

СТРУКТУРНО–ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ НЕЙТРОФИЛОВ ПРИ ГИПЕРОКСИИ

**Н.В. АКУЛИЧ¹, И.А. ВАЙЛУНОВА¹, Н.О. МАКСЮТА¹, А.В. СОРОКА¹,
Н.А. ЕФРЕМОВ¹, А.В. МАРОЧКОВ²**

¹Могилевский государственный университет им. А. А. Кулешова,

г. Могилев, Республика Беларусь

²УЗ «Могилевская областная больница»,

г. Могилев, Республика Беларусь

Введение. Нейтрофилы уже более 100 лет рассматриваются как основные эффекторные клетки при остром воспалении, а их роль в противобактериальной и противогрибковой защите организма хорошо изучена. Допускается [1] их участие в модуляции клеточного и гуморального иммунитета через синтез и продукцию иммунорегуляторных цитокинов.

В настоящее время практически полностью изучены морфология, метаболизм и основные функции нейтрофилов, дана характеристика продуктов их секреции [2]. С одной стороны, дефекты нейтрофилов приводят к разнообразным заболеваниям [3], с другой, – в результате повреждающего действия на нейтрофилы факторов различной природы могут отмечаться как функциональные, так и структурные нарушения нейтрофилов [4]. Если патофизиологические особенности нейтрофилов при действии бактерий, вирусов, грибов, лекарственных препаратов хорошо изучены, то роль операционного стресса, сопровождающегося гипероксией, в доступной нам литературе практически не описана.

Существующие на сегодняшний день методики не позволяют в полной мере оценить срочные (в пределах 30–60 минут) реакции нейтрофилов на экзо– и эндогенные факторы. Мы полагаем, что функционирование нейтрофилов в данном временном диапазоне может быть оценено по состоянию интерфазного хроматина клеточного ядра, принимающего участие в реакциях нейтрофилов на факторы окружающей среды.

По нашему мнению, степень конденсации хроматина при воздействии гипероксии, которая практически всегда имеет место при операционных вмешательствах с использованием ингаляционной анестезии, может оказаться значимым диагностическим критерием, отражающим состояние нейтрофилов при проведении лапароскопических операций.

Влияние гипероксии на организм широко изучается не только на уровне отдельных клеток и их органелл, но и на тканевом и органном (например, органы дыхательной системы) [5]. До настоящего времени нет исчерпывающих представлений о кислородном токсическом пороге, равно как и о предпочтительной концентрации кислорода во время ингаляционной анестезии [6]. Модельные эксперименты не могут в полной мере соответствовать условиям при оперативных вмешательствах, поэтому в наших исследованиях мы постарались изучить влияние гипероксии в реальных ситуациях, путем анализа крови пациентов, которым проводились операции с вдыхание гипероксических ингаляционных смесей.

Механизм воздействия кислорода *per se* на клетки иммунной системы в настоящее время остается детально не изученным. С одной стороны, известны факты ретинопатии у недоношенных детей, дышавших кислородом высокой концентрации [7, 6]. Продемонстрирована повышенная чувствительность эритроцитов к повреждению кислородом [7]. С другой стороны, рост концентрации свободных радикалов может стимулировать антиоксидантные системы, что может оказывать разноплановое влияние на клетки и ткани в зависимости от их особенностей метаболизма.

Цель исследования: изучить влияние гипероксии на фагоцитарную активность и состояние интерфазного хроматина нейтрофилов, что позволит оценить степень активации нейтрофилов при операционном вмешательстве с использованием гипероксии.

Методика и объекты исследования. В исследовании приняло участие 120 пациентов, которым выполнялись лапароскопические операции на органах брюшной полости, лица обоего пола, возраст от 18 до 85 лет, длительность оперативного вмешательства около 60 мин.

Премедикацию и вводный наркоз у пациентов всех групп проводили по общей схеме. На этапе поддержания применялась многокомпонентная сбалансированная эндотрахеальная анестезия. При операционном вмешательстве использовалась смесь с 35% кислорода. Забор венозной крови для исследования проводился гепаринизированным шприцом в объеме 2–4 мл на трех этапах операции:

1 этап – до начала анестезии (больной на операционном столе при пункции вены), 2 этап – через 20–30 мин. после интубации трахеи (основной этап операции), 3 этап – через 5 минут после экстубации пациента.

