**Реакции лимфоцитов на механические и осмотические воздействия при водной депривации**

М.З.Федорова, В.Н. Левин

Критериями, характеризующими состояние белых клеток крови являются показатели их функциональной активности и сопротивляемости различным факторам. Причем, последнее свойство часто бывает более информативным показателем, т.к. угнетение функций может происходить при далеко зашедшей деструкции клеток, имеющей необратимый характер [ 1] . Особенно важное значение это положение имеет при анализе механизмов адаптации организма к экстремальным факторам среды.

Целью проведенного исследования было изучение реакций лейкоцитов на механические и осмотические воздействия в условиях дегидратации организма.

МЕТОДИКА

Опыты проведены на 48 беспородных белых крысах-самцах массой 370-420 г. Животных экспериментальных групп лишали воды при свободном доступе к сухому корму [ 4] . Оценку осмотической стойкости, осморегуляторных и деформационных реакций вели на 3, 6 и 10 сутки безводного содержания. Контролем служили интактные животные.

Для исследований использовали суспензию лейкоцитов в изотоническом забуференном растворе (раствор Дюльбекко), состоящую на 95-98% из лимфоцитов. Осмотическую стойкость, регуляторные возможности и мембранный резерв изучали, используя комплексный метод, подробно описанный ранее [ 6] . Суть метода сводится к следующему. Лейкоциты помещали в растворы хлорида натрия разной концентрации (0,9%; 0,45%; 0,2%). Время экспозиции в гипотонических растворах составляло 60 с и 1 ч. Данные по изменению морфометрических параметров клеток после инкубации в 0,45% растворе использовали для оценки регуляторных возможностей. Мембранный резерв определяли по изменениям площади поверхности лейкоцитов после 60-секундной инкубации в 0,2% растворе хлорида натрия. Расчеты объема и площади поверхности по стандартным формулам для шаровидных тел вели на основе измерения диаметра 50-60 клеток, фиксированных глутаровым альдегидом, помещенных на предметное стекло и окрашенных азур-эозином. Осмотичскую стойкость выражали числом (%) клеток сохранившихся после часовой экспозиции в 0,2% растворе хлорида натрия.

Для оценки деформационных свойств за основу была взята методика Tran-Son-Tay R. с соавт. [ 7] . Капилляры, диаметром 4 мкм заполняли изоосмотическим буфером и соединяли с манометром. Перемещение клеток к капилляру и в капилляре обеспечивалось постоянным во всех опытах отрицательным давлением (100 мм рт. ст.). Все манипуляции проводили в микрокапилляре на предметном столике микроскопа. Для наблюдений и замеров использовали объектив 40 ВИ и окуляр-микрометр МОВ-1-15\* . После регистрации для каждой клетки первичных параметров (диаметр лейкоцитов в исходном состоянии, длина и ширина деформированной клетки, время восстановления до исходной формы) рассчитывали площадь поверхности и объем покоящихся и деформированных лейкоцитов. Для каждого животного было обсчитано 40-60 клеток.

Все полученные данные обработаны статистически. Достоверность различий опрделялась по критерию t Стьюдента.

**Результаты исследования**

Проведенное исследование показало, что к 3-м суткам дегидратации происходило существенное уменьшение размеров лейкоцитов крови. В дальнейшем (6-10 сутки) за счет включения регуляторных механизмов клеточный объем восстанавливался до уровня интактных животных (табл. 1).

Умеренная гипоосмотическая нагрузка (60 с в 0,45% растворе хлорида натрия) приводила к достоверному увеличению объема лимфоцитов у контрольных животных, а также на 6 и 10-е сутки безводного содержания (18¸ 32%, р< 0,01). На 3 сутки дегидратации объемные изменения были незначительны (12%, р > 0,05). Высокий осмотический градиент (60 с в 0,2% растворе хлорида натрия) вызывал достоверное увеличение размеров клеток у всех животных (табл. 1). Однако, в контрольной группе изменения объема лимфоцитов были значительно больше, чем в экспериментальных (54% против 19¸ 32%, р< 0,01). Увеличение площади поверхности в этих условиях составляло: контрольная группа - 33%, 3 сутки дегидратации - 12%, 6 и 10 сутки - 20%. Т.е. мембранный резерв эффективнее использовался лейкоцитами интактных животных.

