

УДК 612.453.018:612.122.2:612.112.91+612.112.92+612.112.93

В. В. Афанасьева

ВЛИЯНИЕ ГИДРОКОРТИЗОНА НА СОДЕРЖАНИЕ И РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ГЛИКОГЕНА В ЦИТОПЛАЗМЕ ГРАНУЛОЦИТОВ КРОВИ КРОЛИКОВ

Известно, что повышение уровня кортикостероидов в организме человека и животных вызывает закономерное изменение содержания в крови различных видов гранулоцитов [3, 9]. В связи с этим возникает важный вопрос, в какой мере наблюдаемые количественные сдвиги числа нейтрофилов, эозинофилов и базофилов сопровождаются качественными сдвигами, в первую очередь изменениями внутриклеточного обмена и функции этих клеток. Особый интерес представляет информация о содержании и обмене гликогена, который является главным источником внутриклеточной энергии, обеспечивающим основную функцию гранулоцитов — фагоцитоз, и играет важную коллоидно-пластическую роль в цитоплазме.

В литературе опубликованы лишь единичные, в значительной степени противоречивые, полученные с помощью полуколичественных цитохимических методов данные о влиянии глюкокортикоидов на содержание гликогена в гранулоцитах. В наших предыдущих исследованиях были сделаны первые попытки использовать метод цитоспектрофотометрии для количественной оценки ШИК-реакции при изучении влияния гидрокортизона на содержание гликогена у больных болезнью Иценко — Кушинга и у лабораторных животных. Целью настоящей работы является комплексное цитоспектрофотометрическое и ультрацитохимическое исследование, дающее возможность более точно судить о содержании гликогена в отдельных видах клеток и его топографии в цитоплазме.

Методика исследований

Опыты проведены на 20 половозрелых кроликах-самцах породы шиншилла весом 2,0—2,5 кг. Гидрокортизон-ацетат фирмы «Рихтер» вводили однократно внутривенно в дозе 5 мг/кг и внутримышечно в течение месяца по 1 мг/кг ежедневно. Кровь изучали до и через 6 ч после однократного, а также через 2 и 4 нед после начала длительного введения гормона.

Цитоспектрофотометрическое исследование проводили в мазках крови, полученной из краевой вены уха. Для выявления гликогена использовали ШИК-реакцию в модификации [12] с учетом требований, предъявляемых для количественных измерений [1]. Контролем служили мазки, обработанные α -амилазой, свободной от протеиназной активности («Reanal», Будапешт). Препараты, обработанные α -амилазой, давали отрицательную ШИК-реакцию. Проведенная цветная реакция допускает цитоспектрофотометрическое измерение содержания вещества в одной клетке, а выявленное с помощью этой реакции вещество представляет собой в основном гликоген [11, 12]. Количество гликогена в цитоплазме гранулоцитов измеряли на зондовом цитоспектрофотометре одноволновым методом [10]. Рабочая длина волны (570 мкм) установлена на основании измерений интенсивности поглощения в различных участках видимой части спектра для выбранного объекта — гликогена, на срезе печени кролика толщиной 10 мк, окрашенном ШИК. Количество гликогена в лейкоцитах выражали в условных единицах и рассчитывали по формуле: $D = k \cdot \left(\frac{\Phi_0}{\Phi} \right)$, где D — концентрация вещества в условных

единицах, Φ_0 — интенсивность светового потока, падающего на объект, Φ — интенсивность светового потока после поглощения его веществом клетки, κ — коэффициент пропорциональности. Всего проведено 2500 цитофотометрических измерений.

Для ультрацитохимического выявления гликогена в цитоплазме гранулоцитов использовали феррицианид-осмиевый метод [4]. Выделенную путем центрифугирования гепаринизированной крови (гепарин фирмы «Рихтер», 2 ед/мл) лейкоцитарную пленку фиксировали 1,6% раствором глutarальдегида на фосфатном буфере pH 7,3, содержащем 1% сахарозы, промывали тем же буфером и постфиксировали 1% раствором OsO_4 , содержащим 0,05 М $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, обезвоживали в спиртах восходящей крепости, абсолютном ацетоне и заключали в аралдит [2]. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-8800, контрастировали цитратом свинца [15] и изучали под электронным микроскопом JEM-7.