Для оценки фагоцитарной активности нейтрофилов в качестве материала нами использовалась венозная кровь поверхностных вен конечностей пациентов до проведения операции, в середине проведения операции, по ее окончании. В качестве объекта фагоцитоза *in vitro* использовались *E. coli* (в соотношении нейтрофилы/бактерии 1:10), меченные флуоресцентными красителями (флюоресцеин изотиоцианатом (FITC)).

Образцы инкубировались в течение 30 мин при 37 градусах. Затем к пробе добавлялся охлажденный стоп–раствор, содержащий этидиум бромид. После к отмытым фосфатным буфером образцам добавляли лизирующий раствор (OptyLyse, Immunotech, Франция).

Оценка активности процесса фагоцитоза нейтрофилами производилась с применением проточного цитофлуориметра Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, США) [8]. Количество фагоцитированных нейтрофилов определяли как процент FITC–позитивных клеток от общего числа нейтрофилов, гейтированных на основании бокового светорассеяния и размера частиц (дот плот EV/SS). В каждой пробе анализировалось 5000 событий. Контроль точности постановки реакции фагоцитоза осуществляли при помощи микроскопа проходящего света Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Германия) с объективом Plan–Neofluar 100×1.3 Oil и видеокамерами «SONY» и «AxioCam MrC5» (Германия).

Показатели парциального давления кислорода крови определяли непосредственно после взятия крови на базе УО «Могилевская областная больница» с использованием анализатора газов крови ABL 800 (Radiometer Medical, Дания).

Микроструктурный анализ хроматина лейкоцитов осуществлялся в препаратах цельной крови. Из крови, взятой до и во время проведения операции и/или подвергшейся инкубации в течение 30, 60 мин при температуре 37°С готовили мазки по стандартной методике, обрабатывали раствором РНКазы и окрашивали галлоцианин–хромовым краплагом.

На данном этапе нами использовались следующие группы:

1. Контроль по времени и по воздействию (исходные данные, 30 и 60 минут инкубации в отсутствии гипероксии и *E.coli*);
2. 30 мин и 60 мин гипероксии;
3. 30 мин гипероксии в сочетании с 30– и 60–минутным действием *E. coli*.

Готовые препараты исследовали методом микроскопии в проходящем свете с иммерсией. На основе препаратов с помощью микроскопа проходящего света AxioImager A1 (Carl Zeiss, Германия) и видеокамеры “AxioCam MRc5” (Carl Zeiss, Германия) создавали архив цифровых изображений хроматина полиморфонуклеарных лейкоцитов. Хроматин выделяли методом пороговой сегментации, принимая во внимание, что наиболее плотные участки хроматина имели наименьшее значение яркости пикселя. Для калибровки использовали эталонное изображение кривой зависимости оптической плотности от яркости пикселя. Дифференциальная пороговая сегментация хроматина производилась с помощью камеры AxioCam MRc 5, Zeiss, Germany) и программы ImageJ (США).

Статистический анализ проводился параметрическими методами и с использованием критерия Вальда–Вольфовица с использованием пакета прикладных программ STATISTICA 6.0. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Показатели парциального давления кислорода крови.

Показатели, определяющие газовый состав крови, зависят от концентрации кислорода во вдыхаемом воздухе (FiO_2). В частности, FiO_2 в начале и в конце операции составляла 21%, в середине операции для поддержания анестезии производилась ингаляция закисно–кислородной смеси с $FiO_2=35\%$. Общеизвестно, что парциальное давление кислорода (pO_2) является одним из важнейших параметров газового состава крови.

На первом этапе оперативного вмешательства у пациентов pO_2 смешанной венозной крови было несколько снижено по сравнению с нормой и составляло в среднем $29 \pm 8,3$ мм рт. ст. . Сниженное pO_2 у пациентов до начала оперативного вмешательства, возможно, обусловлено приемом препаратов на этапе подготовки к проведению операции. Повышение pO_2 у пациентов в середине операции (в среднем $70,6 \pm 22,9$ мм рт. ст.) обусловлено ингаляцией закисно–кислородной смеси с $FiO_2=35\%$ (гипероксия). Снижение pO_2 у пациентов после проведения операции (в среднем $47,03 \pm 15,8$ мм рт. ст.) по сравнению с серединой операции обусловлено ингаляцией закисно–кислородной смеси с $FiO_2=21\%$ (нормоксия).

