

КИЇВСЬКИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

На правах рукопису

ГИНДИЧ ЛАРИСА ОЛЕКСАНДРІВНА

**МОРФОМЕТРИЧНІ І ФУНКЦІОНАЛЬНІ ОСОБЛИВОСТІ  
ПРАЙМЕРНИХ НЕЙТРОФІЛЬНИХ ГРАНУЛОЦИТІВ КРОВІ**

03.00.11. - ембріологія, гістологія і цитологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата біологічних наук

Київ -1996

526

№. 36.223

Дисертацією є рукопис

**ЛННБ України ім.В.Стефаніка**

Робота виконана в лабораторії  
Інституту клінічної та експериментальної  
АМН України



00757204 (P)

Науковий керівник - доктор медичних наук  
**МЕДВЕЦЬКИЙ Євген Болеславович**

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор  
**ГОРДІЄНКО Вадим Максимович**

кандидат біологічних наук  
**ГОРДІЄНКО Ала Іванівна**

Провідна організація - Інститут зоології  
ім. І. І. Шмальгаузена НАН України

Захист дисертації відбудеться "24" грудня 1996 року  
о 15 годині на засіданні спеціалізованої Вченої ради  
Д.01.01.13 при Київському університеті імені Тараса Шевченка  
за адресою: пр.Глушкова, 2. НДІ фізіології Київського універси-  
тету імені Тараса Шевченка (кімн.504).

З дисертацією можна ознайомитись в бібліотеці Київського уні-  
верситету імені Тараса Шевченка за адресою: м.Київ, вул. Володи-  
мирська, 60. Відгуки на автореферат надсилати за адресою:  
252033, м. Київ, вул. Володимирська, 60.

Автореферат розісланий "21" листопада 1996 року

**Вчений секретар**  
**спеціалізованої Вченої ради,**  
**кандидат біологічних наук**

**Г. В. Островська**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність проблеми.** Реакція нейтрофільного гранулоциту на подразнення залежить від висхідного стану клітини. Найбільш адекватна відповідь буде отримана в разі переходу нейтрофільного гранулоциту в так званий стан праймерності, тобто оптимальної готовності до реакції. В літературних джерелах вказується на важливість такого стану нейтрофілів для організму, проте функціональні особливості праймерних клітин залишаються вивченими недостатньо, а їх структурні характеристики взагалі відсутні. Щоб встановити, в якому стані знаходяться нейтрофіли в організмі в умовах клінічної патології і вибрати правильну тактику корекції лікування захворювання, слід визначити наявність праймерних клітин, а для цього необхідна розробка морфометричних і інтегральних функціональних критеріїв нейтрофільних гранулоцитів, що перебувають в стані готовності до сприйняття подразнення. Маючи таку інформацію, з'явиться можливість керувати нейтрофільними гранулоцитами, використовуючи фармакологічні препарати, тим самим збільшувати резервні можливості клітин неспецифічного захисту.

**Мета та завдання роботи.** Мета роботи - вивчити праймерні нейтрофільні гранулоцити крові і розробити морфометричні і функціональні критерії клітин, що перебувають в цьому стані. Для досягнення мети були визначені такі завдання:

- вивчити осмотичну стійкість та еластичність цитоплазматичних мембран інтактних і праймерних нейтрофільних гранулоцитів крові;
- встановити особливості квантпродукуючої реакції інтактних і праймерних нейтрофільних гранулоцитів крові;
- показати вплив антагоністів кальцію на інтактні і праймерні нейтрофільні гранулоцити крові;
- провести морфометричний аналіз основних параметрів нейтрофільних гранулоцитів у спокої та за умов праймерності;
- встановити взаємозв'язок між функціональним станом праймерного нейтрофільного гранулоциту та його структурою;
- впровадити в медичну практику розроблені морфо-функціональні критерії праймерних нейтрофільних гранулоцитів з метою визначення резервних можливостей клітинних факторів неспеци-

фічного захисту організму і керування цим процесом у хворих з гнійно-септичними ускладненнями.

**Наукова новизна.** Визначені раніше невідомі структурно-функціональні особливості праймерних нейтрофільних гранулоцитів крові. Вперше виявлена взаємозалежність функціональної активності і структурних особливостей праймерних нейтрофілів. Встановлена роль блокаторів кальцієвих каналів в управлінні кисневозалежними реакціями нейтрофільних гранулоцитів крові. Показано, що використання антагоністів кальцію дозволяє збільшити резервні можливості праймерних нейтрофілів, а також знизити їх метаболічну активність.

**Теоретичне та практичне значення.** Встановлені морфо-функціональні особливості праймерних нейтрофільних гранулоцитів крові. Виявлені взаємозв'язки між основними морфометричними показниками та функціональною активністю цих клітин дають підставу для впровадження в медичну практику розроблені критерії з метою визначення стану неспецифічного захисту у конкретного пацієнта та вибору тактики корекції лікування. Рекомендовано МОЗ України для впровадження в практику роботи клінічних лабораторій способи визначення резерву неспецифічного захисту та фагоцитарної активності лейкоцитів крові. Отримані дані можуть бути впроваджені в педагогічний процес у вузах відповідного профілю.

**Апробація роботи.** Матеріали дисертації доповідали і обговорювали на III Українському з'їзді гематологів і трансфузіологів (Суми, 1995), Міжнародній конференції, присвяченій 150-річчю з дня народження І.І.Мечникова "Ідеї І.І.Мечникова в розвитку сучасного природознавства" (Харків, 1995), Міжнародній конференції та школі-семінарі молодих вчених "Фізіологія та патологія імунітету, гомеостазу та перекисного окислення ліпідів" (Полтава, 1996).

