

УДК 611-018.53:591.543.42.085

В. В. Ломако, Л. Н. Пироженко*

ЛЕЙКОЦИТЫ ПРИ ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

*ДУ «Отделенческая больница ст. Люботин УТОО ЮЖД» (г. Люботин)

Работа выполнена в рамках плановой темы «Вивчення реакцій функціональних систем організму при різних видах холодних впливів в нормі, вікових періодах та патологічних станах», ГР № 0100U003477.

Вступление. Естественный гипобиоз (ЕГ) у млекопитающих (например, зимняя спячка) широко распространен в природе, является генетически детерминированной стратегией, позволяющей животным выжить в условиях низких температур и недостатка кормов и воды, основан на обычных физиологических реакциях организма и сопровождается обратимым многократным подавлением физиологических и обменных процессов. Состояние ЕГ прерывается периодами, во время которых восстанавливается температура тела и происходят быстрые и интенсивные колебания показателей гомеостаза организма [4,10]. Искусственный гипобиоз (ИГ) при снижении температуры тела до 20–15 °С в условиях гипоксии-гиперкапнии вызывает угнетение подвижности, тактильной и болевой чувствительности, интенсивности метаболизма, ритма сердца и исчезновение БЭА головного мозга. Из этого состояния животное способно возвращаться к нормотермии, как и при естественном гипобиозе [7]. Кроме того, способность погружаться в гипометаболические состояния коррелирует с устойчивостью клеток и систем к повреждениям различного типа [10], что делает подобные состояния чрезвычайно интересными с точки зрения фундаментальной и прикладной медицины.

Практически любые изменения в организме млекопитающих, в частности представления об адаптационных реакциях, в значительной мере связаны с количественно-качественной оценкой изменений лейкоцитарной формулы периферической крови. Степень этих изменений зависит не только от силы и характера внешних воздействий, но и от реактивности организма.

Лейкоциты формируют в организме мощный кровяной и тканевой барьеры против микробной, вирусной и паразитарной инфекций, поддерживают тканевую регенерацию и гомеостаз. Различные виды лейкоцитов выполняют определенные функции, изучение их соотношения, содержания молодых форм,

выявление патологических клеточных форм несет ценную диагностическую информацию [3].

Цель работы — изучение и анализ количественно-качественного соотношения различных видов лейкоцитов при искусственном и естественном гипобиозе у гибернарующих (хомяки) и негибернарующих (крысы) животных.

Объект и методы исследования

Эксперименты проведены на половозрелых самцах золотистых хомячков *Mesocricetus auratus* и крыс линии Вистар с соблюдением всех биоэтических норм при работе с лабораторными животными. Искусственное и естественное гипометаболическое состояние моделировали согласно описанным ранее методам [5,9]. Образец периферической крови забирали у животных непосредственно в состоянии гипобиоза, через 2 и 24 ч после выхода из него и исследовали, используя стандартный метод микроскопического изучения крови — приготовление мазка на предметном стекле [2]. Мазок крови обрабатывали фиксатором Май-Грюнвальда и окрашивали гематологическим красителем (по Романовскому), подсчитывали количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу (процентное соотношение различных видов лейкоцитов).

Рассчитывали следующие интегральные лейкоцитарные индексы [1,8]:

Лейкоцитарный индекс (ЛИ=Л/С) — отражает взаимоотношение гуморального и клеточного звеньев иммунной системы;

Лейкоцитарный индекс интоксикации Кальф-Калифа (ЛИИ=(4Ми+3Ю+2П+С)х(Пл+1)/(Л+М)х(Э+1) — характеризует уровень эндогенной интоксикации и активизации процессов тканевого распада;

Индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ=(Э+Б+С+П)/Л+М) — его повышение — свидетельствует об активном воспалительном процессе и нарушении иммунологической реактивности;

Лимфоцитарно-гранулоцитарный индекс (ЛГИ=10Л/(Ми+Ю+П+С+Э+Б) — позволяет дифференцировать аутоинтоксикацию и инфекционную интоксикацию;

Индекс соотношения нейтрофилов и лимфоцитов (ИСНЛ=П+С/Л) — отражает со-

отношение клеток неспецифической и специфической защиты,

где Ми — содержание (в %) миелоцитов, Ю — юных форм (метамиелоцитов), П — палочко- и С — сегментоядерных лейкоцитов, Пл — плазматических клеток, Л — лимфоцитов, М — моноцитов, Э — эозино- и Б — базофилов.

