

6. Виноградов Г.И. Реакция дегрануляции базофилов как метод выявления аллергии и ауто-аллергии к простым химическим соединениям /Г.И. Виноградов, Е.И. Винарская, Г.М. Науменко // Лабораторное дело. – 1989. – №6. – С. 339-341.
7. Макрофагальный тест в диагностике аллергических состояний /А.Д. Адо, Е.М. Кипервасер, Т.А. Алексеева и др. //Клиника и лабораторная диагностика аллергических заболеваний: матер. науч. конф. – Ужгород, 1974. – С. 4-5.
8. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных /М.Ю. Антомонов. – К., 2006. – 558 с.

**СОСТОЯНИЕ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ ОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ
ЧЕРЕЗ 11 МЕСЯЦЕВ ПЕРОРАЛЬНОГО КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ
БЕНЗ/А/ПИРЕНА И ФЕНОЛА**

Винарская Е.И., Остап О.М., Григоренко Л.Е., Лукьянчук С.В., Чубук Т.А., Спаская Ю.С.

Целью работы было установить изменения в отдельных звеньях иммунной системы через 11 месяцев комбинированного действия БП и фенола.

В работе представлена часть результатов экспериментальных исследований, посвященных изучению комбинированного действия различных доз бенз/а/пирена и фенола на иммунную систему организма.

Полученные данные свидетельствуют о том, что пероральное поступление БП и фенола в дозах 0,1 мг в течение 11 месяцев способствует развитию аутоенсибилизации. Показано, что уменьшение в комбинации дозы фенола до 0,002 мг приводит к лимфопении и иммуносупрессии по Т-клеточному типу.

**CONDITION OF THE IMMUNE SYSTEM OF EXPERIMENTAL ANIMALS AFTER ORAL
COMBINED IMPACT OF BENZO(A)PYRENE AND PHENOL DURING 11-MONTH**

Ye.I. Vinarskaya, O.M. Ostash, L.Ye. Grigorenko, S.V. Lukianchuk, T.A. Chubuk, U.S. Spasskaya

The aim of work was to set changes in the separate links of the immune system in 11 months of the combined action of benzo(a)pyrene and phenol.

The work presents some results of experimental research on the combined effect of various doses of benzo(a)pyrene and phenol at the body's immune system. The data obtained indicate that the peroral ingestion of benzo(a)pyrene and phenol in doses of 0,1 mg over 11 months promotes autosensibilization. It has been demonstrated that the reduction of phenol dose in the combination to 0,002 mg leads to lymphopenia and immunosuppression on T-cell type.

УДК 614.7:612.014.46:615.277:612.017

**ОЦІНКА СТАНУ ІМУННОЇ СИСТЕМИ МИШЕЙ
ПІСЛЯ 6 МІСЯЦІВ ЕПІКУТАННОГО ВПЛИВУ БЕНЗ(А)ПІРЕНУ**

*Винарська О.І., Остап О.М., Лук'янчук С.В., Григоренко Л.Є., Чубук Т.А., Спаська Ю.С.
Державна установа "Інститут гігієни та медичної екології ім. О.М. Марзєєва
НАМН України", м. Київ*

Первинна профілактика екозалежних форм злоякісних новоутворень серед населення передбачає, як відомо, своєчасне виявлення канцерогенних факторів довкілля, що

на сьогодні ускладнюється відсутністю надійних, швидких та економічних методів ідентифікації та гігієнічної оцінки канцерогенів.

За наведених обставин надзвичайно актуальним є пошук методів швидкого отримання відповіді про наявність канцерогенних властивостей у хімічних сполук та відбору тих, що в першу чергу потребують дослідження шляхом проведення хронічних дослідів.

Одним із шляхів вирішення цієї проблеми може бути вивчення комплексу показників одночасних змін в організмі, які пов'язані з можливими механізмами реалізації канцерогенезу і відбуваються на ранніх стадіях впливу канцерогенів ще до появи пухлин. Важливу роль при цьому відіграє імунна система організму, як одна з систем, що швидко реагує на вплив факторів довкілля. Тому вивчення механізмів взаємовідношення пухлинних та імунокомпетентних клітин має не лише фундаментальне значення, але й відкриває широкі можливості для проведення більш ефективних профілактичних заходів [1].

