної резистентності організму вивчали по формулі крові за числом нейтрофілів, фагоцитарним показником організму [6], кількістю NK-клітин.

Обчислювали співвідношення окремих популяцій лейкоцитів у лейкоцитарній формулі для загальної характеристики клітинних реакцій неспецифічного і специфічного захисту організму [7]. Вираховували: індекс співвідношення нейтрофілів та лімфоцитів (ІСНЛ), індекс співвідношення нейтрофілів та моноцитів (ІСНМ), індекс співвідношення нейтрофілів та еозинофілів (ІСНЕ), індекс співвідношення моноцитів та еозинофілів (ІСМЕ), індекс співвідношення лімфоцитів та моноцитів (ІСЛМ), індекс співвідношення лімфоцитів та еозинофілів (ІСЛЕ) [8].

Оцінка клітинного імунітету організму проводилася за показниками відносного та абсолютного вмісту в периферичній крові субпопуляцій Т-лімфоцитів і В-лімфоцитів, шляхом реакції розеткоутворення з еритроцитами, на яких адсорбовані моноклональні антитіла проти рецепторів CD₃ (Т-лімфоцитів), CD₄ (Т-хелпери), CD₈ (Т-цитотоксичні), CD₁₆ (натуральні кілери), CD₂₂ (В-лімфоцити). За кількістю еритроцитів, адсорбованим одним лімфоцитом аналізують ступінь активності Т- і В-клітин, оскільки цей феномен обумовлений щільністю рецепторів на поверхні лімфоцитів і характеризує функціональні властивості останніх.

Підраховували імунорегуляторний індекс по відношенню CD₄/CD₈.

Гуморальний імунітет оцінювали за вмістом імуноглобулінів IgA, IgM, IgG та циркулюючих імунних комплексів (ЦК).

Концентрацію імуноглобулінів в сироватці крові мурчаків вивчали за допомогою радіальної імунодифузії в гелі за Манчіні; – метод базується на дифузії імуноглобулінів в агар, який містить специфічну сироватку та в результаті реакції утворює кільце преципітації, ширина якого прямопропорційна кількості імуноглобулінів. Рівень імуноглобулінів визначали за калібрувальною кривою, яка виражає залежність між рівнем імуноглобулінів та діаметром кільця преципітації [9].

Отримані дані, що виражали у відсотках і в абсолютних одиницях у перерахунку на 1 літр крові ($10^9/л$), аналізували з використанням загальноприйнятих методів статистичної обробки результатів медико-біологічних досліджень, з використанням t-

критерія Ст'юдента та попередньою перевіркою нормальності розподілу.

Результати та їх обговорення. При проведенні внутрішньошкірних проб у дозі 1 : 1000 у дослідній групі тварин на місці введення відмічали незначне почервоніння, діаметром 2-3 мм, у дозі 1 : 100 спостерігали еритемію, набряк, розміром 3-6 мм з утворенням папули по відношенню до контрольної групи (розчинник – 0,9% NaCl), де змін шкіри не було виявлено.

Аналіз показників лейкоцитарної формули показав, що значення відсоткового вмісту і абсолютної кількості еозинофілів та відсоткового вмісту лімфоцитів достовірно перевищує допустимий вміст. Вміст лейкоцитів, базофілів, нейтрофілів та моноцитів у крові тварин контрольної та сенсibilізованої груп вірогідно не відрізнявся (табл. 1).

Між еозинофілами в контрольних та сенсibilізованих тварин спостерігається вірогідна ($p < 0,05$)

Таблиця 1. Показники лейкоцитограми крові мурчаків сенсibilізованих нітросоліном

Назва показників	Контрольні тварини	Сенсibilізовані тварини
Лейкоцити, Г/л	9,40±0,52	10,70±0,53
Базофіли, %	0,25±0,16	0,50±0,19
Базофіли, Г/л	0,03±0,02	0,06±0,02
Еозинофіли, %	1,88±0,35*	3,25±0,36*
Еозинофіли, Г/л	0,18±0,03*	0,36±0,06*
Нейтрофіли, %	21,88±1,20	23,63±0,73
Нейтрофіли, Г/л	2,06±0,16	2,52±0,15
Моноцити, %	2,50±0,19	2,75±0,37
Моноцити, Г/л	0,24±0,02	0,28±0,03
Лімфоцити, %	73,50±1,04*	69,88±0,79*
Лімфоцити, Г/л	6,90±0,40	7,49±0,39

Примітка: *достовірність різниці між показниками $p < 0,05$.

