

ГЕМОПОЭЗ И ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ВОСПАЛЕНИИ НА ФОНЕ ЛОКАЛЬНОГО УДАЛЕНИЯ НЕФАГОЦИТИРУЮЩИХ ГРАНУЛОЦИТОВ

А.Г. Сирак, Е.И. Пискарева, М.А. Долгашова, О.Г. Магомедова, А.П. Арутюнова, О.В. Любанская, Е.Г. Неменушная, М.О. Диденко, З.М. Кочкарова

*ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кафедра гистологии*

Статья посвящена функциональному состоянию лейкоцитов крови и особенностям гемопоэза при воспалении в экспериментальных условиях на фоне локального удаления нефагоцитирующих гранулоцитов. О функциональном состоянии лейкоцитов крови, полученной от 24 крыс-самцов линии Wistar массой 180–220 г, судили по активности их маркерных ферментов. Функциональную активность нейтрофилов изучали при помощи маркеров миелопероксидазы (МПО) и кислой фосфатазы (КФ), моноцитов-макрофагов – α -нафтилацетат-эстеразы (α -НАЭ), лимфоцитов – КФ и α -НАЭ. Установили, что при воспалении на фоне предварительного удаления НГ из очага происходит меньшее поступление нейтрофилов, моноцитов из костного мозга в кровь и далее в очаг воспаления, изменение интенсивности и динамики гемопоэза и, как следствие, повышенная дегрануляция лимфоцитов.

Ключевые слова: воспаление, эксперимент, нефагоцитирующие гранулоциты, миелопероксидаза, кислая фосфатаза, α -нафтилацетат-эстераза.

DOI 10.19163/1994-9480-2020-2(74)-153-156

HEMOPOESIS AND FUNCTIONAL CONDITION OF BLOOD LEUKOCYTES DURING INFLAMMATION IN THE BACKGROUND OF LOCAL REMOVAL OF NONPHAGOCOTATING GRANULOCYTES

A.G. Sirak, E.I. Piskareva, M.A. Dolgashova, O.G. Magomedova, A.P. Arutyunova, O.V. Lyubanskaya, E.G. Nemenuschaya, M.O. Didenko, Z.M. Kochkarova

*FSBEI HE « Stavropol state medical university» of Public Health Ministry of the Russian Federation,
Histology department*

The article is devoted to the functional state of blood leukocytes and peculiarities of hematopoiesis during inflammation under experimental conditions against the background of local removal of non-phagocytic granulocytes. The functional status of blood leukocytes obtained from 24 Wistar male rats weighing 180–220 g was judged by the activity of their marker enzymes. Myeloperoxidase (MPO) and acid phosphatase (CF), macrophage monocytes – α -naphthylacetate esterase (α -NAE), lymphocytes – CF and α -NAE served as markers of the functional activity of neutrophils. Found that during inflammation on the background of prior removal of NG from the focus, there is less neutrophil and monocyte entry from the bone marrow into the blood and further into the inflammation focus, changes in the intensity and dynamics of hemopoiesis, and as a result, increased lymphocyte degranulation.

Key words: inflammation, experiment, non-phagocytic granulocytes, myeloperoxidase, acid phosphatase, α -naphthylacetate esterase.

Определяющими признаками воспаления являются сложные изменения системы крови, микроциркуляторного русла и соединительной ткани в виде альтерации, экссудации, эмиграции лейкоцитов и пролиферации. Реакции, возникающие на повреждения со стороны всего организма, являются основополагающими и характеризуют воспалительно-репаративные изменения макроорганизма в целом [1–3].

Сигнальными клетками, появляющимися первыми в месте повреждения, являются нейтрофильные гранулоциты. Они в свою очередь стимулируют лимфоциты, моноциты, эозинофилы, которые прибывают на помощь нейтрофильным гранулоцитам и активизируют их деятельность. Поэтому нейтрофильные гранулоциты становятся важным звеном, определяющим впоследствии саму возможность внедрения и локализации антигена [4–6].

Нейтрофильные гранулоциты играют важную роль в воспалительном процессе благодаря нахождению в гранулярном аппарате клеток структур, которые активируются и при дегрануляции выделяют свободные радикалы кислорода, лизосомальные энзимы, способствующие подавлению чужеродных микроорганизмов, проникших в соединительную ткань [7, 8, 12].