**Публікації результатів досліджень.** Результати досліджень по темі дисертації відображені в 13 наукових працях, які опубліковані в журналах "Бюллетень експериментальної біології и медицини", "Клиническая хирургия", а також в тезах та матеріалах науково-виробничих конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація викладена на 165 сторінках машинописного тексту та ілюстрована 19 малюнками.

Дисертація включає вступ, огляд літератури, глави, присвяче-

ні матеріалам і методам дослідження, результатам досліджень та їх обговорення, заключення, висновки, список літератури, який містить 157 бібліографічних найменувань.

**Декларація конкретного особистого внеску.** Автором самостійно проведено морфометричне і функціональне дослідження інтактних та праймерних нейтрофільних гранулоцитів крові у 120 здорових чоловік та 45 хворих з гнійно-септичними ускладненнями. Всього було виконано 6120 досліджень, в тому числі 4800 - у здорових людей.

При вивченні морфометричних та функціональних особливостей праймерних нейтрофілів крові були застосовані кондуктометричний, хемілюмінесцентний та світлооптичний з використанням комп'ютерної морфометрії методи.

**Положення, що виносяться на захист.** На підставі аналізу результатів дослідження та співставленні їх з літературними даними на захист виносяться такі положення:

1. Праймерні нейтрофільні гранулоцити активніше інтактних реагують на подразнення і характеризуються зменшенням площі та периметру ядра і клітини в цілому.

2. Нейтрофіли крові у хворих з гнійно-септичними ускладненнями, що мають знижену осмотичну резистентність та подібні до праймерних *in vitro* нейтрофілів морфометричні показники, а також високий функціональний рівень, можуть розглядатися як праймерні *in vivo*.

3. Антагоністи кальцію знижують продукцію активних кисневих радикалів найактивніше у праймерних клітин.

### **МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

В роботі були досліджені нейтрофільні гранулоцити (НГ) 120 здорових чоловік (донорів) та 45 хворих на гнійно-септичні ускладнення, а саме: на гнійний холангіт, панкреатит, панкреа некроз, абсцес печінки, перитоніт, загальний сепсис.

З метою вивчення морфо-функціональних особливостей праймерних НГ було використано кілька способів переведення клітин в праймерний стан *in vitro*. Першою моделлю слугував фізико-хімічний спосіб зміни функціонального стану клітин в результаті "прогріву-охолодження" цільної крові (Земсков і співавт., 1993). Другою моделлю слугував метод переведення НГ в

праймерний стан шляхом інкубації цільної крові в середовищі з бактеріальним ліпополісахаридом (Briheim et al., 1989). Використовувався також метод зміни функціонального стану НГ в результаті зниження осмотичності середовища (Saio Noriuki et al., 1990). Вивчались морфо-функціональні особливості НГ крові після їх модифікації антагоністом кальцію - івоптином ( $5 \cdot 10^{-6}$  г/л) (Калмыков і співавт., 1991).

НГ крові хворих на гнійно-септичні ускладнення вивчались як праймерні, так як контакт цих клітин з ендотоксинами та іншими продуктами інфекційного процесу *in vivo* змінив їх функціональний стан (Лиходед і співавт., 1996; Briheim et al., 1989).

Кількість лейкоцитів, осмотичну резистентність та еластичність їх мембран визначали кондуктометричним методом (Чернов, Чухарева, 1990) на автоматичному аналізаторі LABORSCAL. Підрахунок абсолютної кількості НГ та морфологічний контроль проводивсь світлооптичним методом в фарбованих за Романовським препаратах крові.

Квантпродукуючу активність інтактних та праймерних НГ крові вивчали в цільній крові хемілюмінесцентним методом на спектрометрі DELTA - 300. Оцінювали в динаміці абсолютні показники спонтанної та зимоганстимульованої активності з врахуванням індексу активації (Descumps-Latcha et al., 1991).

Морфометричне вивчення НГ проводили в фарбованих по Романовському препаратах крові на комп'ютерному аналізаторі зображення фірми OPTON з використанням програмного забезпечення науково-виробничої компанії ЄВА. Морфометричні дослідження складались з визначення площі, периметру, оптичної щільності клітини та її ядра, а також ядерно-цитоплазматичного співвідношення.

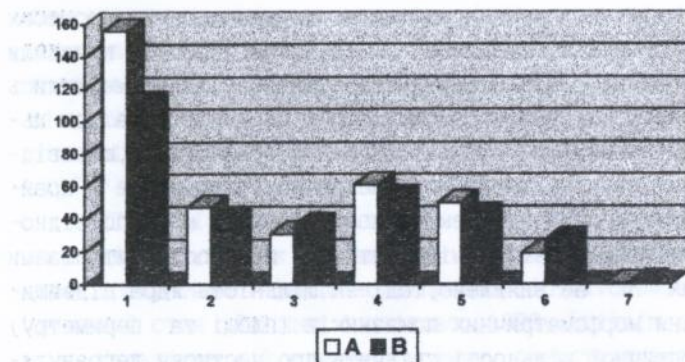
Цифрові дані оброблялись за допомогою пакету прикладних програм SUPERCALK для персональних комп'ютерів. Вірогідність даних визначали за Ст'юдентом.

#### ВЛАСНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Морфо-функціональний стан праймерних НГ крові при використанні моделі "прогріву-охолодження".** Досліди показали, що переведення НГ на новий функціональний рівень шляхом використання циклу "прогрів-охолодження" викликало як морфометричні, так і функціональні зміни. Різке коливання температури навколишнь-

ого середовища, в якому проходила інкубація проб, викликало зміни фізико-хімічного стану клітин, що позначилось на процесах перекисного окислення мембранних ліпідів. Такі процеси призвели до морфометричних змін. В результаті такого впливу зменшились площа і периметр клітини, а також площа і периметр ядра. При цьому ядерно-цитоплазматичне співвідношення збільшилось, що свідчить про різну степінь зміни морфометричних параметрів у праймерних клітин: площа ядра зменшилась в меншій мірі по відношенню до площі цитоплазми. Зміни оптичної щільності цитоплазми в праймерних НГ не виявлено, тоді як щільність ядра підвищилась. Зменшення морфометричних показників (площі та периметру) без змін оптичної щільності свідчить про часткову дегрануляцію, що виникає в праймерних НГ (Мал.1). Підвищення показників оптичної щільності ядра при зниженні його площі та периметру, вказує на загальне зменшення ядра за рахунок стиснення. Про це свідчать і результати рахунку фактора форми, які не залежать від розмірів об'єкту, а відображують його форму. У праймерних НГ було виявлено зменшення фактора форми ядра, що вказувало на його округлення. Різниця фактору форми праймерної і інтактної клітини не встановлено, що є доказом рівнозначності та односторонності змін в показниках площі і периметру клітини.

При вивченні лумінолзалежної спонтанної та зимозанстимульованої хемілюмінесцентної (ХЛ) активності праймерних НГ було відзначено підвищення стимульованої квантпродукуючої реакції при порівнянні з відповідними показниками інтактних нейтрофілів та помірний позитивний їх зв'язок (Мал.2). Зменшувалася час досягнення пікових показників стимульованої активності. Спонтанна активність НГ, переведених в праймерний стан "прогрівом-охолодженням", не відрізнялась від активності контрольних клітин і проявляла слабку обернену взаємозалежність. Індекс активації, важливий показник резерву оксидантної активності фагоцитів крові, у праймерних НГ підвищувався. Таким чином, отримані результати квантпродукуючої реакції праймерних НГ крові свідчать про розширення їх резервних можливостей як фагоцитарних та бактерицидних клітин, а також слугують доведенням існуючого припущення /Wiedermann et al., 1991; Lopez-Gonzalez, Lucas, 1994/, що тільки підготовлена (праймерна) клітина зможе адекватно і з максимальною віддачею відповісти на додаткове подразнення.



Мал.1 Зміна морфометричних показників НГ крові в результаті "прогріву-охолодження" А - інтактні НГ, В - праймерні НГ; 1 - площа клітини; 2 - периметр клітини; 3 - оптична щільність цитоплазми; 4 - площа ядра; 5 - периметр ядра; 6 - оптична щільність ядра; 7 - ядерно-цитоплазматичне співвідношення.



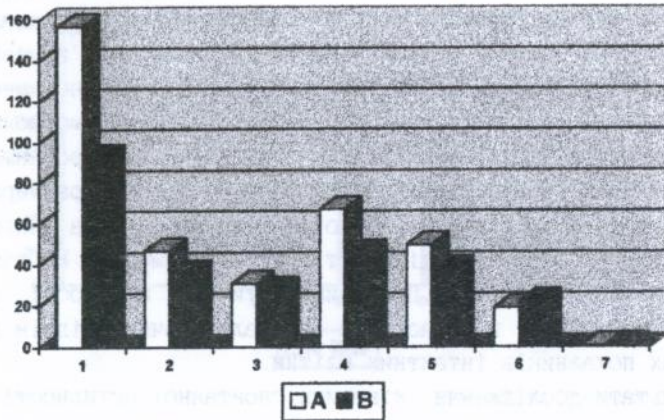
Мал.2 Вплив "прогріву-охолодження" на квантпродукуючу реакцію НГ крові.

### **Морфо-функціональний стан пірогенал - праймерних НГ крові.**

Інкубація НГ цільної крові з ліпополісахаридом - пірогеналом викликала зміни морфометричних показників, аналогічні вищевказаним, а саме: зменшення периметру зовнішньої та ядерної мембран, зменшення площі клітини і ядра (Мал.3). Зміни морфометричних показників ядра в результаті інкубації з пірогеналом були більш вираженими порівняно з цитоплазмою. Форма праймерної клітини не мала відмін від інтактної, фактор форми ядра знизився. Підвищення оптичної щільності ядра праймерних НГ також вказувало на його стиснення. Показники оптичної щільності цитоплазми праймерних гранулоцитів не мали значних відмін від відповідних показників інтактних клітин.

Результати дослідження кінетики спонтанної активності не визначили відмін в показниках ХЛ активності інтактних і праймерних НГ в перші 15 хвилин реєстрації активності перекисно-окисних процесів. Пікові значення спонтанної ХЛ активності пірогенал-праймерних клітин були вищими за відповідні показники контрольних НГ і проявляли слабкий обернений взаємозв'язок (Мал.4). Стимуляційний вплив часток зимозану викликало підвищення активності метаболічних процесів в праймерних НГ порівняно з інтактними клітинами, а час досягнення пікового значення квантпродукуючої реакції - скороченим. Відмічене значне підвищення стимульованої квантпродукуючої реакції праймерних НГ, порівняно з контролем, та виявлена значна сильна кореляційна взаємозалежність цих показників свідчать про можливість зміни функціонального стану клітин неспецифічного захисту з метою їх підготовки до послідуєчого додаткового подразнення. Індекс активності пірогенал-праймерних НГ був вищим за індекс активності інтактних клітин, що також вказувало на збільшення їх потенційних можливостей.