Метою даної роботи було встановити імунотоксичні ефекти за умов епікутанної дії протягом 6 місяців різних доз бенз(а)пірену (БП) з урахуванням особливостей індивідуального реагування дослідних тварин.

Об'єм та методи досліджень. У роботі представлені результати фрагменту проведеного хронічного експерименту, що стосується вивчення імунотоксичних ефектів дослідних тварин за епікутанної дії канцерогену протягом 6 місяців. Експериментальні дослідження проводилися на безпорідних мишах, які були розподілені на 4 групи – інтактний контроль (1 група) та 3 групи мишей, яким здійснювали нашкірні аплікації різними дозами БП (2 група – 0,21 мкг; 3 група – 2,1 мкг; 4 група – 10,5 мкг канцерогену на 1 мишу). Нашкірні аплікації здійснювали 5 разів на тиждень шляхом нанесення розчину БП в ацетоні на попередньо вистрижену шкіру міжлопаткової ділянки спини.

Для оцінки стану усіх ланок імунітету тварин у роботі був використаний комплекс імуно-алергологічних методів згідно [2,3], зокрема: загальний вміст лейкоцитів у периферичній крові та їх якісний склад; кількість Т- і В-лімфоцитів; число природних кілерів; фагоцитарна активність нейтрофільних гранулоцитів [4]; реакції дегрануляції базофілів

(за Шеллі) [4]; гальмування розпластування макрофагів [5] та реакція преципітації циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) розчином поліетиленгліколю 6000 [5]. У реакціях було використано тканинний антиген – шкіра [6]. Обрахунок й аналіз отриманих даних проводили загальноприйнятими методами статистичної обробки результатів медико-біологічних досліджень та параметричними методами перевірки статистичних гіпотез (t-критерій Ст'юдента) [7].

Результати дослідження. Аналіз результатів експериментальних досліджень, отриманих через 6 місяців епікутанної дії (121 нашкірна аплікація) бенз(а)пірену у дозах 0,21 мг, 2,1 мг та 10,5 мг (відповідно, 2, 3 та 4 групи дослідних тварин), свідчить про наявність достовірних відмінностей гематологічних та імунологічних показників при їх порівнянні з відповідними величинами у інтактних тварин (табл. 1).

Так, у мишей, котрі підлягали впливу різних доз канцерогену, спостерігалось вірогідне зниження кількості природних кілерів (у контролі величина цього показника становила $(1,00 \pm 0,01)\%$, у 2 та 4 групах – по $(0,17 \pm 0,17)\%$, а у 3 групі – $(0,33 \pm 0,21)\%$).

Порівняння показників неспецифічних факторів резистентності мишей 2 групи з такими у інтактних тварин не виявило достовірних відмінностей. Кількість лейкоцитів, еозинофілів та моноцитів також вірогідно не відрізнялася від відповідних значень у контролі. У мишей цієї дослідної групи, не було виявлено зрушень у клітинній та гуморальній ланках імунної системи (див. табл. 1).

Разом з тим, співставлення отриманих даних за індивідуальними показниками тварин, котрі отримували канцероген у дозі 0,21 мг (2 група), дозволило встановити більш широкий спектр вірогідних змін окремих показників імунного статусу у 3-х із шести мишей (1 самки і 2 самців). Так, у самки визначалася значно нижча загальна кількість нейтрофілів, у тому числі й сегментоядерних нейтрофільних гранулоцитів. Окремі зрушення відбувалися й у самців: у однієї тварини визначалася вища кількість еозинофілів, а у іншої – зростання числа В-лімфоцитів.

Таблиця 1. Гематологічні показники у мишей через 6 місяців епікутанної дії бенз(а)пірену.

