

## **СООТНОШЕНИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ КАЛЬЦИЯ ПИТЬЕВЫХ ВОД И КРАТКОВРЕМЕННОЙ ИНТЕНСИВНОЙ МЫШЕЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

**С.В. Надеждин, М.З. Федорова, Л.Ф. Перистая**

Белгородский государственный университет, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85  
E-mail: nadezhdin@bsu.edu.ru

Изучалось общее число и соотношение различных форм лейкоцитов с оценкой физиологических свойств белых клеток крови под влиянием алиментарного кальция и интенсивной мышечной деятельности. Кальциевая нагрузка вызывает изменения общего числа и соотношения различных форм лейкоцитов с развитием лимфоцитоза и нейтропении как в периферической крови, так и в костном мозге. Активность белых клеток крови возрастает при повышении концентрации кальция в плазме крови и становится более выраженной после интенсивной мышечной деятельности.

Ключевые слова: лейкоциты, кальций, мышечная нагрузка.

### **Введение**

Исследования последних лет наглядно продемонстрировали роль белых клеток крови в адаптации организма к воздействиям неблагоприятных условий среды. Спектр этиологических факторов, влияющих на защитные свойства организма достаточно широк, среди них особое место в формировании нарушений занимает алиментарное поступление макро- и микроэлементов. Среди современных исследований особый интерес представляют данные о воздействии кальция, поступающего в организм алиментарным путем, на показатели клеточного иммунитета сенсibilизированных животных [5]. Являясь активным в биологическом отношении элементом, кальций участвует в запуске физиологических функций лейкоцитов [13], способствует пролиферации Т-клеток [9], влияет на миграцию нейтрофилов [11]. Многие авторы подчеркивают необходимость расширения научных изысканий в этом направлении. В связи с этим целью настоящего исследования было изучение количественных характеристик и физиологических свойств лейкоцитов периферической крови и красного костного мозга в условиях повышенной концентрации  $Ca^{2+}$  в сыворотке крови.

### **Материалы и методы**

В экспериментальном исследовании использованы лабораторные белые крысы линии «Вистар». Подбор животных и формирование групп, а также сроки воздействия экзогенного фактора, осуществлялись согласно рекомендациям И.М. Трахтенберга и соавт. [6]. Период акклиматизации животных составил один месяц, в течение этого времени крысы получали стандартный рацион вивария и питьевую воду, соответствующую СанПин 2.1.4.559–96 «Вода питьевая». Животные были поделены на 3 группы: 1-я группа (контроль) – употребляли воду с концентрацией  $Ca^{2+}=9,75$  мг/л; 2-я группа животных получала имитаты питьевой воды с повышенным содержанием  $Ca^{2+}=66,5$  мг/л; 3-я группа крыс подвергалась сочетанному воздействию питьевой воды с повышенным содержанием кальция и однократной физической нагрузке (плавание до полного утомления). Все манипуляции с животными осуществлялись с учетом этических требований к работе с ними [10]. Контроль содержания  $Ca^{2+}$  в имитатах питьевой воды проводился с использованием комплексонометрического метода [7].

Кровь для исследования получали путем декапитации с предварительной передозировкой парами эфира. В цельной крови подсчитывали количество и соотношение

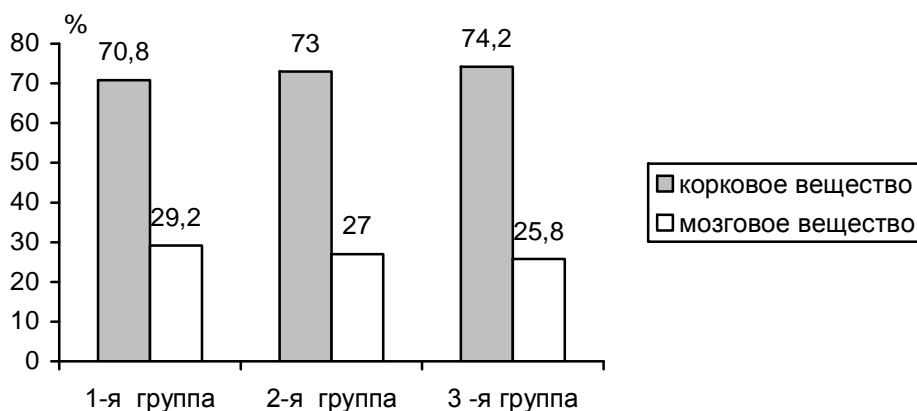
различных форм лейкоцитов унифицированным методом. В сыворотке крови определяли концентрацию  $\text{Ca}^{2+}$  колориметрическим методом на полуавтоматическом анализаторе ФП-90П «Лабсистемс». Суспензию лейкоцитов использовали для оценки функциональных свойств клеток. Локомоционную активность лейкоцитов оценивали по площади миграции под агарозой [8]. Исследование поглотительной способности лейкоцитов крови проводили с использованием пекарских дрожжей [4]. Для оценки адгезионных свойств клетки инкубировали в капилляре при 37°C в течение 60 мин. Затем капилляр перфузировали изотоническим раствором при напряжении сдвига 30 Н/м<sup>2</sup>. Подсчитывали число клеток в исходной суспензии и в смыве после инкубации (неадгезировавшие клетки) [12]. Пунктат клеток костного мозга получали согласно стандартным методикам из эпифизарной части бедренной кости крыс [1], в суспензии клеток определяли процентное соотношение лейкоцитов. Для оценки развития стресс-реакции изучали морфологические изменения в надпочечниках крыс [2].

