

О. О. Чугай, Л. А. Любінець

Львівський національний медичний університет ім. Д. Галицького, м. Львів

ФАГОЦИТАРНА АКТИВНІСТЬ ЛЕЙКОЦИТІВ У ДИНАМІЦІ РОЗВИТКУ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ПНЕВМОНІЇ

Фагоцитоз – один з основних механізмів імунної системи, спрямований на знищення антигенів, в т.ч. бактерійного походження. Провідну роль у фагоцитозі та секреції імунологічно активних речовин відіграють мононуклеарні фагоцити. У статті наведені дані дослідження фагоцитарної активності лейкоцитів у динаміці розвитку експериментальної пневмонії, викликаній культурою *Staphylococcus aureus*. Визначено, що перебіг експериментальної пневмонії характеризувався активізацією макрофагальної фагоцитарної системи, що проявлялось зростанням у крові таких показників, як фагоцитарний індекс, фагоцитарне число, тест відновлення нітросинього тетразолію в диформазан. На тлі тенденції до рівномірного зростання поглинаючої здатності фагоцитуючих лімфоцитів, середня кількість поглинутих інфекційних агентів і перетравлююча активність моноцитів вірогідно збільшувались на 10 і 20 доби експериментальної пневмонії.

Ключові слова: експериментальна пневмонія, фагоцитоз, мононуклеарні фагоцити.

Робота є фрагментом НДР «Патофізіологічні механізми розвитку алергічних і запальних процесів на різних рівнях організації, особливості реактивності організму та їх фармакологічна корекція», № державної реєстрації 0111U000126.

Дихальна система – це одна з найскладніших мультифункціональних систем у людському організмі. Легені не тільки забезпечують обмін газів, а й беруть участь у багатьох фізіологічних процесах організму, зокрема в імунному захисті. Завдяки постійному контакту з повітряним простором довкілля та посиленій васкуляризації, на легені припадає значне антигенне навантаження, в тому числі різних інфекційних агентів. Для елімінації з організму шкідливих речовин, у легенях активується низка захисних механізмів, зокрема – факторів природженого протиінфекційного імунного захисту як клітинного, так і гуморального. Значну роль при цьому відіграють механічні бар'єри, в першу чергу – мукоциліарна система слизових легень і фізіологічні функції (чхання, кашель тощо) [8].

При порушенні цього бар'єру активується наступна ланка імунного захисту – система фагоцитозу. Провідну роль у фагоцитозі та секреції імунологічно активних речовин відіграють мононуклеарні фагоцити (моноцити, тканинні макрофаги). В альвеолах основними постійними фагоцитарними клітинами є альвеолярні макрофаги. При низькому бактеріальному навантаженні чи інфікуванні маловірулентними грам-позитивними мікроорганізмами, альвеолярні макрофаги можуть ефективно фагоцитувати та знешкоджувати інфекційні агенти [8, 9]. Ці клітини мають відносно велику площу поверхні, що полегшує активний фагоцитоз чи ендоцитоз вдихуваних патогенних частинок [10]. Крім того, значна кількість поверхневих рецепторів дозволяє фагоцитувати найрізноманітніші агенти [4]. Моноцити/макрофаги відносяться до антигенпрезентуючих клітин, тобто можуть передавати інформацію про структуру антигену до Т-лімфоцитів і, таким чином – активувати набуту імунну відповідь.

Не менш важливою функцією фагоцитів є здатність до синтезу біологічно активних речовин. Відомо, що активація макрофагів сприяє синтезу понад 100 різних факторів. Зокрема, у відповідь на бактеріальну контамінацію продукується значна кількість прозапальних цитокінів: TNF- α , IL-1 β , IL-6 та IL-12, що призводять до розвитку у легенях запального процесу. Крім того, їхня активність веде до утворення активних форм кисню (ROS) та оксиду азоту (NO), що може викликати пошкодження легеневої тканини [6]. Особливістю альвеолярних макрофагів, на відміну від нейтрофілів, є відсутність здатності утворювати активні форми кисню за участю мієлопероксидази. Однак, вони можуть продукувати пероксид водню за рахунок NADPH-оксидазної системи [5] та активні форми кисню у мітохондріях [12]. Крім того, за участі NO-синтази (NOS2/iNOS) з активних форм кисню та оксиду азоту (NO) можуть утворюватися потужніші бактерицидні агенти, зокрема пероксинітрил [7].