Статистическую обработку проводили методом Стьюдента-Фишера.

Результаты исследований и их обсуждение. Функциональная активность лейкоцитов связана с формированием первой линии защиты от внешних и внутренних агентов, направленной на поддержание постоянства внутренней среды организма. Основная их функция — защита от инфекций путем хемотаксиса (направленного движения к стимулирующим агентам) и фагоцитоза (поглощения и переваривания) чужеродных микроорганизмов.

Нейтрофильные лейкоциты секретируют вещества, обладающие бактерицидными свойствами, способствуют регенерации тканей, удаляя из них повреждённые клетки и секретируя стимулирующие регенерацию вещества. Азурофильные и специфические гранулы нейтрофилов содержат более 20 протеолитических ферментов (в частности, большое количество эластазы, которая может быть фактором, приводящим к деструкции тканей в очаге воспаления, коллагеназу и желатиназу, которые могут вызывать деградацию внеклеточного матрикса), а также миелопероксидазу, интегрин, бактерицидные белки (лактоферрин, дефенсины, катионный антимикробный белок), лизоцим, щелочную фосфатазу, вызывающие бактериолиз и переваривание микроорганизмов. На мембране нейтрофилов расположены различные группы рецепторов, осуществляющие связь нейтрофилов с их микроокружением и регулирующие функциональную активность нейтрофилов: хемотаксис, адгезию, дегрануляцию, поглощение. Это рецепторы для Fc-фрагмента иммуноглобулинов, компонентов комплемента (C3, C5a, CR1). На поверхности нейтрофилов обнаружены интегрин, селектины, которые обеспечивают взаимодействие нейтрофилов с эндотелиальными клетками и последующую миграцию нейтрофилов из кровеносного русла в ткани.

Нейтрофилы способны синтезировать и секретировать ряд цитокинов (ФНО α , ИЛ-1 α , ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-12), колониестимулирующих факторов (ГМ-КСФ, Г-КСФ, М-КСФ), TGF β . Эти БАВ позволяют нейтрофилам участвовать в реакции воспаления, обеспечивают их созревание и функциональную активность, а также определяют влияние нейтрофилов на эффекторные функции других клеток [1–3,6].

Искусственный (у крыс и хомяков) и естественный (у хомяков) гипобиоз сопровождались лейкопенией ($2,5 \pm 0,5 \times 10^9$ /л, в контроле $6-7 \times 10^9$ /л) — значительным снижением количества лейкоцитов, что имеет место при некоторых инфекциях, острых лейкозах, гиперспленизме и др. и указывает на угнетение или истощение защитных механизмов организма [2,3]. Однако, причина наблюдаемой при естественной гибернации лейкопении неизвестна, возможно, быстрая трансмиграция лейкоцитов через клетки эндотелия опосредована действием многих цитокинов, в том числе и хемокинов, уровень которых повышается в плазме и нарушает лейкоцитарный трафик [10]. Было показано, что инкубация с плазмой сусликов, находящихся в состоянии гибернации, и, в меньшей степени, нормотермических сусликов, увеличивает адгезию моноцитов к эндотелиоцитам крыс. Лейкопения при торпидных состояниях может снижать риск воспалительной инфильтрации в уязвимые области, такие как ЦНС, во время выхода из спячки [11]. Лейкопению можно объяснить изменениями условий циркуляции во время спячки, когда часть лейкоцитов из сосудистого русла мигрирует в ткани (селезенки, легких, костного мозга, слизистой ЖКТ) и там депонируется [10]. Нейтрофилы, в основном, мигрируют путем движения между эпителиальными клетками, что приводит к временному нарушению межэпителиальных контактов, затем к локальной потере эпителиоцитов и образованию округлых дефектов внутри монослоя (микрповреждениям). Эти нарушения частично происходят за счет лейкоцитарных протеиназ [2,3, 6,10].