Степень достоверности различий оценивали по критерию Стьюдента, наличие связей между отдельными признаками – по коэффициенту линейной корреляции.

### Результаты исследования и их обсуждение

В ходе работы было установлено увеличение концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  в сыворотке крови подопытных животных по сравнению с его содержанием у крыс контрольной группы ( $2,23 \pm 0,04$  ммоль/л). Так, во 2-й группе она составила  $2,52 \pm 0,1$  ммоль/л, а в 3-й –  $2,63 \pm 0,1$  ммоль/л при  $p < 0,01$ .

Среди животных, использованных в эксперименте, наиболее выраженные изменения морфологии надпочечников по сравнению с 1-й группой отмечались в 3-й группе, подвергшейся однократной физической нагрузке (рис).



Соотношение коркового и мозгового вещества надпочечников

Диаметр клеток пучковой зоны у крыс 3-й группы составил  $5,35 \pm 0,01$  мкм по сравнению с поперечным сечением клеток животных 1-й группы –  $5,13 \pm 0,01$  мкм при  $p < 0,01$ . Митотический индекс для клеток 3-й группы равнялся  $0,14 \pm 0,01$  ‰ при  $p < 0,01$ , тогда как в 1-й группе –  $0,112 \pm 0,01$  ‰. Ионы кальция обладают таким же действием в отношении клеток, как фибронектин: улучшают адгезию клеток с их окружением, активируют пролиферацию и дифференцировку клеток [3, 10]. Морфологические изменения со стороны надпочечников у крыс 3-й группы характеризуют развитие стресс-реакции, что в свою очередь тормозит дифференцировку клеток.

Количество и соотношения различных типов лейкоцитов у интактных крыс не отличались от данных, полученных П.Д. Горизонтовым и соавт. [3]. Однако по сравнению с 1-й группой животных у крыс 2-й и 3-й групп отмечаются снижение содержания нейтрофилов и увеличение количества лимфоцитов в крови. Также были установлены достоверные различия по показателям лейкоцитарной формулы между 2-й и 3-й группами (табл. 1).

Таблица 1

## Количество разных видов лейкоцитов в цельной крови, %

Группа	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы
1	67,0±1,6	2,1±0,19	30,0±1,7	0,5±0,06	0,3±0,08
2	82,0±1,5 **○	1,8±0,24	15,0±1,5 **○	0,6±0,15	0,3±0,09
3	88,0±1,6 **○	1,8±0,19	10,0±1,2 **○	0,6±0,21	0,15±0,08

Примечание: \*\* – достоверность различий по критерию Стьюдента в сравнении с 1-й группой ( $p < 0,01$ ); ○ – то же между 2-й и 3-й группами ( $p < 0,05$ ).

В мазках костного мозга наиболее выраженные достоверные различия по сравнению с 1-й группой выявлены у животных 3-й группы. Как и в цельной крови, отмечаются увеличение количества лимфоцитов при снижении числа нейтрофилов. По этим же показателям установлены существенные различия между 2-й и 3-й группами (табл. 2).

Таблица 2

## Доля зрелых форм лейкоцитов в мазках костного мозга, %

Группа	Лимфоциты	Моноциты	Нейтрофилы	Эозинофилы	Базофилы
1	19,3±1,3	5,2±0,4	67,8±1,1	7,7±0,2	0
2	22,7±0,99	4,0±0,7	69,3±1,5	4,0±0,9**	0
3	43,0±1,9**○	2,0±0,7 **	53,0±2,4 **○	2,0±0,7**	0

Примечание: \*\* – достоверность различий по критерию Стьюдента в сравнении с 1-й группой ( $p < 0,01$ ); ○ – то же между 2-й и 3-й группами ( $p < 0,01$ ).

Алиментарная кальциевая нагрузка оказывает выраженное влияние на количественный состав белой крови и проявляется в виде лимфоцитоза и нейтропении во всех экспериментальных группах. В мазках костного мозга изменение соотношения разных форм лейкоцитов имеет ту же направленность (лимфоцитоз и нейтропения), но более выраженную – у животных 3-й группы, что может быть обусловлено гормональной стимуляцией со стороны надпочечников, вызванной интенсивной мышечной нагрузкой.

