

© А.С. Алипбекова, А.И. Анамбаева

*Казахский Национальный Медицинский Университет
им. С.Д. Асфендиярова,*

г. Алматы, Казахстан

АКТИВНОСТЬ ЩЕЛОЧНОЙ ФОСФАТАЗЫ В ЛИМФОЦИТАХ И НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В ДИНАМИКЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО «ШОКОВОГО» ЛЕГКОГО

Аннотация. В данной статье представлены показатели активности щелочной фосфатазы в лимфоцитах и нейтрофилах периферической крови по величинам цитохимического коэффициента и процента ферментположительных клеток через 1, 24, 72 часа после введения олеиновой кислоты.

При определении активности щелочной фосфатазы в лимфоцитах периферической крови достоверные ее изменения обнаруживались лишь в первом часу развития экспериментального «шокового» легкого, что проявлялось в увеличении среднего цитохимического коэффициента и процента ферментположительных клеток. Напротив, метаболическая активность щелочной фосфатазы в нейтрофильных лейкоцитах не отличалась от контрольных значений через час после воспроизведения «шокового» легкого, но на 3 сутки происходило повышение ферментотрицательных клеток. В целом для нейтрофилов в эти сроки была характерна диффузная окраска с признаками разрушения клеток и выхода из них его внутриклеточных запасов.

Изменялось и соотношение нейтрофилов с разной степенью активности щелочной фосфатазы, которое показало, что спектр ее активности через час и сутки сдвигался в сторону низкоактивных форм, что свидетельствует об угнетении ферментативной активности популяции. При 72 часовой экспозиции наблюдалось резкое снижение доли клеток с 3-ей степенью активности.

Ключевые слова: показатели активности щелочной фосфатазы, динамика экспериментального «шокового» легкого.

© A.S. Alipbekova, A.I. Anambayeva

Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarov,

Almaty, Kazakhstan

ACTIVITY OF ALKALINE PHOSPHATASE IN LYMPHOCYTES AND NEUTROPHILIC GRANULOCYTES OF PERIPHERAL BLOOD IN THE DYNAMICS OF THE EXPERIMENTAL “SHOCK” LUNG

Abstract. The article presents the indices of alkaline phosphatase in lymphocytes and neutrophils of peripheral blood according to the values of the cytochemical coefficient and the percentage of enzyme-positive cells in 1, 24, 72 after the introduction of oleic acid.

The studying of the activity of alkaline phosphatase in lymphocytes of peripheral blood showed significant changes only during the first hour of the development of the experimental shock lung. The metabolic activity of alkaline phosphatase in neutrophile leucocytes didn't differ from the control points in an hour after the developmet of shock lung. The neutrophiles were characterized by diffuse color with signs of cell destruction and depletion of intracellular reserves.

The correlation of neutrophiles with different degrees of the activity of alkaline phosphatase changed and showed that the spectrum of its activity in an hour and a day moved to low-activity forms that proves the

suppression of enzyme activity of the population. In 72-hour exposition there was a sharp decrease of the number of cells with 3-degree activity.

Keywords: indices of the activity of alkaline phosphatase, dynamics of the experimental «shock» lung.

Актуальность. Несмотря на большое число научных публикаций по проблеме «шокового» легкого или респираторного дистресс-синдрома, до сих пор фрагментарны исследования по установлению взаимоотношений между биологически активными веществами, функционально-метаболической активностью иммуннокомпетентных клеток и иммунной системой. Вместе с тем полученные новые знания могли бы стать основой для разработки подходов, в том числе фармакологических, к профилактике и лечению «шокового» легкого [7]. Исследования состояния калликреин-кининовой и иммунной систем, а также метаболической активности лимфоцитов и нейтрофильных гранулоцитов и познания их роли в патогенезе респираторного дистресс-синдрома остаются актуальной проблемой, поскольку очень часто данная патология приводит к развитию полиорганной недостаточности с неблагоприятным исходом для больного [2].