Среднее число β -гранул гликогена на 1 $\mu\text{км}^2$ цитоплазмы определяли на электронномикроскопических фотографиях срезов (ув. 24000 $\times$ —30000 $\times$), включающих ядро и комплекс Гольджи. Использовали квадратную сетку с шагом, эквивалентным 1 $\mu\text{км}$. Количество β -гранул гликогена на 1 $\mu\text{км}^2$ среза определяли после подсчета частиц на всей площади цитоплазмы, что в зависимости от ее величины составляло от 5 до 10 квадратов сетки [5].

Полученный цифровой материал обработан статистически с помощью критерия Стьюдента.

Результаты исследований и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что гранулоциты периферической крови кроликов неоднородны по количеству гликогена. Как видно из гистограммы (рис. 1), в крови интактных кроликов встречается 8 % клеток с очень низким содержанием гликогена (0,009—0,040 усл.ед.), 88 % — с содержанием гликогена 0,050—0,100 усл. ед., 4 % клеток содержат 0,110—0,150 усл.ед. Среднее количество гликогена в гранулоцитах составляет $0,063 \pm 0,003$ усл.ед. (см. таблицу, А).

При цитоспектрофотометрическом исследовании не удается дифференцировать различные виды гранулоцитов в связи с тем, что докраска мазков, выявляющая специфическую зернистость, исключается требованиями цитофотометрии. Сведения о содержании и распределении гликогена в отдельных видах гранулоцитов удается получить только с помощью ультрацитохимического метода. При этом в базофилах и эозинофилах гликоген выявляется в виде электронноплотных β -гранул (гликосом), дисперсно расположенных в цитоплазме (рис. 2, А, Б). Отдельные эозинофилы содержат единичные скопления из 7—15 гранул.

В нейтрофилах гликосомы располагаются между органоидами поодиночке, группами из 6—15 гра-

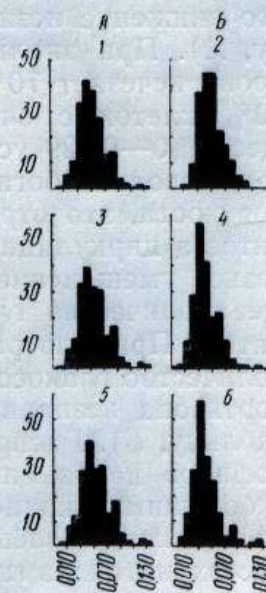


Рис. 1. Распределение гранулоцитов крови кроликов по содержанию гликогена до (А) и после введения гидрокортизона (Б).

По горизонтали — содержание гликогена (в усл. ед.); по вертикали — число клеток, выраженное в процентах; 1, 3, 5 — до введения гидрокортизона, 2 — через 6 ч после введения 5 мг/кг, гидрокортизона, 4 — через 2 нед и 6 — через 4 нед после начала ежедневного введения 1 мг/кг гидрокортизона.

нул, или очень редко в виде больших скоплений (рис. 2, В). Каждая гликосома в таких скоплениях сохраняет свою индивидуальность. Гликосомы могут обнаруживаться в просвете ядерной петли, на ядерной мембране, во вдавлении азурофильной гранулы.

При анализе данных морфометрии обнаружено, что наиболее богаты гликогеном нейтрофилы и базофилы, в эозинофилах его значи-

тельно меньше (см. таблицу, Б). Были отмечены колебания в содержании гликосом в одном и том же виде гранулоцитов. Так, среди нейтрофилов встречались клетки, содержащие от 45 до 121 гликосомы на 1 мкм^2 . В базофилах эти колебания были намного больше (от 27 до 190 на 1 мкм^2). Это, по-видимому, объясняется тем, что в участках цитоплазмы, где специфическая базофильная зернистость расположена очень плотно, гликоген отсутствовал, скапливаясь в свободной от органоидов цитоплазме. В эозинофилах подобных колебаний не отмечено.