Функциональная активность полиморфноядерных лейкоцитов

Функциональная активность нейтрофилов заключается в фагоцитозе чужеродных агентов и собственных мертвых клеток. Диагностическое значение имеют фагоцитарный индекс (ФИ) – число нейтрофилов (%), участвующих в фагоцитозе, а также фагоцитарный показатель – среднее число микробов, поглощенных одной фагоцитирующей клеткой (оценивали по интенсивности флуоресценции поглощенных каждой клеткой FITC–меченных бактерий *E.coli*).

Значение количества активных фагоцитов до оперативного вмешательства варьировало, что можно объяснить индивидуальными особенностями. Для стандартизации мы приняли исходный уровень активных фагоцитов каждого пациента за 100%, а его изменения рассчитывали по отношению к исходному состоянию.

К середине оперативного вмешательства в условиях гипероксии отмечено снижение количества активных фагоцитов (на 15%, $p < 0.05$, критерий серий Вальда–Вольфовица). К окончанию оперативного вмешательства отмечено некоторое возрастание их числа, но оно находилось ниже исходного уровня.

Интенсивность флуоресценции нейтрофилов, поглотивших FITC–меченные бактерии, прогрессивно снижалась относительно (на 15%, $p < 0.05$, критерий серий Вальда–Вольфовица) первоначального уровня, достигая своего минимума к моменту экстубации, что может свидетельствовать о нарастании запущенных оперативным вмешательством и/или применением анестезии процессов.

Поскольку интенсивность флуоресценции нейтрофилов зависит от количества поглощенных бактерий, то снижение интенсивности указывает на уменьшение инкорпорации бактерий *E.coli* нейтрофилами.

Таким образом, полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют об угнетении фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов при проведении лапароскопических операций с применением гипероксических ингаляционных смесей.

Снижение фагоцитарной активности нейтрофилов, возможно, объясняется достоверным увеличением концентрация кислорода и/или кортизола на этапах поддержания анестезии относительно исходного уровня.

Поскольку фагоцитарная активность нейтрофилов не ограничивается рецептор–опосредованным фагоцитозом, то на следующем этапе мы провели оценку интерфазного хроматина нейтрофилов цельной крови.

Опτικο–геометрические параметры интерфазного хроматина нейтрофилов цельной крови пациентов

Площадь q1, q2 и q4 имела логнормальное распределение, оптическая плотность q1 – правую асимметрию распределения, а оптическая плотность q2 и q 4 – нормальный характер распределения. Это указывает на то, что морфологические параметры хроматина на всех этапах наблюдения характеризуются преобладанием гранул с небольшими размерами, с высокой оптической плотностью гетерохроматина. Эухроматин и перигранулярная зона хроматина имеют в равной степени как гипер–, так и гипохромные участки интерфазного хроматина.

При исследовании площади компоненты q1 (рис.) статистически достоверных изменений по сравнению с соответствующими контрольными группами выявлено не было, за исключением роста площади на 30 минуте гипероксии в сочетании с 30 минутным процессом фагоцитоза ($p < 0.05$, критерий серий Вальда–Вольфовица).

Поскольку для нейтрофилов не характерна бласттрансформация, то рост площади q1 может свидетельствовать о разрыхлении гетерохроматина.

Оптическая плотность компоненты q1 в контроле незначительно понижалась, а при гипероксии оставалась повышенной на протяжении всего времени наблюдения ($p < 0.05$, критерий серий Вальда–Вольфовица).

