

ЛЕЙКОЦИТАРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ ПРИ АДАПТАЦИИ К ОСТРОЙ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПОКСИИ ГОЛОВНОГО МОЗГА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ СТРЕССОУСТОЙЧИВОСТИ

Пахрова О.А.¹, Криштоп В.В.¹, Курчанинова М.Г.¹, Румянцева Т.А.²

¹ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, e-mail: chrishtop@isma.ivanovo.ru;

²ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ярославль, e-mail: rum-yar@mail.ru

Проведено исследование особенностей реакции лейкоцитов при моделировании острой гипоксии головного мозга у крыс с разной стрессоустойчивостью. В качестве модели острой тотальной гипоксии мозга в работе использована двухсторонняя перевязка обеих общих сонных артерий. Для оценки стресс-реактивности организма использовался тест «открытое поле» и рассчитывался индекс напряженности адаптации по Л.Х. Гаркави. Исследовался лейкоцитарный состав периферической крови. Наблюдалась стадийность адаптационно-компенсаторных реакций белой крови при моделировании острой тотальной гипоксии мозга у крыс. В начальной фазе (мобилизации) возникали кратковременные нейтрофильный лейкоцитоз, эозинопения и лимфопения со снижением индекса напряженности адаптации и индекса иммунореактивности. Вторая фаза (резистентности) характеризовалась активацией иммунных механизмов, что отражает восстановительные процессы в системе крови. У высокоустойчивых к стрессу животных наблюдался более низкий уровень иммунного ответа по сравнению с животными с низкой стрессоустойчивостью.

Ключевые слова: лейкоциты, острая гипоксия головного мозга, стрессоустойчивость.

CHANGES OF BLOOD LEUKOCYTE INDICES UNDER ACUTE EXPERIMENTAL CEREBRAL HYPOXIA IN RATS WITH DIFFERENT LEVELS OF STRESS RESISTANCE

Pakhrova O.A.¹, Chrishtop V.V.¹, Kurchaninova M.G.¹, Rumyantseva T.A.²

¹Ivanovo State Medical Academy, Ivanovo, e-mail: chrishtop@isma.ivanovo.ru;

²Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, e-mail: rum-yar@mail.ru

The study features leukocyte reaction in the simulation of acute cerebral hypoxia in rats with different stress resistance. Bilateral ligation of common carotid arteries was used as a model of acute cerebral hypoxia total brain. The "open field" test and calculation of the index adaptation tensions by LH Garkavi were applied for assess of stress reactivity. We investigated the leukogram of peripheral blood. Staging adaptive compensatory reactions of white blood cells were diagnosed under the simulation of total acute cerebral hypoxia in rats. In the initial phase (mobilization) short leukocytosis, lymphopenia hypoeosinophilia with a decrease of the indices of adaptation tension and immunoreactivity occurred. The second phase (resistance) characterized by the activation of immune mechanisms reflecting the recovery processes in the blood system. The high stress resistance animals experienced a lower level of immune responses compared to animals with low stress tolerance.

Keywords: white blood cells, acute brain hypoxia, resistance to stress.

Несмотря на существенные успехи в исследовании стрессовых реакций организма, специфика протекания стресс-реакции, обусловленной воздействием эндогенных факторов, изучена недостаточно. Среди таких факторов важное место в клинической практике занимают состояния, сопровождающиеся гипоксией головного мозга [1; 7]. Очевидно, что индивидуальные особенности организма, такие как генотип, соматотип, тип высшей нервной деятельности и уровень стрессоустойчивости, являются факторами, которые необходимо учитывать и при развитии невропатологии и её осложнений, и при проведении лечебно-восстановительных мероприятий [6]. Система крови, являясь одной из ключевых

гомеостатических систем организма, играет важную роль в формировании адекватных компенсаторно-приспособительных реакций организма при экстремальных воздействиях [11; 12]. Вместе с тем до настоящего времени остается во многом не изученным влияние энцефалопатии на формирование реакций системы крови при окислительной недостаточности разного происхождения и степени тяжести, хотя считается доказанным важное значение нарушения деятельности ЦНС в развитии постишемической патологии других органов и систем.