Показники	Група дослідних тварин			
	1 група контроль	2 група	3 група	4 група
Лейкоцити, 10^9 /л	12,22 \pm 1,98	10,90 \pm 0,70	10,87 \pm 0,63	15,42 \pm 5,10
Природні кілери, %	1,00 \pm 0,01	0,17 \pm 0,17*	0,33 \pm 0,21*	0,17 \pm 0,17*
Паличкоядерні нейтрофіли, %	3,80 \pm 0,20	3,83 \pm 0,31	3,00 \pm 0,45	4,17 \pm 0,40
Сегментоядерні нейтрофіли, %	20,20 \pm 1,39	19,50 \pm 1,73	22,50 \pm 1,65	23,83 \pm 7,67
Еозинофіли, %	3,20 \pm 0,58	3,67 \pm 0,71	3,17 \pm 0,91	4,50 \pm 0,56
Моноцити, %	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00	1,00 \pm 0,00
Лімфоцити, %	70,80 \pm 1,77	70,17 \pm 1,33	70,00 \pm 1,59	64,67 \pm 7,32
Лімфоцити, 10^9 /л	8,77 \pm 1,58	7,64 \pm 0,49	7,60 \pm 0,47	8,28 \pm 1,27
Нейтрофіли, %	24,00 \pm 1,52	23,33 \pm 1,74	25,50 \pm 1,63	28,00 \pm 8,03
Нейтрофіли, 10^9 /л	2,82 \pm 0,33	2,53 \pm 0,26	2,76 \pm 0,25	6,27 \pm 4,19
Т-лімфоцити, %	14,60 \pm 0,93	15,67 \pm 0,88	17,50 \pm 1,57	19,00 \pm 1,51*
Т-лімфоцити, $\times 10^9$ /л	1,33 \pm 0,30	1,19 \pm 0,09	1,34 \pm 0,17	1,59 \pm 0,31
В-лімфоцити, %	26,60 \pm 1,89	34,17 \pm 2,79	32,00 \pm 1,79	35,00 \pm 2,94
В-лімфоцити, $\times 10^9$ /л	2,31 \pm 0,46	2,62 \pm 0,32	2,42 \pm 0,19	2,84 \pm 0,42
Кількість фагоцитуючих клітин, %	88,20 \pm 3,69	87,50 \pm 2,03	90,50 \pm 2,05	88,83 \pm 2,40
Кількість фагоцитуючих клітин, $\times 10^9$ /л	2,49 \pm 0,31	2,23 \pm 0,26	2,51 \pm 0,27	5,86 \pm 4,05

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

Таким чином, аналіз індивідуальних показників мишей 2 групи показав відмінності реагування імунної системи в залежності від статі: у самки відбувалося пригнічення системи неспецифічних факторів захисту, а у самців – еозинофілія та стимуляція гуморальної ланки імунітету.

Проведення імунологічного обстеження тварин, які підлягали епікутанній дії бенз(а)пірену у дозі 2,1 мг (3 група), дало змогу встановити відсутність змін у показниках лейкоцитограм мишей: рівень лейкоцитів, відносні числа ПЯН, СЯН, еозинофілів, моноцитів, а також загальна популяція нейтрофілів та їх функціональна активність не мали вірогідних відхилень від значень у інтактних тварин (див. табл. 1). Дія досліджуваної дози канцерогену не впливала на вміст Т- і В-лімфоцитів, що може свідчити про відсутність зрушень у клітинній та гуморальній ланках імунітету.

Порівняння індивідуальних показників тварин 3 групи з середніми значеннями у контролі показало, що після нанесення 121 нашкірної аплікації бенз(а)пірену у дозі 2,1 мкг зміни в імунному статусі п'ятьох із шести дослідних мишей можна характеризувати як стимуляцію у окремих тварин різних ланок імунітету та системи неспецифічних факторів резистентності. Так, у одного самця визначалося збільшення відносної кількості нейтрофілів, зокрема, сегментоядерних нейтрофільних гранулоцитів. У інших двох самців спостерігалася еозинофілія, яка у одного з них супроводжувалася збільшенням відносної кількості В-лімфоцитів. У 2-х мишей-самок відбувалося достовірне збільшення популяції Т-клітин. Тобто, як і в попередній групі, визначався різнонаправлений характер реагування мишей на епікутанну дію канцерогену: активація клітинної ланки імунної системи у самок і стимуляція гуморального

імунітету та системи неспецифічних факторів захисту організму у самців.

