

УДК 591.1: 615.849.11

ПРИМЕНЕНИЕ ЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО МИКРОСПЕКТРАЛЬНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОДЕРЖАНИЯ КАТЕХОЛАМИНОВ В ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Чуян Е.Н., Махонина М.М., Костюк И.В.

В настоящее время общепризнанно, что в формировании ответа организма на действие раздражителей различной природы и интенсивности существенную роль играет симпатoadренальная система (САС), как одна из основных стресс-реализующих систем организма. Ее как центральное гипоталамическое, так и периферические звенья (в частности, адреномедулярное) активно участвуют в формировании адаптационных реакций [1, 2].

В наших предыдущих исследованиях [3] показано изменение активности САС при гипокинетическом (ГК) стрессе, изолированном и комбинированном с ГК воздействии низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты (ЭМИ КВЧ). Кроме того, поскольку на основании представления о стресс-лимитирующих системах [4] можно полагать, что защитный эффект этих систем при стрессе состоит в том, что они взаимодействуют со стресс-реализующими системами, ограничивая активацию последних, мы изучили взаимодействие САС с системой эндогенных опиоидных пептидов (ОпП) – одной из главных стресс-лимитирующих систем организма [5]. В этих экспериментальных исследованиях мы использовали гистофлуоресцентный [6, 7] и цитохимический [8] методы, адекватно характеризующие функциональную активность САС. Однако применяемые нами и другими исследователями гистофлуоресцентные методы, в основе которых лежит способность глиоксалевой кислоты образовывать при взаимодействии с моноаминами флюорофоры, позволяют в основном выявлять определенные изменения морфологических характеристик разных отделов САС при различных воздействиях, а, следовательно, не дают возможности получить точные количественные характеристик наблюдаемых изменений. Кроме того, эти методы являются очень трудоемкими и требуют сложной, дорогой аппаратуры. Наиболее простым в техническом исполнении является цитохимический анализ катехоламинов (КА) в эритроцитах периферической крови [7], позволяющий судить об изменении активности САС в целом, поскольку содержание КА в этих клетках коррелирует с уровнем адреналина и норадреналина в плазме крови [9, 10]. Однако и этот метод не лишен недостатков, поскольку является полуколичественным, а значит, связан с субъективизмом оценки полученных результатов.

Вместе с тем в настоящее время активно разрабатываются методы, позволяющие *in vivo* исследовать функциональные изменения органов и тканей на клеточном и молекулярном уровнях. Наиболее перспективными и активно разрабатываемыми подходами для решения подобных задач являются флуоресцентные методы. Основными преимуществами люминесцентной микроскопии являются высокая чувствительность (чувствительнее обычных цито- и гистохимических методов не менее чем в 1000 раз), возможность количественного измерения содержания различных химических компонентов ткани и клеток, доступность аппаратуры [11].

В связи с этим целью данной работы явилось обоснование применения микроспектрального люминесцентного анализа для определения содержания КА в лейкоцитах крови крыс при воздействиях ЭМИ КВЧ, стресса и введения налоксона, что может дать важную информацию о состоянии обмена КА в организме.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальная часть работы выполнена на 80 белых беспородных белых крысах-самцах, массой 180 – 220 граммов, полученных из опытно-экспериментального питомника Института Гигиены и Медицинской Экологии, фирма «Феникс» (г. Киев).

В экспериментальные группы отбирали животных одинакового возраста и веса со средней двигательной активностью и низкой эмоциональностью, определяемых в тесте «открытого поля». Такой отбор позволил сформировать однородные группы животных, однотипно реагирующих на воздействия. Предварительно отобранные животные были разделены на восемь групп по десять особей в каждой.

К первой группе относились животные, которые в течение девяти суток содержались в обычных условиях вивария и служили биологическим контролем (К). Крысы второй группы ежедневно подвергались 30-минутному воздействию ЭМИ КВЧ на затылочно-воротниковую область (КВЧ). Третью группу составляли крысы, находившиеся в условиях экспериментальной стресс-реакции, которая моделировалась девятисуточным ограничением подвижности (гипокинезия, ГК). Крысы четвертой группы подвергались комбинированному воздействию ГК и ЭМИ КВЧ (ГК+КВЧ).

