УДК 162.112.95:91

© В.В. Степаненко, Я.А. Ушко, О.О. Якобсон, 2012.

КОРЕЛЯЦІЇ ПОКАЗНИКІВ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ МОНОЦИТІВ ТА НЕЙТРОФІЛІВ ПРИ РОЗВИТКУ СТРЕС-РЕАКЦІЇ

В.В. Степаненко, Я.А. Ушко, О.О. Якобсон

Кафедра фізіології, Державна установа "Луганський державний медичний університет", м. Луганськ.

CORRELATIONS BETWEEN FUNCTIONAL CONDITION OF MONOCYTES AND NEUTROPHYLS BY THE DEVELOPMENT OF STRESS-REACTION

V.V. Stepanenko, Y.A. Ushko, O.O. Yacobson

SUMMARY

In model researches on laboratory animals, reproducing experimental selective mielodepresion, is established, that at a realization in an organism of a unspecific stress-syndrome, in an outcome immobilization, in circulatting neutrofiles the jet changes lysosomal of the vehicle determining increase in whey of activity some them lysosomal enzymes happen, that immediately can render influence to a series of parameters of functional activity monocytes of blood.

КОРЕЛЯЦИИ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МОНОЦИТОВ И НЕЙТРОФИЛОВ В УСЛОВИЯХ РАЗВИТИЯ СТРЕСС-СИНДРОМА

В. В. Степаненко, Я. А. Ушко, Е. А. Якобсон

РЕЗЮМЕ

В модельных исследованиях на лабораторных животных, воспроизводя экспериментальную селективную миелодепрессию, установлено, что при реализации в организме неспецифического стресс-синдрома, в результате иммобилизации, в циркулирующих нейтрофилах происходят реактивные изменения лизосомального аппарата, определяющие увеличение в сыворотке крови активности некоторых их лизосомальных ферментов, что непосредственно может оказывать влияние на ряд показателей функциональной активности моноцитов крови.

Ключевые слова: моноцити, нейтрофіли, стрес-реакція.

Вивченню реактивних функціональних змін моноцитів крові, як складової частини системи мононуклеарних фагоцитів, нині приділяється певне значення [4]. Саме у процесах запалення та регенерації, у неспецифічному протиінфекційному захисті, у специфічному клітинному імунітеті, реакції цієї системи можуть набувати загального характеру, а її структурні елементи нарівні з регуляторними функціями здатні безпосередньо реалізовувати ефекторні відповіді. Система мононуклеарних фагоцитів, один з важливих факторів неспецифічної резистентності організму, бере участь також у реакціях гомеостазу при розвитку стрес-синдрому як однієї зі стадій загально-адаптаційного процесу [8,16]. Але біологічні механізми ініціації цієї системи в організмі не досконало вивчені, а дані доступної нам літератури неоднозначні або суперечливі. Так, встановлено, що поряд з дією гормонів на активність моноцитів [8] деякий вплив можуть здійснювати нейтрофіли [1]. Останні у зв'язку зі з'ясованою функцією нейтрофілів у численних фізіологічних реакціях і патологічних процесах відносяться до універсальних ланок, які забезпечують гомеостаз організму людини та теплокровних тварин [5, 14]. Особливе значення це набуває при розвитку в організмі стрес-синдрому, коли нейтрофіли залучаються до генералізованих каскадних гуморальних реакцій [5], та можуть розглядатися як одна зі стреслімітуючих систем організму [6].

Враховуючи вище відзначені факти, метою нашої роботи було вивчення деяких особливостей впливу циркулюючих нейтрофілів на функціональний стан моноцитів крові при розвитку в організмі тварин неспецифічного стрес-синдрому.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Експерименти проведено на 95 безпорідних кролях обох статей масою 2,5-3 кг, яких утримували за умов віварію при 18 - 20° С і на звичайному раціоні харчування. При експериментах дотримувалися «Міжнародних правил проведення робіт з використанням експериментальних тварин».