Антибактериальная функция авторизованных нейтрофилов при воспалении, заключающаяся в выделении катионных белков и факторов проницаемости, способствует активации дегрануляции нефагоцитирующих гранулоцитов и базофильных лейкоцитов, что указывает на стимуляцию клеток мононуклеарной фагоцитарной системы. В результате многообразия клеточных коопераций формируется эффективный противомикробный барьер [9, 10].

В настоящее время установлено взаимодействие моноклеарных и полиморфноядерных клеток [11]. Лимфоциты и моноциты (макрофаги) могут модифицировать функции и активность нейтрофильных гранулоцитов, а нейтрофилы в свою очередь способны оказывать существенное влияние на моноклеарные клетки [12].

Наиболее актуальными проблемами воспаления остаются механизмы взаимодействия всей тучноклеточной системы, сдерживающие прогрессирование хронического воспаления и играющие компенсаторную роль в организме.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Экспериментальное изучение функционального состояния лейкоцитов крови и гемопоэза при воспалении на фоне локального удаления нефагоцитирующих гранулоцитов.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проведен на 24 крысах-самцах линии Wistar массой 180–220 г. В контрольную группу отобрано 12 животных, не имеющих патологических процессов. Основную группу составили 12 крыс-самцов с явными признаками воспаления.

О функциональном состоянии лейкоцитов крови судили по активности их маркерных ферментов. Маркерами функциональной активности нейтрофилов служили миелопероксидаза (МПО) и кислая фосфатаза (КФ), моноцитов-макрофагов – α -нафтилацетат-эстераза (α -НАЭ), лимфоцитов – КФ и α -НАЭ.

Миелопероксидаза – фермент, локализующийся преимущественно в специфических гранулах нейтрофилов, определяли по методу Грэхема – Кнолля, основанному на окислении бензидина перекисью водорода в коричневый оксибензидин в присутствии пероксидазы. Свежие мазки крови фиксировали в 4%-м формалиново-спиртовом растворе, состоящем из 10 частей 40%-го формальдегида и 90 частей 96%-го спирта в течение 30 с. Отмывали в проточной воде и высушивали. Заливали реактивом на пероксидазу, состоящим из бензидина, растворенного в 6 мл 96%-го спирта, 4 мл воды и 0,02 мл 3%-й перекиси водорода, на 5 мин. Тщательно промывали в проточной воде и высушивали. Докрашивали азуром II-эозином. Подсчет гранул производили с учетом интенсивности их окраски в световом микроскопе «Биолам». Интенсивность окраски оценивали по 3-балльной шкале. Активность фермента рассчитывали по формуле Астальди и выражали в СЦК.

Кислую фосфатазу определяли методом азосочетания Берстона. Нефиксированные мазки инкубировали при 37 °С в течение 2 ч в среде, состоящей из 10 мг нафтол-AS-фосфата, растворенного в 5 мл диметилформамида, 15 мл 0,1 М цитратного буфера, pH 5,2, 45 мл дистиллированной воды, 5 мл раствора хлорида магния, 50 мг диазоля

синего. Затем мазки крови промывали изотоническим раствором хлорида натрия. Докрашивали красителем Романовского – Гимзы. Промывали в проточной воде. Подсчет гранул производили с учетом интенсивности их окраски в световом микроскопе «Биолам». Активность фермента рассчитывали по формуле Астальди и выражали в СЦК.

Альфа-НАЭ определяли по методу Леффлера. Свежеприготовленные и высушенные на воздухе мазки крови фиксировали в парах формалина 4 мин. Инкубировали в среде, состоящей из 10 мг α -нафтилацетата, растворенного в 0,2 мл ацетона, 40 мл 0,1 М раствора фосфатного буфера, pH 7,8–8,0, 50 мг прочного синего В, при комнатной температуре 30 мин, промывали в проточной воде 2–3 мин. Докрашивали кислым гемалауном 8 мин, промывали дистиллированной водой 15 мин. В моноцитах производили подсчет гранул с учетом интенсивности их окраски в световом микроскопе «Биолам». Интенсивность окраски оценивали по 3-балльной шкале. Активность фермента рассчитывали по формуле Астальди и выражали в СЦК. Подсчитывали процент лимфоцитов, содержащих α -НАЭ.