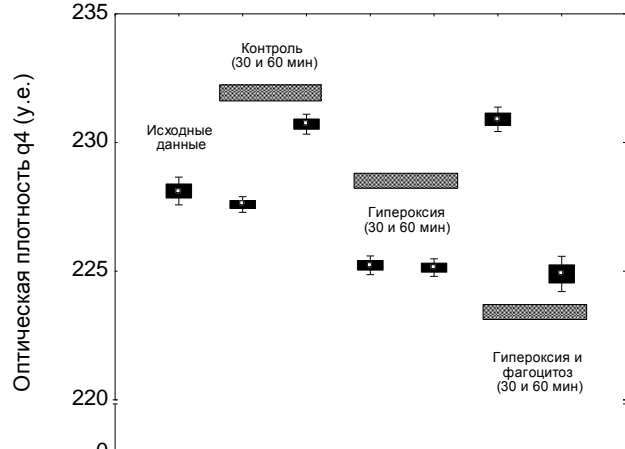
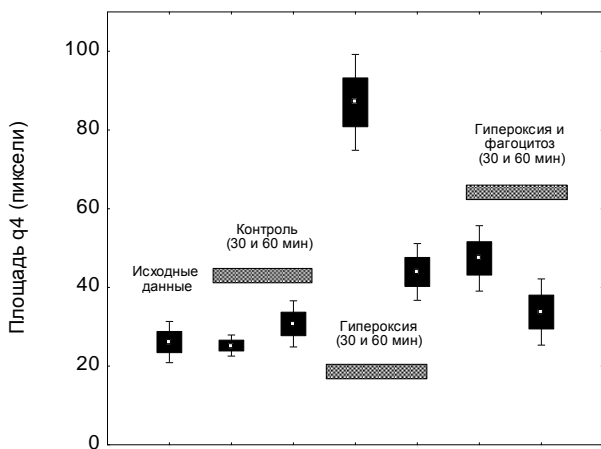
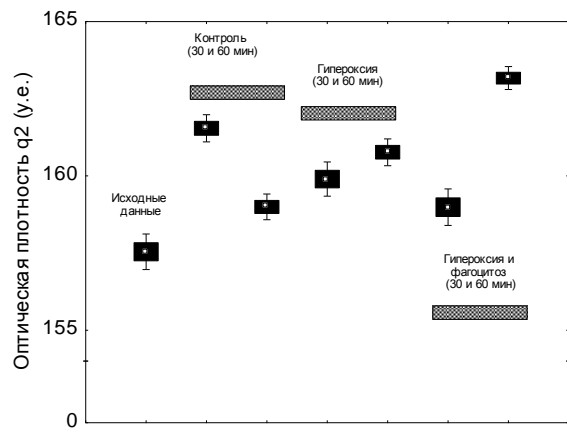
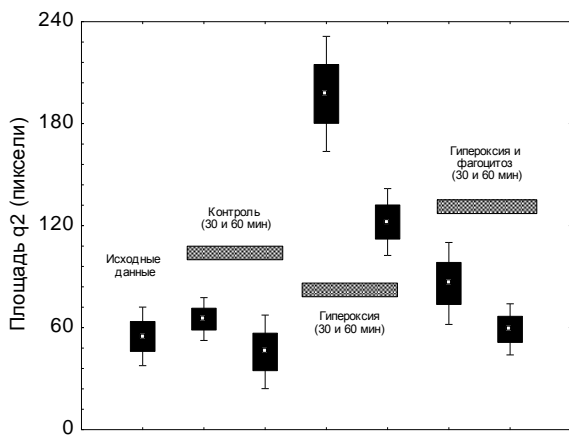
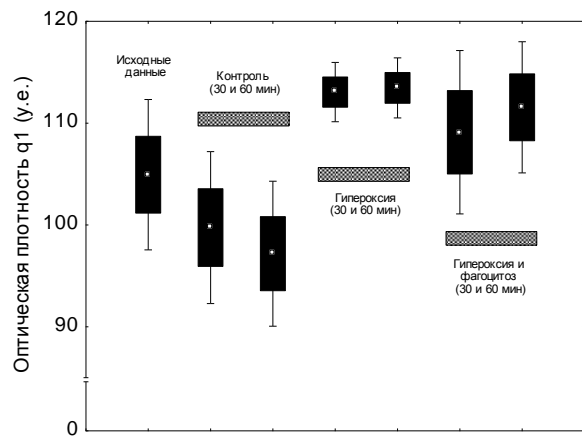
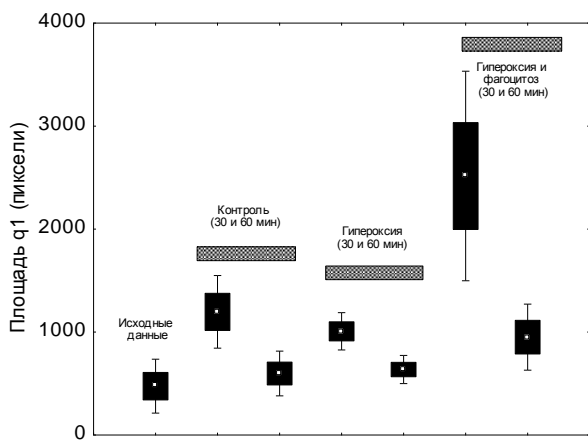