В наших экспериментах ЕГ и ИГ характеризовались увеличением количества палочкоядерных нейтрофилов, т.н. сдвиг лейкоцитарной формулы влево, который

Таблица 1

Лейкоцитарные показатели периферической крови хомяков при естественном гипометаболизме (M+m)

Показатели	Контроль (n=10)	ЕГ (n=12)	ЕГ 2 ч (n=6)	ЕГ 24 ч (n=7)
П %	3,8+1,03	6,18+2,52	13,57+1,72*	9,22+2,05*
С %	30,2+2,61	19,92+2,12*	29,14+3,08	32,43+2,49
Л %	64,2+2,68	72,17+2,93*	56,28+4,5	55,86+3,53*

Продолжение таблицы 1

ЭрБ %	-	2+1	2+1	-
Пл %	-	2+1	1+1	-
ЛИ	2,022+0,193	3,251+0,225*	2,190+0,410	1,727+0,395
ЛИИ	0,326+0,082	0,582+0,081*	2,293+0,334*	0,883+0,173*
ИСЛ	0,618+0,042	0,430+0,081*	0,802+0,137*	0,720+0,118
ИЛГ	17,95+1,96	25,34+2,54*	12,89+2,38	14,00+1,59
ИСНЛ	0,531+0,050	0,424+0,040	0,835+0,164*	0,824+0,124*

Примечание: здесь и в табл. 2, 3 * - различия достоверны по сравнению с контролем (p<0,05); ЭрБ – эритробласт.

был более выражен при ИГ, усиливался и сохранялся таковым и после выхода из гипобриоза (табл. 1–3). У крыс через 24 ч после ИГ данный показатель возвращался к исходному уровню (табл. 3).

Различают сдвиг влево (регенеративный), когда увеличение числа палочкоядерных

нейтрофилов сочетается с появлением молодых форм (миелоцитов, метамиелоцитов). При этом обычно появляется лейкоцитоз, что свидетельствует о повышенной активности костного мозга. И дегенеративный сдвиг, который характеризуется увеличением только палочкоядерных лейкоцитов, что указы-

Таблица 2

Лейкоцитарные показатели периферической крови хомячков при искусственном гипометаболизме (M+m)

Показатели	Контроль (n=10)	ИГ (n=5)	ИГ 2 ч (n=7)	ИГ 24 ч (n=5)
П %	3,8+1,03	12,2+3,4*1	8,86+3,33*	3,0+0,77
С %	30,2+2,61	33,6+3,98	50,43+3,64*	22,2+1,71*
Л %	64,2+2,68	48,0+4,09*	38,86+4,17*	74,2+1,16*
ЭрБ %	-	2+1	1+1	-
Пл %	-	2+1	2+1	-
ЛИ	2,022+0,193	1,736+0,395	0,708+0,059*	3,232+0,497*
ЛИИ	0,326+0,082	2,884+0,91*5	2,547+0,655*	0,391+0,141
ИСЛ	0,618+0,042	0,887+0,186*	1,695+0,263*	0,362+0,023*
ИЛГ	17,954+1,957	17,078+2,187	10,831+2,641*	29,598+1,697*
ИСНЛ	0,531+0,050	0,943+0,199*	1,690+0,261*	0,325+0,023*

вает на функциональное угнетение костного мозга, его лейкопоэтической деятельности и встречается при вирусных инфекциях в сочетании с лейкопенией, при тяжелой интоксикации [2,3].

