

УДК 612.017.591.11:599.1

Н.В.Луніна, В.Е.Добровольська

Реакція лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові та імунореактивність організму за умов іммобілізації

В експериментах, проведених на половозрелых кроликах, установлено, что 12-часовая иммобилизация вызывала в периферической крови животных нейтрофильный лейкоцитоз, сопровождающийся уменьшением числа лизосом и гранул лизосомальных катионных белков в нейтрофилоцитах. В соответствии с этим в сыворотке крови возрастала активность маркерного лизосомального фермента гранулоцитов — кислой фосфатазы (КФ). В этих условиях отмечались количественные изменения показателей гуморального (увеличение содержания в лимфе циркулирующих иммунных комплексов — ЦИК, увеличение числа В-клеток) и клеточного (общая Т-лимфопения, резкое нарастание числа Т-активных лимфоцитов, изменение соотношения субпопуляций Т-теофиллинчувствительных и Т-теофиллинрезистентных лимфоцитов) звеньев иммунитета в начальный период формирования стресс-синдрома. Предполагается существование определенной связи иммунореактивности организма и активности лизосомальных ферментов нейтрофильных гранулоцитов периферической крови в условиях иммобилизационного стресса.

Вступ

Дослідженнями нашої лабораторії встановлено, що при формуванні адапційного синдрому за умов дії на організм різних надзвичайних чинників середовища неінфекційної природи (крововтрата, вагітність та пологи, знижений барометричний тиск, іммобілізація) в периферичній крові розвивався абсолютний нейтрофільний лейкоцитоз, а в нейтрофілоцитах зменшувався вміст лізосом та лізосомальних катіонних білків. При цьому лізосомальні ферменти потрапляють у плазму крові і беруть участь в регуляції гомеостазу [5, 6, 10, 13].

Згідно з сучасними уявленнями [4, 9, 12], нейтрофільні гранулоцити є складовими елементами неспецифічної фази імунної відповіді та безпосередніми учасниками формування специфічних імунних реакцій організму. Лізосомальний фермент гранулоцитів — кисла фосфатаза (КФ) виконує не тільки фагоцитарну функцію, але й регуляторну (по відношенню до імунного реагування) шляхом підсилення проліферації тимоцитів, інгібування синтезу IgG, а також диференціації В-клітин у клітини, які синтезують антитіла класів А та М [2, 7, 8].

Приймаючи до уваги вищезгаданий зв'язок стану нейтрофільних лейкоцитів з імунобіологічними реакціями організму, метою наших досліджень було вивчення функціональної активності лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові та імунореактивність організму за умов дії стресора неінфекційної природи, а саме іммобілізації.

Методика

Експерименти були проведені на 17 безпорідних дорослих кроликах обох статей масою 2,5—2,7 кг. Як стресор неінфекційної природи використовували іммобілізацію тварин у положенні на спині протягом 12 год. Обстеження провадили до і на протязі 14 діб після іммобілізації. Тривалість експериментального дослідження визначалась часом відновлення повного набору лізосом у нейтрофільних лейкоцитах периферичної крові. Загальну кількість лейкоцитів на одиницю об'єму крові визначали за загальнозживаною методикою [11]. Для встановлення лейкоцитарної формули та парціальної гранулоцитограми мазки крові та кісткового мозку забарвлювали за Паппенгеймом [11]. Після цього вираховували абсолютну кількість нейтрофільних лейкоцитів у периферичній крові та визначали абсолютну кількість клітин проліферуючого і дозріваючого пулів гранулоцитарного ряду в одиниці об'єму кісткового мозку. Кількість лізосом нейтрофілів ідентифікували у мазках крові, фарбованих барвником Мая-Грюнвальда, а гранули лізосомальних катіонних білків — світлим зеленим [10]. Активність маркерного лізосомального ферменту кислої фосфатази (КФ 3.1.3.2) у сироватці крові визначали за методом Боданського [11]. Клітинний імунітет оцінювали за зміною відносного значення кількості Т-лімфоцитів (Е-РУК), Т-активних лімфоцитів (ЕА-РУК), а також за відношенням кількості клітин у субпопуляціях Т-теофілінчутливих і Т-теофілінрезистентних лімфоцитів [9, 11]. Для визначення гуморального імунітету використовували реакцію преципітації циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) з поліетиленглюколем (ПЕГ; 3,5 %-вий розчин) — тест ОП-280 та розеткоутворення лімфоцитів з еритроцитами барана (ЕБ) у системі ЕАС для визначення В-клітин [15].

