

УДК 616.9.022.083.31.078.23

Маслянюк Р. П., д.б.н., професор;
Левківський Д. М. к.вет.н., доцент;
Сторчак Ю.Г., аспірант[©]

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

СТАН НЕЙТРОФІЛІВ КРОВІ ТА МОЖЛИВОСТІ НСТ-ТЕСТУ У ВИЗНАЧЕННІ ПАТОЛОГІЇ НОВОНАРОДЖЕНИХ ТВАРИН

На підставі аналізу літературних даних показані нові можливості застосування НСТ-тесту в діагностиці захворювань і стану організму новонароджених. Наведені особливості проведення та результатів, які одержують порівняно з дорослими організмами. Проаналізовані зміни вмісту субпопуляцій нейтрофілів, що визначаються за допомогою НСТ-тесту, а також кінетичні параметри процесу.

Ключові слова: *нейтрофіли, субпопуляції, активність, НСТ-тест.*

Для визначення рівня неспецифічної резистентності організму тварин і людини широко використовують реакцію відновлення нейтрофілами та іншими фагоцитами крові нітросинього тетразолію (НСТ-тест) [8, 12, 13, 16]. Однак, у відношенні до самих нейтрофілів діагностичні можливості НСТ-тесту ще далеко не вичерпані. Це пов'язано передусім з наявністю функціональної неоднорідності нейтрофільних лейкоцитів [1-6, 19, 24]. Клітини однієї субпопуляції – нейтрофіли-кілери (Нк) – потенційні фагоцити, складають маргінальний пул, і їх частка (близько 60%) має менш проникні для НСТ мембрани, активно взаємодіють з субстратом, продукують за необхідності активні форми кисню (АФК), внаслідок чого інактивуються, стають рН- і Na^+ , K^+ -залежними та можуть піддаватися апоптозу. Нейтрофіли іншої популяції (Нс) поглинають чужорідні частинки, мабуть, з метою доставки їх до компетентних органів, входять до циркуляції (приблизно 40%), володіють більш проникними мембранами, не взаємодіють з субстратом, менш активно продукують АФК, функціонують незалежно від рН та вмісту в середовищі Na^+ та K^+ в широких межах і, очевидно, не залучаються в апоптоз. Отже, при різних станах поведінки Нс і Нк істотно відрізняються [1], що проявляється в тому числі в НСТ-тесті [2-7].

Практично проведення НСТ-тесту дає можливість підраховувати не лише частку так званих активних нейтрофілів (ДАН), але й кількість (процентне співвідношення частки) Нс і Нк. У перших із них – відкладання диформазану заповнюють клітину не більше ніж наполовину. Другі – Нк – або містять поодинокі вкраплення диформазану, або не мають його зовсім (Hk^0), або заповнені диформазаном практично повністю (Hk^a). Однак, представлена ситуація вірна лише у випадку, коли умови проведення НСТ-тесту дотримані

[©] Маслянюк Р. П., Левківський Д. М., Сторчак Ю.Г., 2013

таким чином, що активуються усі Нс і частина Нк. Як правило, Нс можуть активуватися спонтанно, тоді як для активації Нк потрібна стимуляція. У випадку дорослих і новонароджених, при тому що співвідношення між популяціями нейтрофілів у них не різняться, умови, в яких активуються усі Нс, виявляються різними [14].

Крім врахування співвідношення між субпопуляціями нейтрофілів ще один важливий аспект розширення діагностичних можливостей НСТ-тесту полягає в дослідженні кінетики процесу відновлення нейтрофілами НСТ [1-6]. При цьому під час проведення реакції із реакційної суміші з певною періодичністю відбираються проби, в яких, як звичайно, підраховується частка клітин з різним ступенем відкладеного диформагану. Залежність ДАН чи Нс або Нк^a від часу обробляються згідно з реакціями, описаними в роботах [3, 7].

За даними [9, 10, 14, 15], нові можливості застосування НСТ-тесту в плані розширення можливостей диференціальної діагностики деяких станів і захворювань новонароджених.