Воздействие ЭМИ КВЧ осуществляли ежедневно с 8.30 до 11.00 часов по 30 минут в течение девяти суток с помощью одноканальных генераторов «Луч. КВЧ–071» (регистрационное свидетельство № 783/99 от 14.07.99, выданное КНМТ МОЗ Украины о праве на применение в медицинской практике в Украине): рабочая длина волны – 7,1 мм; плотность потока мощности – 0,1 мВт/см²; частота модуляции 10±0,1 Гц; габаритные размеры излучателя, выполненного в виде «точки» – 18 x 23 мм. Для осуществления контроля над наличием ЭМИ и его мощности на выходе канала излучателя использовали сервисный прибор «РАМЕД. ЭКСПЕРТ» (ТМ 0158.00.00.00. – СП). Приборы изготовлены Центром радиофизических методов диагностики и терапии «РАМЕД» Института технической механики НАНУ, г. Днепрпетровск.

ГК создавалась путем помещения крыс в специальные кассеты из оргстекла (140 × 60 × 60 мм для каждой крысы), в которых они находились в течение девяти суток по 20 часов. Ограничение подвижности крыс в клетках-пеналах вызывает стрессовую реакцию, которая зависит от степени жесткости ГК [12]. В течение четырех остальных часов проводили экспериментальные исследования, кормление и уход за животными. Полученная экспериментальная модель позволила создать одинаковую степень «жесткости» ГК для всех животных, что является необходимым условием для получения сопоставимых результатов.

Крысам пятой (К+Н), шестой (КВЧ+Н), седьмой (ГК+Н) и восьмой (ГК+КВЧ+Н) групп дополнительно с описанными экспериментальными воздействиями вводили синтетический блокатор рецепторов ОпП внутримышечно (наружная поверхность бедра) налоксон в дозе 0,4 мг/кг.

Налоксон-М 0,04% раствор по 1 мл в ампулах, разработка ГНЦЛС, г. Харьков и ХГФП «Здоров'я народу». Налоксон-М является ((-)-17-аллил-4,5(-эпокси-3,14-дигидроксиморфин-6-он) гидрохлорида дигидратом, принадлежит к группе неселективных блокаторов всех субтипов опиоидных рецепторов (ОР), устраняет центральное и периферическое действие ОпП, включая эндогенные эндорфины, проникает через гематоэнцефалический и плацентарный барьеры. Препарат вводили в течение девяти дней эксперимента в одно и то же время с 8.00 до 10.00 часов, т.е. за 30 минут до КВЧ-воздействия. Это связано с тем, что при внутримышечном введении начинает действовать через 2-3 минуты, продолжительность его действия 2,5-3 часа, средний период полувыведения составляет 1 – 1,5 часа [13].

Забор периферической крови осуществлялся в первые, третьи, пятые, седьмые и девятые сутки эксперимента путем пункции хвостовой вены.

Содержание КА в лейкоцитах периферической крови проводили по методу В. Falck [14] в модификации В.П. Новицкой [15]. Метод основан на реакции моноаминов с формальдегидными парами, в ходе которой образуются флуоресцирующие соединения, дающие ярко-зеленое свечение. Иных методов выявления моноаминов в мазках периферической крови в доступной нам литературе мы не встретили, тогда как определения уровня моноаминов в клетках крови могло бы дать важную информацию о состоянии обмена моноаминов в организме.

Установка для регистрации спектров люминесценции одиночных лейкоцитов состоит из люминесцентного микроскопа МЛ-4 со спектрализующим устройством (фотометрическая насадка ФМЭЛ-К), фотоэлектронного умножителя (ФЭУ – прибор, необходимый для преобразования света в электрический ток), аналогово-цифрового преобразователя, персонального компьютера. Для регистрации и обработки сигналов с микрофлюориметра была написана программа (автор – Попов В.В.) (рис. 1).