різниця в середніх показниках. Кореляційний зв'язок між відповідними показниками є недостовірний. Існує вірогідний ($p < 0,05$) кореляційний зв'язок між моноцитами і лімфоцитами в контрольній групі.

Підвищення кількості еозинофілів гранулоцитів може бути свідченням активації знешкодження токсичних речовин шляхом поглинання дрібних частинок, які

обволікають їх своєю стінкою, втягуючи їх у себе (мікрофаги).

У показниках крові в контрольних та сенсibilізованих тварин спостерігали достовірну різницю ($p < 0,001$) між індексами співвідношення ІСНЕ, ІСЛЕ, ІСНМ, ІСНЛ та ІСМЛ. Між ІСМЕ такої вірогідної достовірності не виявлено (табл. 2).

Таблиця 2. Показники лейкоцитарних індексів мурчаків

Назва показників	Значення показників, $M \pm m$	
	Контрольні тварини	Сенсibilізовані тварини
ІСНЛ	0,30±0,02	0,34±0,01
ІСНМ	9,16±0,91	10,48±2,05
ІСНЕ	14,54±2,51*	8,10±1,10*
ІСМЕ	1,66±0,32	0,92±0,13
ІСЛМ	30,69±2,40	30,81±6,12
ІСЛЕ	48,36±7,94*	23,73±2,88*

Примітка: *достовірність різниці між показниками $p < 0,001$.

З наведених в даних видно, що ІСЛМ та ІСНМ достовірно не змінилося в обох групах. ІСНЕ достовірно змінився за рахунок зменшення нейтрофілів та збільшення кількості еозинофілів в дослідній групі порівняно з контрольною.

Вірогідна різниця ($p < 0,001$) в показниках ІСНЛ вказує на клітинний баланс показників неспецифічного та специфічного захисту. Достовірно збільшений ІСЛЕ вказує про порушену рівновагу клітин, що приймають участь в реакціях гіперчутливості сповіль-

неного та негайного типів.

Згідно даних таблиці 3, у сенсibilізованих тварин відмічено достовірно вірогідне підвищення $СД_8$ у порівнянні з тваринами контрольної групи у відсотках та в абсолютних величинах, що свідчить про порушення механізмів імунорегуляції. Вірогідно підвищений ІРІ сенсibilізованих тварин та достовірно вірогідне підвищення $СД_3$, НК-клітин та фагоцитарної активності. Усі ці порушення можуть свідчити про токсичний вплив нітросоліну на клітинну ланку імунітету.

Таблиця 3. Вплив нітроксоліну на стан клітинної ланки імунітету сенсibilізованих тварин

Назва показників	Значення показників, М±m	
	Контрольні тварини	Сенсibilізовані тварини
T-лімфоцити (CD ₃), %	48,88±1,57*	53,38±1,54*
T-лімфоцити (CD ₃), Г/л	3,38±0,24	3,99±0,25
T-хелпери (CD ₄), %	31,25±1,14	30,88±1,86
T-хелпери (CD ₄), Г/л	2,15±0,14	2,28±0,10
T-цитотоксичні (CD ₈), %	17,63±0,70*	22,50±1,44*
T-цитотоксичні (CD ₈), Г/л	1,23±0,10*	1,75±0,14*
NK-клітин (CD ₁₆), %	15,75±0,77	17,63±0,66
NK-клітин (CD ₁₆), Г/л	1,00±0,20	1,32±0,097
B-лімфоцити (CD ₂₂), %	19,75±1,48	20,13±1,34
B-лімфоцити (CD ₂₂), Г/л	1,39±0,15	1,51±0,13
Імунорегуляторний індекс (ІРІ)	1,78±0,08*	1,43±0,15*
Фагоцитарна активність, %	14,00±0,46	14,85±0,40
Фагоцитарний індекс	3,57±0,76	4,24±0,41

Примітка: достовірність між показниками $p < 0,05$.