**Морфо-функціональні особливості НГ крові хворих на гнійно-носептичні ускладнення** Врахувачи, що ліпополісахарид, структурний компонент клітинної оболонки мікрорганізмів, являється одним з потужних індукторів перебудови метаболічних процесів у фагоцитарних клітин, НГ крові хворих на гнійно-носептичні ускладнення розглядалися нами як праймерні, або стимульовані в умовах *in vivo* - "контактні" (Табл.1). Останні не відрізнялися по морфометричним даним площі клітини від контрольних (до-



Мал.3 Зміна морфометричних показників НГ крові під впливом пірогеналу  
 А - інтактні НГ крові; В - праймерні НГ крові; 1 - площа клітини; 2 - периметр клітини; 3 - оптична щільність клітини; 4 - площа ядра; 5 - периметр ядра; 6 - оптична щільність ядра; 7 - ядро-цитоплазматичне співвідношення.



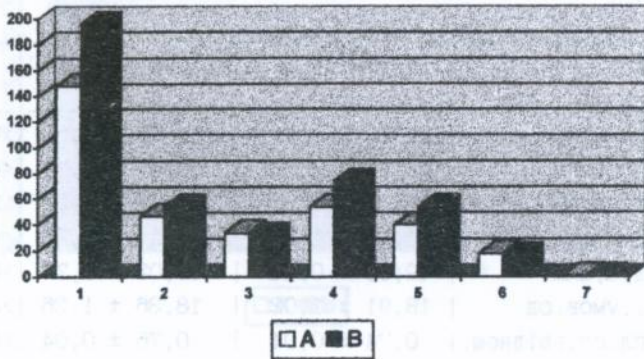
Мал.4 ХЛ активність інтактних та пірогенал-праймерних НГ крові.

Морфометричні показники інтактних та "контактних" НГ крові  
(  $M \pm m$  )

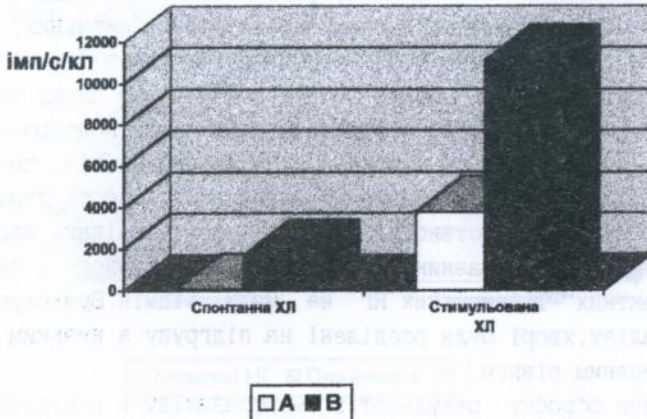
| Показники                  | Інтактні НГ   | " Контактні" НГ | p     |
|----------------------------|---------------|-----------------|-------|
| Площа НГ, мкм <sup>2</sup> | 156,62 ± 3,51 | 166,79 ± 4,59   | >0,05 |
| Периметр НГ, мкм           | 46,96 ± 0,65  | 49,41 ± 0,76    | <0,05 |
| Щільн. цитопл., умов. од.  | 31,36 ± 1,02  | 33,82 ± 1,35    | >0,05 |
| Площа яд. мкм <sup>2</sup> | 61,18 ± 1,20  | 64,21 ± 1,38    | <0,05 |
| Перим. ядра, мкм           | 49,80 ± 0,24  | 50,02 ± 0,77    | >0,05 |
| Щільн. яд., умов. од       | 18,91 ± 1,02  | 18,36 ± 1,26    | >0,05 |
| Яд.-цитопл. співвіднош.    | 0,74 ± 0,04   | 0,76 ± 0,04     | >0,05 |

норських) НГ. Периметр "контактних" НГ був підвищеним порівняно з периметром інтактних клітин крові здорових людей, а фактор форми також перевищував відповідний показник контрольної групи, що свідчить про зміну форми "контактної" клітини за рахунок її подовження. Такі клітини набули поляризованої морфології: сформували псевдоподії на широкій поверхні, більш вузьке тіло та витончений хвіст. На зміну форми НГ в бік втрати сферичної форми (неактивних) та поляризації клітин (активних) в результаті активації вказують Wilkinson і співавт. (1990) та Mc.Carthy і співавт. (1991). Також було відзначено, що площа ядра "контактних" НГ перевищувала показник площі ядра контрольних клітин, а периметр ядерної мембрани не відрізнявся від периметру ядра інтактних НГ. Вивчення оптичної щільності ядра і цитоплазми у хворих не встановило відмін від відповідних параметрів НГ здорових. Показники ядерно-цитоплазматичного відношення "контактних" і інтактних НГ не мали відмін. Враховуючи дані ХЛ аналізу, хворі були розділені на підгрупу з низьким та високим резервним рівнем.

Проводячи обробку результатів морфологічного аналізу в підгрупі з низьким резервом (Мал.5), було виявлено перевищення показників площі та периметру як ядра, так і клітини в цілому порівняно з контрольними нейтрофілами. По оптичній щільності ядра такої різниці не встановлено, тоді як щільність цитоплазми була зниженою. Відмічене збільшення площі і периметру НГ з низькими



Мал.5 Морфометричні показники "контактних" НГ крові з високим (А) та низьким (В) резервним рівнем; 1 - площа клітини; 2 - периметр клітини; 3 - оптична щільність цитоплазми; 4 - площа ядра; 5 - периметр ядра; 6 - оптична щільність ядра; 7 - ядро-цитоплазматичне співвідношення.



Мал.6 Квантпродукуюча реакція А - інтактних НГ крові, В - "контактних" НГ крові.