Содержание гликогена (в условных единицах) (А) и количество β -гранул гликогена (на 1 мкм^2 среза клетки) (Б) в гранулоцитах крови кроликов в норме, после однократного и длительного введения гидрокортизона

Тип клеток	Норма	После введения гидрокортизона					
	$M \pm m$	через 6 ч 5 мг/кг $M \pm m$	p	через 2 нед 1 мг/кг $M \pm m$	p	через 4 нед 1 мг/кг $M \pm m$	p

А Гранулоциты $0,063 \pm 0,003$ $0,062 \pm 0,001$ $>0,2$ $0,053 \pm 0,002$ $<0,05$ $0,052 \pm 0,001$ $<0,001$

Б Нейтрофилы $74,4 \pm 2,9$ $61,2 \pm 3,8$ $<0,01$ $52,0 \pm 1,9$ $<0,001$ $55,1 \pm 2,6$ $<0,001$

Базофилы $76,1 \pm 7,1$ $57,3 \pm 4,2$ $<0,02$ $27,2 \pm 7,4$ $<0,01$ — — —

Эозинофилы $46,0 \pm 2,4$ — — — — — — —

После однократного введения гидрокортизона содержание ШИК-положительных веществ в гранулоцитах несколько снижается, однако это снижение незначительно и статистически недостоверно (см. таблицу, А). При анализе соответствующей гистограммы оказалось, что из крови исчезает 70% клеток с очень большим ($0,120-0,149$ усл. ед.) и 80% клеток с очень малым содержанием ШИК-положительных веществ ($0-0,029$ усл. ед.), в то же время увеличивается количество клеток, довольно богатых гликогеном ($0,100-0,119$ усл. ед.). По всей вероятности, это отражает перераспределение различных видов гранулоцитов в циркуляции в результате введения гидрокортизона, в частности резкое уменьшение числа эозинофилов — клеток, содержащих наименьшее количество гликогена по сравнению с другими видами гранулоцитов. При ультрацитохимическом исследовании было выявлено, что количество гликосом в нейтрофилах и базофилах после инъекции гидрокортизона незначительно, но статистически достоверно снизилось (см. таблицу, Б). Распределение гликогена в цитоплазме базофилов и нейтрофилов не изменилось. Изредка встречались единичные нейтрофилы с большими скоплениями гликосом, которые располагались среди азурофильных и специфических гранул, или в лишенных органелл выростах цитоплазмы (рис. 3, А). Однако среднее количество гликогена в этих клетках не было существенно увеличено.

В связи с тем, что после введения гидрокортизона наблюдается резкая эозинопения, нам не удалось исследовать этот вид клеток.

Через 2 и 4 нед после начала многократного введения гормона содержание ШИК-положительных веществ в цитоплазме гранулоцитов было статистически достоверно снижено (см. таблицу, А). Из анализа гистограмм можно заключить, что это уменьшение обусловлено исчезновением из крови клеток, богатых гликогеном и преобладанием