Кролів було поділено на дві групи. У тварин І-ї контрольної групи відтворювали розвиток неспецифічного стрес-синдрому іммобілізацією кролів у положенні на спині протягом дванадцяти годин [9]. Тварини ІІ-ї дослідної групи таку іммобілізацію проводили на фоні депресії гранулоцитопоезу.

Пригнічення гранулоцитопоезу здійснювали пероральним введенням мієлосану [10] (АО «Октябрь» Санкт-Петербург) у дозі 10 мг/добу протягом 5-7 діб до зменшення абсолютної кількості нейтрофілів у

периферичній крові на 45-50%.

У кролів обох груп вивчали стан моноцитів крові та циркулюючих нейтрофілів. Моноцити з крові виділяли за допомогою центрифугування у градієнті щільності триомбраст-фікол з наступним використанням здатності моноцитів до адгезії до скла [12].

У моноцитах ідентифікували цитоплазматичну РНК з розрахунком середнього цитохімічного коефіцієнту [2], а також проводили модифікований інтегральний НСТ-тест з наступним визначенням його показників: відсоток функціонально активних клітин, коефіцієнт функціональної активності, відносний коефіцієнт функціональної активності, відсоток фагоцитуючих клітин і коефіцієнт активності фагоцитозу [13].

Обчислювали абсолютну кількість нейтрофілів загальноприйнятим методом. У нейтрофілах візуалізували первинні лізосоми та реакції лізосомального апарату, а також ступінь та індекс дегрануляції. Одночасно у сироватці крові тварин обох груп визначали активність кислої фосфатази [7]. Статистичну обробку отриманих результатів проводили методом прямих різниць [3].

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Результати проведеного дослідження свідчать, що у кролів І-ї групи при 12-годинній іммобілізації відбувалися зміни моноцитів крові (див табл.). Так, підвищувалися показники НСТ-тесту, сягаючи найбільших значень на четверту добу. На чотирнадцяту добу експерименту показники не відрізнялися від вихідних значень. Як відомо, НСТ-тест характеризує активність оксидаз фагосом, дегідрогеназ мітохондрій, гліколізу та пентозофосфатного циклу, що відображає функціональний стан моноцитів [13].

Після іммобілізації протягом двох діб наявність цитоплазматичної РНК у моноцитах була нижчою порівняно з вихідними значеннями, а, починаючи з третьої доби, наявність цитоплазматичної РНК була більшою, ніж у доіммобілізаційний період. На чотирнадцяту добу дослідження рівень цитоплазматичної РНК був аналогічним, доіммобілізаційному.

Така динаміка цитоплазматичної РНК є типовою для постстресорного стану організму й співвідноситься з катаболічною та анаболічною фазою формування «адаптаційного сліду» [11]. Тобто, реалізація в організмі стрес-синдрому внаслідок 12-годинної іммобілізації [9] зумовлює зміни метаболізму цитоплазматичної РНК моноцитів крові.

Одночасно у І-ї групі кролів 12-годинна іммобілізація призводила до розвитку нейтрофільозу з максимумом на четверту добу після стресової дії. Лише на шістнадцяту добу кількість нейтрофілів у периферичній крові була такою ж, як і до іммобілізації.

