

ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО СОСТАВА КРОВИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХОЛОДОВОМ ВОЗДЕЙСТВИИ

Гармаева Д.К.¹, Аржакова Л.И.¹, Дмитриева Т.И.², Павлова Н.И.^{2,3}, Гармаев Ц.К.¹

¹ФГАОУ ВО «Северо-Восточный федеральный университет имени М.К. Аммосова», Якутск, e-mail: dari66@mail.ru;

²ФГБОУ ВО «Якутская государственная сельскохозяйственная академия», Якутск, e-mail: dark_dell@mail.ru;

³ФГБНУ «Якутский научный центр комплексных медицинских проблем», Якутск

Данная статья содержит результаты исследований, проведенных на беспородных крысах, помещенных в холодильную камеру при температуре -20 °С с соблюдением адекватных условий влажности и вентиляции. Экспозицию животных проводили в течение 60 минут ежедневно 7, 14, 21, 30 суток. Результаты показали, что иммунокомпетентные клетки периферической крови под влиянием холодого воздействия меняют свою активность. Установлено, что реакции неспецифического иммунного ответа, обеспечиваемые моноцитами и нейтрофилами, снижаются. Однако на 14-е сутки отмечается повышение их количества, что, возможно, связано с кратковременной стимуляцией лейкоцитопоэза. Активность клеток специфического иммунного ответа – лимфоцитов остается повышенной у всех групп животных, максимально увеличиваясь на 7-е и 30-е сутки эксперимента. Также показано, что холодое воздействие сопровождается снижением количества тромбоцитов, что рассматривается нами как их целесообразная реакция на действие холода. Гипотермия животных активизирует процессы эритропоэза и, соответственно, приводит к повышенным показателям гематокритного числа. Эти изменения клеточного состава форменных элементов крови проявляются в особенностях реакции эритроцитов, тромбоцитов и лейкоцитов при холодоем воздействии на животных, закономерны и подтверждаются в данном исследовании.

Ключевые слова: клетки крови, специфический и неспецифический иммунный ответ, холодое воздействие.

INDICATORS OF CELLULAR COMPOSITION AT EXPERIMENTAL COLD EFFECTS

Garmaeva D.K.¹, Arzhakova L.I.¹, Dmitrieva T.I.², Pavlova N.I.^{2,3}, Garmaev Z.K.¹

¹FGAOU VO "North-Eastern Federal University named after M.K. Ammosov", Yakutsk, e-mail: dari66@mail.ru;

²FGBOU VO "Yakut State Agricultural Academy", Yakutsk, e-mail: dark_dell@mail.ru;

³Yakut Scientific Center for Complex Medical Problems, Yakutsk

This article contains the results of studies conducted on non-native rats placed in a cold store at -20 °C with adequate humidity and ventilation conditions. The animals were exposed for 60 minutes every day for 7, 14, 21, 30 days. The results showed that immunocompetent cells of peripheral blood under the influence of cold factor change their activity. It was found that the responses of the nonspecific immune response provided by monocytes and neutrophils are reduced. However, on the 14th day there was an increase in their number, which may be due to a short-term stimulation of leukocytopoiesis. Whereas, the activity of cells of a specific immune response - lymphocytes remained elevated in all groups of animals, maximally increasing on the 7th and 30th days of the experiment. It is also shown that the cold effect is accompanied by a decrease in the number of platelets, which is their reasonable response to the effects of cold. Hypothermia of animals is also a factor that activates the processes of erythropoiesis, and, accordingly, leads to increased indices of the hematocrit number. These changes in cellular composition, which are expressed in the features of the reaction from erythrocytes, platelets and leukocytes of animals with cold exposure are natural and confirmed in this study.

Keywords: blood cells, specific and nonspecific immune response, cold exposure.

В связи с усиленными темпами освоения Крайнего Севера в настоящее время вопрос адаптации организма человека к жизни в северных широтах, где он подвергается воздействию низких природных температур, вновь становится актуальным [1; 2].

