**Функциональная активность лейкоцитов крови крыс, подвергшихся воздействию на них холода**

А. Д. Тяпкина

При действии на организм экстремальных факторов, к числу которых относится переохлаждение, происходят изменения гомеостатических констант (прежде всего относящихся к системе крови). Белые клетки крови, имея высокую реактивность, быстро включаются в адаптационные реакции [3]. Они способны к неспецифическому реагированию в ответ на альтерирующие воздействия. Переохлаждение организма может быть вызвано внешними низкими температурами и фармакологическими агентами, способными снижать температуру тела. Это, главным образом, вещества, оказывающие наркотический эффект. К их числу относится этиловый алкоголь, способный воспроизводить все характерные черты влияния неингаляционных наркотиков на теплорегуляцию [5].

Изменение функциональной активности лейкоцитов при охлаждении организма, являясь сложной медико-биологической и клинической проблемой, изучено недостаточно. Целью нашего исследования была оценка некоторых функциональных свойств белых клеток крови при экзогенном охлаждении организма и гипотермии, вызванной низкой температурой окружающей среды в сочетании с действием этилового спирта.

**Материал и методы исследования**

Опыты проведены на 30 белых крысах - самцах, поделённых на 3 группы: контрольная (I), гипотермия (II), гипотермия + алкоголь (III). Животных II группы охлаждали в воде при температуре 15°С до появления признаков "холодового наркоза". Животным III группы за 20 мин. до охлаждения вводили через желудочный зонд 30%-ный раствор этилового спирта (1мл/100г).

Смешанную кровь для исследований брали путём декапитации у предварительно наркотизированных животных. Гепаринизированную кровь (10ед/мл) центрифугировали 10мин. при 1500 об/мин. Собирали лейкоциты, а примесь эритроцитов разрушали 0,83% раствором хлорида аммония. Клетки дважды отмывали изотоническим буферным раствором. Отмытые клетки ресуспендировали и определяли их концентрацию путём подсчёта в камере Горяева.

**Фагоцитоз**

Для исследования поглотительной способности нейтрофилов использовали частицы латекса размером 0,8мкм. Смесь лейкоцитов с латексом выдерживали во влажной камере при 37°С в течение 30 мин. при постепенном, легком взбалтывании. Затем готовили мазки, фиксировали 5 мин. в метаноле и окрашивали азур-II-эозином. Поглотительную способность нейтрофилов оценивали по числу фагоцитирующих клеток (фагоцитарная активность) и среднему числу поглощённых частиц (фагоцитарный индекс) [6].

**Миграционная активность**

Для постановки миграции под агарозой использовали модифицированный вариант, описанный в многочисленных работах [4,8]. Агарозу с добавлением культуральной клеточной среды 199 наслаивали на предметные стёкла. Для оценки спонтанной миграции в агаровом геле с помощью пробойника вырезали одну лунку, в которую помещали суспензию лейкоцитов. На втором стекле ставили реакцию индуцированной миграции. Для этого вырезали группу из двух лунок: одну - для клеточной суспензии, вторую - для хемоаттрактанта, в качестве которого использовали свежую плазму крови. Стёкла помещали во влажную камеру при 37°С на 2 ч., затем погружали в 2%-ный раствор глутарового альдегида на 60 мин. после фиксации и удаления агарозы, клетки окрашивали азур-эозином по Романовскому. В обоих случаях для оценки локомоционной активности измеряли площадь распространения клеток и рассчитывали хемотаксический дифференциал - отношение изменений площади индуцированной миграции по сравнению со спонтанной к площади клеточного ареала при самопроизвольной миграции (%).

**Адгезионная способность**

40 мкм суспензии лейкоцитов помещали в капилляр с внутренним диаметром 0,56 мм, предварительно обработанный аутоплазмой. Клетки инкубировали во влажной камере при 37°С в течение 60 мин. Затем капилляр перфузировали раствором Дульбекко при напряжении сдвига 0,1 Н/м2 и повторно - 30 Н/м2. Считали число клеток в исходной суспензии, а также первом (неадгезировавшие и с малой силой сцепления) и втором (со средней силой сцепления) смыве. Из полученных данных рассчитывали число клеток, оставшихся в капилляре (с большой силой сцепления) [9].

**Механические свойства лейкоцитов**

В основу эксперимента была положена методика Tran-Son-Tay R. с соавт. [11]. Вытягивали капилляры диаметром 4 мкм, помещали их в микрокамеру и соединяли с манометром. Вся система заполнялась изоосмотическим буфером. Перемещение клеток в капилляре и к капилляру обеспечивалось постоянным во всех опытах отрицательным давлением (60 мм вод. ст.). Все манипуляции проводили на предметном столике микроскопа. Для наблюдений и замеров использовали объектив 40 ВИ и окуляр-микрометр МОВ-1-15\*. Регистрировали для каждой клетки первичные параметры (диаметр лейкоцита в исходном состоянии, длину и ширину деформированной клетки, время восстановления до сферической формы).