При неспецифічному стрес-синдромі, викликаному іммобілізацією, нейтрофільоз зумовлюється надходженням кісткомозкового резерву нейтрофілів у перші чотири доби та активізацією надалі процесів гранулоцитопоезу [9]. У кролів І-ї групи розвиток нейтрофільозу супроводжувався зміною функціонального стану лізосомального апарату нейтрофілів. Так, у постіммобілізаційний період спостерігалося зменшення кількості первинних лізосом у нейтрофілах, про що також свідчать і показники ступеня та індексу дегрануляції. Найбільших значень вони сягали на четверту добу постіммобілізаційного періоду. У периферичній крові значно збільшилася абсолютна кількість дегранульованих нейтрофілів. На чотирнадцяту добу досліду вказані показники не відрізнялися від вихідних значень. У кролів І-ї групи, поряд з реакціями моноцитів крові та циркулюючих нейтрофілів у сироватці крові, значно підвищувалася активність кислої фосфатази. Це спостерігалося одночасно зі змінами лісозомального апарату нейтрофілів на фоні нейтрофільозу. Але зміни активності у сироватці крові кислої фосфатази, як маркерного ферменту лізосом, можуть характеризувати лізосомальні реакції клітин різних тканин організму [5]. Тому було застосовано мієлосан, як специфічний засіб мієлодепресивної дії, що дозволяє вибірково зменшувати у циркуляції кількість нейтрофілів [10]. Так, у кролів ІІ-ї групи, яким іммобілізацію проводили на фоні пригнічення гранулоцитопоезу, було встановлено, що у циркуляції значно зменшена абсолютна кількість нейтрофілів порівняно з аналогічними результатами у динаміці спостережень за тваринами І-ї групи. Абсолютна кількість нейтрофілів не відновлювалася протягом усіх шістнадцяти діб досліджень після проведеної іммобілізації. При цьому у нейтрофілах крові відбуваються зміни їх лізосомального апарату, які характеризуються відповідними показниками дегрануляційної реакції. Остання має саме такий напрям, як і у тварин І групи. Поряд з цими реактивними змінами циркулюючих нейтрофілів у сироватці крові кролів ІІ-ї групи спостерігається підвищення активності кислої фосфатази. Але рівень ферменту значно нижчий, ніж у І групі тварин.

Отже, підвищення активності кислої фосфатази у сироватці крові кролів при розвитку в їхньому організмі неспецифічного стрес-синдрому, може залежати від прояву лізосомальних реакцій і кількості саме таких нейтрофілів у циркуляторному руслі. Отже, це ще раз доводить можливість участі нейтрофілів крові у загально-адаптаційних генералізованих гуморальних реакціях на рівні цілісного організму [5].

Крім того, нами встановлено, що у тварин ІІ групи на фоні зниження нейтрофільозу у моноцитах крові відбуваються зміни, які кількісно відрізняються від таких у кролів І-ї групи. Так, показники НСТтесту у моноцитах тварин ІІ групи є нижчими, а зниження наявності цитоплазматичної РНК у моноцитах їх крові було більш довготривалим. Тобто наші результати свідчать про можливість, у певних випадках, впливу циркулюючих нейтрофілів на показники функціональної активності моноцитів крові. А саме, при реалізації в організмі тварин неспецифічного стрес-синдрому, на фоні нейтрофільозу у циркулюючих нейт-

Показник	Група	Вихідний стан	Стан після введення препарату	Стан показників після іммобілізації.					
				1-а доба	2-а доба	4-а доба	6-а доба	10-а доба	14-а доба
Відсоток функціонально активних клітин	I	60,0 ±0,58	–	+14,1 ±0,61	+17,9 ±0,59	+37,9 ±0,75	+26,2 ±0,80	+17,2 ±0,96	–0,8 ±0,83
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.2
	II	59,5 ±0,69	59,1 ±0,64	+3,2 ±1,11	+7,0 ±1,56	+15,7 ±1,88	+12,6 ±1,70	+6,9 ±1,35	+0,1 ±0,38
	P	–	>0.5	<0.02	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	>0.5
	P_1	>0.5	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.2
Коефіцієнт функціональної активності	I	1,44 ±0,013	–	+0,44 ±0,021	+0,59 ±0,014	+1,65 ±0,035	+0,92 ±0,033	+0,53 ±0,017	–0,04 ±0,020
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.05
	II	1,44 ±0,015	1,43 ±0,014	+0,12 ±0,018	+0,23 ±0,037	+0,60 ±0,074	+0,47 ±0,044	+0,26 ±0,049	0 ±0,022
	P	–	>0.5	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.5
	P_1	>0.5	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.1
Відносний коефіцієнт функціональної активності	I	2,40 ±0,026	–	+0,14 ±0,021	+0,20 ±0,024	+0,75 ±0,029	+0,33 ±0,035	+0,16 ±0,030	–0,04 ±0,030
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.5
	II	2,41 ±0,031	2,41 ±0,033	+0,07 ±0,025	+0,09 ±0,021	+0,29 ±0,052	+0,23 ±0,052	+0,14 ±0,047	0 ±0,039
	P	–	>0.5	<0.05	<0.01	<0.001	<0.01	<0.02	>0.5
	P_1	>0.5	–	<0.05	<0.01	<0.001	>0.1	>0.5	>0.2
Відсоток фагоцитуючих моноцитів	I	35,1 ±0,64	–	+7,5 ±1,20	+22,6 ±2,06	+30,1 ±1,63	+23,0 ±1,56	+13,1 ±1,45	+0,1 ±0,67
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.5
	II	34,9 ±0,88	34,6 ±0,50	+2,4 ±0,85	+7,0 ±1,34	+19,6 ±1,56	+14,3 ±1,51	+6,1 ±1,44	+0,5 ±0,40
	P	–	>0.5	<0.02	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	>0.2
	P_1	>0.5	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	>0.5
Коефіцієнт активності фагоцитозу моноцитів	I	1,45 ±0,012	–	+0,37 ±0,009	+0,45 ±0,015	+1,09 ±0,032	+0,85 ±0,044	+0,37 ±0,022	+0,01 ±0,008
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.2
	II	1,45 ±0,010	1,45 ±0,012	+0,25 ±0,028	+0,30 ±0,035	+0,65 ±0,033	+0,37 ±0,021	+0,13 ±0,017	0 ±0,004
	P	–	>0.5	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.2
	P_1	>0.5	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.5