Відомо, що діагностичні критерії НСТ-тесту при його класному проведенні, як у випадку спонтанного, так і стимульованого варіанту, добре визначені для дорослих. Що стосується організмів неонатального періоду, то в цьому питанні немає єдиної думки [11, 21, 22, 26]. Основні причини протиріч обговорені в роботі [14] і зумовлені умовами визначення НСТ-тесту (часом, що пройшов від забору крові до початку реакції та концентрацією гепарину та НСТ). При цьому виявлені істотні особливості активації нейтрофілів новонароджених порівняно з дорослими: спонтанна активність нейтрофілів у перших має той же порядок, що і стимульована активність в останніх [12, 13] (ДАН 30% і більше). Відповідно, швидкість спонтанної реакції відновлення НСТ нейтрофілів новонароджених призводить до нормальних значень ДАН порядку 90% і більше, що дозволяє застосовувати цей варіант НСТ-тесту в діагностиці лише виражених патологій, коли активність непрофільної ланки імунітету сильно пригнічена. Однак, в такій ситуації для новонароджених спонтанний НСТ-тест навряд чи виявиться менш інформативним, ніж стимульований. За такими причинами проведення стимульованого НСТ-тесту стосовно новонароджених в діагностиці будь-якої патології буде, скоріш за все, недоцільним.

Умови проведення спонтанного НСТ-тесту у новонароджених, при яких ДАН не дуже велика і активуються Нс, наведені в роботах [14, 15]. Як виявилось, і в цьому ж випадку результати (наприклад, ДАН) залежать принаймні ще від двох факторів: маси тіла і віку новонароджених, при чому мають місце важливі різниці між значеннями показників у доношених і недоношених дітей і тварин. У доношених новонароджених ДАН збільшується в перші 7 діб життя, а відтак поступово знижується, що узгоджується з результатами інших авторів [17]. При цьому відмічалася кореляція, але не між ДАН і віком, як можна було очікувати, а між масою тіла і ДАН (0,72, $p \leq 0,01$) про що вказують також інші автори [18, 23, 25].

У недоношених дітей залежність ДАН від часу життя аналогічна, однак значення показника завжди менше, ніж у доношених дітей, що відповідає

літературним даним [20], і кореляція між ДАН і масою тіла ($r=0,2$, $p\leq 0,5$). З врахуванням сказаного, для підвищення діагностичної значимості, НСТ-тест доцільно проводити, суворо дотримуючись зв'язку з віком новонароджених, наприклад, відразу після народження (1-й день життя) і/або в кінці перинатального періоду (7-й день життя).

У багатьох роботах [10, 14, 15], де новонароджені діти були обстежені, починаючи з першого дня після народження з різним терміном гестації та з наявністю бактеріальної інфекції, були встановлені достовірні різниці ($p\leq 0,05$) за показниками Nk^1 або Nk^a між здоровими та хворими пневмонією та ентероколітом. Аналіз всіх отриманих даних у сукупності дозволяє виявити істотні різниці та тенденції. Так, збільшення ДАН у хворих дітей з різною бактеріальною інфекцією порівняно з клінічно здоровими (контролем), як правило, забезпечується зростанням серед нейтрофілів частки клітин (Nc) і відповідно, зниженням частки Nk. Отже, в ситуаціях, які вимагають посилення неспецифічних факторів імунного захисту, нейтрофіли, що здійснюють ліквідацію патогенного чинника *in situ* (Nk), виявляються малоефективним і вони заміщаються нейтрофілами, здатними доставити патогенних збудників до компетентних органів (Nc). Крім цього, при зміні частки нейтрофілів-кілерів (Nk) частка активних клітин (Nk^a) серед них змінюється незакономірно: з ростом числа Nk кількість Nk^a може як збільшуватись, так і зменшуватись, і навпаки. Такі взаємозв'язки, очевидно, зумовлені специфікою тої чи іншої хвороби, а з'ясування причин спрямованості змін показників вимагає предметних досліджень у кожному конкретному випадку.