Цель исследования

Изучить особенности адаптационно-восстановительных реакций крови при моделировании острой тотальной гипоксии головного мозга у крыс в зависимости от уровня их стрессоустойчивости.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проводился на 90 крысах обоего пола (47 самцов и 43 самки), массой 180-200 граммов, линии Wistar, возрастом 3-4 месяца, содержавшихся в группах по 5 особей в стандартных условиях вивария. Опыты проводили в весенние месяцы: март - апрель. Эксперимент выполнен в соответствии с этическими принципами, установленными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.), а также в соответствии с требованиями приказов № 1179 МЗ СССР от 11.10.1983 г., № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г.

В качестве модели острой тотальной гипоксии мозга в работе использована двухсторонняя перевязка обеих общих сонных артерий [10]. Операция проводилась под кратковременным внутривенным наркозом золетилом из расчета 20-40 мг/кг массы подопытного животного, который вводили за 40 минут до начала моделирования. Перед моделированием нарушения мозгового кровообращения оценивали ориентировочно-исследовательское поведение животных с помощью теста «открытое поле»: рассчитывали интегральный индекс активности (ИА) [5] по формуле $ИА = \frac{ГА}{ЛП + ЛПц}$, где ГА - горизонтальная активность, ЛП - латентный период первого перемещения и ЛПц - латентный период выхода в центр поля. На основе показателей поведения в «открытом поле» крысы были разделены на активных и пассивных в зависимости от индивидуальных значений ИА. Активные животные прогностически более устойчивы к действию стрессорных нагрузок, пассивные обладают низкой резистентностью функций организма к стрессорным нагрузкам. Животных выводили из эксперимента на 1, 6, 8, 14, 21, 28 и 35-е сутки после операции, 19 интактных животных составили группу контроля. Мазки крови фиксировались и окрашивались азур-2-эозином по Романовскому. В мазках крови подсчитывалось

процентное содержание разных форм лейкоцитов. Для оценки реактивности организма нами рассчитывался индекс напряженности адаптации по Л.Х. Гаркави [2], индекс иммунореактивности по Д.О. Иванову [4], а также ядерный индекс сдвига. Статистическая обработка проводилась с помощью пакета программ Statistic for Windows 6.0. Для оценки достоверности различий между группами использован t-критерий Стьюдента ($p < 0,05$).

Результаты исследования и их обсуждение

При проведении исследования клеточных показателей «белой крови» было выявлено достоверно более высокое содержание палочко- и сегментоядерных нейтрофилов в крови у контрольных крыс с низким уровнем стрессоустойчивости (НУС) по сравнению с животными, обладающими высоким уровнем стрессоустойчивости (ВУС), примерно в 1,5 раза ($p < 0,02$) (рис. 1).

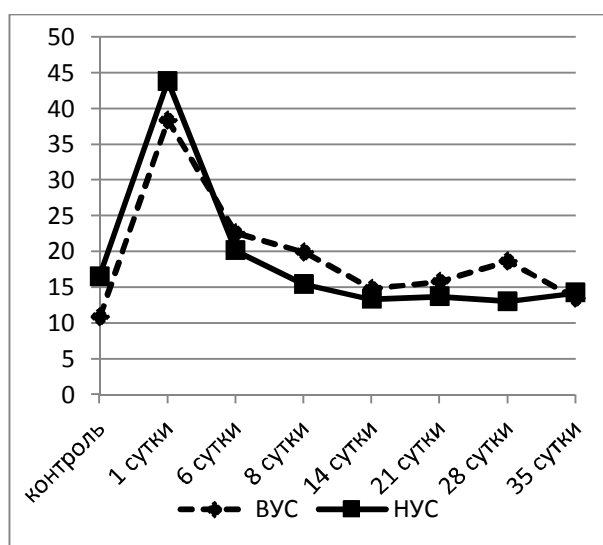


Рис. 1. Динамика процентного содержания сегментоядерных нейтрофилов в крови у крыс с разной стрессоустойчивостью. (ВУС - высокий уровень стрессоустойчивости, НУС - низкий уровень стрессоустойчивости)

На 1-е сутки после операции наблюдался значительный рост доли нейтрофилов в крови как у животных с ВУС - на 250% ($p < 0,001$), так и у группы животных с НУС - на 175% ($p < 0,002$). Нейтрофильный лейкоцитоз возникает в результате выброса неспособных к делению гранулоцитов из различных депо, главным образом из костного мозга. Эта «срочная помощь» увеличивает защитные свойства крови. К 6-му дню после операции отмечалось резкое снижение количества нейтрофилов в крови. В дальнейшем (8-21-е сутки эксперимента) содержание нейтрофилов в обеих группах продолжало снижаться, при этом у крыс с НУС процент палочко- и сегментоядерных нейтрофилов приближался к контрольным значениям, в то время как у группы животных с ВУС доля нейтрофилов оставалась достоверно выше (в 2 раза, $p < 0,02$), чем в контрольной группе, до 28-го дня эксперимента. К