Рисунок – Диаграммы площади и оптической плотности компонентов q1, q2, q4 в динамике наблюдения

Площадь перигранулярного хроматина значительно (в 3–4 раза) выросла к 30 минуте оперативного вмешательства с применением гипероксических ингаляционных смесей. К 60–й минуте оперативного вмешательства с применением гипероксических ингаляционных смесей площадь q2 сохранялась увеличенной, но превышала исходное значение только в 1,5 раза. Добавление бактерий к образцам крови, подвергшейся влиянию гипероксии, характеризовалось сходной тенденцией (30–минутное воздействие *E.coli* превышало значение 60–минутного). Примечательно, что оптическая плотность перигранулярной зоны тесно коррелировала (обратная корреляция) с величиной площади за исключением 30 минутной гипероксией в сочетании с 30 минутной инкубацией с *E.coli*.

Изменения морфологических параметров эухроматина нейтрофилов имели сходство с компонентой $q2$, а оптические – имели сложный характер, причем даже в контрольных образцах. На наш взгляд, такие реакции могут указывать как на высокую реактивность хроматина, так и подверженность слабоупакованных хроматиновых фибрилл незначительным изменениям гомеостаза.

Увеличение площади гетеро- и перигранулярного хроматина связано с их разрыхлением под воздействием гипероксии. Можно предположить, что причиной разрыхления гетеро- и перигранулярного хроматина являются разрывы в молекуле ДНК, которые образуются под воздействием активных форм кислорода, имеющих место при использовании гипероксических ингаляционных смесей.

Компактизация эухроматина и разрыхление перигранулярного хроматина, выполняющего регуляторную роль, возможно, послужило причиной снижения фагоцитарной активности нейтрофилов.

Выводы. Нижний предельный допустимый уровень F_iO_2 составляет 0,21 или 21%. Во время общей анестезии дыхания атмосферным воздухом обычно недостаточно, чтобы поддерживать сатурацию артериальной крови в нормальных пределах. Это обусловлено увеличением неравномерности регионарных вентиляционно–перфузионных отношений и шунтированием крови в легких, а также угнетением анестетиками спонтанного дыхания. Поэтому вдыхаемая (вдуваемая) газовая смесь должна содержать 25–30% кислорода; при наличии же гиповолемии, гипертермии, гиповентиляции, искусственной вентиляции легких в агрессивных режимах F_iO_2 требует дополнительного увеличения [6]. Предельный уровень F_iO_2 , считающийся безопасным для длительного использования, составляет 0,5 (50%). Однако при критическом поражении легких его приходится превышать [6].

Участие кислорода в процессах жизнедеятельности нейтрофилов является предметом изучения нескольких наук [7]. Во время фагоцитоза нейтрофил потребляет большое количество кислорода. Развивается так называемый кислородный взрыв, который не связан с повышенным потреблением кислорода митохондриями. Повышенное потребление кислорода требуется для образования активных форм кислорода, от которых зависит эффективная внутриклеточная гибель микробов, поглощенных фагоцитами.

Газовый состав крови, определенный нами на всех этапах исследования, позволил сделать предположение о том, что повышенное давление кислорода будет способствовать активации нейтрофилов. Однако анализ фагоцитарной активности в условиях гипероксии выявил снижение количества активных фагоцитов, использующих рецептор–опосредованный механизм фагоцитоза. Некоторый рост активных фагоцитов наблюдается к окончанию оперативного вмешательства, но и в это время их количество находилось ниже исходного уровня.

Кроме того, интенсивность флуоресценции нейтрофилов, поглотивших FITC–меченые бактерии, прогрессивно снижалась относительно первоначального уровня, достигая своего минимума к моменту экстубации, что может свидетельствовать о нарастании запущенных оперативным вмешательством и/или применением анестезии процессов, что доказывает угнетение фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов при проведении лапароскопических операций с применением гипероксических ингаляционных смесей.

Снижение рецептор–опосредованного фагоцитоза наряду с уменьшением количества активных фагоцитов, на наш взгляд, объясняется несколькими причинами:

1. ускорение элиминации из кровотока активированных кислородом фагоцитов;
2. переключение фагоцитоза преимущественно на кислородзависимые механизмы. Это предположение нуждается в последующей проверке.

Морфологические параметры хроматина на всех этапах наблюдения характеризуются преобладанием гранул с небольшими размерами, с высокой оптической плотностью гетерохроматина. Эухроматин и перигранулярная зона хроматина имеют в равной степени как гипер-, так и гипохромные участки интерфазного хроматина.