После инкубации в формальдегидных парах мазки крови исследовали под глицериновой иммерсией с использованием люминесцентного микроскопа на длине волны 450 нм при длине возбуждающего света 405 нм. Величину сигнала рассчитывали в условных единицах, что не является истинным показателем абсолютного количества вещества в клетке, но прямо пропорционально этому количеству. Среднее содержание КА рассчитывали после измерения яркости

свечения десяти лейкоцитов в каждом мазке крови. Автофлуоресценцию предметного стекла без мазка крови использовали как контроль и вычитали из средней величины флуоресценции лейкоцитов.

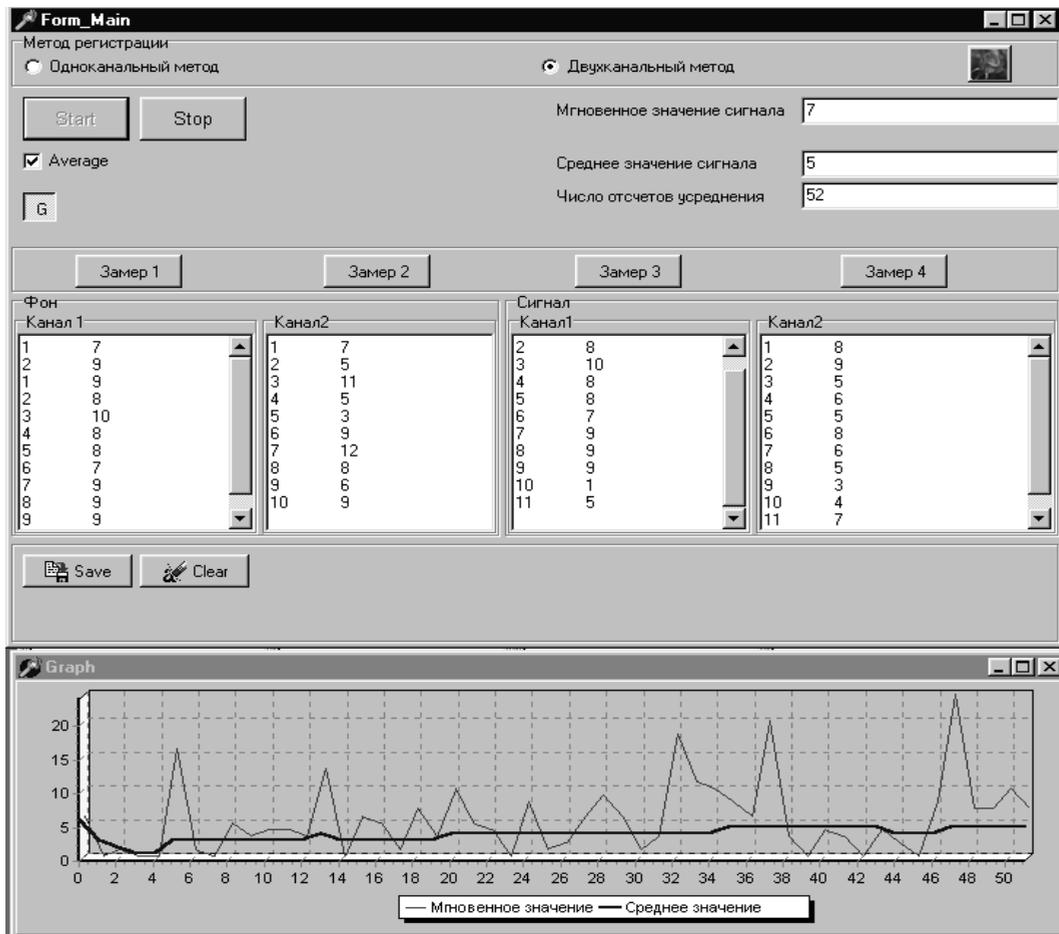


Рис. 1. Интерфейс программы регистрации сигналов микрофлуориметра.

Оценку достоверности наблюдаемых изменений проводили с помощью t -критерия Стьюдента для независимых выборок после проверки на нормальность распределения. Корреляционный анализ проводили по методу Пирсона. Расчеты и графическое оформление полученных в работе данных проводились с использованием программы Microsoft Excell [16] и программного пакета «STATISTICA – 6.0» [17].