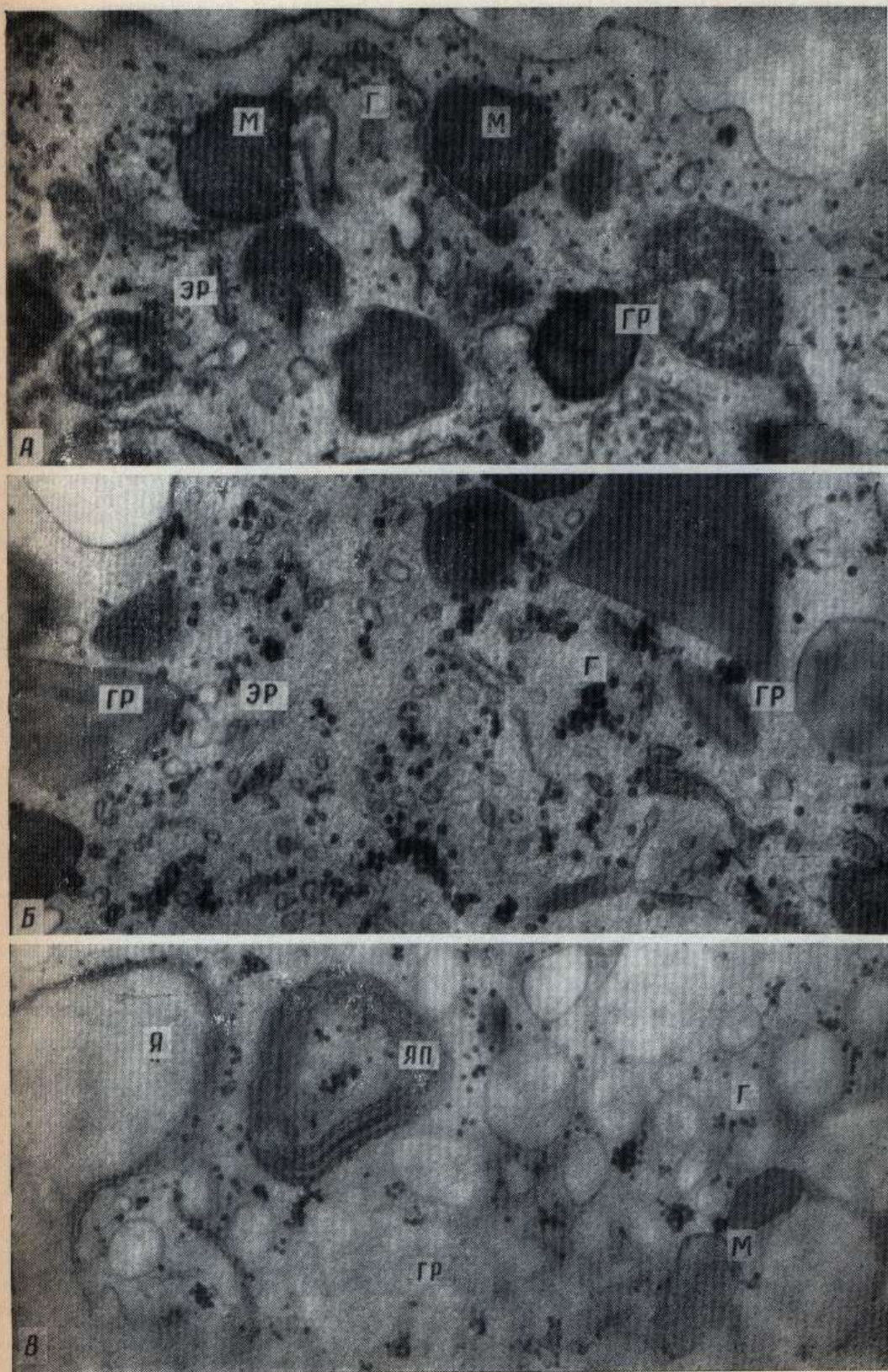


Рис. 2. Распределение гликосом (г) в гранулоцитах периферической крови intactного кролика.

А — фрагмент базофила, ув. 44 000×; Б — фрагмент эозинофила, ув. 36 000×; В — фрагмент нейтрофила, ув. 38 000×. Я — ядро, яп — ядерная петля, м — митохондрии, эр — эндоплазматический ретикулум, гр — гранулы.