Показник	Група	Вихідний стан	Стан після введення препарату	Стан показників після іммобілізації. 1-а доба	2-а доба	4-а доба	6-а доба	10-а доба	14-а доба
Абсолютна кількість нейтрофілів, $\times 10^9$ /л	I	3,6 ±0,077	–	+1,9 ±0,027	+2,3 ±0,028	+3,2 ±0,027	+2,7 ±0,036	+2,0 ±0,054	+0,1 ±0,060
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.2
	II	3,6 ±0,073	1,5 ±0,071	+0,2 ±0,063	+0,4 ±0,084	+1,0 ±0,113	+0,8 ±0,075	+0,5 ±0,086	+0,7 ±0,109
	P	–	<0.001	<0.02	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	P_1	>0.5	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Ступінь дегрануляції нейтрофілів	I	1,00 ±0,000	–	+0,28 ±0,013	+0,41 ±0,013	+0,79 ±0,018	+0,65 ±0,009	+0,32 ±0,011	0
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.5
	II	1,00 ±0,000	1,00 ±0,000	+0,29 ±0,018	+0,39 ±0,017	+0,75 ±0,016	+0,61 ±0,022	+0,31 ±0,017	0 ±0,002
	P	–	>0.5	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.1
	P_1	>0.5	–	>0.5	>0.2	>0.1	>0.05	>0.2	>0.1
Індекс дегрануляції нейтрофілів	I	0	–	+1,41 ±0,062	+2,41 ±0,099	+7,25 ±0,217	+5,15 ±0,115	+1,73 ±0,081	0
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.5
	II	0	0	+0,43 ±0,095	+0,76 ±0,137	+2,61 ±0,127	+1,87 ±0,116	+0,61 ±0,107	0 ±0,002
	P	–	>0.5	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.1
	P_1	>0.5	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.1
Активність кислої фосфатази (О.Б.)	I	0	–	+0,30 ±0,004	+0,31 ±0,008	+0,41 ±0,007	+0,37 ±0,003	+0,21 ±0,006	0,02 ±0,010
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.1
	II	0	0	+0,05 ±0,012	+0,08 ±0,015	+0,16 ±0,012	+0,14 ±0,012	+0,08 ±0,009	+0,02 ±0,008
	P	–	>0.5	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.1
	P_1	>0.5	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.5
Середній цитохімічний коефіцієнт РНК	I	1,27 ±0,010	–	-0,91 ±0,017	-0,90 ±0,018	+0,75 ±0,060	+0,61 ±0,067	+0,43 ±0,028	-0,01 ±0,007
	P	–	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.2
	II	1,26 ±0,013	1,28 ±0,007	-0,93 ±0,019	-0,93 ±0,022	+0,23 ±0,030	+0,21 ±0,026	+0,10 ±0,024	0 ±0,009
	P	–	>0.5	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	>0.5
	P_1	>0.5	–	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	>0.5

Примітки: I – імунізовані тварини; II – імунізовані тварини, яким вводили імуномодулятор; P – інтактні тварини; P_1 – інтактні тварини, яким вводили імуномодулятор.