Результаты прошли статистическую обработку с применением однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественных сравнений Ньюмена – Кейсла в программе «Primer of Biostatistics 4.03» для Windows. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Все экспериментальные исследования проведены в полном соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (изложенными в национальном стандарте «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434-2009), с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о «Защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей» (Страсбург, 1986), в соответствии с международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985), «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Россия, 2011), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003) и положительным заключением этического комитета в условиях вивария на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ставропольский государственный аграрный университет» (Ставрополь).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении функциональной активности лейкоцитов крови установлено, что при естественном течении воспаления активность МПО в нейтрофилах возрастает на 6-й час, 3-, 21- и 28-е сутки, в эти же сроки несколько увеличивается и активность КФ. Активность α -НАЭ в моноцитах повышается на

1-е и достоверно на 7–14-е сутки. В лимфоцитах активность КФ возрастает на 6-й час, 3-, 21-, 28-е сутки; количество лимфоцитов, содержащих α -НАЭ, несколько увеличивается на 1-е и 7-е, 14-е сутки (рис. 1).

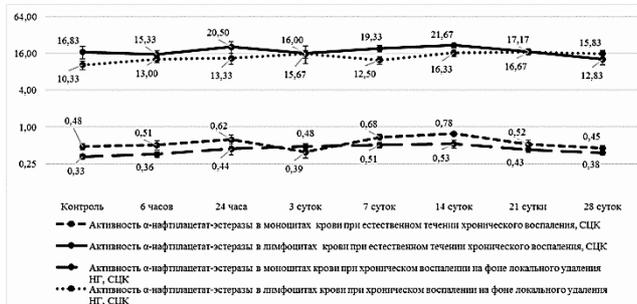


Рис. 1. Активность α -нафтилацетат-эстеразы в лейкоцитах крови при естественном течении хронического воспаления и при хроническом воспалении на фоне локального удаления НГ ($M \pm m, n = 6$). Данные статистически достоверны относительно показателей контрольной группы ($p_1 < 0,05$)

Активность ферментов в лейкоцитах зависит от соотношения между дегрануляцией и эмиграцией клеток и притоком вновь образованных лейкоцитов из костного мозга в периферическую кровь. По нашему мнению, ферментативная деятельность отражает приток лейкоцитов, так как представленные сроки соответствуют поступлению лейкоцитов из костномозгового резерва (6-й–24-й часы), активации гемопоэза (3-и сутки), повторному выходу лейкоцитов в кровь (7-е сутки), вторичной активации гемопоэза (14–28-е сутки).

Активность МПО в нейтрофилах при воспалительном процессе на фоне удаления нефагоцитирующих гранулоцитов (НГ) ниже, чем при естественном течении процесса, на 6-й час – 3-и сутки, и выше – на 7–14-е сутки; активность КФ – меньше в контрольной группе и больше на 3–7-е сутки. Активность α -НАЭ в моноцитах ниже в контроле и отстает на 1-е и 7-е сутки, превышает на 3-и сутки и меньше на 14-е сутки (рис. 2).

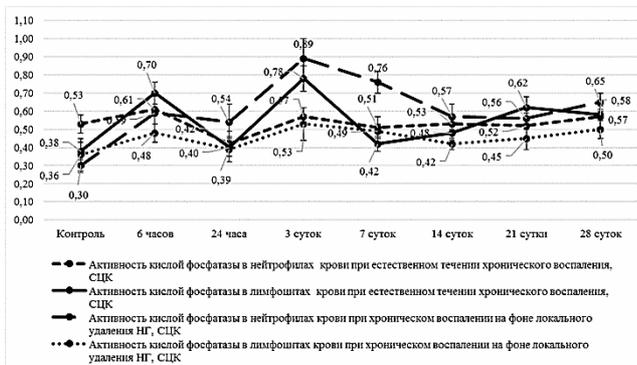


Рис. 2. Активность кислой фосфатазы в лейкоцитах крови при естественном течении хронического воспаления и при хроническом воспалении на фоне локального удаления НГ ($M \pm m, n = 6$). Данные статистически достоверны относительно показателей контрольной группы ($p_1 < 0,05$)

Активность КФ в лимфоцитах меньше на 6-й час, 3-и и 21-е сутки, количество лимфоцитов, содержащих α -НАЭ, меньше во все сроки исследования, за исключением 28 суток, достоверно – на 7-е сутки (рис. 3).