Збільшення дози бенз/а/пірену до 10,5 мг при епікутанній дії на організм не впливало на загальний рівень та кількість окремих форм лейкоцитів у крові дослідних тварин 4 групи. Зміни фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів також не спостерігалися (див. табл. 1).

Проте, при оцінці вмісту окремих субпопуляцій імунокомпетентних клітин у периферичній крові тварин 4 групи встановлено збільшення відносної кількості Т-лімфоцитів (у 1 групі – $(14,60 \pm 0,93)\%$, у 5 групі – $(19,00 \pm 1,51)\%$) (див. табл. 1). Разом з тим слід відмітити, що з точки зору протипухлинного захисту, клітинна ланка оцінюється як більш важлива [8,9].

Вивчення особливостей індивідуального реагування організму мишей на епікутанну дію максимальної дози бенз/а/пірену (10,5 мг) протягом 6 місяців дозволило виявити у одного з самців достовірні відмінності більшості імунологічних показників: лейкоцитоз, підвищення загального рівня нейтрофілів (зокрема, відносного числа паличко- та сегментоядерних нейтрофільних гранулоцитів) зі зростанням їх фагоцитарної активності. Досліджуючи стан клітинної ланки імунної системи організму, у цієї тварини було встановлено також збільшення відносної та абсолютної кількості Т-клітин, тоді як загальна чисельність лімфоцитів знижувалася. (При патоморфологічному дослідженні у цієї тварини було діагностовано плоскоклі-

тинний рак шкіри). В цей же період у двох інших самців спостерігалось лише підвищення відносного рівня В-лімфоцитів, що може свідчити про стимуляцію гуморального імунітету.

Імунологічна картина у самок 4 групи виглядала дещо по-іншому. Так, при аналізі лейкоцитограм у цих трьох мишей було виявлено зменшення кількості сегментоядерних нейтрофілів. Крім того, у 2-х мишей відмічено підвищення відносного рівня В-лімфоцитів. В той же час розвиток еозінофілії, зменшення абсолютного числа В-клітин та пригнічення фагоцитарної активності нейтрофільних гранулоцитів спостерігалось лише у однієї з самок.

Таким чином, при дослідженні індивідуальних показників імунного статусу в межах окремих дослідних груп виявлявся більш широкий спектр зрушень у порівнянні з середніми значеннями, що може бути зумовлено підвищенням внутрішньо групової змінності, великим розмахом варіаційного ряду того чи іншого показника. Разом з тим відомо, що порушення індивідуального гомеостазу дестабілізує урівноважену з середовищем систему і є сигналом неблагополуччя [10].

Дані, отримані при вивченні впливу досліджуваного канцерогену на розвиток гіперчутливості негайного типу, свідчать, що бенз/а/пірен у дозах 0,21 мг, 2,1 мг та 10,5 мг не призводив до розвитку аутосенсibiliзації в організмі дослідних тварин (табл. 2).

Таблиця 2. Ступінь дегрануляції базофільних гранулоцитів через 6 місяців епікутанної дії бенз(а)пірену.

Група дослідних тварин	% дегранульованих базофілів (тканинний антиген – шкіра) *
1 група (контроль)	$4,80 \pm 1,50$
2 група	$8,67 \pm 0,67$
3 група	$10,40 \pm 0,98$
4 група	$8,00 \pm 1,26$

Примітка. * – від 10 до 20% – реакція слабопозитивна; від 20 до 30% – реакція позитивна; 30% – реакція різко позитивна.

При визначенні загального рівня циркулюючих імунних комплексів (за концент-

рації поліетиленгліколю 3% та 4%) накопичення ЦІК у сироватці крові тварин, які за-

знавали впливу різних доз бенз/а/пірену, не виявлялося (табл. 3). Навпаки, спостерігалось зниження концентрації ЦІК у тварин 2 та 4 груп.