Таблица 1

Размеры лимфоцитов, инкубированных в растворах хлорида натрия разной осмолярности

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | Концентрация раствора, время инкубации | | | |
| Группа | 0,9% | 0,45%, 60 с | 0,45%, 1 ч | 0,2%, 60 с |
| Контроль | 5,2± 0,05  (74) | 5,7± 0,07°  (97) | 5,3± 0,07  (78) | 6,0± 0,1°  (113) |
| 3 сутки  дегидратации | 5,0± 0,06\*  (65) | 5,2± 0,1\*  (74) | 4,9± 0,05\*  (62) | 5,3± 0,07\* °  (78) |
| 6 сутки  дегидратации | 5,3± 0,07  (78) | 5,6± 0,07°  (92) | 5,3± 0,06  (78) | 5,8± 0,06°  (102) |
| 10 сутки  дегидратации | 5,2± 0,06  (74) | 5,5± 0,06\* °  (87) | 5,2± 0,08  (74) | 5,7± 0,07\* °  (97) |

Примечание. В таблице представлены значения диаметра клеток (мкм). В скобках - объем лейкоцитов (мкм3). Звездочкой обозначена достоверность различий по сравнению с параметрами клеток контрольных животных (р< 0.05), кружочком - достоверность внутригрупповых различий с клетками, инкубированными в изотоническом растворе (р< 0.05).

Кинетика объема клеток при увеличении времени инкубации в 0,45% растворе хлорида натрия до 1 ч была примерно одинаковой у животных всех групп (табл. 1). Диаметр лимфоцитов уменьшался на 8,4% (р< 0,01) у интактных животных и 6,0¸ 6,5% (р< 0,01) у животных экспериментальных групп. Реакции регуляторного уменьшения объема приводили к восстановлению исходных параметров клеток.

Динамика осмотической стойкости лимфоцитов на разных стадиях обезвоживания организма отличалась от фазных изменений объема. С увеличением сроков водной депривации осмотическая стойкость лейкоцитов возрастала, достигая достоверных различий по сравнению с контролем к 10 суткам (контроль - 70± 7%; 3 сутки дегидратации- 69± 5,5%; 6 сутки - 76± 5,9%; 10 сутки - 95± 2,2%).

Изучение деформационных реакций лейкоцитов проводилось на живых клетках, помещеных в изотоничную среду. Несмотря на то, что глутаровый альдегид считается фиксатором, сохраняющим прижизненное состояние клетки [ 3] , морфометрические показатели, замеренные для оценки осморегуляторных реакций оказались ниже, чем полученные в данных опытах. Значение диаметра лимфоцитов до деформации были 7,0-7,5 мкм. Различия результатов измерений возможно вызваны влиянием иммерсионной среды (солевой раствор) и материалом микрокамеры при изучении деформабельности, либо глутарового альдегида при оценке объемных изменений в гипотонических растворах. Несмотря на имеющиеся различия абсолютных значений первичных параметров, динамика их изменений позволяет оценить сопротивляемость лейкоцитов механическим воздействиям и сопоставить с данными по осморегуляции.

Таблица 2

Деформационные изменения и время восстановления исходной формы лейкоцитов на разных стадиях обезвоживания организма

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Группа | Р1  мкм2 | Р2  мкм2 | V1  мкм3 | V2  мкм3 | Т  с |
| Контроль | 172± 5,6 | 232± 10,9° | 224± 11,7 | 222± 11,5 | 70± 3,9 |
| 3 сутки  дегидратации | 165± 5,3 | 220± 10,3° | 211± 10,8 | 210± 10,7 | 71± 4,5 |
| 6 сутки  дегидратации | 162± 4,2 | 217± 8,3° | 202± 8,4 | 200± 8,3 | 92± 4,1\* |
| 10 сутки  дегидратации | 165± 4,3 | 217± 8,6° | 207± 9,2 | 204± 8,9 | 94± 3,7\* |

Примечание. Р1 - исходная площадь поверхности клеток; Р2 - площадь поверхности деформированных клеток; V1 -исходный объем клеток; V2 - объем деформированных клеток; Т - время восстановления исходной формы лейкоцитов. Звездочкой обозначена достоверность различий по сравнению с контрольной группой (р< 0,01); кружочком - внутригрупповые различия по сравнению с исходными показателями (р< 0,01).