Крыс содержали в условиях вивария при температуре 18 – 22°C на стандартном пищевом рационе и в стандартных условиях освещения (12 часов темнота: 12 часов свет). Световая фаза начиналась в 7.00 утра. Эксперименты проводились с соблюдением принципов «Европейской конвенции о защите позвоночных

животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986) и постановления первого национального конгресса по биоэтике (Киев, 2001).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У интактных животных содержание КА в лейкоцитах находилось в пределах от $98,77 \pm 9,85$ до $115,30 \pm 18,36$ усл.ед. Значения этого показателя в контрольной группе животных в течение всех суток эксперимента изменялись незначительно ($p > 0,05$). При введении антагониста ОР налоксона интактным животным содержание КА достоверно не отличалось от значений, зарегистрированных у животных первой группы (рис. 2-А). Эти результаты согласуются с нашими предыдущими исследованиями [5] и с данными о том, что в норме введение налоксона не действует на фоновое артериальное давление [18] и не влияет на порог болевой чувствительности [19]. По-видимому, это связано с тем, что высвобождение ОпП происходит не «тонически», а лишь при отклонении гомеостаза от нормы.

После девятикратного воздействия ЭМИ КВЧ на интактных животных уровень КА в лейкоцитах снизился относительно соответствующих значений этого показателя у животных контрольной группы на 40,87% ($p < 0,001$). Полученные данные согласуются с нашими предыдущими исследованиями, в которых зарегистрировано снижение содержания КА в эритроцитах периферической крови крыс под влиянием ЭМИ КВЧ тех же параметров [5].

Под влиянием вводимого налоксона у животных шестой группы, подвергнутых ежедневному КВЧ-воздействию наблюдалось достоверное повышение значений изученного показателя на 49,61% ($p < 0,05$) относительно значений у животных второй группы (КВЧ) на девятые сутки наблюдения. При этом достоверных различий с контрольной группой животных не наблюдалось (рис. 2-Б), что так же сопоставимо с изменением содержания КА в эритроцитах крови крыс [5]. Таким образом, блокада рецепторов ОпП у животных, нивелировала снижение содержания КА в клетках крови, происходящее под влиянием ЭМИ КВЧ.

При ограничении двигательной активности крыс содержание КА в лейкоцитах возросло на 20,78% ($p < 0,001$) уже к седьмым суткам наблюдения, а максимального значения достигло к девятым суткам ГК и составило 136,58% ($p < 0,001$) относительно значений в контрольной группе (рис. 2-В).

Ежедневное введение налоксона животным, подвергнутым ГК стрессу привело к еще более значительному повышению КА в лейкоцитах уже на пятые сутки ($p < 0,05$) эксперимента, а максимальные различия были зафиксированы на девятые сутки наблюдения (на 14,21%, $p < 0,001$ от уровня этого показателя у гипокинезированных животных, которым налоксон не вводился).

Данные об изменении содержания КА в лейкоцитах крови крыс при действии ГК стресса и вводимого налоксона согласуются с динамикой содержания КА в эритроцитах при тех же экспериментальных воздействиях [5].