Цель исследования – изучение активности щелочной фосфатазы в лимфоцитах и нейтрофильных гранулоцитах периферической крови через 1, 24, 72 часа после введения олеиновой кислоты в динамике развития экспериментального «шокового» легкого.

Материал и методы. Эксперименты выполнены на 240 белых беспородных крысах обоего пола массой 160–200 г., составивших 4 серии опытов, включая контрольных животных. Создание модели «шокового» легкого проводили путем введения олеиновой кислоты в ткань легких в дозе 0,27 мл на 100 г массы животного. Животных забивали путем массивного одноразового забора крови из правого желудочка сердца через 1, 24, 72 часа с момента введения токсического реагента. До введения олеиновой кислоты и забоя подопытных крыс осуществляли наркоз посредством интраперитонеального применения 0,3 мл 5 % кетамина и 0,2 мл 2 % ксилазина. Определение щелочной фосфатазы проводилось по методу В.В. Соколова, Р.П. Нарциссова [4]. Для оценки активности ферментов в мазках

крови подсчитывали 100 клеток и затем определяли процентное соотношение субпопуляций с выведением среднего цитохимического коэффициента, отражающего усредненную активность энзима в пересчете на одну клетку. Все исследования проводили с помощью микроскопа БИОЛАМ (x975).

Результаты и обсуждение. Щелочная фосфатаза – гидролитический фермент, лизирующий освобождение фосфата из спиртовых и фенольных моноэфиров в щелочной среде. Щелочная фосфатаза нейтрофильных гранулоцитов имеет самостоятельную клиничко-диагностическую ценность и считается «надежным индикатором» функциональной напряженности этих клеток, информативным показателем уровня реактивности всего организма [1]. В исходном состоянии (контроле) активность щелочной фосфатазы была обнаружена в единичных лимфоцитах и эти результаты соответствуют литературным данным, так как в норме щелочная фосфатаза в лимфоцитах периферической крови встречается редко [6]. Как видно из рисунка 1, для этой опытной серии величина среднего цитохимического коэффициента составляла $0,004 \pm 0,002$, процент ферментположительных клеток – $0,30 \pm 0,12$.

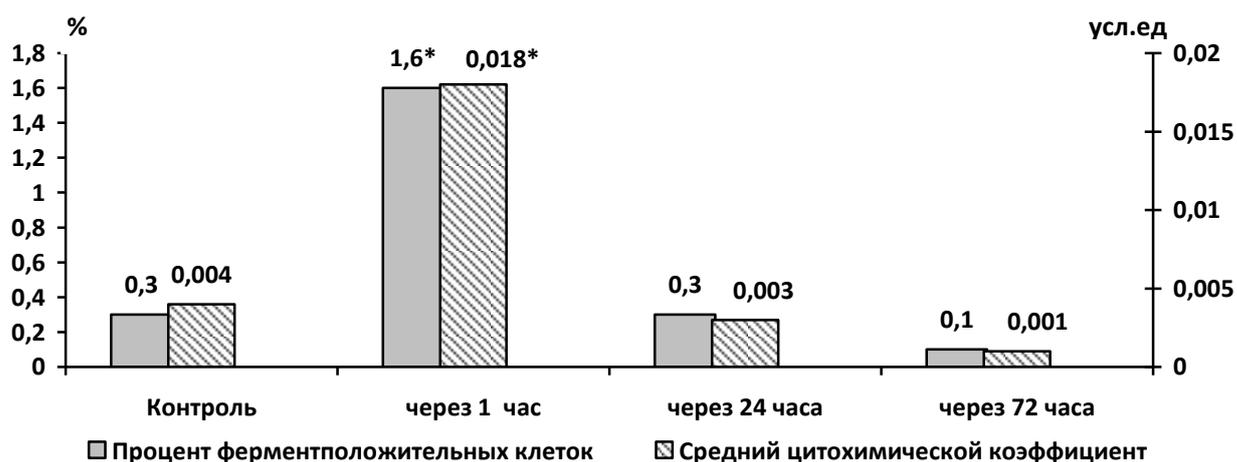


Рис. 1. Активность щелочной фосфатазы в лимфоцитах периферической крови в динамике развития экспериментального «шокового» легкого

Примечание: * – $P < 0,05$ достоверно по сравнению с контролем; n – количество животных 20.