**Осмотическая резистентность**

Определение осмотической стойкости лейкоцитов проводили классическим способом по методу Сторти [10], подсчитывая процент клеток, сохранившихся после часовой экспозиции в 0,2% растворе хлорида натрия.

**Результаты исследований и их обсуждение**

В качестве фактора охлаждения была выбрана вода температуры 15°С, т.к. переохлаждение в водной среде по сравнению с воздушной (той же температуры) наступает в несколько раз быстрее [2].

Критерием сопротивляемости белых крыс к максимальному охлаждению служило время до появления признаков "холодового наркоза" после погружения животных в воду. Наступление "холодового наркоза" определялось замедлением, а затем и нарушением координации плавательных движений, появлением тонических судорог и погружением на дно аквариума. По ходу исследования было отмечено следующее.

Для крыс II группы была характерна двигательная активность в виде плавательных движений. Время до появления признаков "холодового наркоза" составляло в среднем 17 мин. Большая часть животных III группы была малоподвижна, но признаки "холодового наркоза" регистрировались в среднем через 23 мин. Изменения ректальной температуры у животных II группы составили в среднем 14°С, у животных III группы - 11°С. По данным литературы [2], такое снижение температуры характеризует среднюю степень гипотермии.

На основе полученных в эксперименте данных был сделан анализ изменений активных и пассивных свойств лейкоцитов в условиях переохлаждения организма, в том числе после введения этилового спирта. Анализ изменений поглотительной способности нейтрофилов в условиях гипотермии выявил незначительное снижение фагоцитарной активности (1%) с одновременным увеличением числа поглощенных частиц (19%). Охлаждение в условиях алкогольной интоксикации негативно сказывалось на функциональной активности нейтрофилов: снижались оба показателя (ФА-10%, ФИ -17%) (табл. 1).

Таблица 1

Показатели поглотительной способности нейтрофилов

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Группа животных | Фагоцитарная активность (%) | Фагоцитарный индекс (отн. ед.) |
| I группа | 92,8 ± 1,01 | 9,3 ± 0,3 |
| II группа | 91,5 ± 1,03 | 11,1 ± 0,46\* |
| III группа | 84,1 ± 1,28\*, \*\* | 8,0 ± 0,49\*, \*\* |

Примечание: \* - достоверность различий по сравнению с контролем (р < 0,05);

\*\* - достоверность различий по сравнению с переохлаждением (р < 0,05).

Выявленные изменения поглотительной способности относятся к неспецифическим реакциям защиты фагоцитирующих клеток, т.к. частицы латекса, используемые нами в опытах, не являются антигенными и могут поглощаться нейтрофилами при отсутствии опсонинов.

Нейтрофилы выполняют фагоцитарную функцию как в крови, так и за пределами кровеносного русла. Для осуществления данной функции клетки должны путём черезэндотелиальной миграции покинуть кровоток. Часть из них медленно движется вдоль сосудистой стенки и иногда адгезируется к ней. Другая часть мигрирует через эндотелий. Таким образом, адгезия нейтрофилов является необходимой в процессе черезэндотелиального транспорта и фагоцитоза.

Проведённое исследование выявило следующие особенности адгезионной способности лейкоцитов в экстремальных условиях (табл. 2).

Таблица 2

Адгезионная способность нейтрофилов

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Группа животных | Неадгезировавшие клетки (%) | Клетки со средней степенью сцепления (%) | Клетки с большой силой сцепления (%) |
| I группа | 32,2 ± 4,62 | 11,5 ± 2,12 | 56,1 ± 6,15 |
| II группа | 50,3 ± 3,89\* | 10,6 ± 0,87 | 39,1 ± 4,35\* |
| III группа | 29,3 ± 3,9\*\* | 13,1 ± 1,94 | 57,6 ± 5,7\*\* |

Примечание: \* - достоверность различий по сравнению с контролем (р < 0,05);

\*\* - достоверность различий по сравнению с переохлаждением (р < 0,05).

При охлаждении животных адгезионная способность лейкоцитов достоверно снижалась (56%), преимущественно за счёт клеток с большой силой сцепления. Сочетание охлаждения с введением алкоголя приводило к возвращению числа адгезировавших клеток к уровню контрольных животных. Стабилизирующий эффект в данном случае связан, скорее всего, с гуморальными сдвигами, опосредуемыми этиловым спиртом. Если сравнить динамику показателей III группы животных с показателями II группы, то можно отметить резкое снижение числа неадгезировавших клеток (42%) и, одновременно, увеличение числа клеток с большой силой сцепления (33%) и клеток со средней силой сцепления (19%).

Вероятно, этиловый спирт влияет на биоэнергетические процессы, затрагивающие и белые клетки крови.

При оценке адгезионной способности должны учитываться два рода явлений: 1) прочность физического контакта между клетками и матриксом; 2) распластывание лейкоцитов на подложке, что затрудняет их удаление с субстрата [7]. Для того, чтобы выяснить влияние данных процессов на изменение неспецифической адгезии, необходимо рассмотреть динамику миграционной активности.