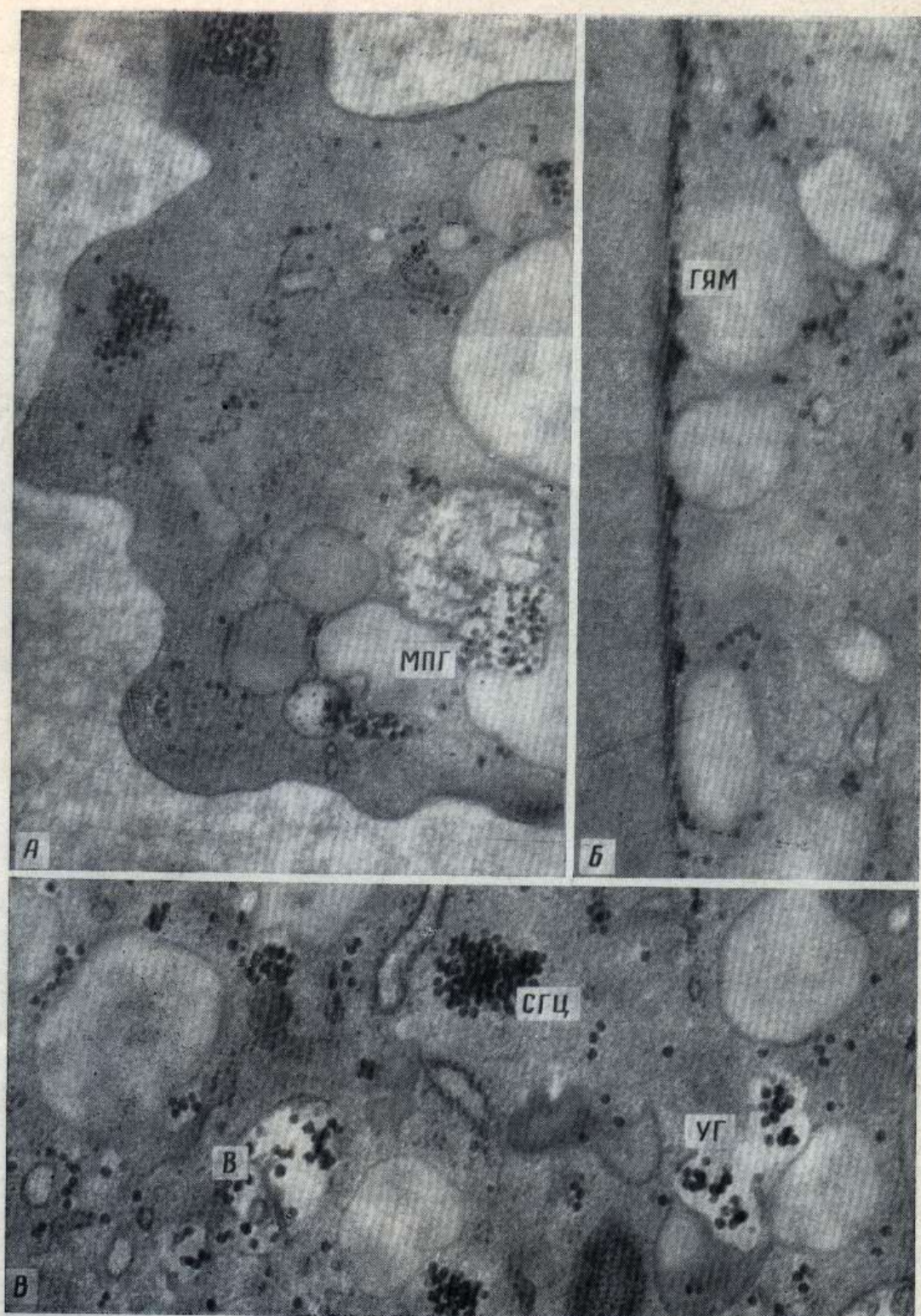


Рис. 3. Распределение гликосом в нейтрофилах периферической крови кролика под воздействием гидрокортизона.

А — фрагмент нейтрофила после однократного введения гидрокортизона. Видны скопления глико-
сом на участке цитоплазмы, лишенной органелл (слева вверху), между первичными гранулами
(мпг) и одиночные гликосомы среди гранул, ув. 39 000×. Б — фрагмент нейтрофила через месяц
после начала ежедневного введения гидрокортизона. Скопление гликосом на ядерной мембране
(гям), ув. 48 000×. В — фрагмент нейтрофила через месяц после начала ежедневного введения
гидрокортизона. Скопления гликосом в цитоплазме (сгц), в углублении гранул (уг), в вакуоле (в),
ув. 48 000×.