Таблиця 3. Рівень циркулюючих імунних комплексів у крові дослідних тварин через 6 місяців епікутанної дії бенз(а)пірену.

Групи	Концентрація ЦІК, од.екстинкції (3%)	Концентрація ЦІК, од.екстинкції (4%)
1 група (контроль)	52,00 ± 6,01	30,60 ± 7,87
2 група	19,33 ± 3,77*	28,50 ± 3,16
3 група	44,00 ± 5,32	46,33 ± 5,05
4 група	31,67 ± 4,63*	27,50 ± 4,66

Примітка. * – вказана достовірна різниця показників порівняно з 1-ю, контрольною групою (p<0,05).

Індекс гальмування розпластування макрофагів у вивчених дослідних групах був більшим за 0,8 і становив 0,88, 0,85, 0,84 (відповідно, для 2, 3, 4 груп), що свідчить про відсутність розвитку гіперчутливості сповільненого типу за впливу різних доз канцерогену (табл. 4).

Таблиця 4. Реакція гальмування розпластування макрофагів через 6 місяців епікутанної дії бенз(а)пірену.

Групи	Індекс гальмування розпластування макрофагів *
1 група (контроль)	–
3 група	0,88
4 група	0,85
5 група	0,84

Примітка. * – індекс гальмування (ІГ) < 0,8 – реакція позитивна.

Враховуючи результати імунологічного обстеження тварин у попередні терміни спостереження (через 1 та 3 місяці експерименту), які представлені у попередніх публікаціях, та аналізуючи зміни в імунному статусі дослідних тварин у динаміці протягом 6 місяців, можна прослідкувати фазність прояву імунологічних реакцій. Так, на початку експерименту епікутанна дія бенз/а/пірену у дозі 0,21 мг у мишей спостерігалось пригнічення клітинної ланки імунітету, яке супроводжувалося активацією системи неспецифічних факторів захисту при збільшенні дози канцерогену в 10 (3 група) та 20 разів (4 група), а також сенсibilізацією організму мишей 3 групи. При подовженні терміну експо-

зиції до 3 місяців відбувалася нормалізація визначуваних раніше змін. Лише у тварин 3 та 4 груп визначалася аутосенсibilізація до діючого канцерогену за негайним типом. Проте через 6 місяців експозиційного періоду імунологічна картина дещо змінилася. Вплив бенз/а/пірену у всіх досліджуваних концентраціях викликав зменшення у крові мишей числа природних кілерів, котрі є важливим компонентом вродженого імунітету і відіграють ключову роль в елімінації пухлинних клітин у фазі імунологічного нагляду.

Таким чином, у мишей, які підлягали епікутанній дії бенз/а/пірену у дозі 10,5 мкг (4 група) алергічна реакція I типу (негайна

гіперчутливість за класифікацією P. Gell, R. Coombs), яка визначалася через 3 місяці досліджень, на кінець 6 місяця зникала, що може свідчити про розвиток високодозової толерантності.

Висновки

Встановлено, що епікутанна дія протягом 6 місяців бенз/а/пірену в дозах 0,21 мкг, 2,1 мкг та 10,5 мкг призводила до зниження кількості природних кілерів, а вплив канцерогену у найвищій дозі викликав ще й активацію клітинної ланки імунітету.

Виявлено більш широкий спектр зрушень в імунній системі при аналізі показників у окремих індивідів (мишей). Це проявлялося розвитком еозинофілії, зрушеннями в системі неспецифічних факторів захисту організму та активацією гуморальної ланки імунітету.