Результати експерименту опрацьовано статистично за методом прямих різниць з використанням критерію t Стьюдента.

Результати та їх обговорення

Досліди показали (табл. 1), що після іммобілізації у периферичній крові кроликів розвивався абсолютний нейтрофільний лейкоцитоз, який спостерігався протягом 12 діб після стресорного збудження. Найбільша кількість нейтрофілів у крові виявлена на 4-у добу після іммобілізації. Починаючи з 1-ї доби після дії стресорного фактору, у кістковому мозку кроликів реєструвалось зменшення числа клітин дозріваючого пулу (табл. 2), що свідчить про надходження зрілих гранулоцитів у кров. Максимальне зменшення загального числа клітин гранулоцитарного ряду кісткового мозку відбувалось на 4-у добу дослідження. Активація мієлопоезу відзначалася на 6-у добу і тривала протягом наступних 12—14 діб (див. табл. 2). Вже через добу після іммобілізації у нейтрофілоцитах зменшувалося число лізосом і гранул лізосомальних катіонних білків. Протягом 4 діб зростало абсолютне число нейтрофільних гранулоцитів, що мають менш 30 лізосом та гранул лізосомальних катіонних білків. Далі число цих клітин зменшувалося (з 6-ї по 12-у добу). Відновлення повного набору лізосомальних гранул у нейтрофілоцитах спостережено на 14-у добу досліді. Активність КФ у сироватці крові підвищувалася, починаючи з 1-ї доби після збудження, і досягала найбільшого значення на 4-у добу. З 8-ї доби активність цього ферменту знижувалася і на 14-у добу не відрізнялася від початкової (див. табл. 1).

Таблиця 1. Деякі показники стану лізосомального апарату нейтрофільних гранулоцитів периферичної крові у кроликів до та після іммобілізації ($M \pm m$)

Час спостереження	Вміст нейтрофільних лейкоцитів у 1 л крові, $1 \cdot 10^9$			Активність кислої фосфатази у сироватці крові, БЕ
	Загальне число лейкоцитів	Число лейкоцитів, що мають менше 30 лізосом	Число лейкоцитів, що мають менше 30 гранул катіонних білків	
До іммобілізації	$3,67 \pm 0,38$	0	0	0
Після іммобілізації:				
1-а доба	$1,93 \pm 0,46$	$1,10 \pm 0,08$	$1,08 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,01$
2-а доба	$2,33 \pm 0,44$	$1,72 \pm 0,11$	$1,71 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,02$
3-я доба	$2,63 \pm 0,44$	$3,03 \pm 0,14$	$2,41 \pm 0,14$	$0,36 \pm 0,02$
4-а доба	$3,20 \pm 0,46$	$4,07 \pm 0,14$	$3,79 \pm 0,14$	$0,40 \pm 0,01$
6-а доба	$2,73 \pm 0,50$	$3,19 \pm 0,17$	$2,66 \pm 0,20$	$0,38 \pm 0,02$
8-а доба	$2,24 \pm 0,60$	$1,93 \pm 0,12$	$1,75 \pm 0,17$	$0,27 \pm 0,02$
10-а доба	$1,38 \pm 0,52$	$0,53 \pm 0,08$	$0,65 \pm 0,09$	$0,22 \pm 0,01$
12-а доба	$1,04 \pm 0,47$	$0,15 \pm 0,05$	$0,22 \pm 0,10$	$0,19 \pm 0,01$
14-а доба	$0,49 \pm 0,45$	0	0	0

Примітка. В цій таблиці та в табл. 2, 3 всі значення показників, що їх отримано після іммобілізації, вірогідні по відношенню до значень, отриманих до іммобілізації, і мають $P < 0,05$.

Таблиця 2. Показники гранулоцитопоезу у кроликів до та після іммобілізації ($M \pm m$)

Час спостереження	Вміст клітин гранулоцитарного ряду у 1 л кісткового мозку, $1 \cdot 10^9$		
	Загальне число клітин	Число клітин проліферуючого пулу	Число клітин дозріваючого пулу
До іммобілізації	$26,42 \pm 3,32$	$9,42 \pm 0,77$	$17,00 \pm 2,63$
Після іммобілізації:			
1-а доба	$-3,33 \pm 0,35$	$-1,73 \pm 0,25$	$-1,60 \pm 0,35$
2-а доба	$-7,86 \pm 0,49$	$-3,23 \pm 0,28$	$-4,63 \pm 0,50$
3-я доба	$-10,84 \pm 1,19$	$-4,40 \pm 0,50$	$-6,44 \pm 0,80$
4-а доба	$-11,67 \pm 1,43$	$-4,60 \pm 0,45$	$-6,50 \pm 1,39$
6-а доба	$-23,70 \pm 3,78$	$-2,89 \pm 0,49$	$0,05 \pm 2,68^*$
8-а доба	$-5,43 \pm 4,87^*$	$-0,93 \pm 0,37$	$4,60 \pm 0,80$
10-а доба	$14,43 \pm 2,97$	$2,00 \pm 0,52$	$8,17 \pm 1,90$
12-а доба	$9,14 \pm 2,40$	$0,73 \pm 0,34$	$3,74 \pm 0,80$
14-а доба	$4,57 \pm 1,06$	$0,20 \pm 0,18^*$	$1,86 \pm 0,72$