Через 1 час после введения «шокового» реагента число ферментположительных лимфоцитов в крови возросло; достоверно увеличивались по сравнению с контрольными величины среднего цитохимического коэффициента ($0,018 \pm 0,005$, $P < 0,05$) и процент фермент-

положительных клеток ($1,60 \pm 0,48$ %, $P < 0,05$). К 24 часам показатели активности лимфоцитарной щелочной фосфатазы снижались относительно 1-часового срока ($P < 0,05$) и приближались к таковым в исходном состоянии: средний цитохимический коэффициент равнялся $0,003 \pm 0,001$, процент ферментположительных клеток – $0,30 \pm 0,09$. Через 72 часа динамика изменений показателей была аналогична таковой в предыдущей группе: средний цитохимический коэффициент и процент ферментположительных клеток уменьшались (по отношению к их значениям при 1-часовой экспозиции) соответственно до 0,001 усл.ед. и 0,10 %, достоверно не отличаясь от контроля.

Основные показатели (средний цитохимический коэффициент и процент ферментположительных клеток) активности щелочной фосфатазы в нейтрофилах периферической крови крыс в динамике развития «шокового» легкого отражены на рис. 2. Судя по показателям среднего цитохимического коэффициента и процента ферментположительных клеток, ее активность не отличалась от контрольных значений в ранние сроки эксперимента, но на 3-и сутки наблюдалась тенденция к увеличению энзимнегативных клеток.

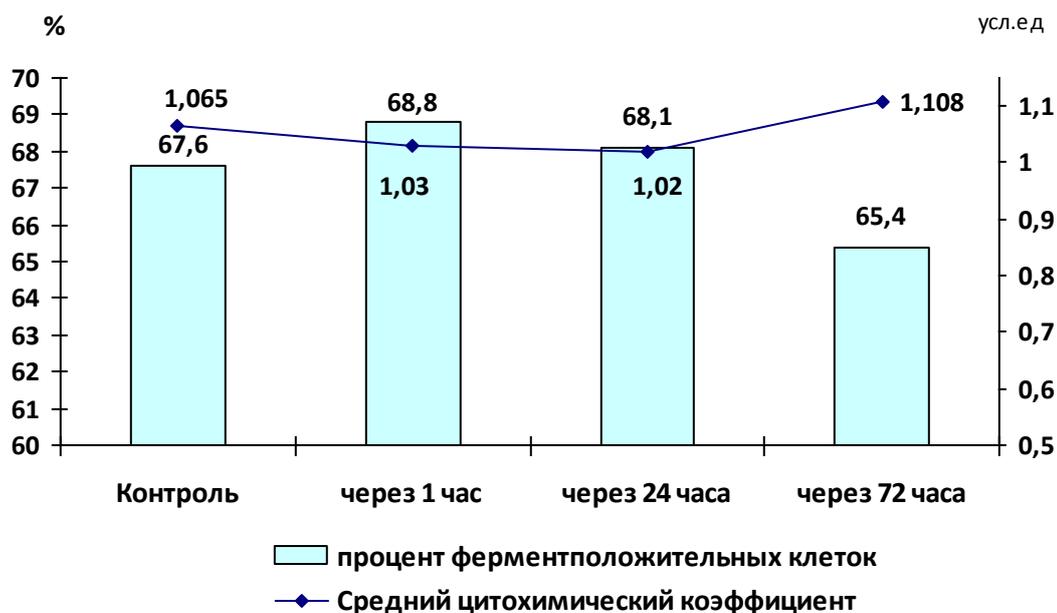


Рис. 2. Активность щелочной фосфатазы в нейтрофилах периферической крови в динамике развития экспериментального «шокового» легкого

Примечание: * – $P < 0,05$ достоверно по сравнению с контролем; n – количество животных 20.