В мазках крови у хомячков при ЕГ и ИГ, а также через 2 ч после выхода мы наблюдали появление эритробластов, что является показателем интенсивного раздражения костного мозга, возможно, вследствие гипоксии. Также мы находили плазматические клетки (незрелые В-лимфоциты), у небольшой части лимфоцитов наблюдалась плазматизация цитоплазмы, что является следствием сбоя в работе иммунной системы. У некоторых хомячков при ИГ в образцах крови наблюдали единичные (1±1 %) нормобласты, также появляющиеся при раздражении костного мозга, когда ощущается нехватка гемоглобина в крови (табл. 1,2).

Для оценки неспецифической резистентности организма рассчитывали интеграль-

ные лейкоцитарные индексы, позволяющие оценить в динамике состояние различных звеньев иммунной системы, не прибегая к специальным методам исследования [1,8]. При ЕГ происходило увеличение ЛИ, ЛИИ и ИЛГ, а ИСЛ и ИСНЛ, напротив, снижались (табл. 1); после выхода из ЕГ ЛИ снижался, ЛИИ и ИСНЛ значительно повышались (особенно, ЛИИ через 2 ч после выхода). Следовательно, состояние ЕГ у хомячков сопровождалось преобладанием гуморального звена иммунной системы, повышением уровней ауто- и эндогенной интоксикации (ЭИ), активацией процессов тканевого распада, но без воспалительного процесса, нарушением иммунологической реактивности и усилением специфической защиты. Период выхода из ЕГ характеризовался активацией клеточного звена иммунитета, усилением процессотканевого распада, ЭИ и преобладанием неспецифической защиты.

При ИГ и через 2 ч у хомяков ЛИИ, ИСЛ и ИСНЛ повышались, в то время как ЛИ и ИЛГ либо достоверно не изменялись (при ИГ), либо снижались (через 2 ч). Через 24 ч, напротив, ЛИ и ИЛГ повышались, а ИСЛ и ИСНЛ — снижались, ЛИИ возвращался к контрольному уровню (табл. 2). Таким образом, при ИГ и через 2 ч после выхода у хомяков нарушается иммунологическая реактивность организма, усиливаются эндотенная и инфекционная интоксикация, процессы тканевого распада и воспаления, превалирует клеточный иммунитет. Через 24 ч усиливается аутоинтоксикация, преобладает

гуморальный иммунитет, но при этом восстанавливается иммунная реактивность и отсутствуют ЭИ, тканевой распад и воспаление.

У крыс при ИГ и поле выхода изменялись лишь 3 из изученных индексов: ЛИ повышался только через 2 ч, возвращаясь к исходному уровню к 24 ч. ИЛГ увеличивался через 2 и 24 ч после ИГ, ЛГ повышался при ИГ, восстанавливался через 2 ч и снижался к 24 ч наблюдения. Организм крыс оказался более устойчивым к действию факторов гипбернации (гипоксия, гиперкапния, гипотермия и др.), чем у хомяков. У крыс при ИГ удалось дифференцировать только аутоинтоксика-

Таблица 3

Лейкоцитарные показатели периферической крови крыс при искусственном гипометаболизме (M+m)

Показатели	Контроль (n=5)	ИГ (n=8)	ИГ через 2 ч (n=5)	ИГ через 24 ч (n=5)
П %	0,4+0,245	0,75+0,36	4,6+1,03*	1,92+0,4*
С %	28,2+2,56	28,37+3,71	27,6+7,61	36,4+2,31*
Л %	67+2,5	68,4+4,1	65,4+8,3	62,2+1,7
ЛИ	2,528+0,193	3,046+1,279	5,37+1,514*	1,86+0,146
ЛИИ	0,328+0,049	0,299+0,027	0,48+0,089	0,572+0,103
ИСЛ	0,48+0,054	0,476+0,116	0,703+0,244	0,623+0,043
ИЛГ	22,19+2,0	29,64+3,49*	21,95+2,13	17,16+1,11*
ИСНЛ	0,476+0,049	0,471+0,112	0,83+0,262*	0,612+0,051*

цию, через 2 ч преобладали гуморальный иммунитет и неспецифическая защита, а через 24 ч — определялись инфекционная интоксикация и усиление специфической защиты.