потенційними можливостями свідчать про те, що дані фагоцити були не праймерними і перебували в стані, при якому відбувалося "розпластування" клітин, що супроводжувалося збільшенням розмірів клітини. Наші результати підтверджували дані Petty /1989/ та McKinney, Gallin /1990/ які вказували на збільшення площі мононуклеарних макрофагів під впливом ліпополісахаридів та інших активаторів протеїнкінази С.

В підгрупі з високим резервним рівнем було виявлено зниження показників площі і периметру клітини та площі і периметру ядра порівняно з відповідними показниками контрольних НГ. По оптичній щільності цитоплазми та ядра відмін не встановлено. Порівняльний аналіз морфометричних параметрів пірогенал-праймерних НГ та "контактних" клітин в високим резервним рівнем не виявив різниці відповідних показників. Вказані особливості НГ з високим резервом характеризують їх як праймерні клітини.

Враховуючи те, що дані ХЛ аналізу спонтанної активності перекисно-окисних процесів у "контактних" НГ були вищими за показники спонтанної квантпродукуючої реакції контрольних клітин, можна припустити, що у хворих на гнійно-септичні ускладнення ендogenous ліпополісахариди викликають активацію метаболічних процесів нейтрофілів. В обстеженій групі хворих були пацієнти з низькими показниками квантпродукуючої реакції НГ, які не змінювалися при додатковому стимулюючому подразненні. У більшості обстежених все ж відбувалося підвищення активності перекисно-окисних процесів НГ в результаті додаткового стимулюючого впливу *in vitro* частками зимозану (Мал.6). Вивчення кінетики стимульованої люмінолзалежної ХЛ "контактних" клітин встановило збільшення показників порівняно з відповідними показниками контрольних НГ, а також скорочення часу досягнення пікового значення квантпродукції. Цей факт вказує на стан праймерності НГ у хворих, викликаний контактом клітин *in vivo* з продуктами бактеріального запалення.

Аналіз індексу активації НГ хворих виявив коливання цього параметру в широкому діапазоні значень. Було встановлено, що середньостатистичне значення індексу в підгрупі обстежених, в яких стимуляційне подразнення зимозаном не викликало активації квантпродукуючої реакції (11 чоловік), було нижчим за індекс активації НГ контрольної групи. Це зниження було наслідком незначної різниці між показниками стимульованої та спонтанної

ХЛ активності: в одному випадку це були дуже низькі значення квантпродукуючої реакції, в іншому - високі. У таких пацієнтів низький індекс активації свідчив про виснаження клітин неспецифічного захисту. Аналіз індексу активації в підгрупі хворих, у яких стимуляційне подразнення *in vitro* зимованом викликало підвищення квантпродукуючої реакції (34 чоловіки), відмін від індексу активації пірогенал-праймерних НГ не встановив.

**Вплив антагоністу кальцію на морфо-функціональний стан НГ крові.** В результаті модифікації НГ крові антагоністом кальцію - ізоптином спостерігалось двократне зменшення площі клітин, зменшення периметру цитоплазматичної мембрани та площі і периметру ядра. Зменшення площі клітини виникало переважно за рахунок зменшення площі цитоплазми, про що свідчить зростання ядерно-цитоплазматичного співвідношення. Фактор форми модифікованих ізоптином НГ не змінився порівняно з показником контрольних клітин. Оптична щільність цитоплазми нейтрофілів зменшилась, що вказує на часткову дегрануляцію клітин під час інкубації крові з ізоптином. Цей факт підтверджує дані літератури, що вказують на активації процесів дегрануляції під впливом перерозподілу йонного та катіонного складу клітини /Atkinson, Bercov, 1989; Beck-Speier et al., 1994; Borregaard et al., 1994/.

Активність спонтанної продукції активних кисневих радикалів модифікованими ізоптином НГ знижена порівняно з квантпродукуючою реакцією контрольних клітин, причому це зниження спостерігається на всьому протязі реєстрації ХЛ активності. Використання зимовану, як стимулюючого подразника, викликало підвищення оксидантної активності ізоптин-модифікованих НГ. Проте ця активність не досягала рівня стимульованої квантпродукуючої реакції контрольних клітин. Зниження спонтанної та стимульованої активності ізоптин-модифікованих НГ порівняно з контролем не впливало на індекс активації, який не відрізнявся від показнику інтактних клітин.

Вивчення кінетики спонтанної квантпродукуючої реакції модифікованих ізоптином "контактних" НГ показало, що даний антагоніст кальцію викликав зниження пікових показників ХЛ активності, тоді як активність перекисно-окисних процесів в перші 15 хвилин дослідження не відрізнялась від показників ХЛ активності не модифікованих "контактних" клітин. Попередня інкубація

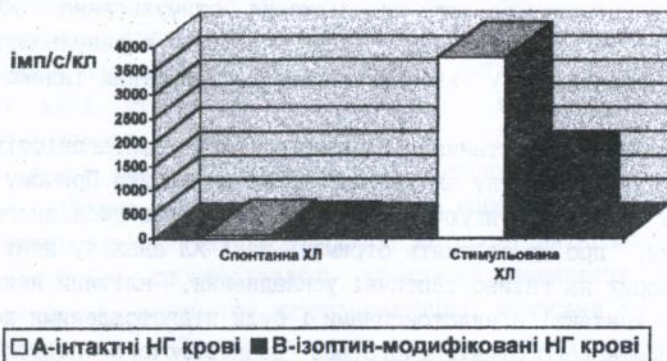
крові хворих на гнійно-септичні ускладнення з ізоптином викликала зниження стимульованої зимованом квантпродукуючої реакції на протязі всього періоду дослідження стимульованої ХЛ (Мал.7). Такі зміни функціональної активності НГ в результаті модифікації ізоптином у хворих викликали підвищення індексу активації.