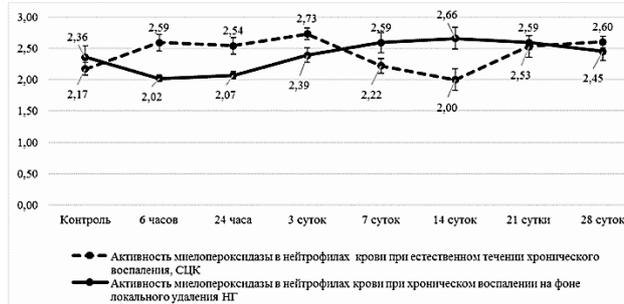


Рис. 3. Активность миелопероксидазы в лейкоцитах крови при естественном течении хронического воспаления и при хроническом воспалении на фоне локального удаления НГ ($M \pm m, n = 6$). Данные статистически достоверны относительно показателей контрольной группы ($p_1 < 0,05$)

Следовательно, различные показатели ферментативной активности отражают меньшее поступление нейтрофилов и моноцитов из костного мозга в кровь и, далее, в очаг воспаления, изменения интенсивности и динамики костномозгового кроветворения и с учетом усиления миграции лимфоцитов в патологический очаг повышенную дегрануляцию лимфоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показатели ферментативной активности лейкоцитов в крови при воспалительном процессе в результате предварительного удаления НГ из патологического очага приводят к усилению костномозгового кроветворения и снижению выхода лейкоцитов из костного мозга в периферическую кровь. В самом воспалительном очаге наблюдается аккумуляция лимфоцитов при незначительном присутствии нейтрофилов и моноцитов.

ЛИТЕРАТУРА

- Алексеева Н.Т. Участие клеточного компонента в регенерации раны // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2014. – № 1 (3). – С. 9–15.
- Баглай Е.О., Дубиков А.И. Тучные клетки – ключевые участники патогенеза иммуновоспалительных заболеваний // Научно-практическая ревматология. – 2015. – № 2 (53). – С. 182–189.
- Корденко А.Н., Алексеева Н.Т., Анохина Ж.А. Видовые особенности структуры тучных клеток кожи // Журнал анатомии и гистопатологии. – 2014. – № 4 (3). – С. 36–38.
- Парахонский А.П. Медиаторные аспекты воспалительного процесса // Аспирант. – 2015. – № 1 (16). – С. 133–137.
- Сирак А.Г., Пискарева Е.И., Магомедова О.Г. и др. Роль нефагоцитирующих гранулоцитов периферической крови в клеточных реакциях при воспалении // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2019. – Т. 14, № 1–2. – С. 238–242.

6. Сирак А.Г., Щетинин Е.В., Сирак С.В. и др. Иммуногистохимические особенности больших слюнных желез крыс при экспериментальном пародонтите // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2018. – Т. 13, № 2. – С. 410–414.

7. Хаспекова С.Г., Антонова О.А., Шустова О.Н. и др. Активность тканевого фактора в микрочастицах, продуцируемых *in vitro* эндотелиальными клетками, моноцитами, гранулоцитами и тромбоцитами // Биохимия. – 2016. – № 2 (81). – С. 206–214.

8. Breedveld A., van Egmond M., Kormelink T.G., et al. Granulocytes as modulators of dendritic cell function. *Journal of Leukocyte Biology*. – 2017. – No. 4 (102). – P. 1003–1016.

9. Mayda H., Ahsen A., Bağcıoğlu E. Effect of Increased Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) and Decreased Mean Platelet Volume (MPV) Values on Inflammation in Acute Mania // *Noro Psikiyatrs Ars*. – 2016. – No. 53 (4). – P. 30–36.

10. O'Sullivan J.A., Carroll D.J., Moreno-Vinasco L., et al. Frontline science: characterization of a novel mouse strain expressing human siglec-8 only on eosinophils // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2018. – No. 1 (104). – P. 11–19.

11. Pugh A.M., Auteri N.J., Goetzman H.S. A Murine Model of Persistent Inflammation, Immune Suppression, and Catabolism Syndrome // *J Orthop Surg Res*. – 2017. – No. 18 (8). – P. 17–25.

12. Sirak A.G., Piskareva E.I., Magomedova O.G. Leukocytic responses in peripheral blood and peculiarities of bone marrow hematopoiesis in acute and chronic inflammation on a background of local removal of non-phagocytic granulocytes // *Medical News of North Caucasus*. – 2019. – No. 14 (3). – P. 512–516.