Що стосується досліджень кінетики НСТ-тесту, то розрахунок параметрів порівнянь дозволяє отримати додаткові характеристики відносно активності нейтрофілів у цьому процесі. Збільшення констант швидкостей відновлення НСТ (наприклад, k_0 чи k_1) вказує на більш високу метаболічну активність нейтрофілів по відношенню до продукції АФК [3-7]. Навпаки, зменшення цих показників свідчить про зниження швидкості продукції АФК нейтрофілами. При цьому, привертає увагу тиск нтозами сті змін показників: збільшення значення Nk^a відповідає зменшенню k_1 і, навпаки, зниження величин Nk^a супроводжується збільшенням k_1 . Така зворотна взаємозалежність пояснюється тим, що зменшення швидкості продукції АФК усіма нейтрофілами компенсується ростом числа активних нейтрофілів-кілерів (Nk^a). Навпаки, зниження їх частки серед нейтрофілів компенсується ростом швидкості продукції АФК усіма нейтрофілами. У зв'язку з виявленою закономірністю виникає питання про необхідність дослідження кінетики відновлення НСТ нейтрофілами. Відповідь на це питання – безумовно позитивна: враховуючи низькі значення Nk^a (поодинокі клітини на 100 нейтрофілів), k_1 – виявляється більш надійною характеристикою стану однією із ланок неспецифічної резистентності організму новонароджених. Як показник в багатьох дослідженнях, погрішності визначення Nk^a і k_1 істотно відрізняються. В першому випадку відносна погрішність ($[m_1/m]\times 100\%$) може досягти 50% і більше, тоді як в другому випадку вона, як правило, складає близько 100%.

Крім цього, при наявності інших патологій також може виникати ситуація, коли дослідження кінетики процесу відновлення НСТ виявиться необхідним засобом постановки диференціального діагнозу.

Таким чином, кількісне визначення вмісту серед нейтрофілів клітин двох субпопуляцій – нейтрофілів (Нс) і нейтрофілів-кілерів (Нк), а також числа серед останніх активних нейтрофілів, і швидкості процесу відновлення НСТ суттєво підвищує діагностичні можливості НСТ-тесту.

Література

1. Герасимов И.Г. Оптимизация условий определения холинэстеразы / И.Г. Герасимов // Клин. Лаб. Диагностика.- 2004.- №5. – С. 35-38.
2. Герасимов И.Г. Функциональная неоднородность нейтрофилов/И.Г. Герасимов //Клин. Лаб. Диагностика.- 2006.- №2.- С. 34-36.
3. Герасимов И.Г. Функциональная неравнозначность нейтрофилов крови человека: генерация активных форм человека / И.Г. Герасимов, Д.Ю. Игнатов // Цитология.-2001.- №5.- с. 432-436.
4. Герасимов И.Г. Особенности активации нейтрофилов in vitro / И.Г. Герасимов, Д.И. Игнатов // Цитология.- 2004.- №2.- С.155-158.
5. Герасимов И.Г. Свертывание крови активирует нейтрофилы к респираторному взрыву / И.Г. Герасимов, Д.Ю. Игнатов // Бюлл. Экспер. Биол. И медицины.- 2005.- №7.- С. 88-90.
6. Герасимов И.Г. Особенности восстановления нитросинего тетразолия нейтрофилами человека / И.Г. Герасимов, Д.Ю. Игнатов, М.А. Котельницкий // Цитология.- 2005.- №6.- С. 549-553.
7. Кишкун А.А. Иммунологические и серологические исследования в клинической практике / А.А. Кишкун // М.- 2006.- 536 с.
8. Клименко Т.М. Тест восстановления нейтрофилами нитросинего тетразолия в диагностике некротизирующего энтероколита у недоношенных новорожденных /Т.М.Клименко // Здоровье ребенка.- 2008.- №3.- С. 104-107.
9. Линчевский Г.Л. Диагностическая значимость реактивности лейкоцитов крови при бактериальной инфекции у новорожденных / Г.Л. Линчевский, О.В. Воробьева // Перинатология и педиатрия.-2008.- №3. – С.17-20.
10. Маслянюк Р.П. Функціональна активність нейтрофілів у здорових телят раннього віку / Р.П. Маслянюк, О.М. Даньків // Вісник аграрної науки.- 2002.- №8.- С. 67-72.
11. Маслянюк Р.П. Нейтрофільні гранулоцити, структура і функції / Р.П. Маслянюк, Р.Й. Кравців // Біологія тварин. – 2003.- в.5.- №1-2.- С. 52-58.
12. Маслянюк Р.П. Функціональна активність нейтрофільних гранулоцитів у протиінфекційному захисті тварин / Р.П. Маслянюк, Ю.Р. Кравців // Наук.вісник ЛНАВМ та БТ.-2007.- т.9 (33).- С. 185-193.
13. Миллер И. Иммунитет человеческого плода и новорожденного / И. Миллер // Прага.-1983.- 186 с.
14. Никулин Б.А. Оценка и корреляция иммунного статуса / Б.А. Никулин // М.- 2007.- 376 с.