Фермент в нейтрофильных гранулоцитах содержался в виде гранул или диффузного распределения по цитоплазме. Преобладание того или иного варианта его локализации в конце эксперимента находилось в обратной зависимости от доминирующей формы в исходном состоянии животных. Если у крыс до начала эксперимента в нейтрофилах наблюдалась гранулярная форма щелочной фосфатазы, то через 72 часа у них чаще встречалась диффузная окраска с признаками разрушения клеток и, напротив, у животных с преимущественно диффузной локализацией фермента в исходном состоянии на 3-и сутки эксперимента наблюдалось восстановление его внутригранулярных запасов в клетках. Возможно, разное исходное функциональное состояние клеток неспецифической защиты стало причиной противоположно направленных сдвигов ферментативной реакции щелочной фосфатазы в пределах одной опытной группы, что привело к статистически незначимым изменениям величин среднего цитохимического коэффициента и процента ферментположительных клеток в нейтрофилах во все наблюдаемые сроки. В целом картина крови характеризовалась появлением широкоплазменных и крупных лимфоцитов, комплексов нейтрофилов с лимфоцитами и диффузией фермента из первых во вторые.

В этих экспериментах нами проанализировано также соотношение нейтрофилов с разной степенью активности щелочной фосфатазы, которые приведены в таблице: через 1 час после введения олеиновой кислоты происходит незначительный рост процента клеток с 1-й степенью активности фермента за счет сокращения доли высокоактивных форм (с 3-й степенью).

Таблица

Процентное соотношение нейтрофилов с разной степенью активности щелочной фосфатазы (ЩФ) в динамике эксперимента

Время наблюдения	Степень активности ЩФ			
	0 степень	1 степень	2 степень	3 степень
Контроль (исходное состояние)	32,4 \pm 3,53	31,1 \pm 3,77	29,7 \pm 1,60	6,8 \pm 1,61
Через 1 час	31,2 \pm 2,41	33,2 \pm 2,86	30,1 \pm 2,76	5,5 \pm 1,58
Через 24 часа	32,1 \pm 2,92	34,1 \pm 3,26	31,3 \pm 2,24	2,7 \pm 0,85*
Через 72 часа	34,6 \pm 3,32	35,5 \pm 2,18	28,1 \pm 1,81	1,8 \pm 0,74*

Примечание: * – P < 0,05; n – количество животных 20.

Аналогичные, но более выраженные сдвиги в распределении клеток по степеням активности отмечались через 24 часа, причем число клеток с 3-й степенью активности уменьшалось в этот период наблюдения почти в 2,5 раза по отношению к контролю ($P < 0,05$). При 72-часовой экспозиции наблюдалась небольшая тенденция к снижению доли клеток со 2-й степенью активности щелочной фосфатазы и продолжалось уменьшение доли клеток с 3-й степенью активности относительно предыдущих сроков.

Выводы. Полученные данные убедительно показывают, что после введения «шокового» реагента наблюдается неизменный уровень основных показателей щелочной фосфатазы в нейтрофилах периферической крови (средний цитохимический коэффициент и процент ферментположительных клеток). В то же время спектр ее активности сдвигался в сторону низкоактивных форм. Возможно, снижение содержания щелочной фосфатазы в нейтрофилах соответствует омоложению популяции этих клеток [3].

В лимфоцитах достоверное повышение активности ЩФ обнаружено через час после воздействия, в дальнейшем она возвращалась к исходному уровню. Появление и возрастание активности щелочной фосфатазы в циркулирующих лейкоцитах может служить метаболическим индикатором адаптивного ответа организма на введение токсического реагента [5].

Список литературы:

1. *Балябина М.Д., Слепышева В.В., Козлов А.В.* Методы определения активности щелочной фосфатазы // *Лабораторная диагностика.* – 2007. – № 3. – С. 10–13, 15–17.
2. *Лейдерман И.Н.* Синдром полиорганной недостаточности (ПОН). Метаболические основы // *Вестник интенсивной терапии.* – 1999. – № 2. – С. 8–13.
3. *Павлов К.А., Дубова Е.А., Мишнев О.Д.* Медиаторные взаимодействия при остром респираторном дистресс-синдроме // *Общая реаниматология.* – 2007. – № 5–6. – С. 208–212.
4. *Соколов В.В., Нарциссов Р.П.* Цитохимия ферментов в профпатологии. – М.: Медицина. – 1975. – 120 с.