Выявлено разрыхление гетерохроматина на 30 минуте гипероксии в сочетании с запуском фагоцитоза, но без аппликации *E.coli*. Площадь перигранулярного хроматина при применении гипероксических ингаляционных смесей увеличивалась в несколько раз, поскольку такие изменения могут отражать процессы ремоделирования в нейтрофилах при действии кислорода, а значит – открывать путь для целенаправленного управления.

Дополнительная стимуляция нейтрофилом (воздействие на лектиноподобные рецепторы) не меняла характера реакции нейтрофилов. Таким образом, сочетанная стимуляция кислородом и

хемоаттрактантами в первом приближении активирует хроматин лимфоцитов, за исключением срочного (имеющего обратный характер) ответа.

По результатам проделанной работы можно сделать следующие выводы:

1. Лапароскопические операции с применением гипероксических ингаляционных смесей сопровождаются снижением фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови.

2. Хроматин нейтрофилов является чувствительным к влиянию повышенных концентраций кислорода. В частности, гипероксия вызывает разрыхление гетеро- и перигранулярного хроматина и компактизацию эухроматина.

3. Изменения во время анестезии количества лейкоцитов, гранулоцитов и лимфоцитов наряду со стабильными параметрами гемодинамики, оксигенации, вентиляции, достаточной глубины анестезии характеризуют адекватный уровень анестезиологической защиты пациентов от операционной травмы, но обладают способностью снижать фагоцитарную активность нейтрофилов, что должен учитывать анестезиолог при проведении анестезии [9].

ЛИТЕРАТУРА

1. Пинегин, Б.В. Нейтрофилы: структура и функция / Б.В. Пинегин, А.Н. Маянский // Иммунология. – 2007. – № 6. – С. 374–382.
2. Галактионов, В.Г. Иммунология: учебник / В.Г. Галактионов. – М.: Изд-во МГУ, 1998. – 480 с.
3. Тотолян, А.А. Клетки иммунной системы / А.А. Тотолян, И.С. Фрейдлин. – СПб.: Наука, 2000. – 231 с.
4. Новиков, Д.К. Оценка иммунного статуса. / Д.К. Новиков, В.И. Новикова. – М., 1996. – 281 с.
5. Davey, H.M. Flow Cytometry and Cell Sorting of Heterogeneous Microbial Populations: the Importance of Single-Cell Analyses / H.M. Davey, D.B. Kell // Microbiological Reviews. – 1996. – Vol. 60, № 4. – P. 641–696.
6. Шурыгин, Н.А. Мониторинг дыхания в анестезиологии и интенсивной терапии. / Н.А. Шурыгин. – СПб.: Издательство «Диалект», 2003. – 416 с.
7. Марочков, А.В. Влияние различных концентраций кислорода, применяемых во время многокомпонентной эндотрахеальной анестезии, на структурно-функциональные параметры эритроцитов / А.В. Марочков, А.Л. Липницкий, Н.В. Акулич // Общая реаниматология. – 2012. – № 6. – С. 11–16.
8. Cell Lab Quanta™ SC Instructions for Use PN 721742. Beckman Coulter, Inc.
9. Влияние различных вариантов многокомпонентной сбалансированной анестезии на лейкоцитарную формулу и фагоцитарную активность крови пациентов / С.А. Точило, А.В. Марочков, Н.О. Максютя, Н.В. Акулич // Новости хирургии. – 2013. – Том 21, № 2. – С. 82–88.

STRUCTURE AND FUNCTIONAL CHARACTER OF NEUTROPHILS AFTER HYPEROXIA

*N.V. AKULICH, I.A. VAYLUNOVA, N.O. MAKSYUTA, A.V. MAGPIE,
N.A. EFREMOV, A.V. MAROCHKOV*

Summary

The effect of hyperoxia on the phagocytic activity and the state of the interphase chromatin of neutrophils was studied. It was found that the use of inhaled hyperoxic mixtures during laparoscopic surgery causes a decrease in the phagocytic activity of peripheral blood neutrophils, compaction of the euchromatin and loosening of the heterochromatin of neutrophils.

© Акулич Н.В., Вайлунова И.А., Максютя Н.О.,
Сорока А.В., Ефремов Н.А., Марочков А.В.

Поступила в редакцию 7 октября 2013г.