Коли бактерійне навантаження є значним чи виникає інфікування більш вірулентними грам-позитивними мікроорганізмами, такими як *Pseudomonas aeruginosa* чи *Klebsiella pneumoniae*, то для елімінації бактерій залучаються поліморфноядерні нейтрофіли (ПЯН). Вони також є важливими фагоцитуючими клітинами, завдяки здатності до внутрішньоклітинного кілінгу і позаклітинного цитолізу [11].

Метою роботи було вивчення фагоцитарної активності лейкоцитів у динаміці розвитку експериментальної пневмонії.

Матеріал та методи дослідження. Експериментальні дослідження проводились на 9 морських свинок (савцяч) масою 180-220 г, поділених на 4 групи: I група – інтактні морські свинки, 3 тварини (контроль); II група – морські свинки з експериментальною пневмонією на 6-ту добу, 2 тварини; III група – морські свинки з експериментальною пневмонією на 10-ту добу, 2 тварини; IV група – морські свинки з експериментальною пневмонією на 20-ту добу, 2 тварини. Усіх тварин утримували в стандартних умовах віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Евтаназію тварин проводили шляхом декапітації з дотриманням Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та наукових цілей (Страсбург, 1985). Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001). Відтворювали експериментальну пневмонію шляхом інтраназального введення тваринам культури *Staphylococcus aureus* за методом В. Н. Шляпникова і співав [2]. Тварин декапітували на 6-ту, 10-ту та 20-ту добу розвитку ЕП. За показниками, що відображають стан макрофагальної системи, вивчали активність фагоцитозу моноцитів/макрофагів у крові. Для цього аналізували фагоцитарну активність моноцитів (ФАМ) за чашечковим методом [3]. В якості тест-об'єкту фагоцитозу використовували живу добову культуру *S. aureus* (штам 505). При постановці ФАМ визначали наступні показники: фагоцитарний індекс (ФІ) – відсоток фагоцитуючих моноцитів, фагоцитарне число (ФЧ) – кількість поглинутих бактеріальних клітин на 1 моноцит. Також проводили спонтанний НСТ-тест у крові за методикою М. Е. Віксмана, А. Н. Маянського [1].

Отримані результати статистично оцінювали за t-критерієм Стьюдента. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного (М) за результатами кожного дослідження \pm стандартне відхилення (m). Достовірними вважалися відмінності при $p < 0,05$ (95,5%).

Результати дослідження та їх обговорення. У результаті проведених досліджень виявили, що в морських свинок з ЕП спостерігалось зростання показників макрофагальної фагоцитарної системи. Зокрема, виявлено зростання ФЧ на 6, 10 та 20 добу експерименту на 9,8%, 41,1% та на 46%, відповідно, порівняно з контрольною групою. Крім того, ФІ також зростав, відповідно на 11,9%, 15,6% та 22,9% на 6, 10, та 20 добу дослідження, порівняно з контрольною групою. Подібними визначені результати НСТ-тесту, які також зростали, відповідно на 9,0%, 9,8% та 57,8% на 6, 10 та 20 доби. Звертає на себе увагу те, що на тлі рівномірної тенденції до зростання ФІ впродовж періоду формування пневмонії, інші два показники демонстрували певні періоди максимального зростання. Так, ФЧ збільшилося в 1,4 рази саме на 10 добу експерименту, що було вірогідно більше порівняно з контрольною групою, $p < 0,05$. Натомість, НСТ-тест, що показує метаболічну перетравлюючу активність лімфоцитів в 1,6 разів вірогідно збільшився на 20 добу порівняно з контрольною групою тварин, $p < 0,05$. (Таб.1).