При дослідженні функціонального стану В-системи імунітету за рівнем сироваткових імуноглобулінів IgA, IgM, IgG та ЦІК (табл. 4) відмічено вірогідне ($p < 0,05$) підвищення ЦІК у сенсibilізованих мурчаків

по відношенню до тварин контрольної групи. Показники імуноглобулінів (IgA, IgM, IgG) у сенсibilізованих тварин суттєво не відрізнялися від показників у контролі.

Таблиця 4. Вплив нітроксоліну на гуморальну ланку адаптивної імунної відповіді

Назва показників	Значення показників, М±m	
	Контрольні тварини	Сенсibilізовані тварини
Циркулюючі імунні комплекси (ЦІК), ум.од.	25,13±3,71*	47,75±5,73*
Імуноглобулін А (IgA), г/л	1,82±0,21	1,93±0,18
Імуноглобулін М (IgM), г/л	0,22±0,03	0,30±0,04
Імуноглобулін G (IgG), г/л	2,15±0,28	2,48±0,30

Примітка: *достовірність між показниками $p < 0,05$.

Підвищений рівень ЦІК вказує на стимуляцію імунної відповіді на надходження антигенів, які запускають ланцюги патологічних змін, що призводять до аутоімунних захворювань.

Висновки. Нітроксолін впливає на імунну систему і викликає алергенну перебудову організму.

При внутрішньошкірній сенсibilізації мурчаків спостерігали достовірні зміни у показниках периферичної крові: збільшення відсоткового вмісту і абсолютної кількості еозинофілів та відсоткового вмісту лімфоцитів.

Не змінює рівень нейтрофілів у сироватці крові. Збільшує ІСЛЕ, який вказує на порушену рівновагу

клітин, що приймають участь в реакціях гіперчутливості сповільненого та негайного типів.

Нітроксолін діє на клітинну ланку імунітету: підвищує CD₈ у порівнянні з тваринами контрольної групи у відсотках та в абсолютних величинах; підвищує ІРІ сенсibilізованих тварин; CD₃, NK-клітин та фагоцитарну активність.

Порушує гуморальну відповідь адаптивного імунітету. Підвищує рівень ЦІК у сироватці крові, що сприяє виникненню аутоімунних захворювань. Рівень імуноглобулінів IgA, IgM, IgG у сенсibilізованих тварин суттєво не відрізнявся від тварин контрольної групи.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пухлик Б.М. Лекарственная аллергия и побочные эффекты лекарственных средств в аллергологии. – Львів: Медицина світу, 2008. – 108 с.
2. Победенная Г.П. Лекарственная аллергия: проблемы и пути решения/ Г.П. Победенная // Здоров'я України. – №1(17). – 2012. – С. 60 - 63.
3. Stella A. Cochrane, Josie H.E. Arts. Thresholds in chemical respiratory sensitization. / Stella A. Cochrane, Josie H.E. Arts. [et al.] // Toxicology. – 2015. – V.333 – P. 179-94.
4. Дослідження імуноотоксичної дії потенційно небезпечних хімічних речовин при їх гігієнічній регламентації: МР 8.1.4.104-2003 [Затв. МОЗ України 25.07.2003]. К., 2003. – 30 с.
5. Постановка исследования по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны: методические указания № 2121-80 от 23.01.1980 г.-Рига, 1980.
6. Посібник з лабораторної імунології / Л.Є. Лаповець, Б.Д. Луцик, Г.Б. Лебедь, В.М. Акімова – Львів, 2008. – С. 26 - 33.
7. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др. - М.: Медицина, 1987. - С. 106 - 126.
8. Порушення імунного статусу організму людини за дії хімічних чинників та методи їх визначення: метод. Рекомендації / укл.: І.М. Трахтенберг, Н.М. Дмитруха, О.С. Моложава та ін.-Київ, 2007. – 48 с.
9. Логинский В.Е. Количественное определение циркулирующих иммунных комплексов у гематологических и онкологических больных / В.Е. Логинский, Т.Г. Фецич, Л.С. Захарчук // Лабораторное дело – 1983. - №6 - С. 16 - 18.
10. Гемодитограма (Клінічний аналіз крові): МР ЛНМУ ім. Данила Галицького. Видання 2. – Львів – 2003. – 40 с.