* Значення не вірогідні.

Паралельно досліджувалися показники гуморального та клітинного імунітету. Результати спостереження (табл. 3) свідчать про зменшення загальної кількості Т-клітин відносно доіммобілізаційних показників протягом всього періоду дослідження (див. табл. 3). У субпопуляції Т-активних лімфоцитів перевищення вихідного рівня відмічалось у перші дві доби спостереження. Далі, навпаки, їх число було меншим ніж початкове до кінця дослідження. До іммобілізації число Т-теофілінчутливих лімфоцитів співвідносилось до числа Т-теофілінрезистентних приблизно, як 1:3, що відповідало нормі [11]. Починаючи з 1-ї доби після стресор-

Таблиця 3. Показники імунореактивності організму у кроликів до та після іммобілізації (M±m)

Час спостереження	Відносне число клітин, здатних до розеткоутворення з еритроцитами барана, % загального					Оптична густина циркулюючих імунних комплексів, осаджених на поліетиленглюколі, l
	В-лімфоцитів	Т-лімфоцитів				
		Загальне число	Число Т-активних	Число Т-теофілін-резистентних	Число Т-теофілін-чутливих	
До іммобілізації	14,4±1,25	65,6±2,79	23,8±1,74	47,8±1,52	15,8±1,02	11,6±0,90
Після іммобілізації:						
1-а доба	11,5±1,97	-25,8±3,54	21,0±2,84	-20,6±2,30	-7,2±2,00	7,54±2,30
2-а доба	1,6±0,37	-23,7±3,24	3,1±1,05	-21,0±2,26	-6,1±2,19	25,10±4,46
3-я доба	-2,8±0,82	-21,0±2,42	-7,4±2,70	-14,8±2,35	-3,2±1,27	7,10±1,79
4-а доба	-4,9±0,79	-17,8±2,07	-13,4±2,17	-27,2±1,17	9,4±1,88	-3,50±1,42
6-а доба	-2,9±0,72	-4,0±0,75	-17,7±2,66	-18,9±2,47	14,9±2,30	-8,90±0,96
8-а доба	1,2±0,52	-11,7±2,10	-8,6±2,79	-16,4±1,50	2,9±1,38	3,00±1,25
10-а доба	1,6±0,42	-8,7±2,38	-7,5±2,00	-11,2±1,67	2,5±1,17	-0,60±0,23
12-а доба	1,3±0,34	-5,9±1,87	-5,6±1,47	-3,7±0,88	1,9±0,88	-0,90±0,38
14-а доба	1,0±0,25	-3,8±1,76	-2,0±0,5	-1,6±0,42	1,9±0,88	-2,90±0,79

ної дії, число Т-теофілінчутливих лімфоцитів збільшувалося на фоні зниження загального числа Т-лімфоцитів і на 4-ту добу кількість клітин цих популяцій співвідносилася приблизно, як 1:1 (див. табл. 3). Число Т-теофілінрезистентних лімфоцитів було нижчим за вихідне протягом всього періоду спостереження, а його мінімальне значення припадало на 4-у добу експерименту. Напруженість гуморального імунітету була виражена зростанням числа ЦІК у сироватці крові, починаючи з 1-ї доби після іммобілізації, яке вже на 2-у добу дослідів мало максимальне значення. З 4-ї доби після дії стресора їх число зменшувалося, крім деякого зростання на 8-у добу, та залишалося нижчим за вихідний до кінця спостереження. Число В-клітин максимально збільшувалося на 1-у добу після дії іммобілізації. В інтервалі з 3-ї по 6-у добу число В-лімфоцитів було меншим ніж перед дослідом. З 8-ої доби та до кінця експерименту їх число було більше від початкового (див. табл. 3).