окончанию наблюдения (35-е сутки после моделирования гипоксии мозга) содержание сегментоядерных нейтрофилов в исследуемых группах крыс было в пределах исходных значений, однако доля палочкоядерных нейтрофилов у животных с НУС достигала значений достоверно ниже контрольных ($1,8 \pm 0,12\%$ при $3,63 \pm 0,21\%$ в контроле, $p < 0,05$). Ядерный индекс сдвига (ЯИС) имел обратную тенденцию - на 1-6-е сутки эксперимента он снижался в обеих группах примерно в 1,5 раза ($p < 0,05$). В группе животных с ВУС к 14-му дню он достигал контрольных значений и до конца срока эксперимента оставался в пределах нормы. У крыс с НУС ЯИС начиная с 6-х суток повышался, достигая максимальных значений к 21-му дню эксперимента ($0,32 \pm 0,03$ при $0,22 \pm 0,02$ в контроле, $p < 0,05$), а в более поздние сроки (28-35-е сутки) резко снижался и к 35-му дню был в 2 раза ниже - $0,11 \pm 0,02$, чем в контроле ($p < 0,02$).

Достоверных отличий в содержании эозинофилов у контрольных животных обнаружено не было (рис. 2а).

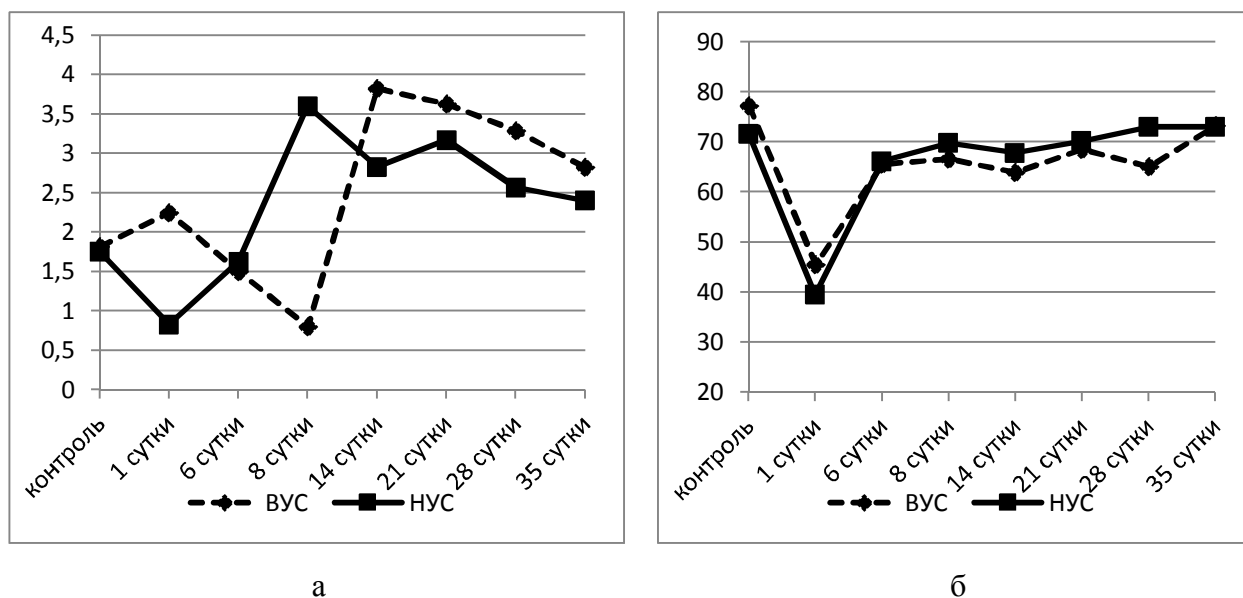


Рис. 2. Динамика процентного содержания эозинофилов (а) и лимфоцитов (б) в крови у крыс с разной стрессоустойчивостью

