

УДК: 612.112.3+612.119–612.119+612.017

Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови крыс с различной реакцией на стресс

Е.В.Кузьменко, Н.А.Никифорова, М.О.Иваненко

ГУ «Институт медицинской радиологии имени С.П.Григорьева АМН Украины» (Харьков, Украина)

Изучена функциональная активность фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови крыс в зависимости от их реакции на стресс-воздействие. По реакции белого ростка кроветворения животных разделили на гипо- и гиперреактивных. Изменения показателей нейтрофильного фагоцитоза в условиях стресса имели двухфазный характер. Первая фаза (через 3 часа после иммобилизации) характеризовалась снижением параметров фагоцитоза, вторая (через 24 часа после иммобилизации) – увеличением. Этот процесс более выражен у гиперреактивных животных по сравнению с гипореактивными.

Ключевые слова: *фагоцитоз, периферическая кровь, стресс, реактивность.*

Фагоцитарна активність нейтрофілів периферичної крові щурів з різною реакцією на стрес

О.В.Кузьменко, Н.А.Никифорова, М.О.Иваненко

Вивчена функціональна активність фагоцитуючих нейтрофілів периферичної крові щурів залежно від їх реакції на стрес-вплив. По реакції білого ростка кровотворення тварин розділили на гіпо- та гіперреактивних. Зміни показників нейтрофільного фагоцитозу в умовах стресу мали двофазний характер. Перша фаза (через 3 години після імобілізації) характеризувалася зниженням параметрів фагоцитозу, друга (через 24 години після імобілізації) – збільшенням. Цей процес більш виражений у гіперреактивних тварин у порівнянні з гіпореактивними.

Ключові слова: *фагоцитоз, периферична кров, стрес, реактивність.*

Phagocytic activity of peripheral blood neutrophils in rats with different reaction on stress

Ye.V.Kuzmenko, N.A.Nikiforova, M.O.Ivanenko

Functional activity of peripheral blood phagocytosis neutrophils of rats with different reactivity under immobilized stress has been studied. Animals were divided in two groups – hyporeactive and hyperreactive according to the reaction of the white blood. Changes of indexes of neutrophil phagocytosis in the conditions of stress had diphasic character. The first phase (in 3 hours after immobilization) was characterized by decrease in phagocytosis parameters, and the second one (in 24 hours after immobilization) – by increase in these indexes. This process is more expressed in hyperreactive animals in comparison with hyporeactive rats.

Key words: *phagocytosis, peripheral blood, stress, reactivity.*

Введение

Изучение влияния стресса на защитные функции организма является одной из важнейших задач современной биологии и медицины.

Известно, что стрессорная реакция, как комплекс механизмов психических и соматических проявлений живого организма в ответ на внешнее воздействие, направлена на сохранение многоуровневого гомеостаза (Груздева, Шилов, 2003). Основная роль стресса заключается в усилении адаптивных возможностей организма, которые обеспечивают известное постоянство изменчивости внутренней среды (Шилов и др., 2005; Горизонтов и др., 1983). Однако влияние этих изменений на состояние некоторых показателей неспецифической резистентности организма при стрессе до конца не изучено.

В ряде работ (Воронина, 1989; Орлова и др., 2003; Барабой, 2006), а также в наших предыдущих исследованиях (Москаленко та ін., 1995) показано, что крысы различаются по своей реактивности в ответ на стресс-воздействие. Однако остается неясным, как последняя отражается на функциональной и, в частности, фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови.

Цель работы – изучение функциональной активности фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови крыс в зависимости от их реакции на стресс-воздействие.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на 48 крысах-самцах линии Вистар массой 180–220 г, 3-месячного возраста, которые находились в условиях стандартного светового и пищевого режима (вода и еда *ad libitum*). Животные были подвергнуты стресс-воздействию 3-часовой иммобилизацией в положении лежа на животе. Кровь отбирали из латеральной хвостовой вены до иммобилизации, через 3 и 24 часа после воздействия. Фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови оценивали методом завершеного фагоцитоза (Кудрявицкий, 1985). Для оценки параметров фагоцитарной реакции нейтрофилов периферической крови крыс определяли их поглотительную и переваривающую способность по отношению к тест-культуре стафилококка (штамм С-52) после совместной инкубации.

Результаты учитывали микроскопически. Рассчитывали комплекс показателей: фагоцитарное число (Фч) – процент фагоцитов из числа сосчитанных нейтрофилов (у.е.), фагоцитарный индекс (Фи) – среднее число микробов, поглощенных одним активным нейтрофилом. Для оценки переваривающей функции фагоцитов определяют бактерицидную активность нейтрофилов (БАН), т.е. отношение количества переваренных микробов к общему числу поглощенных микробов, выраженное в процентах, и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ).

Математическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel for Windows XP. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента (Гланц, 1999). Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Реакция на действие стрессовых факторов является индивидуальным свойством организма. Формирование приспособительных механизмов обеспечивается через непрерывный обмен информацией между уровнями управления. Информация, которая заложена в функциональной и, в частности, фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови и кодируется мозговой деятельностью, может быть использована для оценки регуляторных механизмов, которые характеризуют адаптационные возможности организма (Ярилин, 2006).

Результаты исследования реакции белого ростка кроветворения в ответ на стрессорное воздействие позволили разделить животных на две группы (табл. 1): гиперреактивные (2 группа, $n=20$) – с резко выраженным по отношению к исходному уровню для каждого животного изменением процентного соотношения содержания лимфоцитов к нейтрофилам (л/н) – $0,49 \pm 0,01$; гипореактивные (1 группа, $n=20$) – с однонаправленной, но менее выраженной реакцией (со средним значением коэффициента л/н $0,92 \pm 0,08$), $p < 0,01$ между группами. Среднее значение данного коэффициента в норме составляло $2,3 \pm 0,09$ ($1,84–2,37$), ($n=8$) (Кузьменко та ін., 2008).

Разделение крыс на гипо- и гиперреактивных позволило проанализировать особенности функциональной активности фагоцитирующих клеток периферической крови животных разной реактивности.

Установлено, что дозированная кровопотеря, связанная с взятием крови, приводила к снижению количества эритроцитов и концентрации гемоглобина (табл. 1). Эти показатели оставались сниженными до конца наблюдения. Наименьшее среднее значение числа эритроцитов и концентрации гемоглобина отмечено во 2 группе – $2,7 \pm 0,5 \times 10^{12}/л$ и $106,5 \pm 4,2$ г/л соответственно сразу после стресса. Развитие умеренной постгеморрагической анемии можно рассматривать как фактор, усиливающий стрессорное воздействие иммобилизации.

Через 3 часа после иммобилизации во 2-й группе (гиперреактивные животные) развивался нейтрофильный лейкоцитоз с одновременным снижением относительного количества циркулирующего пула лимфоцитов периферической крови. Если относительное содержание нейтрофилов до стрессорного воздействия составляло $31,1 \pm 1,2$ %, то после воздействия $61,9 \pm 2,2$ % ($p < 0,05$), в то время как относительное содержание лимфоцитов составляло $66,8 \pm 1,2$ и $28,5 \pm 1,5$ % ($p < 0,05$) соответственно. В группе гипореактивных животных (1 группа) в этот период наблюдения нейтрофильная реакция была менее выражена (количество нейтрофилов в контрольной группе составило $31,1 \pm 1,2$ %), а через 3 часа после стресс-воздействия – $42,7 \pm 1,3$ % ($p < 0,05$), содержание же лимфоцитов равнялось до стресса $66,8 \pm 1,1$ %, а через 3 часа после него – $45,6 \pm 1,3$ % ($p < 0,05$).

Изучение поглотительной способности фагоцитирующих нейтрофилов периферической крови показало, что через 3 часа после стресса в обеих группах животных наблюдалось снижение как фагоцитарного индекса (Фи), так и фагоцитарного числа (Фч), выраженное в группе гиперреактивных

животных. Фи у крыс 1 и 2 групп составил $90 \pm 2,1$ % и $74 \pm 1,5$ %, ($p < 0,02$), а Фч – $4,6 \pm 0,5$ у.е. и $2,1 \pm 0,2$ у.е. ($p < 0,02$) соответственно (табл. 2).

Однако в связи с развитием нейтрофильного лейкоцитоза относительное содержание нейтрофилов недостаточно отражает изменения их фагоцитарной активности. Поэтому было рассчитано абсолютное число фагоцитирующих нейтрофилов. Установлено, что абсолютное число последних через 3 часа после иммобилизации повышалось и составило в 1 группе $74,4 \pm 1,5 \times 10^9$ /л, а во 2 группе – $115,2 \pm 2,2 \times 10^9$ /л ($p < 0,02$) (табл. 2).

Таблица 1.