Известно, что на негативное воздействие различных факторов окружающей природной среды организм человека отвечает мобилизацией адаптационных механизмов регуляции функционирования систем, в том числе и системы крови, что может проявляться

изменением её клеточного состава [3; 4]. В осуществлении защитной реакции организма большую роль играют лейкоциты, которые обеспечивают неспецифический и специфический клеточный иммунитет организма и отвечают на воздействия любых стресс-факторов. При длительном или чрезвычайно сильном воздействии неблагоприятных факторов происходят изменения иммунологической реактивности, приводящие к снижению адаптационных возможностей организма, к развитию транзиторных или стойких форм вторичной иммунной недостаточности [5].

Дисбаланс иммунной системы оказывает влияние на формирование, характер течения и исходы многих патологических процессов. Наиболее высокие уровни заболеваемости в условиях Крайнего Севера приходится на болезни органов дыхания, нервной системы, органов чувств и системы кровообращения [1; 6; 7].

Таким образом, актуальность исследования механизмов адаптации системы крови и реакций иммунных органов на холодовое воздействие продиктована необходимостью поиска путей повышения сопротивляемости организма к низким температурам, разработки мер профилактики и коррекции нарушений иммунного ответа организма людей, постоянно и временно проживающих в условиях Заполярья, в том числе и Республики Саха (Якутия). Эта медико-социальная проблема требует глубокой и всесторонней проработки, прежде всего, на теоретическом уровне.

Данное исследование является частью комплексной работы, связанной с изучением механизмов дезадаптации в условиях Арктики и Субарктики. Данная работа проводится с учетом приоритетных направлений научной платформы «Иммунология» государственной программы «Стратегия развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года».

Целью исследования является изучение изменений клеточного состава крови крыс в зависимости от времени их экспозиции в условиях холодового воздействия.

Материалы и методы исследования. Исследование проводили на 40 беспородных крысах-самцах массой тела 200-300 г. Выбор пола животных был продиктован необходимостью получения стабильных результатов, исключая влияние циклических изменений, характерных для организма самок. Методом случайной выборки животные были распределены на контрольную группу и опытную, разделенную на 4 подгруппы по 8 особей в каждой. Животные находились в стандартных условиях вивария, соответствующих требованиям санитарно-эпидемиологических правил СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (2014). Экспозицию опытных крыс производили в холодильных камерах при температуре -20°C с соблюдением адекватных

условий влажности и вентиляции в течение 60 минут ежедневно на протяжении 30 суток.

Протокол экспериментальной части исследований, использованный на этапах содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из опыта, соответствовал принципам биологической этики, изложенным в Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985); Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целей (Страсбург, 1986); Приказе МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных»; Приказе МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» [8].

Исследования проводили сразу после получения проб крови на 7-е (1-я подгруппа), 14-е (2-я подгруппа), 21-е (3-я подгруппа), 30-е сутки (4-я подгруппа) после начала эксперимента. Животных выводили из опыта методом декапитации с соблюдением требований гуманности, согласно Приложению № 4 «О порядке проведения эвтаназии (умерщвления) животного» к Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приложение к Приказу МЗ СССР № 755 от 12.08.1977). Кровь получали во время декапитации животного. Гематологические исследования проводили на автоматизированном гематологическом анализаторе AbacusJunior 30, биохимические исследования сыворотки крови – на биохимическом анализаторе Mindray BA-88A с применением растворов HigtTechnology.

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета программ Statistica 6.0. После проверки вариационных рядов на правильность распределения значимость различий между ними определяли параметрическим методом с расчётом средней арифметической, ошибки средней арифметической ($M \pm m$) и t-критерия Стьюдента. Различие считали значимым при $p < 0,05$.