У крыс с НУС в 1-е сутки после операции отмечалось снижение содержания эозинофилов с $1,75 \pm 0,18\%$ до $0,83 \pm 0,12\%$ ($p < 0,005$). У животных с ВУС снижение содержания эозинофилов в крови наблюдалось позже - на 8-е сутки эксперимента ($0,80 \pm 0,09\%$ при $1,82 \pm 0,11\%$ в контроле, $p < 0,05$). Уменьшение числа эозинофилов обусловлено тем, что они уходят из крови в соединительную ткань, где принимают активное участие в осуществлении функции макрофагов. Затем этот показатель резко повышался, достигая максимальных значений к 8-му дню наблюдения у группы НУС животных ($3,60 \pm 0,16\%$, $p < 0,05$), а у крыс с ВУС их концентрация к 14-му дню превышала исходные

значения более чем в 2 раза - $3,83 \pm 0,15\%$ ($p < 0,05$). Начиная с 21-х суток в обеих группах количество эозинофилов не отличалось от контрольных значений.

Динамика содержания лимфоцитов в крови после двусторонней перевязки обеих сонных артерий была противоположна изменениям концентрации сегментоядерных нейтрофилов: контрольные значения у животных с ВУС были значительно выше ($76,45 \pm 1,43\%$), чем у крыс с НУС ($71,63 \pm 1,45\%$; $p < 0,05$) (рис. 2б). Уже через сутки после операции доля лимфоцитов в крови существенно снижалась: у животных с ВУС на 41% ($p < 0,002$), у крыс с НУС - на 45% ($p < 0,001$). Лимфопения может быть обусловлена распадом или миграцией лимфоидных клеток. К 6-м суткам эксперимента отмечалось повышение количества лимфоцитов в крови в обеих исследуемых группах. При этом у НУС крыс процент лимфоцитов приближался к контрольным значениям, в то время как у ВУС животных доля нейтрофилов до 28-го дня после моделирования гипоксии мозга оставалась достоверно ниже (на 14%, $p < 0,05$), чем в контрольной группе, и только к окончанию наблюдения (35-е сутки) содержание лимфоцитов возвращалось к исходным значениям.

Достоверных отличий процентного содержания моноцитов в крови у крыс с разной стрессоустойчивостью в контрольных группах обнаружено не было ($7,73 \pm 0,25\%$ - у ВУС крысы, $6,13 \pm 0,18\%$ - у НУС, $p > 0,05$). Существенных изменений этого показателя в первую неделю после операции не выявлено. На 14-е сутки эксперимента доля моноцитов в крови значительно повышалась: до $13,67 \pm 0,44\%$ у ВУС животных, до $12,17 \pm 0,35\%$ - у НУС, что значительно превышает показатели в контроле ($p < 0,02$). В дальнейшем (21-35-е сутки) концентрация моноцитов у всех животных была в пределах нормы.

Известно, что лейкоцитарная формула является интегральным показателем баланса всех гомеостатических систем организма. Причиной лейкоцитарных перестроек часто является общая мобилизация защитных механизмов организма, поэтому она с успехом используется для оценки неспецифической реакции адаптации [9]. Адаптационный показатель мы определяли методом, разработанным Л.Х. Гаркави с соавт. (1990), путем расчета индекса напряженности адаптации (ИНА), отражающего отношение числа лимфоцитов к числу сегментоядерных нейтрофилов в лейкоцитарной формуле [2]. Для оценки изменений использовали диапазоны нормы адаптационного показателя, определенные для основных видов лабораторных животных [8]. Согласно этим исследованиям, критическое предстрессовое значение показателя адаптации (ИНА) для белых крыс равно 1,6. При анализе динамики ИНА выявлено, что исходные значения его у животных с активным типом поведения были значительно выше таковых у пассивных крыс ($7,64 \pm 0,21$ при $4,61 \pm 0,14$, $p < 0,002$) (рис. 3а).