REFERENCES

1. Alekseeva N.T. Uchastie kletochnogo komponenta v regeneracii rany [The participation of the cellular component in wound regeneration]. *Zhurnal anatomii i gistopatologii* [Journal of Anatomy and Histopathology], 2014, no. 1 (3), pp. 9–15. (In Russ.; abstr. in Engl.).

2. Baglay E.O., Dubikov A.I. Tuchnye kletki – kljuchevye uchastniki patogeneza immunovospalitel'nyh zabolovaniy [Mast cells are key participants in the pathogenesis of immuno-inflammatory diseases]. *Nauchno-prakticheskaja revmatologija* [Scientific and practical rheumatology], 2015, no. 2 (53), pp. 182–189. (In Russ.; abstr. in Engl.).

3. Kordenko A.N., Alekseeva N.T., Anokhin Zh.A. Vidovye osobennosti struktury tuchnyh kletok kozhi [Species features of the structure of mast cells of the skin]. *Zhurnal*

anatomii i gistopatologii [Journal of Anatomy and Histopathology], 2014, no. 4 (3), pp. 36–38. (In Russ.; abstr. in Engl.).

4. Parakhonsky A.P. Mediatorny aspekt vospalitel'nogo processa [Mediator aspects of the inflammatory process]. *Aspirant* [Graduate student], 2015, no. 1 (16), pp. 133–137. (In Russ.; abstr. in Engl.).

5. Sirak A.G., Piskareva E.I., Magomedova O.G., et al. Rol' nefagocitirujushhih granulocitov perifericheskoj krovi v kletochnyh reakcijah pri vospalenii [Role of non-phagocytic peripheral blood granulocytes in cellular reactions in inflammation]. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza* [Medical Herald of the North Caucasus], 2019, vol. 14, no. 1-2, pp. 238–242. (In Russ.; abstr. in Engl.).

6. Sirak A.G., Shchetinin E.V., Sirak S.V., et al. Immunogistohimicheskie osobennosti bol'shih sljunnyh zhelez kryс pri jeksperimental'nom parodontite [Immunohistochemical features of the large salivary glands of rats during experimental periodontitis]. *Medicinskij vestnik Severnogo Kavkaza* [Medical Herald of the North Caucasus], 2018, vol. 13, no. 2, pp. 410–414. (In Russ.; abstr. in Engl.).

7. Khaspekova S.G., Antonova O.A., Shustova O.N., et al. Aktivnost' tkanevogo faktora v mikrochastichah, produciruemyh *in vitro* jendotelial'nymi kletkami, monocitami, granulocitami i trombocitami [Tissue factor activity in micro-particles produced in vitro by endothelial cells, monocytes, granulocytes and platelets]. *Biokhimija* [Biochemistry], 2016, no. 2 (81), pp. 206–214. (In Russ.; abstr. in Engl.).

8. Breedveld A., van Egmond M., Kormelink T.G., et al. Granulocytes as modulators of dendritic cell function. *Journal of Leukocyte Biology*, 2017, no. 4 (102), pp. 1003–1016.

9. Mayda H., Ahsen A., Bağcıoğlu E. Effect of Increased Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio (NLR) and Decreased Mean Platelet Volume (MPV) Values on Inflammation in Acute Mania. *Noro Psikiyatrs Ars*, 2016, no. 53 (4), pp. 30–36.

10. O'Sullivan J.A., Carroll D.J., Moreno-Vinasco L., et al. Frontline science: characterization of a novel mouse strain expressing human siglec-8 only on eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology*, 2018, no. 1 (104), pp. 11–19.

11. Pugh A.M., Auteri N.J., Goetzman H.S. A Murine Model of Persistent Inflammation, Immune Suppression, and Catabolism Syndrome. *J Orthop Surg Res*, 2017, no. 18 (8), pp. 17–25.

12. Sirak A.G., Piskareva E.I., Magomedova O.G. Leukocytic responses in peripheral blood and peculiarities of bone marrow hematopoiesis in acute and chronic inflammation on a background of local removal of non-phagocytic granulocytes. *Medical News of North Caucasus*, 2019, no. 14 (3), pp. 512–516.

Контактная информация

Сирак Алла Григорьевна – д. м. н., профессор, зав. кафедрой гистологии, Ставропольский государственный медицинский университет, e-mail: sergejsirak@yandex.ru