Изменение количества гемоглобина, эритроцитов, нейтрофилов, лейкоцитов, лимфоцитов в периферической крови гипо- и гиперреактивных крыс после 3-часовой иммобилизации

Группа	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, $\times 10^{12}$ /л	Лейкоциты, $\times 10^9$ /л	Лимфоциты, %	Нейтрофилы, %
К (n=8)	$195 \pm 0,8$	$10,5 \pm 0,1$	$14,2 \pm 0,6$	$66,8 \pm 1,2$	$31,1 \pm 1,2$
через 3 часа после стресса					
1 (n=20)	$147 \pm 3,5^*$	$5,2 \pm 0,4$	$18,5 \pm 0,5$	$45,6 \pm 1,3^*$	$42,7 \pm 1,3^*$
2 (n=20)	$106,5 \pm 4,8$	$2,7 \pm 0,5^*$	$19,5 \pm 0,5^*$	$28,5 \pm 1,5$	$61,9 \pm 2,2^*$
через 24 часа после стресса					
1 (n=20)	$185 \pm 0,5^*$	$9,2 \pm 0,6^*$	$14,9 \pm 0,8^*$	$56,6 \pm 1,2^*$	$42,0 \pm 2,1^*$
2 (n=20)	$138 \pm 2,1^*$	$7,1 \pm 0,3$	$16,6 \pm 0,7$	$49,0 \pm 1,6^*$	$33,5 \pm 1,5$

Примечание: 1 группа – гипореактивные, 2 группа – гиперреактивные, К – контрольная группа; * – достоверно по отношению к показателям до стресса; $p < 0,05$.

Таблица 2.

Изменение фагоцитарной активности нейтрофилов гипо- и гиперреактивных крыс

Группа	Фагоцитарный индекс (Фи)		Фагоцитарное число (Фч)	Бактерицидная активность нейтрофилов (БАН)	Индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ)
	%	$\times 10^9$ /л			
К (n=8)	$98 \pm 1,4$	$43,1 \pm 1,2$	$6,3 \pm 0,6$	$47,4 \pm 1,3$	$1,2 \pm 0,4$
через 3 часа после стресса					
1 (n=20)	$90 \pm 2,1^*$	$74,4 \pm 1,5^*$	$4,6 \pm 0,5$	$39,0 \pm 0,6^*$	$0,8 \pm 0,1^*$
2 (n=20)	$74 \pm 0,6^{***}$	$115,2 \pm 2,2^{***}$	$2,1 \pm 0,2^*$	$27,6 \pm 1,7^*$	$0,5 \pm 0,3$
через 24 часа после стресса					
1 (n=20)	$94 \pm 1,0$	$71,2 \pm 2,3^*$	$5,1 \pm 0,1^*$	$40,0 \pm 0,8^*$	$1,1 \pm 0,1^*$
2 (n=20)	$96 \pm 1,1^{***}$	$88,8 \pm 3,0^{***}$	$4,8 \pm 0,5^{***}$	$38,1 \pm 1,4^*$	$1,7 \pm 0,2^{***}$

Примечание: 1 группа – гипореактивные, 2 группа – гиперреактивные, К – контрольная группа; достоверно по отношению: * – к показателям до воздействия фактора ($p < 0,05$); ** – гиперреактивные и гипореактивные ($p < 0,02$).

По-видимому, отсутствие параллелизма в динамике между относительными и абсолютными показателями на данный период обследования может быть связано с выбросом из костномозгового

депо относительно незрелых в функциональном отношении нейтрофилов (Шилов, Орлова, 2000; Barriga et al., 2001).

Через 24 часа после иммобилизации наблюдалось дальнейшее повышение относительного и снижение абсолютного количества циркулирующего пула нейтрофилов в обеих группах (табл. 2).

При этом отмечалась снижение переваривающей способности. Бактерицидная активность нейтрофилов (БАН) в группе гиперреактивных животных составила по сравнению с контролем $27,6 \pm 1,7$ % – через 3 часа после стресса и $38,1 \pm 1,4$ % – через 24 часа после него, $p < 0,06$. В группе гипореактивных животных снижение БАН носило, относительно контрольных крыс, менее выраженный характер ($39,0 \pm 0,6$ % – через 3 часа после стресса и $40,0 \pm 0,8$ % – через 24 часа после воздействия, $p < 0,02$). Снижение бактерицидной активности нейтрофилов крови через 3 часа после иммобилизации сопровождалось у гиперреактивных животных угнетением индекса завершенности фагоцитоза (ИЗФ), который составил $0,5 \pm 0,3$ у.е. В группе гипореактивных животных снижение ИЗФ было незначительно; значение индекса – $0,8 \pm 0,1$ у.е. Через 24 часа в обеих группах наблюдали одностороннее повышение ИЗФ ($1,1 \pm 0,1$ – 1 группа и $1,7 \pm 0,5$ – 2 группа ($p < 0,05$)).