В работе [10] было показано, что животные в торпидном состоянии устойчивы к гипотермии, гипоксии, ишемии, реперфузионному повреждению органов и тканей, невосприимчивы к инфекциям и т.п. Однако, полученные нами результаты не согласуются в этими утверждениями. В какой-то степени, вероятно, это можно объяснить тем, что хомяки являются не истинными гипербаторами, а факультативными.

Выводы. ЕГ (у хомяков) и ИГ (у хомяков и крыс) сопровождалась лейкопенией, сдвигом лейкоцитарной формулы влево. У хомяков в мазках крови наблюдались эритро- и нормобласты, плазматические клетки, плазматизация цитоплазмы лейкоцитов. Анализ динамики лейкоцитарных индексов показал, что ЕГ и ИГ у хомяков характеризовались значительными изменениями в состоянии различных звеньев иммунной системы: меняются взаимоотношения клеточного и гуморального иммунитета, специфической и неспецифической защиты, активируются процессы интоксикации и тканевого распада, воспалительные процессы и нарушается иммунологическая реактивность. Эти изменения в основном нивелируются через 24 ч

после выхода. Организм крыс оказался более устойчивым к действию факторов гипбернации, чем у хомяков.

Перспективы дальнейших разработок в данном направлении. Планируется изучение некоторых звеньев иммунной системы при искусственных и естественных гипометаболических состояниях с применением специальных методов исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаркави Л.Х. Адаптационные реакции и резистентность организма/Л.Х. Гаркави, Е.Б. Квакина, М.А. Уколова. — Ростов-на-Дону. — 1990.
2. Гематология, новейший справочник/Под ред. К.М. Абдулкадырова. — М.; СПб., 2004.
3. Долгушин И.И. Нейтрофилы и гомеостаз//И.И. Долгушин, О.В. Бухарин. — Екатеринбург, 2001. -168 с.
4. Калабухов Н.И. Спячка млекопитающих/Н.И. Калабухов. — М.: Наука, 1985. — 264 с.
5. Ломако В.В. Система эластаза-альфа-1-ингібітор протеїназ у хом'яків при гібернації/В.В. Ломако, Л.М. Самохіна, О.В. Шило//Вісник проблем біології та медицини. — 2010. — № 1. — С. 153–157.
6. Луговская С.А., Козинец Г.И. Иерархия гемопоэтических клеток: кинетика, структура и функции//Клиническая лабораторная диагностика. — 2009. — № 5. — С. 21–37.
7. Мельничук С.Д. Гіпобіоз тварин (молекулярні механізми та практичне значення для сільського господарства і медицини)/С.Д. Мельничук, Д.О. Мельничук. — К., 2007. — 220 с.
8. Мустафина Ж.Г. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией/Ж.Г. Мустафина, Ю.С. Крамаренко, В.Ю. Кобцева//Клиническая лабораторная диагностика. — 1999. — № 5. — С. 46–48.

9. Самохіна Л. М. Еластази за умов штучного гіпометаболічного стану у щурів/Л. М. Самохіна, В. В. Ломако, О. В. Шило//Проблеми криобиології. — 2008. — Т. 18, № 4. — С. 557–560.
10. Carey H.V. Mammalian Hibernation: Cellular and Molecular Responses to Depressed Metabolism and Low Temperature/H.V. Carey, M.T. Andrews, S.L. Martin//Physiol. Rev. — 2003. — Vol. 83. — P. 1153–1181.
11. Effects of plasma from hibernating ground squirrels on monocyte endothelial cell adhesive interactions/Y.Yasuma, R.M. McCarron, M.Spatz, J.M. Hallenbeck//Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. — 1997. — V. 273. — P. R1861–R1869.
12. Endothelial-dependent mechanisms regulate leukocyte transmigration: a process involving the proteasome and disruption of the vascular endothelial-cadherin complex at endothelial cell-to-cell junctions/J. R. Allport, H.Ding, T.Collins et al.//J. Exp. Med. — 1997. — V. 186. — P. 517–527.
13. Heldmaier G. Natural hypometabolism during hibernation and daily torpor in mammals/G.Heldmaier, S.Ortmann, R.Elvert//Respiratory Physiology & Neurobiology. — 2004. — V. 141, № 3. — P. 317–329.