ЛІТЕРАТУРА

1. Черниченко І.О. Хімічний канцерогенез і профілактика онкологічних захворювань на індивідуальному рівні /І.О. Черниченко, О.М. Литвиченко, Н.В. Баленко //Гігієна населених місць: зб. наук. праць. – 2010. – №56. – С. 149-154.
2. Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals. – Geneva: WHO, 1996. – 390 p.
3. Дослідження імунотоксичної дії потенційно небезпечних хімічних речовин при їх гігієнічній регламентації: Методичні рекомендації /Ін-т екогігієни і токсикології ім. Л.І. Медведя МОЗ України; Розроб. М.Г. Проданчук, П.Г. Жмілько, Д.В. Зінченко та інш. //Збірн. нормативних док-тів з охорони здоров'я. – К., 2003. –№8(31). – С. 149-168.
4. Оценка влияния факторов окружающей среды на иммунологическую реактивность организма: Методические рекомендации /НИИ общей и коммунальной гигиены им. А.Н. Марзеева. – К., 1988. – 23 с.
5. Макрофагальный тест в диагностике аллергических состояний /А.Д. Адо, Е.М. Кипервассер, Т.А. Алексеева и др. //Клиника и лабораторная диагностика аллергических заболеваний: мат. науч. конф. – Ужгород, 1974. – С. 4-5.
6. 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 /Винарская Елена Ивановна. – К., 2000. – 390 с.
7. Антомонов М.Ю. Математическая обработка и анализ медико-биологических данных /М.Ю. Антомонов. – К., 2006. – 558 с.
8. Параметры иммунитета у больных раком желудка /И.Г. Соловьева, Д.Н. Егоров, К.В. Вардосанидзе и др. //Вопросы онкологии. – 2006. – Т. 52, №3. – С. 305-308.
9. Гранов А.М., Молчанов О.Е. Канцерогенез и иммунология опухоли. Фундаментальные и клинические аспекты /А.М. Гранов, О.Е. Молчанов // Вопросы онкологии. – 2008. – Т. 54, №4. – С. 401-409.
10. Роль генетических и других биомаркеров в прогнозировании течения послеоперационного периода у больных раком легкого /Э.Б. Цыбникова, В.А. Спицын, Р.К. Агапова и др. //Вестник Российской академии медицинских наук. – 1996. – №12. – С. 3-5.

**ОЦЕНКА СОСТОЯНИЯ ИММУННОЙ СИСТЕМЫ МЫШЕЙ
ПОСЛЕ 6 МЕСЯЦЕВ ЭПИКУТАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ БЕНЗ(А)ПИРЕНА**
Винарская Е.И., Остап О.М., Лукьянчук С.В., Григоренко Л.Е., Чубук Т.А., Спаская Ю.С.

В работе представлены результаты эксперимента, целью которого было установить иммунотоксические эффекты после 6 месяцев эпикутанного воздействия различных

доз бенз(а)пирена с учетом особенностей индивидуального реагирования подопытных животных. Показано, что эпикутанное воздействие бенз/а/пирена в дозах 0,21 мкг, 2,1 мкг та 10,5 мкг приводило к снижению количества натуральных килеров, а влияние канцерогена в самой большой дозе вызывало также увеличение количества Т-лимфоцитов. Более широкий спектр изменений в иммунной системе (эозинофилия, активация неспецифических факторов защиты организма и гуморального звена иммунитета) установлен при оценке иммунологических показателей индивидуально каждой мыши.

**ASSESSMENT OF MICE IMMUNE SYSTEM STATE
AFTER 6 MONTHS' EPICUTANEOUS BENZOPYRENE EXPOSURE**

Ye.I. Vinarskaia, O.M. Ostash, S.V. Lukianchuk, L.Ye. Grigorenko, T.A. Chubuk, Yu.S. Spasskaia

The results of the experiment for the establishment of immunotoxic effects after 6 months of epicutaneous exposure of benzopyrene different doses taking into account the individual responses of the experimental animals are presented in the article. It is demonstrated that the epicutaneous impact of benzopyrene in the doses of 0,21 mcg, 2,1 mcg, 10,5 mcg leads to a decrease of the number of natural killers. Impact of the carcinogen in its largest dose caused an increase in the number of T-lymphocytes too. A wider range of the changes in the immune system (eosinophilia, activation of nonspecific defense factors of the organism and humoral link of the immunity) has been established at the evaluation of the immunological parameters for each mouse separately.

Куратор розділу – д. мед. наук, проф. Черниченко І.О.