Исследование поглотительной способности лейкоцитов показало, что только у животных 3-й группы отмечается увеличение фагоцитарной активности нейтрофилов с достоверными различиями (3-я группа – 34,7±1,4 %, 1-я группа – 28,83±1,42 % при  $p < 0,01$ ) по сравнению с контролем. Анализ результатов локомоционной активности показал, что существенные изменения стимулированной миграции свойственны всем экспериментальным группам по сравнению с контрольной при  $p < 0,01$ . Площадь миграции клеток, стимулированной дрожжевым супернатантом, во 2-й группе составила 9,5±0,3 мм<sup>2</sup>, в 3-й – 10,4±0,6 мм<sup>2</sup>, а в 1-й группе равнялась 8,1±0,43 мм<sup>2</sup> при  $p < 0,01$ . По площади спонтанной миграции достоверные различия наблюдаются между 2-й группой (8,9±0,3 мм<sup>2</sup>), и 1-й группой (6,3±0,35 мм<sup>2</sup>), а также 2-й и 3-й группами (3-я группа – 7,4±0,4 мм<sup>2</sup> при  $p < 0,01$ ). В качестве тенденции проявлялось снижение адгезионных свойств у лейкоцитов животных 2-й и 3-й групп (34,4±10,1 % и 27,6±7,2 % соответственно), тогда как в 1-й группе количество адгезировавших клеток было равно 48,8±12,2 %. Возрастание фагоцитарной и локомоционной активности при снижении адгезионных свойств белых клеток крови может быть связано с увеличением концентрации Ca<sup>2+</sup> в сыворотке крови опытных животных, приводящим к активации физиологических реакций лейкоцитов.

## Выводы

1. Увеличение концентрации кальция в крови приводит к изменениям общего числа и соотношения различных форм лейкоцитов как в периферической крови, так и в костном мозге.

2. Кальциевые нагрузки вызывают повышение поглотительной способности и существенное увеличение миграционной активности лейкоцитов.

3. При интенсивной мышечной деятельности на фоне кальциевых нагрузок выявленные количественные и функциональные сдвиги становятся более выраженными.

#### Список литературы

1. Алексеев Н.А. Кинические аспекты лейкопений, нейтропений и функциональных нарушений нейтрофилов. – СПб.: Фолиант, 2002. – 416 с.
2. Виноградов В.В. Стресс: Морфобиология коры надпочечников. – Мн.: Беларуская навука, 1998. – 319 с.
3. Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И. Стресс и система крови. – М.: Медицина, 1983. – 239 с.
4. Иммунологические методы / Под ред. Г. Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
5. Суханов Б. П., Горшков А. И., Королев А.А. Влияние рационов питания с различным содержанием кальция на показатели клеточного иммунитета сенсibilизированных крыс // Гигиена и санитария. – 1995. – № 3. – С.22-23.
6. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О. Проблемы нормы в токсикологии. – М.: Медицина, 1991. – 208 с.
7. Установки дистилляционные опреснительные стационарные // Методы химического анализа соленых вод: ГОСТ 26449.1-85. – М., 1985. – С.23-29.
8. Федорова М.З., Левин В.Н. Спонтанная миграция нейтрофилов крови в смешанной популяции лейкоцитов и ее изменения под влиянием веществ аутоплазмы при различных функциональных состояниях организма // Клиническая лабораторная диагностика. – 2001. – № 5. – С. 16-19.
9. Chaturvedi P., Saxena V., Dhawan R., Chaturvedi U. Role of calcium in induction of dengue virus-specific helper T cells // Indian J. Exp. Biol. – 1995. – № 11. – P. 809-815.
10. Howerd-Ojones N. The ethical code SMMNS on experimental procedures with use of animals // The chronicle WHO. – 1985. – Vol. 39, № 3. – P. 3-9.
11. Mandeville T.H., Maxfield R. Effects of buffering intracellular free calcium on neutrophil migration through three-dimensional matrices // J. Cell. Physiol. – 1997. – N 2. – P. 168-178.
12. Mege J.-L. et al. Inhibition of granulocyte adhesion by pentoxifylline // Pentoxifylline and analogues: Effects of leukocyte function. Proceedings of the workshop. Saint Paul-de-Vence, France. – 1989. – P. 17-23.
13. Tuominen-Gustafsson H.B. Calcium signalling pathways in human neutrophils // Acta acad. aboen. B. – 1998. – № 2. – P.1-72.

### **RATIO AND PHYSIOLOGICAL PROPERTIES OF PERIPHERAL BLOOD END RED BONE MARROW'S LEUKOCYTES IN CONDITIONS OF HEIGHTENED CALCIUM CONCENTRATION OF POTABLE WATER AND MOMENTARY INTENSIVE MUSCLE ACTIVITY**

**S.V. Nadezhdin, M.Z. Fyodorova, L.F. Peristaja**

Belgorod State University, Pobedy Str., 85, Belgorod, 308015, Russia  
E-mail: nadezhdin@bsu.edu.ru

In the research there has been explored the general number and the ratio of leukocytes' different forms with the estimate of white blood cells' physiological properties under influence of alimentary calcium and intensive muscle activity. Calcium increase evokes the change of general number and ratio of leukocytes' different forms with the lymphocytosis and granulocytopenia development both in peripheral blood and in the red bone marrow. At increase of concentration of calcium in whey of blood change of functional properties of white blood cells which become more expressed after intensive muscular activity is marked.

Key words: leukocytes, calcium, muscle activity.