Работа выполнена в Медицинском институте СВФУ им. М.К. Аммосова, исследование крови и сывороток крови выполнено в научно-исследовательской клинко-диагностической лаборатории для сельскохозяйственных и домашних животных Якутской ГСХА.

Результаты исследования и их обсуждение. В результате проведенных исследований установлены показатели периферической крови контрольных и опытных групп животных до и после воздействия холода. Показатели контрольной группы животных, содержащихся в оптимальных условиях температуры, соответствуют физиологической норме [8], в то время как результаты, полученные у крыс, подвергавшихся холодovому воздействию, свидетельствуют об изменениях количественного состава всех форменных

элементов периферической крови в разные сроки эксперимента (табл.).

Динамика показателей периферической крови крыс, подвергнутых холодовому воздействию

Показатели, ед. изм.	Контрольная группа (n = 8)	Опытные подгруппы (n = 32)			
		7-е сутки (n = 8)	14-е сутки (n = 8)	21-е сутки (n = 8)	30-е сутки (n = 8)
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	14,50±1,32	9,36±2,47	15,96±2,49	6,91±1,24*	6,99±0,62*
Лимфоциты, %	57,87±1,26	78,57±2,74*	72,97±2,60*	60,37±,15	79,75±2,15*
МID, %	14,4±1,98	11,52±1,18	15,01±0,61	7,88±1,44*	4,91±1,44*
Гранулоциты, %	25,91±2,05	9,9±2,24*	13,92±2,61*	25,97±4,1	13,83±0,75*
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	7,59±1,17	6,98±0,38	7,2±0,65	8,09±1,09	5,97±1,29
Гемоглобин, г/л	127,75±1,93	127,75±6,87	132,62±10,83	140,12±14,82	120,5±13,77
Гематокрит, %	43,29±0,72	41,73±2,40	40,33±3,67	58,24±5,99*	46,14±6,8
MCV, фл	57,25±0,52	59,62±0,69	57,62±0,66	66,1±0,56*	66,07±1,05
MCH, пг	17,41±0,22	18,32±0,21*	17,86±0,25	15,47±0,23*	17,61±0,15
MCHC, г/л	310,87±4,6	306,62±3,33	305,87±3,88	233,25±3,03*	262,62±3,58*
RDWc, %	18,18±0,28	17,3±0,34	17,61±0,32	16,03±0,33*	15,21±0,46*
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	931,7±36,27	860,87±56,4	885,62±76,79	354,62±119,09*	483,75±111,02

Примечание: n - число наблюдений; * – статистически значимое отличие от данных контрольной группы ($p < 0,05$).

Результаты исследования свидетельствуют о том, что холодовое воздействие оказывает влияние на количество клеток, обеспечивающих реакции неспецифического и специфического иммунного ответа. Уже на 7-е сутки эксперимента наблюдается тенденция снижения общего количества лейкоцитов крови (на 35,5%), которое переходит в значимое на 21-е и 30-е сутки (на 52,3% и 51,8% соответственно), несмотря на то что на 14-е сутки отмечается незначительное повышение числа клеток (на 10,1%) по сравнению с данными контрольной группы (табл., рис. 1).