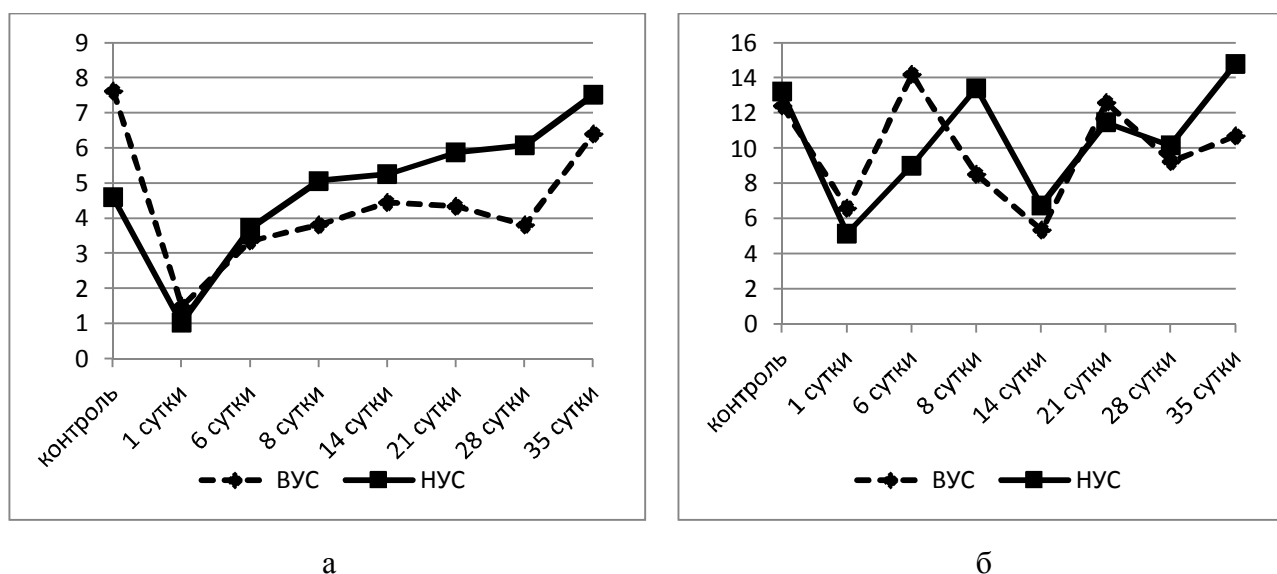


Рис. 3. Динамика индекса напряженности адаптации (а) и индекса иммунореактивности (б) у крыс с разной стрессоустойчивостью

Через 1 сутки после операции отмечалось напряжение механизмов, формирующих адапционный ответ. Это проявилось значительным (в среднем на 80% от контрольных значений) снижением индекса по Гаркави в обеих группах ($1,48 \pm 0,28$ - у животных с ВУС, $1,02 \pm 0,21$ - у НУС крыс, $p < 0,001$), что свидетельствовало о развитии стресс-реакции. Далее ИНА повышался, при этом у крыс с НУС уже к 6 суткам после операции он достигал исходных значений, а начиная с 14 суток ИНА достоверно повышался, достигая к 35 суткам $7,52 \pm 0,19$, что превышает показатель контрольной группы на 65% ($p < 0,05$). У животных с ВУС этот показатель имел сходную динамику, однако восстановление было более длительным и наступало лишь к концу наблюдения (35-е сутки). Следовательно, развитие реакций адаптации в обеих группах идет по единым принципам с наиболее выраженными изменениями в лейкоцитарной формуле в период срочной адаптации у животных с исходно низким уровнем стрессоустойчивости. При включении механизмов долгосрочной адаптации происходит «нормализация» показателей лейкоцитарной формулы у животных с ВУС, при этом животные с НУС переходят на качественно новый функциональный уровень, что отражается более высокими по сравнению с исходными значениями ИНА, начиная с 14 суток после операции. Сопоставление результатов анализа данных индекса по Л.Х. Гаркави позволяет сделать вывод: в первые несколько суток после моделирования острой тотальной гипоксии головного мозга разворачиваются основные реакции повреждения и защиты, причем наиболее нестабильное состояние приходится на первые сутки после операции. Последующие изменения лейкоцитарной формулы свидетельствуют как об уменьшении со

временем степени «стрессогенного» воздействия гипоксии головного мозга, так и об адаптации организма к данному состоянию.