Таблица 3

Показатели миграционной активности лейкоцитов

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Группа животных | Площадь распространения клеток при спонтанной миграции (мм2) | Площадь распространения клеток при индуцированной миграции (мм2) | Хемотаксический дифференциал (%) |
| I группа | 4,2 ± 0,22 | 4,2 ± 0,35 | 9,1 ± 6,64 |
| II группа | 4,6 ± 0,18 | 4,6 ± 0,26 | 4,5 ±10,19 |
| III группа | 4,7 ± 0,29 | 5,6 ± 0,25\*, \*\* | 22,8 ± 7,42 |

Примечание: \* - достоверность различий по сравнению с контролем (р < 0,05);

\*\* - достоверность различий по сравнению с переохлаждением (р < 0,05).

Анализ результатов показал, что при охлаждении животных до признаков "холодового наркоза" миграционные реакции нейтрофилов не отличались от контроля. Сочетание охлаждения с дачей алкоголя приводило к повышению хемокинетической активности. У животных I и II групп хемотаксическое действие не вызвало изменения площади миграции. У III группы животных хемотаксическое действие вызывало достоверный прирост площади миграции с 4,7 ± 0,29 мм2 до 5,6 ± 0,25 мм2. Следовательно, охлаждение организма не влияет на миграционную активность лейкоцитов, а активизирующий эффект, вызванный приёмом умеренных доз алкоголя до начала охлаждения, связан, скорее всего, с гуморальными сдвигами, опосредуемыми этиловым спиртом.

При оценке механических свойств лейкоцитов использовали время восстановления деформированной клетки до сферической формы. Полученные данные говорят о том, что после переохлаждения организма время восстановления увеличилось с 2,5 ± 0,44 мин. до 2,8 ± 0,38 мин. (р < 0,05). У животных III группы время "релаксации" было значительно ниже по сравнению с контролем и II группой (2,2 ± 0,29 мин., р < 0,01).

Возможно, это происходит потому, что охлаждение отрицательно воздействует на эластичность мембран клеток [1], а этиловый спирт оказывает стабилизирующий эффект за счёт своего влияния на биоэнергетические процессы в клетке [5].

Осмотическая стойкость лейкоцитов при переохлаждении организма снизилась на 13,7% (контроль - 48,8 ± 5,17; переохлаждение - 35,1 ± 5,13, р < 0,01). При сочетании охлаждения с дачей алкоголя осмотическая стойкость повысилась на 3,4% (52,2 ± 3,82%, р < 0,01).

Исследований по морфофункциональным перестройкам клеток в условиях общей экзогенной гипотермии нам не встретилось.По данным [1], локальное охлаждение вызывает разрушение мембран клеток и деструкцию клеточных органелл. Образующиеся при этом соединения обладают иммуносупрессорными свойствами и поэтому являются одной из причин угнетения иммунологической реактивности организма, наблюдающегося при локальном действии низких температур.Проведённое исследование показало, что при острой гипотермии происходят неоднозначные изменения физиологических реакций лейкоцитов, проявляющиеся в снижении адгезионных свойств при увеличении поглотительной способности и стабильности миграционных реакций нейтрофилов. Сочетание охлаждения с дачей алкоголя в большинстве случаев вызывает повышение функциональной активности лейкоцитов крови, что, по-видимому, связано с его специфическим воздействием на обмен веществ.

**Список литературы**

Авакян А.Р. Иммуномодулирующее действие ферментов при локальном охлаждении // Тезисы докладов V Российского национального конгресса: Человек и лекарство. М., 1998. С. 429 - 429.

Баженов Ю.И. Термогенез и мышечная деятельность при адаптации к холоду. Л.: Наука, 1981. С. 7-11.

Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И. Стресс и система крови. М.: Медицина, 1883. С. 57 - 57.

Дугласс С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике. М.: Медицина, 1983.

Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований / Под ред. Н.В. Лазарева. Л.: Медгиз, 1954. С. 115-117.

Потапова С.Г., Хрустиков В.С., Демидова Н.В., Козинец Г.И. Изучение поглотительной способности нейтрофилов крови с использованием инертных частиц латекса // Проблемы гематологии и переливания крови. 1977. № 9. С. 58-59.

Редчиц Е.Г., Гузеева О.В. Адгезия нейтрофилов: патогенетические и методические аспекты // Лаб. дело. 1991. № 5. С. 4-8.

Соколова Т.Ф., Редькин Ю.В. Изучение спонтанной миграционной активности лейкоцитов под агаровым покрытием // Лаб. дело. 1983. № 1. С. 31-33.

Mege Y., Eon B., Saux P. et al. Inhibition of Granulocyte Adhesion by Pentoxifylline and Analogues: Effects of Leukocyte function // Proceedings of the Workshop. - France, Saint Paul-de-Vence, 1989. P. 17-23.

Storti E. Pederzini A. Augmentation de la resistance des globules blancs par Padministration de stiblene // Schweiz, Med. Wochenschr. 1955. V 85. P.38-39

Tran- Son- Tay R., Needham D., Yeung A., Hochmuth R.M. Timedependent recovery of passive neutrophils after large deformation // Biophys. J.Biophysical Society.1991. P. 856-866.