гранулоцитов с низким его содержанием (0,050—0,100 усл. ед.). Отмечалось значительное уменьшение количества гликоген в цитоплазме нейтрофилов и базофилов (см. таблицу, Б). В нейтрофилах наблюдалось также перераспределение этих частиц — гораздо чаще, чем в норме встречались клетки с более крупными скоплениями гликоген. Эти скопления имели различную локализацию: были разбросаны среди органелл, вплотную прилегали к ядерной мембране, которая, как правило, расслаивалась, находились в непосредственном контакте с азурофильными гранулами, вакуолями и миелоноподобными образованиями (рис. 3, Б, В). Одиночных гликоген было меньше. В базофилах отклонений от нормы не обнаружено.

Таким образом, из приведенного материала очевидно, что отдельные гранулоциты периферической крови интактных кроликов содержат различное количество гликогена; кратковременное и, в особенности длительное, повышение уровня гидрокортизона в организме кроликов приводит к снижению содержания гликогена в гранулоцитах (нейтрофилах и базофилах) и перераспределению гликоген между отдельными компартментами клетки.

Известно, что под влиянием кортикостероидов в крови возрастает число нейтрофилов и резко снижается число эозинофилов и базофилов [3]. Следовательно, уменьшается количество клеток с низким (эозинофилы) и высоким (базофилы) содержанием гликогена. Поскольку базофилы в крови кроликов преобладают над эозинофилами (2,5% и 0,42% соответственно) [3], то уменьшение их количества более значительно сказывается на общем уровне гликогена в гранулоцитах, определяемом цитоспектрофотометрически. Нейтрофилез, вызванный кортикостероидами, обусловлен усиленным выходом в кровоток клеток зрелого пула костного мозга, а также — увеличением времени пребывания нейтрофилов в сосудистом русле [7, 9]. При этом возможно появление в крови молодых форм нейтрофилов, содержащих меньшее количество гликогена [6]. Однако мы не наблюдали каких-либо морфологических признаков, свидетельствующих о незрелости клеток. Кроме того, в наших исследованиях после однократной инъекции гидрокортизона, когда нейтрофилез наиболее ярко выражен и можно было бы ожидать выброса в кровь большого количества молодых нейтрофилов и соответственно резкого снижения уровня гликогена, мы не наблюдали этого снижения, тогда как после многократного введения гормона, сопровождавшегося менее выраженным нейтрофилезом, снижение гликогена было значительным.

Можно полагать, что снижение уровня гликогена в гранулоцитах, в частности нейтрофилах, связано, главным образом, с воздействием гидрокортизона на метаболизм гликогена. Это согласуется с данными ряда биохимических исследований о непосредственном воздействии кортикостероидов на углеводный обмен в лейкоцитах [8, 13, 16], а также с работами, в которых показано угнетающее действие глюкокортикоидов на фагоцитарную активность нейтрофилов [7, 8, 14, 17].

Наряду с количественными сдвигами гликогена в нейтрофилах наблюдаются изменения его топографии. Обнаруженное усиление морфологической связи между азурофильными зернами и гранулами гликогена, накопление этих гранул у ядерной мембраны и усиленная агрегация свидетельствуют, вероятно, об изменении каких-то локально протекающих процессов, нуждающихся в большом количестве энергии, наиболее выраженных после длительного применения гормона. Отсутствие подобных изменений в базофилах, возможно, зависит от разных функциональных особенностей этих видов клеток.

Выводы

1. Различные гранулоциты периферической крови интактных кроликов содержат разное количество гликогена. Наиболее богаты гликогеном нейтрофилы и базофилы, в эозинофилах его значительно меньше.
2. Под влиянием гидрокортизона происходит уменьшение содержания гликогена в базофилах и нейтрофилах, а также перераспределение гликогена в цитоплазме нейтрофилов. Это, вероятно, отражает изменение внутриклеточного метаболизма гликогена и свидетельствует об изменении функциональной активности гранулоцитов.