УДК 611–018.53:591.543.42.085

ЛЕЙКОЦИТИ ПРИ ГИПОМЕТАБОЛИЧНИХ СТАНАХ

Ломако В. В., Пироженко Л. М.

Резюме. Природний (у хом'яків) і штучний (у хом'яків і щурів) гіпометаболізм супроводжувався лейкопенією, зсувом лейкоцитарної формули вліво. У хом'яків в крові спостігалася еритро- і нормобласти, плазматичні клітини, плазматизація цитоплазми лейкоцитів. Аналіз динаміки лейкоцитарних індексів показав, що гіпометаболізм у хом'яків характеризувався значними змінами в стані різних ланок імунної системи: змінювалися взаємвідносини клітинного й гуморального імунітету, специфічного і неспецифічного захисту, активувалися процеси ауто- і ендогенної інтоксикації та тканинного розпаду, порушувалась імунологічна реактивність. Ці зсуви в основному відновлювались через 24 г після виходу. Організм щурів виявився більш стійким до впливу факторів гібернації (гіпоксія, гіперкапнія, гіпотермія), ніж у хом'яків.

Ключові слова: гіпометаболізм, лейкоцити, резистентність, хом'як, щур.

УДК 611–018.53:591.543.42.085

ЛЕЙКОЦИТЫ ПРИ ГИПОМЕТАБОЛИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЯХ

Ломако В. В., Пироженко Л. Н.

Резюме. Естественный (у хомяков) и искусственный (у хомяков и крыс) гипометаболизм сопровождался лейкопенией, сдвигом лейкоцитарной формулы влево. У хомяков в мазках крови наблюдались эритро- и нормобласты, плазматические клетки, плазматизация цитоплазмы лейкоцитов. Анализ динамики лейкоцитарных индексов показал, что естественный и искусственный гипометаболизм у хомяков характеризовались значительными изменениями в состоянии различных звеньев иммунной системы: меняются взаимоотношения клеточного и гуморального иммунитета, специфической и неспецифической защиты, активируются процессы интоксикации и тканевого распада, воспалительные процессы и нарушается иммунологическая реактивность. Эти изменения в основном нивелируются через 24 ч после выхода. Организм крыс оказался более устойчивым к действию факторов гибернации, чем у хомяков.

Ключевые слова: гипометаболизм, лейкоциты, резистентность, хомяк, крыса.

UDC 611–018.53:591.543.42.085

LEUKOCYTES at HYPOMETABOLIC STATES

Lomako V. V., Pirozhenko L. N.

Summary. Natural (in hamsters) and artificial (in hamsters and rats) hypometabolism is accompanied by leucopenia and shift of leukocytic formula in left. Erythro- and normoblasts, plasmatic cells are observed in hamster blood; leukocyte cytoplasmas are plasmated. The analysis of leukocyte indices dynamics showed that hypometabolism in hamsters was characterized by significant changes of different links of immune system: relationships between cell and humoral immunity, specific and non-specific protection were changed; processes of auto- and endogenous intoxication and tissue disintegration were activated; immune reactivity was distorted. These changes were mostly nulled 24 hrs after arousal. Rats turned out to be more resistant to hibernation factors (hypoxia, hypercapnia, hypothermia) than hamsters.

Key words: hypometabolism, leukocytes, resistance, hamster, rat.

Стаття надійшла 30.08.2010 р.