Таким чином, використання фармакологічних антагоністів кальцію, знижує оксидантну активність НГ крові людини. Причому, ефективність такої деактивуючої дії залежить від висхідного стану клітини, про що свідчать отримані дані ХЛ аналізу нейтрофілів у хворих на гнійно-септичні ускладнення, клітини яких перебували у контакті з ендотоксинами і були підготовленими до сприйняття додаткового стимулюючого, або деактивуючого подразнення.

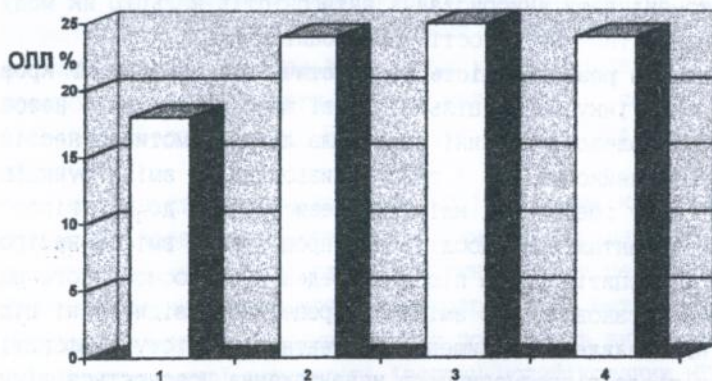
Враховуючи отримані результати дослідження, з метою обмеження руйнівної дії продуктів перекисного окислення ліпідів нейтрофілів крові на оточуючі тканини при запальних процесах, можна рекомендувати використання антагоністів кальцію як модулятора оксидантної активності гранулоцитів крові.

#### **Осмотична резистентність та еластичність мембран НГ крові**

Короткочасна інкубація цільної крові здорових людей у небалянсованому солевому розчині викликала лізис осмотично нестійкої фракції лейкоцитів, а також призводила до зміни функціонального стану збережених клітин, резистентних до дії гіпоосмотичного навантаження. Дослідження процентного вмісту нейтрофілів та лімфоцитів до та після проведення гіпоосмотичного навантаження встановило, що змінам в процентному відношенні підлягають НГ. Виявлене підвищення процентного вмісту лімфоцитів у пробах після гіпоосмотичного навантаження пояснюється лізисом нестійких у осмотичному відношенні нейтрофілів. При мікроскопічному дослідженні мазків проб після гіпоосмотичного навантаження, поруч з лімфоцитами та збереженими нейтрофільними гранулоцитами, знаходились НГ з різною мірою прояву внутрішньоклітинних дегенеративних змін (хроматиноліз, пікнов або повний розпад клітин). Аналіз отриманих результатів виявив зниження процентного вмісту резистентних НГ після проведення інкубації в середовищі з пірогеналом та після "прогріву-охолодження" (Мал.8). Дослідження осмотичної стійкості лейкоцитів крові у хворих на гнійно-септичні ускладнення встановило підвищення



Мал.7 Вплив антагоністів кальцію на квантпродукуючу реакцію НГ крові



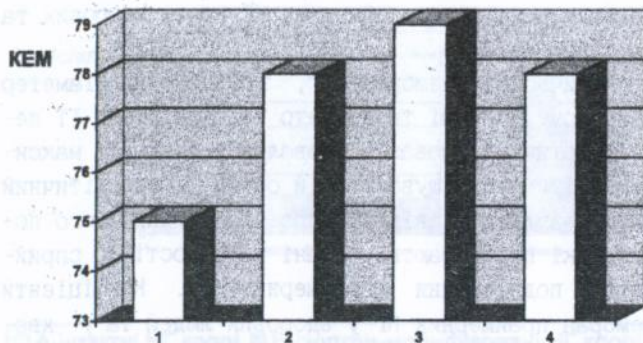
Мал.8 Процентний вміст осмотично нестійких НГ крові; 1 - інтактні НГ крові; 2 - праймерні "прогрівом-охолодженням" НГ крові; 3 - праймерні пірогаллом НГ крові; 4 - "контактні" НГ крові.

проценту нестійких клітин порівняно з показником здорових людей. Вміст осмотично нестійких праймерних НГ крові здорових та хворих людей не відрізнявся.

Показник еластичності мембран НГ, враховуючий діаметр клітини в ізотонічному розчині та діаметр клітини після її перебування в гіпоосмотичних умовах, дозволив встановити максимальну здатність клітин збільшувати свій об'єм (передлітичний стан). Отримані результати свідчать про підвищення цього показника у клітин, які перебувають у стані готовності до сприйняття додаткового подразнення (праймерних НГ). Коефіцієнти еластичності мембран праймерних НГ у здорових людей та у хворих на гнійно-септичні ускладнення не відрізнялись (Мал.9). Встановлена особливість підтверджує літературні дані /Нефедова, Кубатиев. 1991; Куничан та співавт., 1996; Gristein, Foskett, 1990; Rosengren et al., 1994/, що свідчать про взаємозв'язок форми клітини (її об'єму) та проникності мембрани, які характеризують лабільність клітинних мембран до механічної деформації і розтягу.

Таким чином, у праймерних НГ крові відбулася зміна фізико-хімічного стану мембран і як наслідок змінилась функціональна активність цих клітин, яка відобразилась на осмотичній резистентності. Визначення стійкості НГ крові до впливу гіпоосмотичного навантаження буде слугувати важливим критерієм в діагностиці бактеріальних ускладнень, та як контакт НГ крові з ендотоксинами призводить до підвищеної їх здатності до перекисного окислення ліпідів мембран, і як наслідок до підвищеної чутливості до різних дезінтегруючих факторів.