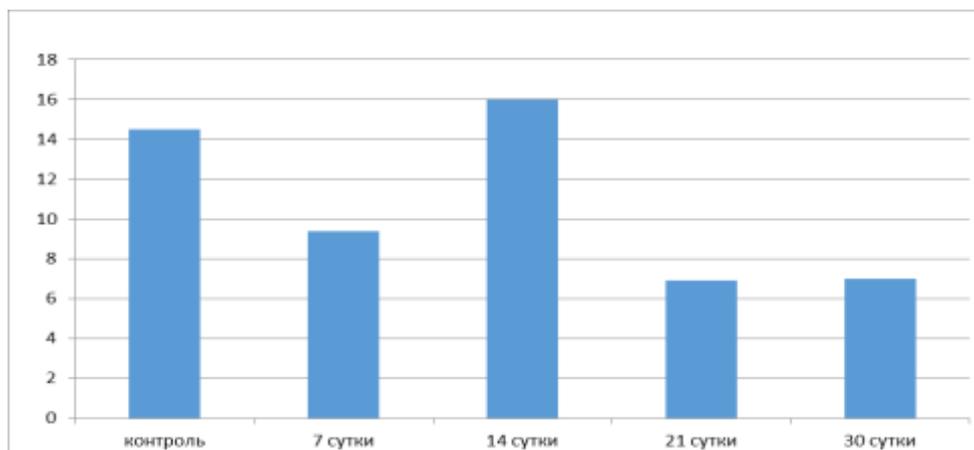


Рис. 1. Общее количество лейкоцитов ($\times 10^9/\text{л}$) у опытных животных в сравнении с контрольной группой в разные сроки эксперимента

В то же время количество лимфоцитов остается повышенным в течение всего эксперимента, статистически значимо возрастая на 7, 14 и 30-е сутки (на 35,7, 26,1 и 37,8% соответственно) (рис. 2).

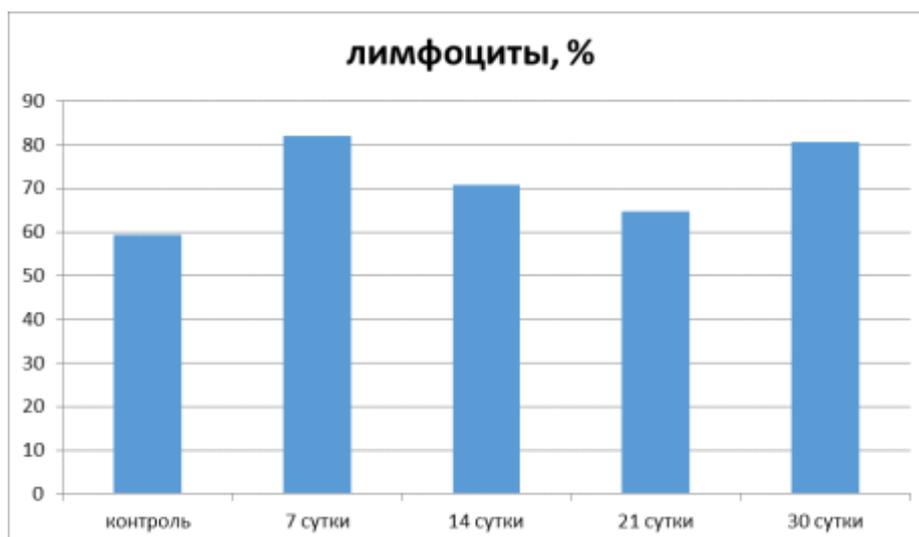


Рис. 2. Изменения относительного количества лимфоцитов в разные сроки эксперимента в сравнении с контрольной группой

MID – показатель, отражающий содержание смеси моноцитов, эозинофилов, базофилов и незрелых клеток, достоверно снижается на 21-е сутки на 45,3%; на 30-е сутки – на 65,9% по сравнению с контрольной группой. Количество гранулоцитов (эозинофилов, нейтрофилов и базофилов) статистически значимо снижается на 7, 14 и 30-е сутки (на 61,8, 46,3 и 46,6% соответственно), а на 21-е сутки эксперимента соответствует контрольной величине (рис. 3).