Литература

1. Бродский В. Я. Трофика клетки.— М.: Наука, 1966.— 352 с.
2. Бутенко З. А., Глузман Д. Ф., Зак К. П., Филатова Р. С., Шляховенко В. А. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов.— Киев, Наукова думка, 1974.— 245 с.
3. Зак К. П. Роль гормонов коры надпочечников в регуляции морфологического состава крови: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук.— Киев, 1971.— 34 с.
4. Лукишина В. В., Зак К. П. Ультрацитохимическое выявление гликогена в лейкоцитах крови.— Лаб. дело, 1976, № 5, с. 268—269.
5. Ackerman G. A. Ultrastructural localization of glycogen in erythrocytes and developing erythrocytic cell in normal human bone marrow.— Z. Zellforsch., 1973, 140, S. 433—444.
6. Bishop C. R., Athens J. W., Boggs D. R., Warner H. R., Cartwright G. E., Wintrobe M. M. Leukokinetic studies XIII. A non-steady-state kinetic evaluation of the mechanism of cortisone-induced granulocytosis.— J. Clin. Invest., 1968, 47, p. 249—260.
7. Clemmensen O., Andersen V., Hansen N. E., Karle H., Koch C., Soborg M., Weeke B. Sequential studies of lymphocytes, neutrophils and serum proteins during prednisone treatment.— Acta med. scand., 1976, 199, N 1—2, p. 105—111.
8. Cooper M. R., De Chatelet L. R., Mc Call C. E. The in vitro effect of steroids on polymorphonuclear leukocyte metabolism.— Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1972, 141, N 3, p. 986—990.
9. Fauci A. S., Dale D. C., Balow J. E. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations.— Ann. Intern. Med., 1976, 84, N 3, p. 304—315.
10. Filkuka J., Dolezel S., Aubrechtova V. Microspectrophotometric determination of DNA content in cells of the BS tumor, Woltcer's tumor and in the lymphocytes of peripheral blood.— Neoplasma, 1966, 13, N 2, p. 145—148.
11. Gahrton G. Normal human neutrophil leukocytes as a reference system for the microspectrophotometrically quantitated periodic-schiff reaction.— J. Histochem. Cytochem., 1966, 14, N 1, p. 45—48.
12. Gartner J., Norden A. Studies on periodic acid-schiff reactive material in white blood cells from the peripheral blood of patients with diabetes, polycythaemia and chronic lymphocytic leukaemia.— Acta med. scand., 1961, 169, N 3, p. 289—302.
13. Landau B. R. Adrenal steroids and carbohydrate metabolism.— Vitamins and hormones. New York—London: Academic Press, 1965, 23, p. 1—95.
14. Olson G. E., Polk H. C. Jr. In vitro effect of ascorbic acid on corticosteroid-caused neutrophil dysfunction.— J. Surg. Res., 1977, 22, N 2, 109—112.
15. Reynolds E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy.— J. Cell. Biol., 1963, 17, N 1, p. 208—212.
16. Simonsson B. Uptake of ^3H -cortisol by rabbit polymorphonuclear leukocytes in vitro.— Acta endocrinol., 1971, 67, N 4, p. 634—651.
17. Spirer Z., Zakuth V., Weismann Y., Bogair N. The effect of corticosteroids on the bactericidal activity of leucocytes.— Experientia, 1974, 30, N 3, p. 303—305.

Киевский институт эндокринологии
и обмена веществ

Поступила в редакцию
1.VIII 1978 г.

V. V. Afanasjeva

HYDROCORTISONE EFFECT ON GLYCOGEN CONTENT
AND DISTRIBUTION IN RABBIT BLOOD CYTOPLASM
GRANULOCYTES

Summary

Glycogen content and glycosomes distribution were studied cytophotometrically in different granulocyte types of male rabbit peripheral blood in norm and after hydrocortisone administration. It is established that neutrophils and basophils abound in glycogen, eosinophils contain it in a considerably less amount. There were fluctuations in glycosome numbers in cells of the same granulocyte type. An increase, especially prolonged one, in the hydrocortisone level in the organism is accompanied by a redistribution of blood granulocytes with different contents of glycogen, by a decrease in its content in basophils and neutrophils, by changes in glycosome topography in neutrophilic cytoplasm. The results obtained suggest changes in intracellular glycogen metabolism and functional activity of granulocytes.

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Kiev