5. Федотова Г.Г., Киселева Р.Е. Изменение активности щелочной и кислой фосфатазы лейкоцитов в развитии неспецифического воспаления легких // Современные наукоемкие технологии. – 2007. – № 7. – С. 91–92.

6. Шабалдин А.В., Кострова Т.О. Клинико-иммунологические аспекты хронической обструктивной болезни легких // Медицинская иммунология. – 2010. – Т. 12, № 3. – С. 207–212.

7. Kevill Katharine A., Bhandari V. A role for macrophage migration inhibitory factor in the neonatal respiratory distress syndrome // J. Immunol. – 2008. – Vol. 180, № 1. – P. 601–608.

References

1. Balyabina M.D., Slepysheva V.V., Kozlov A.V. Metody opredeleniya aktivnosti shchelochnoy fosfatazy [Method of detection of the activity of alkaline phosphatase]. *Laboratornaya diagnostika*, 2007, no. 3, pp. 10–13, 15–17 (in Russian).

2. Leyderman I.N. Sindrom poliorgannoy nedostatochnosti (PON). Metabolicheskie osnovy [Syndrome of multi-organ failure. Metabolic basis]. *Vestn. intens. Ter.*, 1999, no. 2, pp. 8–13 (in Russian).

3. Pavlov K.A., Dubova E.A., Mishnev O.D. Mediatornye vzaimodeystviya pri ostrom respiratornom distress-sindrome [Mediatory cooperation in acute respiratory distress-syndrome]. *Obshch. Reanimatol.*, 2007, no. 5–6, pp. 208–212 (in Russian).

4. Sokolov V.V., Nartsissov R.P. Tsitokhimiya fermentov v profpatologii [Cytochemistry of enzymes in professional pathology]. Moscow: Meditsina, 1975. 120 p. (in Russian).

5. Fedotova G.G., Kiseleva R.E. Izmenenie aktivnosti shchelochnoy i kisloy fosfatazy leykotsitov v razvitii nespetsificheskogo vospaleniya legkikh [Studying of the activity of leucocyte alkaline phosphatase in the developmet of non-specific pneumonia]. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii*, 2007, no. 7, pp. 91–92 (in Russian).

6. Shabalдин A.V., Kostrova T.O. Kliniko-immunologicheskie aspekty khronicheskoy obstruktivnoy bolezni legkikh [Clinical-immunologic aspects of chronic obstructive pulmonary disease]. *Med.immunol.*, 2010, vol. 12, no. 3, pp. 207–212 (in Russian).

7. Kevill Katharine A., Bhandari V. A role for macrophage migration inhibitory factor in the neonatal respiratory distress syndrome. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 1, pp. 601–608.

Алипбекова Айгуль Сураповна – старший преподаватель модуля нормальной физиологии (тел.: 8 (727) 338-70-90, e-mail: alipbek_aigul@mail.ru).

Анамбаева Айгуль Ибадуллаевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры общей гигиены и экологии (тел.: 8 (727) 338-70-90, e-mail: aigul050271@mail.ru).

Казахский Национальный Медицинский Университет им. С.Д. Асфендиярова, 050000, Казахстан, г. Алматы ул. Толе-би, 94.

Alipbekova Aigul Surapovna – senior teacher of the course of normal physiology (tel. 8 (727) 338-70-90, e-mail: alipbek_aigul@mail.ru)

Anambaeva Aigul Ibadullaevna – Candidate of Medical Science, associate professor of the department of general hygiene and ecology (tel. 8 (727) 338-70-90, e-mail: aigul050271@mail.ru).

Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarov, 94, Tole-bi Str., Almaty, 050000, Kazakhstan.