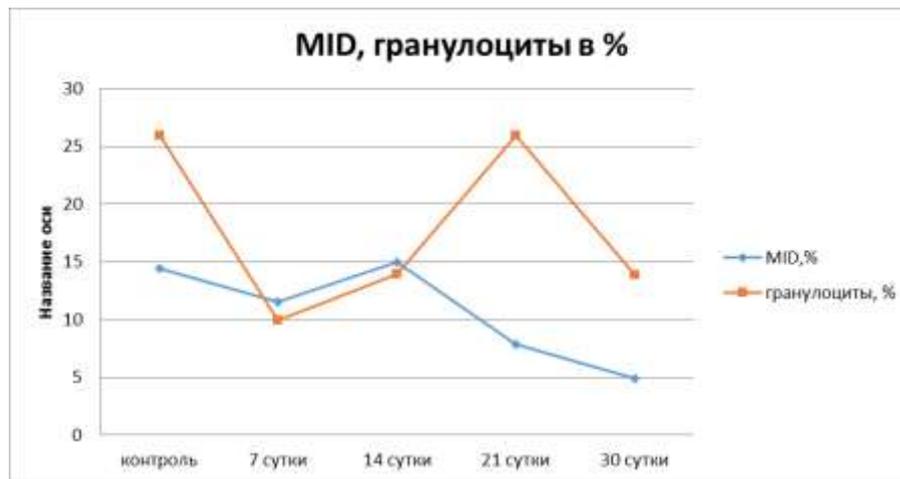


Рис. 3. Динамика изменений относительных показателей MID и гранулоцитов в разные сроки эксперимента по сравнению с контрольной группой

Значительное снижение общего количества лейкоцитов как на 7-е, так и на 21-е и 30-е сутки эксперимента свидетельствует о том, что холодовое воздействие действительно является стрессовым фактором для теплокровных животных. Это соответствует результатам, полученным Е.Г. Костоломовой, согласно которым популяции изолированных иммунокомпетентных клеток (ИКК) по-разному реагируют на длительность холодовой экспозиции [9]. Кратковременное охлаждение является фактором, активирующим функциональную активность моноцитов и нейтрофилов, а длительное - угнетающим. В исследованиях В.М. Николаева также отмечалось, что при адаптации крыс к гипотермии изменяются показатели неспецифического клеточного иммунитета, связанные с фагоцитарной активностью лейкоцитов [10]. Статистически значимое уменьшение среднего числа поглощённых частиц лейкоцитами как в первой, так и во второй группах экспериментальных животных свидетельствует об угнетении неспецифического клеточного иммунитета при воздействии отрицательных температур. Будем полагать, что в нашем эксперименте экспозиция крыс в условиях низкой температуры в течение от 7 до 30 суток, сопровождавшаяся подавлением активности лейкоцитов, являлась достаточно длительной. Однако увеличение числа лейкоцитов на 14-е сутки (на 10,1% по отношению к контролю и на 45,6% относительно показателя на 7-е сутки) связано с кратковременной стимуляцией лейкоцитопозеза. В экспериментальных работах И.И. Шахматова на крысах-самцах линии Вистар, подвергнутых комбинированному (холодовому) плаванию в воде при температуре +7 °С, показано повышение количества лейкоцитов преимущественно за счет резкого нарастания гранулоцитов. Авторы утверждают, что в результате действия холодового фактора стимулируется специфический иммунный ответ, а реакции неспецифического ответа, опосредованные лейкоцитами, – подавляются [11].

Обращает на себя внимание существенное снижение количества тромбоцитов в периферической крови после воздействия холода на организм. Так, на 21-е сутки эксперимента отмечалось статистически значимое снижение количества тромбоцитов до $354,62 \pm 119,09$ ($\times 10^9/\text{л}$) по сравнению с контрольными показателями. Значительное снижение тромбоцитов отмечалось и на 30-е сутки эксперимента. Наблюдаемые нами изменения в гематологическом статусе данных животных согласуются с литературными данными, в которых описано уменьшение числа тромбоцитов, как реакция на стресс. Уменьшение количества тромбоцитов при чрезмерном холодовом воздействии объясняется непосредственным участием их в воспалительных и репаративных процессах. При тяжелом холодовом повреждении тканей происходит превалирование их потребления над продукцией, что приводит к снижению количества кровяных пластинок и появлению незрелых молодых форм с низким ферментативным и медиаторным потенциалом, что, в свою очередь, реализуется в снижении их адгезивно-агрегационной способности [12].