Таким чином у кроликів, під час початкового періоду формування адаптаційного синдрому, іммобілізація викликала пригнічення гуморального і клітинного імунітету, про що свідчить підвищення числа В-клітин та циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові, зменшення загального числа Т-лімфоцитів і Т-теофілінрезистентних клітин, збільшення субпопуляції Т-активних лімфоцитів [2, 4, 7—9]. Одночасно з такими змінами показників гуморального та клітинного імунітету максимально зростала функціональна активність лізосомального апарату нейтрофілів периферичної крові. Результати кореляційного аналізу значень деяких показників стану імунної системи організму та ферментативної системи нейтрофілоцитів сироватки крові у кроликів під час формування стрес-синдрому дали підстави для припущення взаємозв'язку цих систем.

Правомірність такого припущення підтверджується даними літератури про взаємний вплив нейтрофілів та лімфоцитів один на одне [2]. З одного боку, існує пояснення стресогенних нейтрофіліоза і лімфопенії глюкокортикоїдообумовленою міграцією Т-клітин-регуляторів у кістковий мозок та

стимуляцією там гемопоєзису індукуючого мікрооточення у напрямку нейтрофілгранулоцитарного паростку [3]. З другого боку, існує припущення, що за умов зниження резистентності лізосомальних мембран нейтрофілних гранулоцитів їхні ферменти підвищують активність лізосомального апарату лімфоцитів і таким чином індукують їхню трансформацію, яка має значення у клітинному і гуморальному імунитеті [12]. Саме бласттрансформовані лімфоцити є колонієстимулюючим чинником у гранулоцитопоезі [1].

У результаті наших експериментів встановлено існування зв'язку між підвищенням активності лізосомальних ферментів нейтрофілоцитів і збільшенням числа Т-теофілінчутливих лімфоцитів, які ідентифікуються деякими авторами як Т-супресори [9]. У свою чергу, надруковані дані свідчать про здатність нейтрофілів вивільняти чинник, посилюючий активність супресорних клітин [14]. Імовірно, цим чинником може бути лізосомальна КФ [8], термін збільшення активності якої співпадає із терміном збільшення числа Т-теофілінчутливих клітин. Зміна числа В-клітин у період активації лізосомального апарату нейтрофілоцитів посередньо підтверджує можливе (хоча і менш виражене порівняно з Т-клітинами) реагування В-лімфоцитів на комплекс гуморальних змін, зумовлених іммобілізаційним стресорним фактором [4]. Зниження числа ЦІК під час максимальної активності лізосомальних ферментів у сироватці крові не протилежить даним про участь кислих гідролаз у елімінації ЦІК шляхом фагоцитозу [7, 8] та деградації недосяжних для фагоцитів комплексів поза нейтрофілоцитами шляхом екзоцитозу.

Виходячи із зазначеного, стає доцільним подальше вивчення характеру зв'язку функціональної активності лізосомального апарату нейтрофілних гранулоцитів периферичної крові та імунореактивності організму за умов дії стресорів неінфекційної природи.

N.V.Lunina, V.E.Dobrovolskaya

REACTION OF THE LYSOSOMAL APPARATUS OF NEUTOPHILIC LEUKOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD AND IMMUNOREACTIVITY OF THE ORGANISM UNDER CONDITIONS OF IMMOBILIZATION

Experiments carried out on mature rabbits have shown that 12-hours-long immobilization induced in the peripheral blood of animals neutrophilic leukocytosis accompanied by a decrease in the amount of lysosomas and granules of lysosomal cationic proteins in neutrophilocytes. In compliance with this the activity of acid phosphatase (AP), a marker lysosomal enzyme of granulocytes, in the blood serum has grown. Under these conditions we observed quantitative changes in humoral (an increase in the amount of circulating immune complexes (CIC) in the lymph as well as in B-cells) and in cellular (general T-lymphopenia, a sharp increase in the number of T-theophylline-sensitive and T-theophylline-resistant lymphocytes) components of the immunity at the initial period of the stress-syndrome formation.

It is supposed that there is a definite relation between immunoreactivity of the organism and activity of lysosomal enzymes of neutrophilic granulocytes in the peripheral blood under conditions of immobilization stress.

T.G.Shevchenko Pedagogical Institute of Lugansk,
Ministry of Education, Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Афанасьев В.В., Алмазов В.А. Родоначальные кровотверные клетки человека. — Л.: Наука, 1985. — 202 с.
2. Бережная Н.М. Нейтрофилы и иммунологический гомеостаз. — К.: Наук. думка, 1988. — 192 с.
3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Захарова О.Ю. Роль опиоидных пептидов в регуляции гемопоэза. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 1990. — 136 с.