Таблиця 1

Динаміка показників макрофагальної фагоцитарної системи у крові морських свинок з експериментальною пневмонією (М \pm m, n=9)

Показник	Інтактні тварини	6 доба ЕП	10 доба ЕП	20 доба ЕП
ФЧ, %	6,0 \pm 1,2	6,59 \pm 1,0	8,47 \pm 2,5*	8,76 \pm 1,5*
ФІ, %	70,4 \pm 4,2	78,79 \pm 4,5	81,42 \pm 5,2	86,54 \pm 5,3
НСТ, %	6,0 \pm 0,9	6,54 \pm 1,5	6,59 \pm 1,6	9,47 \pm 1,8*

Примітка * - $p < 0,05$ – порівняння з контрольною групою

Висновок

Перебіг експериментальної пневмонії характеризувався активізацією макрофагальної фагоцитарної системи, що проявлялось зростанням у крові таких показників, як ФІ, ФЧ, НСТ. На тлі тенденції до рівномірної зростання поглинаючої здатності фагоцитуючих лімфоцитів, середня кількість поглинутих інфекційних агентів і перетравлююча активність моноцитів вірогідно збільшувались на 10 і 20 доби експериментальної пневмонії.

Список літератури

1. Viksman M. E. Sposob otsenki funktsionalnoy aktivnosti neytrofilov cheloveka po reaktsii vosstanovleniya nitrosinogo tetrazoliya: Metod. rekomendatsii. / M. E. Viksman, A. N. Mayanskiy. – Kazan: Kazanskiy NIIEM, - 1979. – 11 s.
2. Shlyapnikov V. I. Eksperimentalnyie modeli ostruyh pnevmoniy, vyizvannyih uslovno-patologicheskimi bakteriyami i ih assotsiatsiy: metod. ukazaniya / [V. I. Shlyapnikov, T. L. Solodova, S. A. Stepanov i dr.]. – Saratov, 1988. – 30 s.
3. Frolov V. M. Opredelenie fagotsitarnoy aktivnosti monotsitov perifericheskoy krovi u bolnyh / V.M. Frolov, N.A. Peresadin, I.Ya. Pshenichnyiy // Laboratornoe delo. – 1990. – No. 9. – S. 27-29.
4. Aderem A. Mechanisms of phagocytosis in macrophages / A. Aderem, D. M. Underhill. // Annu Rev Immunol. – 1999. – No.17. – P. 593–623.

5. Hampton M. B. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing / M. B. Hampton, A. J. Kettle, C. C. Winterbourn. // Blood. – 1998. – No.92. – С. 3007–3017.
6. Gordon S. Alternative activation of macrophages / S. Gordon. // Nat Rev Immunol. – 2003. – No.3. – P. 23–25.
7. MacMicking J. Nitric oxide and macrophage function / J. MacMicking, Q. W. Xie, C. Nathan. // Annu Rev Immunol. – 1997. – No.15. – P. 323–350.
8. Nelson S. Pathophysiology of pneumonia / S. Nelson, C. M. Mason, J. Knolls [et al.] // Clin. Chest Med. – 1995. – No.16. – P. 1–12.
9. Onofrio J. M. Granulocyte-alveolar macrophage interaction in the pulmonary clearance of Staphylococcus aureus / J. M. Onofrio, G. B. Toews, M. F. Lipscomb. // Am. Rev. Respir. Dis. – 1983. – No.127. – P. 335–342.
10. Steinman R. M. Endocytosis and the recycling of plasma membrane / R. M. Steinman, I. S. Mellman, W. A. Muller [et al.] // J Cell Biol. – 1983. – No.96. – P. 1–27.
11. Toews G. B. The relationship of inoculum size to lung bacterial clearance and phagocytic cell response in mice / G. B. Toews, G. N. Gross, A. K. Pierce. // Am. Rev. Respir. Dis. – 1979. – No.120. – P. 559–566.
12. West A. P. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS / A. P. West, I. E. Brodsky, C. Rahner [et al.]. // Nature. – 2011. – No.472. – P. 476–480.

Реферати

ФАГОЦИТАРНАЯ АКТИВНОСТЬ ЛЕЙКОЦИТОВ В ДИНАМИКЕ РАЗВИТИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

Чугай О. А., Любинец Л. А.