Повышение гематокрита, эритроцитов – одна из количественных характеристик физиологической «подстройки» организма к новым условиям жизни. Повышенный гематокрит и одновременное усиление синтеза эритропоэтина, стимулирующего созревание эритроцитов, может быть одним из признаков реакции на стресс, в нашем случае на холодовой [3].

Заключение. Таким образом, холодовое воздействие является стрессом, выражающимся в реакции со стороны всего клеточного состава крови. В результате действия холодового фактора стимулируется специфический иммунный ответ, на что указывает увеличение в крови количества лимфоцитов, а реакции неспецифического ответа, опосредованные другими видами лейкоцитами, – подавляются. Уменьшение количества тромбоцитов также представляется как целесообразная реакция организма в ответ на холодовое воздействие, так как тромбоциты принимают непосредственное участие в репаративных процессах, наблюдающихся при повреждении ткани холодом. Повышенный показатель гематокрита свидетельствует об увеличении доли форменных элементов крови относительно плазмы и является достоверным критерием ответной реакции на стресс.

Дальнейшие исследования коснутся изучения процессов пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток органов и тканей лимфоидного комплекса (селезенка, тимус, лимфатические узлы, МАЛТ полых органов) при холодовой нагрузке.

Список литературы

1. Петрова П.Г., Борисова Н.В., Платонов Ф.А., Туркебаева Л.К. Роль экспедиционных

исследований в изучении здоровья населения Арктики // Вестник Северо- Восточного федерального университета имени М.К. Аммосова: Серия «Медицинские науки». 2017. № 2 (07). С. 28-35.

2. Среда обитания и здоровье человека на Севере: Эколого-медицинский аспект / Под ред. Д.Д. Саввинова, П.Г. Петровой. Новосибирск: Наука, 2005. 290 с.

3. Вычужанова Е.А. Влияние хронического стресса на острую стресс-реакцию у крыс // Наука и образование: проблемы, идеи, инновации: 2015. № 1. С. 9-11.

4. Сапин М.Р., Никитюк Д.Б. Иммунная система, стресс и иммунодефицит. М.: АПП «Джангар», 2000. 184 с.

5. Гольдерова А.С., Захарова Ф.А., Алексеев С.Н. Особенности неспецифической адаптивной реакции у больных с острой холодовой травмой // Якутский медицинский журнал. 2009. № 1(25). С. 7-9.

6. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. М.: Изд-во ВНИРО, 1995. 219 с.

7. Человек на Севере: системные механизмы адаптации: сб. тр., посвященный 20 –летию НИЦ «Арктика» ДВО РАН, в 2-х томах Том 2 / Под общей редакцией засл. деятеля науки, д.м.н., проф. А.Л. Максимова. Магадан: СВНЦ ДВО РАН, 2011. 162 с.

8. Абрашова Т.В., Гущин Я.А., Ковалева М.А., Рыбакова А.В., Селезнева А.И., Соколова А.П., Ходько С.В. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб.: «ЛЕМА». 2013. 116 с.

9. Костоломова Е.Г. Сопряженность иммунофизиологических реакций макроорганизма и изолированных иммунокомпетентных клеток при различных режимах криовоздействия: автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2011. 171 с.

10. Николаев В.М. Изменения прооксидантно-антиоксидантного равновесия в ответных эколого-биохимических реакциях организма животных и человека на действие холода: автореф.дисс. ... канд.биол.наук. Якутск, 2007. 22 с.

11. Шахматов И.И. Влияние однократной иммобилизации различной интенсивности на реакции системы гемостаза // Бюлл. СО РАМН. 2011. Т. 31, №4. С. 33-36.

12. Шаповалов К.Г., Михайличенко М.И., Сизоненко В.А. Функциональное состояние тромбоцитов при местных холодовых поражениях // Казан. мед. ж. 2008. Т. 89, №5. С. 662-665.