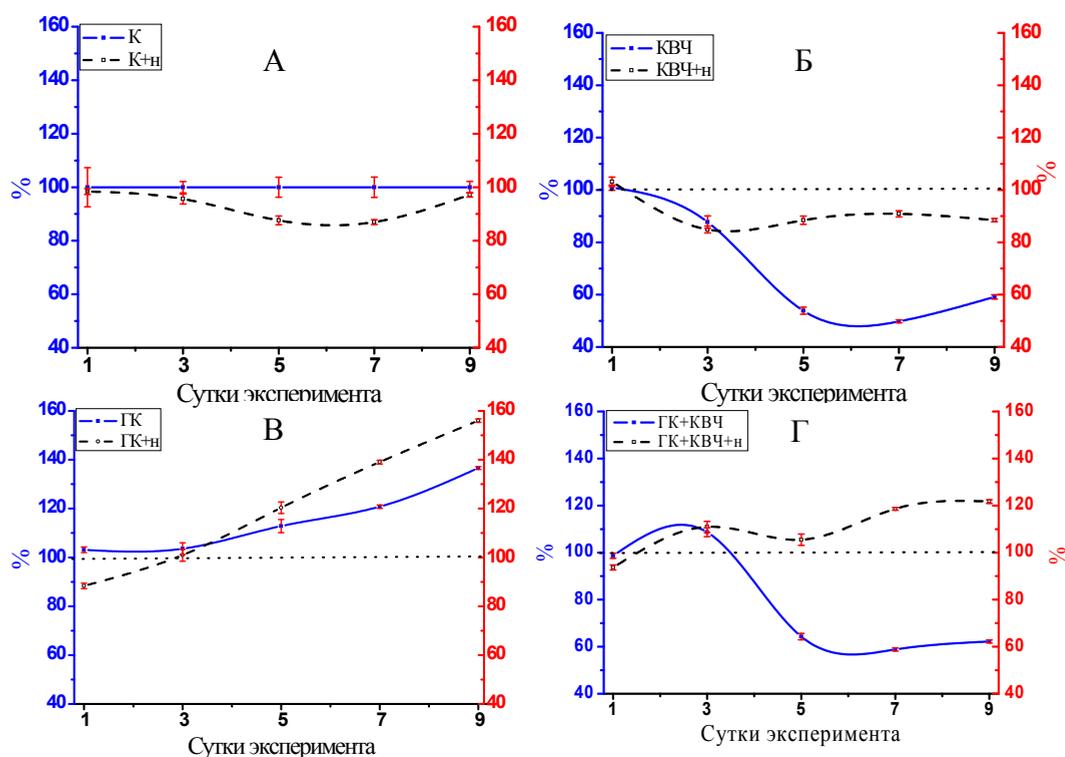


Рис. 2. Динамика содержания катехоламинов в лейкоцитах периферической крови интактных крыс (А), при воздействиях ЭМИ KBЧ (KBЧ) (Б), гипокинезии (ГК) (В), их комбинации (ГК+KBЧ) (Г) и введении налоксона (н) (в % относительно значений контрольной группы).

При комбинированном воздействии ГК и ЭМИ KBЧ уровень КА в лейкоцитах значительно отличался от значений этого показателя у животных, которые также находились в условиях ограничения подвижности, но дополнительно не подвергались KBЧ-воздействию (рис. 2-Г). Так произошло достоверное снижение содержания КА в лейкоцитах уже на пятые сутки эксперимента на 43,01% ($p < 0,05$), максимальное снижение наблюдалось на девятые сутки наблюдения и составило 54,46% ($p < 0,001$). Аналогичные изменения при сочетаном действии ГК и ЭМИ KBЧ наблюдались в динамике ЦПС КА в эритроцитах [5].

Введение налоксона животным, подвергнутым комбинированному действию ЭМИ KBЧ и ГК, напротив, привело к увеличению содержания КА на 64,05% ($p < 0,05$) относительно значений этого показателя у животных четвертой группы (ГК+KBЧ) на пятый день эксперимента, а к девятым суткам разница составила 95,70% ($p < 0,01$). При этом содержание КА достоверно не отличалось от значений данного показателя у животных второй группы, находившихся в условиях изолированного ГК стресса, что согласуется с данными по изучению содержания

КА в эритроцитах, что согласуется динамикой содержания КА в эритроцитах при тех же экспериментальных воздействиях [5].

Таким образом, в данной работе показано, что динамика содержания КА в лейкоцитах периферической крови крыс, подвергнутых воздействиям ЭМИ КВЧ, ГК, их комбинации и введению налоксона в основном соответствовала изменению цитохимического показателя содержания КА в эритроцитах крови крыс тех же экспериментальных групп [5]. Результаты корреляционного анализа (рис. 3) выявили высокую положительную корреляционную связь между этими показателями ($r=0,77$, $p<0,001$). Подобный результат, вероятно, свидетельствует о том, что при изменении концентрации КА в плазме крови происходит изменение содержания не только в эритроцитах, но и в лейкоцитах, которые также выполняют транспортную функцию.