Кроме того, нами определялся индекс иммунореактивности (ИИР), предложенный Д.О. Ивановым с соавторами (2002) [4], который показывает отношение относительного содержания лимфоцитов и эозинофилов в крови к числу моноцитов, что отражает баланс лимфокинов и монокинов. Этот индекс может быть использован для контроля за состоянием иммунной системы в условиях острой гипоксии мозга. Мы не обнаружили достоверных различий исходных значений этого индекса в группах крыс с разной стрессоустойчивостью (рис. 3б). В раннем периоде после воздействия (1 сутки) отмечалось падение ИИР, более выраженное в группе НУС крыс (с $13,23 \pm 1,13$ до $5,16 \pm 1,03$ - у НУС крыс, с $12,44 \pm 1,29$ до $6,58 \pm 1,23$ у ВУС животных, $p < 0,002$). Падение ИИР связано со снижением относительного содержания лимфоцитов, которое у животных с НУС сочеталось с дефицитом эозинофилов. Это свидетельствует о недостатке блокаторов воспаления, следовательно, дезинтоксикационного компонента в спектре медиаторов, и означает неблагоприятную динамику иммунных реакций, в отличие от ВУС крыс. На 6-е сутки у животных с ВУС и на 8-е сутки у НУС крыс этот показатель приближается к контрольным значениям, однако на 14-й день эксперимента происходит вторичное падение ИИР в обеих группах. Это связано с достоверным ростом числа моноцитов в крови и позволяет предположить рост монокиновых эффектов, способствующих в том числе ангиогенезу и пролиферации фибробластов и эндотелия (HВ-EGF, TGF-а и HGF) [3].

Заключение

Таким образом, в первые сутки возникает начальная фаза (мобилизации), которая характеризуется возникновением преходящего нейтрофильного лейкоцитоза, эозинопении и временной лимфопении, снижением индекса напряженности адаптации и индекса иммунореактивности. Вторая фаза (резистентности), наступающая в более поздние сроки (через 6 суток) в виде активации иммунных механизмов, является специализированной реакцией, создающей повышенную резистентность к гипоксии, и реализуется с участием гормонов. В целом нужно отметить, что у низкоустойчивых к стрессу животных иммунный ответ на гипоксию мозга был более выраженный по сравнению с животными, высокоустойчивыми к стрессу.

Список литературы

1. Антипенко Е.А., Трошин В.В., Дерюгина А.В., Густов А.В. Неспецифическая резистентность организма при хронической ишемии головного мозга // Медицинский

альманах. - 2011. - № 1 (14). - С. 60-62.

2. Гаркави Л.Х. Адаптационные реакции и резистентность организма / Л.Х. Гаркави, Е.Б. Квакина, М.А. Уколова. – Ростов н/Д : Изд-во Ростовского университета, 1990. – 224 с.
3. Жибурт Е.Б. Цитокины в кроветворении, иммуногенезе и воспалении / Е.Б. Жибурт, Н.Б. Серебряная, И.В. Каткова, В.В. Дьякова // Терра Медика Нова. - 1996. - № 3. - С. 10-19.
4. Иванов Д.О. Лейкоцитарные индексы клеточной реактивности как показатель наличия гипо- и гиперэргического вариантов неонатального сепсиса / Д.О. Иванов, Н.П. Шабалов, Н.Н. Шабалова [и др.] // Опыт лечения детей в многопрофильной детской больнице : сб. - СПб., 2002. - С. 22-28.
5. Коплик Е.В. Метод определения критерия устойчивости крыс к эмоциональному стрессу // Вестник новых медицинских технологий. - 2002. – Т. IX, № 1. – С. 16-18.
6. Криштоп В.В., Румянцева Т.А., Пахрова О.А. Влияние состояния высшей нервной деятельности и пола на выживаемость при моделировании тотальной гипоксии головного мозга у крыс // Современные проблемы науки и образования. -2015. - № 5.; URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=22431>.
7. Маслюкова А.В. Биохимические маркеры перенесенного острого нарушения мозгового кровообращения / А.В. Маслюкова, И.К. Томилова, Е.А. Баклушина // Вестник Ивановской медицинской академии. - 2015. - Т. 20, № 1. - С. 37-44.
8. Мулик А.Б. Уровень общей неспецифической реактивности организма: разработка, оценка, практическое применение. – Волгоград : Изд-во Волгоградского гос. ун-та, 2001. - 144 с.
9. Охтова Ф.Р. Ишемический инсульт и показатели клеточного и гуморального иммунитета (клинико-иммунологическое исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук (14.01.11). – М., 2014. - 25 с.
10. Шулятникова Т.В. Ультраструктурные особенности микроциркуляторного русла в критических зонах ишемии головного мозга в эксперименте // Патология. – 2010. – № 2. – С. 32–34.
11. Юшков Б.Г. Система крови и адаптация организма к экстремальным воздействиям // Вестник РАМН. - 2006. - № 3. - С. 3-5.
12. Semenza G.L. Involvement of oxygen-sensing pathways in physiologic and pathologic erythropoiesis // Blood. - 2009. - Vol. 114, № 10. - P. 2015-2019.