**Взаємозв'язок основних морфометричних показників та квантпроодукуючої реакції НГ крові** Встановлена значна обернена взаємозалежність між спонтанною квантпроодукуючою реакцією НГ крові та показниками площі клітини і ядра, а також периметром клітинної та ядерної мембран. Це вказує на важливість розмірів клітини і ядра для перекисно-окисних процесів інтактних нейтрофілів. Одночас, не встановлено кореляційної залежності спонтанної квантпроодукуючої реакції з оптичною щільністю цитоплазми, яка є показником концентрації азурофільних та специфічних гранул в НГ. Встановлена особливість свідчить про незалежність перекисно-окисних процесів та процесів дегрануляції в гранулоцитах, що перебувають в стані спокою (Мал.10).



Мал.9 Еластичність мембран резистентних НГ крові; 1 - інтактні НГ крові; 2 - праймерні "прогрівом-охолодженням" НГ крові; 3 - праймерні пірогеналом НГ крові; 4 - "контактні" НГ крові.



Мал.10 Взаємозалежність морфометричних показників та спонтанної квантируючої реакції НГ крові; 1 - площа клітини; 2 - периметр клітини; 3 - оптична щільність цитоплазми; 4 - площа ядра; 5 - периметр ядра; 6 - оптична щільність ядра; 7 - ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

При кореляційному аналізі морфометричних показників та функціональних особливостей праймерних НГ крові у хворих на гнійно-септичні ускладнення були встановлені інакші взаємозалежності. Так, спонтанна активність праймерних НГ у хворих проявляла обернену залежність з показниками периметру і площі клітини, тоді як зв'язок з периметром та площею ядра був мало значущим. Встановлена обернена кореляційна залежність вказує на взаємозв'язок квантпродукуючої реакції "контактних" НГ, що змінили свій функціональний стан в результаті взаємодії з продуктами бактеріального запалення, та периметру клітини. Виявлена дискоординація спонтанної активності "контактних" НГ та їх розмірів. Очевидно, що все свідчить про повноцінне функціонування клітин, що знаходяться у здавленому (нерозпластаному) стані. Відмінною особливістю "контактних" НГ було взаємовідношення між квантпродукуючою реакцією та оптичною щільністю цитоплазми. Клітини, проактивовані в організмі хворого, мали більш високі показники спонтанної ХЛ активності, яким відповідали знижені показники оптичної щільності цитоплазми, що вказувало на дегрануляцію НГ під впливом контакту *in vivo* з продуктами запалення. Встановлений факт підтверджує думку авторів /Прилуцкая, Кашкина, 1992/, які вважають, що дегрануляція НГ при запальних захворюваннях є показником прояву функціональної активності нейтрофілів периферичної крові.

"Контактні" НГ проявляли високу кореляційну залежність між рівнем стимульованої квантпродукуючої реакції та морфометричними показниками. Особливо тісна обернена залежність стимульованої ХЛ активності виявлялась із площею ядра та площею клітини, що також свідчить про дискоординацію розмірів клітини та її потенційних можливостей, а встановлений обернений взаємозв'язок стимульованої квантпродукуючої реакції та ядерно-цитоплазматичного співвідношення підкреслює важливість не стільки абсолютних значень, скільки їх співвідношення.

Наявність кореляційних зв'язків між індексом активації, що є показником резервних можливостей НГ, та морфометричними параметрами було встановлено в групі здорових обстежених та групі хворих на гнійно-септичні ускладнення. Проте, в контрольній групі виявлялась тісна обернена залежність індексу активації з площею клітини та ядра, помірною - з оптичною щільністю ядра та цитоплазми. Виявлялась також помірною обернена

взаємозалежність індексу та ядерно-цитоплазматичного співвідношення. Резервні можливості "контактних" НГ крові, що були частково вичерпані в організмі хворого, в меншій мірі проявляли взаємозв'язок з морфометричними показниками. Найбільш вираженим був взаємозв'язок індексу активації з периметром клітини та ядра, тоді як зв'язок з площею клітини та ядра був помірним. Істотною була обернена взаємозалежність між індексом активації та оптичною щільністю цитоплазми в обох групах обстежених.

### ВИСНОВКИ

1. Праймерні нейтрофільні гранулоцити крові характеризуються зменшенням площі та периметру ядра, а також клітини в цілому.

2. В процесі переведення нейтрофілів в праймерний стан виникає зниження кількості осмотично резистентних нейтрофільних гранулоцитів та підвищення еластичності мембран осмотично стійких клітин.

3. Індукована зимозаном квантпродуруюча реакція праймерних нейтрофільних гранулоцитів крові має скорочений в 1,3 рази період досягнення пікових показників порівняно з інтактними клітинами і складає  $(52,89 \pm 4,62)$  хвилини.

4. Між індексом активації нейтрофільних гранулоцитів крові, площею їх ядра та площею клітини в цілому існує тісний обернений взаємозв'язок, в зв'язку з чим показники площі можуть бути використані як побічні критерії функціонального резерву цих клітин.

5. Нейтрофільні гранулоцити у хворих з гнійно-септичними ускладненнями із збереженим високим рівнем оксидантної активності мають подібні морфометричні характеристики з нейтрофільними гранулоцитами, переведеними в праймерний стан в умовах *in vitro* і можуть розглядатися як праймерні клітини. Нейтрофільні гранулоцити з низьким резервним рівнем відрізняються збільшеними показниками площі та периметру клітини і ядра, зниженою оптич-

ною щільністю цитоплазми і мають низький індекс активації. Такі нейтрофільні гранулоцити необхідно розглядати як клітини з вичерпаним функціональним потенціалом.