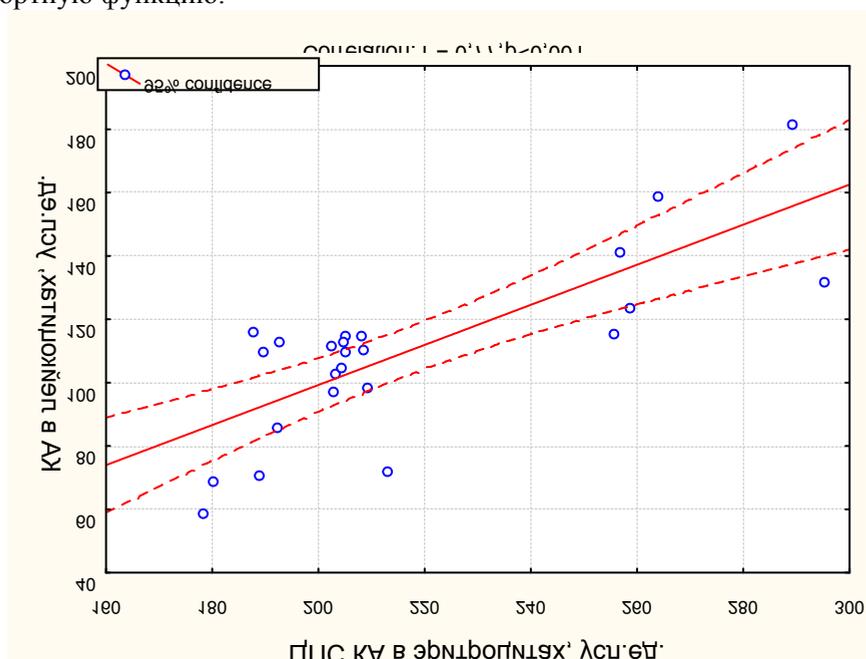


Рис. 3. Корреляционная связь между содержанием КА в лейкоцитах и цитохимическим показателем содержания (ЦПС) эритроцитов периферической крови крыс во всех группах экспериментальных животных.

Явление связывания КА с форменными элементами крови (эритроцитами, тромбоцитами, лейкоцитами) обнаружено уже давно [20]. Известно, что при увеличении концентрации КА в крови усиливается и скорость их элиминации. Увеличение содержания КА в плазме крови приводит к повышению депонирующей функции клеток крови [8]. Этому способствуют наличие β -адренорецепторов на мембранах форменных элементов крови, высокая связывающая емкость и адсорбционные свойства этих клеток. Следовательно, выявленные в наших и других исследованиях высокие положительные корреляции между содержанием КА в лейкоцитах и эритроцитах ($r = +0,77$; $p<0,001$), весовым коэффициентом

надпочечников и ЦПС КА в эритроцитах ($r = +0,88$; $p < 0,05$) [3] и лейкоцитах ($r = +0,71$; $p < 0,05$) (рис. 4), между содержанием КА в плазме крови и их уровнем в эритроцитах ($r = +0,95$; $p < 0,05$) [10], уровнем КА в мезентериальных лимфоузлах, в тимусе, в селезенке и крови крыс ($r = +0,67$; $p < 0,05$) [21] позволяют считать, что изменение содержания КА в лейкоцитах, определенное микроспектральным флуоресцентным методом, свидетельствует об изменении активности САС в целом.