15. Татарченко В.В. Тест восстановления нейтрофилами нитросинего тетразолия в диагностике бактериальной инфекции новорожденных / В.В. Татарченко, Г.А. Линчевский // Клин. Лаб. Диагност. -2008.- №4.- С. 12-14.
16. Татарченко В.В. Особенности спонтанного НСТ-теста у новорожденных / В.В. Татарченко, Д.Ю. Игнатов // Лаб. Диагностика.- 2007.- т. 20.-С. 57-59.
17. Abuharfeil N. The effect of sodium nitrite on some parameters of the immune system / N. Abuharfeil, E. Sarnur // Food Chem. Tasi cal.- v.39.- P. 119-124.
18. Anderson D.C. Complement levels and leukocyte phagocytosis in newborn babies / D.C. Anderson, L.K. Pickering, R.D. Feigin // J. Pediatr.- 1974.- v.85.- P. 420-425.
19. Arinola O.G. Complement levels and leukocyte phagocytosis in neworn babies / O.G. Arinola, K.A. Obisesan // Afr. J. Med. Sci.- 2003.- v.32.- P. 401-404.
20. Clement L.T. Identificant on of neutrophyl subpopulation with monoclonal antibodies / L.T. Clement, J.F. Lehmege//Blood.-1983.-v.61.-P.326-332.
21. Drohous V. Impact of prematurity, stress and sepsis on the neutrophyl respiratory burst in term and preterm neonates without signs of infection and in those with increased levels of C-reactive protein/V. Drohous//Biol.Neonate.-1997.-v.72.-P.2001-2009.
22. Gessler P. Neutrophil respiratory burst in term and neonates without signs of infection and in those with increase levels of reactive protein / P. Gessler, T. Nebel // Pediatr. Res. -1996.-v.95.- P.843-848.
23. Katamoto H. Nitroblue tetrazolium reduction of neutrophyls in heat stressed goats is not influenced by vitamin E infection/ H. Katamoto, H. Hukuda // J. Vet. Med. Sci.- 1998.- v.60.- P.1243-1249.
24. Metha R. Intrapartum magnesium sulfate oxposare attenuates neutrophyl function in preterm neonates / R. Metha, A. Petrova // Biol. Neonate.- 2006.- v.89.- P.99-103.
25. Tenner A.J. Stimulatio of a human polynuclear leukocytes oxidative response by tine C Ig subunit of the first complement / A.J. Tenner, N.R. Cool // J. Immunol.- 1982.- v.128.- P.2547-2552.
26. Wu Y.C. Detection of defective granulocyte function with flow cytometry in newborn infants / Y.C. Wu, Y.R. Huang, C.H. Ling // Microbiol. Immunol. Infect. -2005.- v.38.- P. 17-24.
27. Zhu X.D. Non-mieloperoxidase-mediated system activity of тиск нтоз in newborn infants / X.D. Zhu, T.X. Chen, R.X. Ji // Zhonghua. Er. Ke. Za. Zhi.- 2003.- v.41.- P.286-289.

Summary

On the basis of the analysis of literature data new possibilities of the NBT-test in diagnostics of diseases and conditions of newborn are shown. Features of carrying out and results received thus in compare son to adults are specified. Changes in the maintenance of subpopulations neutrophyls, defined by means of the NBT-test, and also kinetic parameters of process are analyzed.

Рецензент – к.б.н., доцент Турко І.Б.