6.Ефект модулюючого впливу блокатора кальцієвих каналів (ізоптину) залежить від висхідного стану нейтрофільних гранулоцитів: праймерні клітини реагують на модуляцію ізоптином з більшим ефектом.

7.Використання антагоністів кальцію з метою модифікації нейтрофільних гранулоцитів крові у хворих на гнійно-септичні ускладнення знижує генерацію кисневих радикалів і дозволяє збільшити резервні можливості цих клітин.

#### СПИСОК ДРУКОВАНИХ РОБІТ

- 1.Оценка мембранных свойств лейкоцитов крови у больных с гнойно-септическими осложнениями /Клинич.хирургия.-1993.- N 9-10.- с.45-47 (співавт.:Є.Б.Медвецький,Є.А.Хільченко)
- 2.Экспресс-метод определения фагоцитарной активности лейкоцитов крови /Информационное письмо. МЗ Украины, протокол N 3, 12.03.93 (співавт.: Є.Б.Медвецький,К.П.Тумасова)
- 3.Особенности функциональной активности лейкоцитов крови человека, подвергшихся воздействию гипотонической среды / Бюл.эксперим.биол.- 1994.- N 7.-с.93-94
- 4.Хемилуминесцентный и морфометрический анализ нейтрофильных гранулоцитов крови у больных с гнойно-септическими осложнениями / Бюл.эксперим.биол.-1994.- N 7.- с.91-92 (співавт.: Є.Б.Медвецький)
- 5.Экспресс-метод определения резерва защитных сил организма /Информационное письмо. МЗ Украины, протокол N 1, 8.06.94 (співавт.:Є.Б.Медвецький,К.П.Тумасова)
- 6."Хемилуминесцентный анализ нейтрофилов крови в коррекции лечения гнойно-септических состояний"./ III Український з'їзд гематологів і трансфузіологів. Тезиси доповідей.23-25 травня 1995 р., м.Суми,с.26-27 (співавт.:Є.Б.Медвецький)
7. Квантпродуцирующая реакция нейтрофильных гранулоцитов

крови человека и ее использование при разработке новых медицинских технологий /Деп. в ГНТБ Украины 25.07.95, N 1893 - Ук.95, 14 с. (співавт.: Є.В.Медвецький)

8. Квантпродуцирующая реакция нейтрофильных гранулоцитов крови больных с гнойно-септическими осложнениями" /Международная научная конференция, посвященная 150-летию со дня рождения И.И.Мечникова "Идеи И.И.Мечникова в развитии современного естествознания". Тезисы докладов. 28-30 ноября 1995 г., г. Харьков, с.73-74.

9. Способ управления клеточными процессами неспецифической защиты организма /Информационный бюллетень. Дополнение к журналу "Доповіді АМН України" Выпуск 1, Київ, 1995. - с.7 (співавт. Є.В.Медвецький, К.П. Тумасова)

10. Изучение функциональной активности примированных нейтрофильных гранулоцитов у гнойно-септических больных" /Клин. хирургия. -1995. -N 9-10. - с.22-23 (співавт.: Є.В.Медвецький)

11. Факторы и механизмы примирования нейтрофильных гранулоцитов крови человека /Київ, 1996. - 20 с. -Деп. в ГНТБ Украины 04.04.96, N 881 - Ук.96

12. Функциональные особенности нейтрофильных гранулоцитов крови человека /Київ, 1996. - 13 с. -Деп. в ГНТБ Украины 04.04.96, N 882 - Ук.96 (співавт.: Є.В.Медвецький, В.А.Дзев)

13. Прогнозування репаративних процесів гнійних ран / Інформаційний бюллетень. Дополнение к журналу "Доповіді АМН України, Выпуск 2, Київ, 1996. - с.11 (співавт.: П.О.Шкарбан)

#### АННОТАЦИЯ

Гиндич Лариса Александровна. Морфометрические и функциональные особенности примированных нейтрофильных гранулоцитов крови.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.11 - эмбриология, гистология и цитология. Киевский университет имени Тараса Шевченко, Киев, 1996.

Защищается 13 научных работ, которые содержат результаты изучения морфометрических и функциональных особенностей примированных нейтрофильных гранулоцитов у здоровых (доноров) и больных с гнойно-септическими осложнениями. Хемиллюминесцентный анализ примированных нейтрофильных гранулоцитов установил повышение выработки активных кислородных радикалов после стиму-

ляции клеток зимозаном. Применение антагонистов кальция продлевает жизнеспособность примированных нейтрофильных гранулоцитов за счет угнетения внутриклеточных метаболических процессов. Установлена взаимосвязь между морфометрическими параметрами и кислород-зависимой активностью примированных нейтрофильных гранулоцитов.

#### **SUMMARY**

Gindich Larisa Alexandrovna. Morphometric and functional peculiarities of priming neutrophil granulocytes of blood.

The thesis for obtaining Ph.D degree in biological sciences on speciality 03.00.11 - embriology, histology and cytology. Taras Shevchenko Kiev University, Kiev, 1996.

13 papers containing results of researchs of morphometric and functional peculiarities of priming neutrophil granulocytes of healthy (donors) and pathients with sepsis are presented for Ph.D degree. Chemiluminescent analysis of priming neutrophil granulocytes found increase of production of active oxygen radicals after stimulation of cells by zymosan. Application of antagonists of calcium prolongs life of priming neutrophil granulocytes due to inhibition of intracellular metabolic process. Correlation of morphometric parameters of priming neutrophil granulocytes with oxygen-depended activity were determed.

Ключові слова: лейкоцит, нейтрофільний гранулоцит, морфометрія, хемілюмінесценція, осмотична резистентність.

438071

AB. AB 36.223