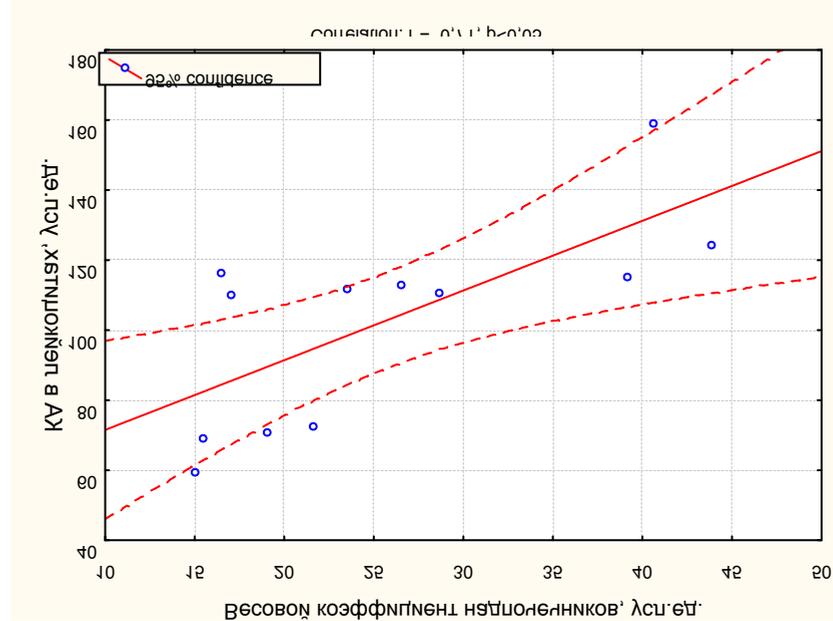


Рис. 4. Корреляционная связь между содержанием КА в лейкоцитах периферической крови крыс и весовых коэффициентов надпочечников у интактных животных, при воздействии ЭМИ КВЧ, гипокинезии и их комбинации.

Следовательно ГК стресс приводит к значительному увеличению активности САС, играющей роль пускового фактора в развитии стресса. Систематическое введение неселективного блокатора всех субтипов ОР налоксона животным, подвергнутым ГК стрессу, способствовало еще большей активации САС, свидетельствующее о том, что при ГК стрессе ОпП могут оказывать защитное действие, ограничивая чрезмерную активацию САС и предупреждая тем самым катехоламиновые повреждения организма [22-25]. Снижение активности САС, происходящее у крыс под влиянием изолированного и комбинированного с ГК миллиметрового излучения низкой интенсивности, блокировалось предварительным введением антагониста ОР – налоксона. Такое явление может быть обусловлено активацией системы ОпП при воздействии ЭМИ КВЧ.

Полученные результаты согласуются с нашими [3, 5] и литературными данными, в которых показано, что в основе изменений функционирования организма при стрессе лежит активация стресс-реализующих систем и, в том числе, САС [26], при этом увеличивается продукция КА, которые играют роль пускового фактора в развитии стресса [27].

Таким образом, применение микроспектрального люминесцентного метода определения содержания КА в лейкоцитах является адекватным для определения изменения активности САС при экспериментальных воздействиях разной природы и интенсивности. Этот метод прост в методическом отношении и при минимальных затратах времени позволяет объективно оценить результаты исследования.

ВЫВОДЫ

1. Динамика содержания катехоламинов в лейкоцитах соответствует изменению этого показателя в эритроцитах крови крыс, что подтверждается корреляционным анализом ($r = 0,77$, $p < 0,001$).

2. Применение микроспектрального люминесцентного метода определения содержания катехоламинов в лейкоцитах является адекватным для определения активности симпатoadреналовой системы.