рофілах виникають реактивні зміни їх лісозомального апарату, що безпосередньо визначає рівень ферментемії деяких лізосомальних ензимів, які можуть впливати на стан моноцитів крові. Ці факти, можливо, набувають певного біологічного значення, бо поряд з можливістю клітин системи мононуклеарних фагоцитів вплинути на функції нейтрофілів [18], з'ясовано також наявність в організмі оберненого зв'язку.

ВИСНОВКИ

Таким чином, при розвитку у цілісному організмі неспецифічного стрес-синдрому, на фоні нейтрофільозу, циркулюючі нейтрофіли здатні чинити дію як на плазменну ланку гемостазу [5], безпосередньо активуючи фактор Хагемана [5], так і впливати на активність моноцитів у крові, які є структурно-функціональною частиною всієї системи мононуклеарних фагоцитів.

ЛИТЕРАТУРА

1. Адаменко Г.П. Метод оценки взаимодействия нейтрофильных лейкоцитов и моноцитов крови **в** смешанной культуре клеток//Клин. лаб.диагностика.1993.№ 4. С.53.

2. Бутенко З.А., Глузман Д.Ф., Зак К.П. и др. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов. К.:Наук. думка, 1974. С. 7-17.

3. Крошин В.С.Статистика. М.:Знание, 2008. 326 с.

4. Возианов А.Ф., Бутенко А.К., Зак К.П. Цитокины. Биологические и противоопухолевые свойства. К.: Наук, думка, 1998. 317 с.

5. Коваль С.Б., Луніна Н.В., Середенко М.М. Синдром дегрануляції нейтрофільних лейкоцитів // Буковин. мед. .вісник. 2000. 4, Ме 1. С.179-187.

6. Коваль С.Б. Реакция лизосомального аппарата циркулирующих нейтрофильных лейкоцитов и изменение активности ангиотензин-конвертирующего фермента в сыворотке крови рожениц при физиологических и осложненных родах // Медико-социал. проблемы семьи. 1999. 4, № 1. С. 18-23.

7. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. / Под.ред. Меньшова В.В. М.: Медицина, 1987. 368 с.

8. Луговая С. А. Структура и функции моноцитов //Клин. лаб. диагностика. 1997. №9. С.10-16.

9. Лунина Н.В. Абакумова Л.В. Возрастные особенности реакции лизосомального аппарата нейтрофильных лейкоцитов периферической крови кроликов на действие иммобилизации // Физиол.журн. 1991. 37, Ms 2. С.60-65.

10.Машковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Медицина, 1987. 2. С.446-447.

11.Меерсон Ф.З. Постстрессорная активизация синтеза нуклеиновых кислот и белков и ее роль в адаптационных реакциях организма // Патол.физиология и эксперим.терапия. 1982. № 5. С.3-14.

12.Михеенко Т.В. Два метода получения обогащенной популяции моноцитов периферической крови // Лаб. дело. 1987. №10.-С. 763-766.

13.Филев Л.В. Особенности функциональной активности моноцитов при остром вирусном гепатите //Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 1985. №8. С.61-65.

14.Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbe//Immunity. 2010 Nov 24;33(5):657-70.

15.Gordon L.I., Douglas S.D., Kay N.E. et al. Modulation of neutrophil function by lysosome, a macrophage secretory product. In.: International Conference on Sarcoidosis and other Granulomatour Disoerdes, 7th. Cardiff. 1980. P.76-83.

16.Kadoi K. An in vitro monocyte culture method and establishment of a human monocytic cell line (K63). //Veterinaria Italiana. 2011 Apr-Jun;47(2):139-46.