REFERENCES

1. Pukhlyk B.M. Lekarstvennaya allerhyya y pobochnye efekty lekarstvennykh sredstv v allerholohyy. – L'viv: Medytsyna svitu, 2008. – 108 s.
2. Pobedennaya H.P. Lekarstvennaya allerhyya: problemy i puty reshenyya/ H.P. Pobedennaya // Zdorov'ya Ukrainy. – #1(17). – 2012. – S. 60 - 63.
3. Stella A. Cochrane, Josie H.E. Arts. Thresholds in chemical respiratory sensitization. / Stella A. Cochrane, Josie H.E. Arts. [et al.] // Toxicology. – 2015. – V.333 – P. 179 - 94.
4. Doslidzhennya imunotoksychnoyi diyi potentsiyno nebezpechnykh khimichnykh rechovyn pry yikh hiihyenichniy rehlamentatsiyi: MR 8.1.4.104-2003 [Zatv. MOZ Ukrainy 25.07.2003]. K., 2003. – 30 s.
5. Postanovka yssledovannya po hyhyenycheskomu normyrovanyyu promyshlennykh allerhenov v vozdukhe rabochey zony: metodycheskye ukazannya # 2121-80 ot 23.01.1980 h.-Ryha, 1980.
6. Posibnyk z laboratornoyi imunolohiyi / L.Ye. Lapovets', B.D. Lutsyk, H.B. Lebed', V.M. Akimova – L'viv, 2008. – S. 26 - 33.
7. Laboratornye metody yssledovannya v klynyke. Spravochnyk / V.V. Men'shykov, L.N. Delektorskaya, R.P. Zolotnytskaya y dr. - M.: Medytsyna, 1987. - S. 106 - 126.
8. Porushennya immunooho statusu orhanizmu lyudyny za diyi khimichnykh chynnykiv ta metody yikh vyznachennya: metod. Rekomendatsiyi / ukl.: I.M. Trakhtenberh, N.M. Dmytrukha, O.S. Molozhava ta in.-Kyiv, 2007. – 48 s.
9. Lohynskyy V.E. Kolychestvennoe opredelenye tsyrkulyruyushchykh ymmunnykh kompleksov u hematolohycheskykh y onkolohycheskykh bol'nykh / V.E. Lohynskyy, T.H. Fetsych, L.S. Zakharchuk // Laboratornoe delo – 1983. - #6 - S. 16 - 18.
10. Hemotsytograma (Klinichnyy analiz krovi): MR LNMU imeni Danyla Halyts'koho. 2 vydannya. – L'viv – 2003. – 40 s.

Immunotoxic impact assessment Nitroxoline in the experiment on laboratory animals

Iaskiv G.

Abstract. The influence Nitroxoline on the immune system murchakiv. Studied non-specific resistance of the organism by the formula of blood, the phagocytic index. Cellular immunity was assessed on the content of T-lymphocytes and their subpopulations. Humoral immunity - containing immunoglobulin IgA, IgM, IgG and CIC. Nitroxoline affects the immune system and cause allergenic restructuring of the body. Increases the number of eosinophils, lymphocytes, activates neutrophil phagocytic activity. Effects on cellular immunity, increases SD8; IRI; SD3, NK-cells. Violates humoral response adaptive immunity, increases the level of CIC in blood, what contributes to autoimmune diseases.

Keywords: Nitroxoline, immunotoxic effect, cellular and humoral immunity.

Оценка иммунотоксического влияния нитроксолину в условиях эксперимента на лабораторных животных

А. И. Яскив

Аннотация. Проведено исследование влияния нитроксолину на иммунную систему морских свинок. Изучали неспецифическую резистентность организма по формуле крови, фагоцитарному показателю. Клеточный иммунитет оценивали по содержанию Т-лимфоцитов, их субпопуляций. Гуморальный иммунитет - содержанием иммуноглобулинов IgA, IgM, IgG и ЦИКов. Нитроксолин влияет на иммунную систему и вызывает аллергенную перестройку организма. Повышает количество эозинофилов, лимфоцитов, активирует фагоцитарную активность нейтрофилов. Действует на клеточное звено иммунитета: повышает СД₈; ИРИ; СД₃, НК-клетки. Нарушает гуморальный ответ адаптивного иммунитета, повышает уровень ЦИК в крови, способствует возникновению аутоиммунных заболеваний.

Ключевые слова: нитроксолин, иммунотоксическое влияние, клеточный и гуморальный иммунитет.