Список литературы

1. Пшенникова М.Г. Феномен стресса. Эмоциональный стресс и его роль в патологии // Пат. физиол. – 2000. – № 2. – С. 25-31.
2. Пшенникова М.Г., Попкова Е.В., Бондаренко Н.А. и др. Катехоламины, оксид азота и устойчивость к стрессорным повреждениям: влияние адаптации к гипоксии // Росс. Физиол. журн. – 2001.
3. Чуян Е.Н. Нейроиммуноэндокринные механизмы адаптации к действию низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты: Автореф. дисс. ... доктора биол. наук: 03.00.13 / КНУ. – Киев, 2004. – 40 с.
4. Меерсон Ф.З., Пшенникова М.Г., Кузнецова Б.А. Развитие адаптации к стрессу в результате курса транскраниальной электростимуляции // Бюл. exper. биол. и мед. – 1994. – № 1. – С. 16-18.
5. Чуян О.М., Махоніна М.М., Заячнікова Т.В., Джелдубаєва Е.Р. Взаємодія симпатoadреналової і опіодергїчної систем у реакціях організму на ізольований і комбінований з гіпокнезією вплив низькоінтенсивного випромінювання надто високої частоти // Вісник проблем біології і медицини. – 2006. – №1. – С. 230-236.
6. Axelsson S., Bjoklung M., Falck B., Lindvall O., Svensson L. Glycooxylic acid condensation: a new fluorescence method for the histochemical demonstration of biogenic monoamines // Acta Physiol. Scand. – 1973. – Vol. 87, № 1. – P. 57-62.
7. Швелев В.Н., Жучкова Н.И. Простой способ выявления адренергических нервных структур в тканях человека и животных с применением раствора глиоксалевой кислоты // Арх. анат., гистол., эмбриол. – 1979. – Т. 76, № 6. – С.114-116.
8. Мардарь А.И., Кладиенко Д.П. Цитохимический способ выявления катехоламинов в эритроцитах // Лаборат. дело. – 1986. – № 10. – С. 586-590.
9. Мардарь Г.І. Депонування катехоламінів і структурні зміни в еритроцитах за умов порушення функції симпатико-адреналової системи // Фізіол. журн. – 2001. – Т. 47, № 1. – С. 53-60.
10. Малыгина В.И. Симпатoadреналовая система крыс при адаптации к гипокнезии: Автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.13 / СГУ. – Симферополь, 1989. – 23 с.
11. Самойлов В.О., Барский И.Я., Бигдай Е.В. и др. Прижизненная флюориметрия в физиологии и клинике // Мед. техника. – 1997. – № 3. – С. 3 - 7.
12. Коваленко Е.А., Гуровский Н.Н., Гипокнезия. – М.: Медицина, 1980. – 307 с.
13. Лоуренс Д.Р., Бенитт П.Н. Клин. фармакол. – 1993. – Т. 1-2. – 1358 с.
14. Falck B., Owman C. A detailed methodological description of the fluorescence method for the cellular demonstration of biogenic monoamines. Acta Univ. Lundensis, Section II. – 1965. – № 7.

15. Новицкая В.П. Модификация метода определения моноаминов в лейкоцитах на мазках периферической крови // Клиническая лабораторная диагностика. – № 1. – 2002. – С. 24-33.
16. Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Модмон, 2000. – 319 с.
17. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2006. – 312 с.
18. Holaday J. W. Cardiovascular consequences of endogenous opiate antagonism // Biochem. Pharmacol. — 1983.— Vol. 32, № 4 — P. 573—585.
19. Goldstein A., Pryor G.T., Otis L. S. et al. On the role of endogenous opioid peptides: Failure of naloxone to influence shock escape threshold in the rat // Life Sic. — 1976. — V. 18. — P. 599—604.
20. Утевский А.М., Осинская В.О. Обмен катехоламинов и некоторые механизмы адаптации // Новое о гормонах и механизмах их действия. – К.: Наукова думка, 1977. – С. 123-133.
21. Шурлыгина А.В., Труфакин В.А. Гушин Г.В., Корнева Е.А. Суточные вариации содержания адреналина, норадреналина и β -адренорецепторов в крови и лимфоидных органах здоровых крыс // Бюллетень экспер. биологии и медицины. – 1999. – Т. 128, № 9. – С. 344-346.
22. Henderson G. Effect of normorphine and enkephalin on spontaneous potentials in the vas deferens // Eur. J. Pharmacol. – 1976. – Vol. 39(2). – P. 409-412.
23. Belle E.A., D'Souza T.J., Zarzour J.Y., Lemieux M., Wong C.C. Hospital epidemic of scabies: diagnosis and control // Can. J. Public. Health. – 1979. – Vol. 70(2). – P. 133-135.
24. Millan M.J. The neurobiology and control of anxious states // Progress in Neurobiology. – 2003. – Vol. 70. – P. 83-244
25. Erdo S. L. Peripheral GABAergic mechanisms // Trends Phami. Sci. – 1985. – Vol. 6. – P. 205-208.
26. Chrousos G.P., Gold P.W. The concepts of stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis // J. A. M. A. – 1992. – Vol. 267. – P. 1244 – 1252.
27. Селье Г. Очерки об адапционном синдроме. – М.: Медицина, 1960. – 254 с.

Поступила в редакцию 20.10.2006 г.