Полученные в работе данные указывают на важную роль активации фагоцитирующих клеток в повышении резистентности организма при стрессе. Известно, что стресс представляет собой типовой комплекс реакций аварийного реагирования, направленных на максимальную мобилизацию энергетических ресурсов организма для повышения его резистентности к действию повреждающих факторов (Хайтов, Лесков, 2001; Asterita, 1985).

Как показано в настоящей работе, при остром стрессе наблюдалось достоверное повышение фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови у гиперреактивных животных. Изменения показателей нейтрофильного фагоцитоза в условиях стресса имели двухфазный характер. Первая фаза (через 3 часа после иммобилизации) характеризовалась снижением параметров фагоцитоза, а вторая (спустя 24 часа после иммобилизации) – увеличением показателей фагоцитоза.

Депрессия показателей нейтрофильного фагоцитоза в первой фазе может быть связана с выходом из костномозгового депо относительно незрелых нейтрофилов. Важно отметить, что эта фаза изменений функций поглотительной активности фагоцитирующих клеток совпадала с развитием стадии тревоги общего адаптационного синдрома, а вторая – со стадией повышенной резистентности. Этот процесс был более четко выражен у гиперреактивных животных по сравнению с гипореактивными.

Выводы

Таким образом, результаты исследования показали, что интенсивность депрессии исследуемых показателей клеточного звена иммунитета определяется индивидуальными особенностями организма, в частности исходной реактивностью иммунной системы в ответ на неспецифичное стрессорное влияние.

Список литературы

- Барабой В.А. Стресс: природа, биологическая роль, механизмы, исходы – К.: Фитосоциоцентр, 2006. – 424с.
- Воронина Н.П. Функциональная активность разных классов макрофагов при стрессе // Сб. научн. тр.: Моделирование и клиническая характеристика фагоцитарных реакций. – Горький, 1989. – С. 15–21.
- Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М: Практика, 1999. – 459с.
- Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И. Стресс и система крови. – М: Медицина, 1983. – 824с.
- Груздева Е.А., Шилов Ю.И. Влияние тестостерона на количественный состав и фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови крыс // Медицинская иммунология. – 2003. – Т.5, №3–4. – С.198.
- Кудрявицкий А.И. Оценка киллерной бактерицидности нейтрофилов периферической крови здоровых доноров и больных в прямом визуальном тесте // Лабораторное дело. – 1985. – №1. – С. 45–47.
- Кузьменко О.В., Иваненко М.О., Никифорова Н.А. та ін. Стан лейкопоезу щурів різної індивідуальної реактивності в залежності від часу доби опромінення // Український радіологічний журнал. – 2008. – Т.16, вип.1. – С. 55–61.
- Москаленко І.П., Никифорова Н.А., Лозінська І.М. та ін. Прояв індивідуальної реактивності щурів у пострадіаційній депресії лейкопоезу // Український радіологічний журнал. – 1995. – №3. – С. 256–260.

- Орлова Е.Г., Ланин Д.В., Шилов Ю.Ш. Модуляция функциональной экспрессии адренорецепторов фагоцитирующих клеток при остром стрессе и введении гидрокортизона // Медицинская иммунология. – 2003. – Т.5, № 3–4. – С. 209–210.
- Хаитов Р.М., Лесков В.П. Иммуитет и стресс // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. – 2001. – Т.87, №8. – С. 1060–1073.
- Шилов О.И., Орлова Е.Г. Адренергические механизмы регуляции функций фагоцитирующих клеток периферической крови крыс при остром стрессе // Медицинская иммунология. – 2000. – Т.4, №1. – С. 29–36.
- Шилов Ю.И., Шилов С.Ю., Ланин Д.Р. и др. Адренергические механизмы регуляции иммунного ответа и функций неспецифических эффекторных клеток при стрессе // Медицинская иммунология. – 2005. – Т.7, №2–3. – С. 127–128.
- Ярилин А.А. Иммуные и цитогенетические эффекты плотно- и редкоионизирующих излучений – К.: Здоров'я, 2006. – 200с.
- Barriga C., Artin M.I., Tabla R. et al. Circadian rhythms of melatonin, corticosterone and phagocytosis: effect of stress // J. Pineal Res. – 2001. – Vol.30. – P. 180–187.
- Asterita M.F. The physiology of stress. – NY: Human Sciences Press, 1985. – 264p.

Представлено: А.М.Марющенко / Presented by: A.M.Maryushenko

Рекомендовано до друку: Є.Е.Перським / Recommended for publishing by: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 15.02.2010.

© О.В.Кузьменко, Н.А.Никифорова, М.О.Іваненко, 2010
© E.V.Kuzmenko, N.A.Nikiforova, M.O.Ivanenko, 2010