Деформация клеток при прохождении через микрокапилляр за счет приложения внешних сил осуществлялась при постоянном объеме и увеличении площади поверхности (табл. 2). Используемый при этом "мембранный резерв" был фактически одинаковым у животных всех групп и составлял 32-35%. Отмеченного выше уменьшения объема циркулирующих клеток на 3 сутки дегидратации этой методикой не выявлено. Важным показателем, позволяющим судить о функциональном состоянии клеток является время восстановления исходной формы после деформации. Динамика этой характеристики отражена в табл. 2. Сравнительная оценка использования "мембранного резерва" при деформации лейкоцитов и при набухании в средах с низкой осмолярностью показала, что в контрольной группе он используется примерно в том же "количестве" (35% и 33%). У животных экспериментальных групп превращение клеток из сферических в цилиндрические идет за счет такого же "резерва" мембраны, что и у интактных животных, а объемные изменения в гипотонических растворах выражены значительно слабее.

**Обсуждение результатов**

Анализ полученных данных позволил установить, что при воздействии на лейкоциты интактных животных осмотических и механических факторов включаются ауторегуляторные механизмы. Они обусловливают эффективное использование пластичных свойств цитоплазматической мембраны, других клеточных структур и быстрое восстановление геометрической формы. Последнее имеет важное функциональное значение, т.к. клеточный объем выполняет роль вторичного посредника в регуляции относительной эффективности анаболизма и катаболизма [ 5] . Водная депривация уже на первом этапе (3 сутки) ведет к ослаблению реактивности изученной клеточной системы, о чем свидетельствуют меньшие изменения объема в гипотонических средах. Длительное безводное содержание животных сопровождается дезинтеграцией механизмов клеточной ауторегуляции. При одинаковых с интактными животными исходных параметрах клетки и динамике объемных изменений, выраженность последних значительно ниже. Параллельно возрастает осмотическая стойкость и время восстановления до исходной формы после деформации. Объяснением этих фактов могут служить данные об индукции в клетке синтеза белков, увеличивающих устойчивость к различным факторам. При этом повышается вязкость цитоплазмы вплоть до ее желатинизации. В основе гелеобразования лежит полимеризация актина и образование трехмерной сети [ 1,2] . Желатинизация цитоплазмы является паранекротическим сдвигом, но на обратимых стадиях повреждения физиологические функции остаются на высоком уровне [ 1] .

**Список литературы**

[ 1] Александров В.Я. Реактивность клеток и белки. Наука. Л. 1985.

[ 2] Браун А.Д., Моженок Т.П. Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы. Наука. Л. 1987.

[ 3] Дуглас С.Д., Куи П.Г. Исследование фагоцитоза в клинической практике. Медицина. М. 1983.

[ 4] Куприянов В.В., Магомедов М.А., Тихомиров А.Н. Состояние микроциркуляторного русла брыжейки при экспериментальной дегидратации. Арх. анат. 77 (8): 5-13. 1979.

[ 5] Орлов С.Н., Новиков К.Н. Регуляция объема клеток: механизмы, сопряженные клеточные реакции и патофизиологическое значение. Физиол. журн. им. И.М.Сеченова. 82 (8-9): 1-15. 1996.

[ 6] Федорова М.З., Левин В.Н. Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови. Клинич. лабор. диагн. (11): 44-46. 1997.

[ 7] Tran-Son-Tay R., Needham D., Yeung A., Hochmuth R.M. Time-dependent recovery of passive neutrophils after large deformation. Biophys. J. Biophisical Society. 60: 856-866. 1991.

Для подготовки данной работы были использованы материалы с сайта <http://www.yspu.yar.ru/>