Фагоцитоз – один из основных механизмов иммунной системы, направленный на уничтожение антигенов, в т.ч. бактериального генеза. Ведущую роль в фагоцитозе и секреции иммунологически активных веществ играют мононуклеарные фагоциты. В статье приведены результаты исследования фагоцитарной активности лейкоцитов в динамике развития экспериментальной пневмонии, вызванной культурой *Staphylococcus aureus*. Определено, что развитие экспериментальной пневмонии характеризовалось активацией макрофагальной фагоцитарной системы, что проявлялось ростом в крови таких показателей, как фагоцитарный индекс, фагоцитарное число, тест восстановления нитросинего тетразолия в диформазан. На фоне тенденции к равномерному увеличению поглощающей способности фагоцитирующих лимфоцитов, среднее количество поглощенных инфекционных агентов и процессинговая активность моноцитов достоверно увеличивались на 10 и 20 сутки экспериментальной пневмонии.

Ключевые слова: экспериментальная пневмония, фагоцитоз, мононуклеарные фагоциты.

Статья надійшла 23.02.2017 р.

PHAGOCYTOTIC ACTIVITY OF LEUKOCYTES IN THE DYNAMIC OF EXPERIMENTAL PNEUMONIA

Chugai O., Lyubinetz L.

Phagocytosis – one of the basic mechanisms of the immune system, aimed at the destruction of antigens, including bacterial origin. The leading role in phagocytosis and secretion of immunological active substances play mononuclear phagocytes. The article presents the research data of phagocytic activity of leukocytes in the dynamics of experimental pneumonia caused by *Staphylococcus aureus*. Determined that the course of experimental pneumonia characterized by activation of macrophage phagocytic system which manifested in growing of blood indicators such as phagocytic index, phagocytic number, nitroblue tetrazolium recovery test in dyformazan. Against the background of the trend towards a uniform increase absorptive capacity of phagocytic lymphocytes, the average number of absorbed infectious agents and digesting activity of monocytes significantly increased at 10 and 20 days of experimental pneumonia.

Key words: experimental pneumonia, phagocytosis, mononuclear phagocytes.

Рецензент Старченко І.І.

УДК 611.631-019-018:547547.96]-08

А. Ю. Шегедін, А. М. Яценко, О. Д. Лушк

Львівський національний медичний університет ім. Д.Галицького, м. Львів

ЕКСПОНУВАННЯ ГЛІКОКОН'ЮГАТИВ У ПОСТНАТАЛЬНОМУ МОРФОГЕНЕЗІ ЯЄЧКА ЩУРА ЗА ДАНИМИ PAS-РЕАКЦІЇ ТА ЛЕКТИНОВОЇ ГІСТОХІМІЇ

З використанням методів загальної морфології, PAS-реакції, манозоспецифічних (PSA, GNA, Con A) та галактозоспецифічних (PNA, VAA, CNFA) лектинів досліджено перебудову глікому яєчка щура на послідовних етапах пре- (20-й пренатальний день) та постнатального (1-й, 20-й, 40-й постнатальні дні, дорослий щур) морфогенезу. Встановлено, що процеси морфогенезу супроводжуються інтенсивною перебудовою вуглеводмісних біополімерів, зокрема, рецепторів лектинів в складі структурних компонентів яєчка. Манозоспецифічні лектини можуть бути рекомендовані в якості селективних гістохімічних маркерів фетальних клітин Лейдига, галактозоспецифічні лектини – акросомальних систем сперматозоїдів щура. Рецептори лектинів обох вищезначених груп експонуються лептотенними і зиготенними сперматоцитами починаючи з 20-го постнатального дня.

Ключові слова: яєчко щура, постнатальний морфогенез, лектинова гістохімія, гліком.

Робота є фрагментом НДР «Лектино- та імуногістохімічний аналіз вуглеводних детермінант нормальних та патологічно змінених клітин і тканин», № державної реєстрації 0113U000207.

Клітинним глікокон'югатам належить важлива роль у взаємному розпізнаванні клітин, забезпеченні нормального ембріогенезу, постнатального розвитку та функціонування організму, включаючи диференціацію, ріст, контактне гальмування клітин, імунну відповідь та ін. Не менш важливу роль у морфо-функціональній організації тканин, органів та їхніх систем відіграють