

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ КОМБИНИРОВАННОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ГИПОКСИЧЕСКОЙ ТРЕНИРОВКИ И ПЕРЕМЕННОГО МАГНИТНОГО ПОЛЯ НА КИСЛОРОДЗАВИСИМЫЕ ПРОЦЕССЫ В НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ЛЕЙКОЦИТАХ КРОВИ КРЫС

Е. Г. Рохмистрова, О. М. Лабынцева, В. В. Липова, Е. П. Лобкаева

ФГУП «РФЯЦ-ВНИИЭФ», г. Саров Нижегородской обл.

Введение

Возрастающее воздействие неблагоприятных экологических факторов ставит задачу разработки новых методов повышения неспецифической резистентности организма как базовой функции, определяющей устойчивость к экстремальным факторам. Необходимость поиска решения проблемы сохранения функционального состояния и более полного использования физиологических резервов организма отмечается многими исследователями [1, 2].

Известно, что одним из эффективных методов универсального повышения неспецифической резистентности организма является гипоксическая тренировка [2, 3]. Вместе с тем, доказано, что магнитное поле различной частоты и интенсивности способно влиять на нормальную работу организма, причем его биологическое действие носит неспецифический характер [4]. В работах [5, 6] было показано, что магнитное поле с определенными параметрами сигнала повышает устойчивость организма к действию различных повреждающих агентов.

Одной из наиболее чувствительных систем, реагирующих на действие магнитного поля, является система крови [7]. Лейкоциты, как один из ее компонентов, обладают высокой реактивностью и участвуют в формировании неспецифических адаптационных реакций организма [8]. Функциональное состояние нейтрофильных лейкоцитов, ответственных за процесс фагоцитоза, является важным показателем неспецифической резистентности организма [9]. Среди широкого спектра проявлений функциональной активности нейтрофилов особое значение имеет кислородзависимый метаболизм, способный быстро перестраиваться в ответ на воздействие различных стимулирующих агентов [10, 11]. Это послужило основанием выбора функциональной активности нейтрофилов в качестве маркера неспецифической резистентности организма.

Данное исследование направлено на изучение комбинированного действия магнитного поля и гипоксической тренировки на кислородзависимые процессы в нейтрофильных лейкоцитах крови крыс в целях повышения неспецифической клеточной резистентности организма.

Материалы и методы исследования

Объект исследования

Исследования были проведены на белых беспородных крысах-самцах в количестве 120 штук, разделенных на шесть экспериментальных групп:

- животных группы I подвергали мнимому действию двух экспериментальных факторов (гипоксии и магнитного поля), они составили контрольную группу;
- крысы группы II проходили тренировку умеренной нормобарической гипоксией;
- животных групп III и IV подвергали мнимому действию гипоксической тренировки, после последнего сеанса которой их обрабатывали магнитным полем со средними значениями модуля магнитной индукции 1,98 и 2,93 мТл соответственно;
- крыс групп V и VI подвергали комбинированному действию умеренной гипоксии и магнитного поля (со средними значениями модуля магнитной индукции 1,98 и 2,93 мТл соответственно).

Схемы воздействия и характеристики действующих факторов

Для создания магнитного поля со средними значениями модуля магнитной индукции 1,98 и 2,93 мТл в эксперименте использовали генератор УМТИ-3Ф. Воздействие на животных магнитным полем проводили однократно в течение 30 мин.

Умеренную нормобарическую гипоксию моделировали с помощью гипоксической газовой смеси, содержащей 5 % кислорода и 95 % азота. Тренировку умеренной гипоксией проводили в течение 14 дней по 30 мин в день.

При комбинированном воздействии крысы проходили гипоксическую тренировку, после последнего сеанса, которой животных подвергали однократному действию магнитного поля.

Забор образцов крови проводили через 24 ч после последнего экспериментального воздействия.

Методы исследования

Для оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных лейкоцитов был использован тест с нитросиним тетразолием (НСТ-тест) [12], позволяющий оценить состояние кислородзависимого механизма бактерицидности полиморфноядерных лейкоцитов крови при воздействии различных факторов [13]. НСТ-тест проводили в двух вариантах: спонтанном и стимулированном зимозаном (аналог антигенного раздражения в организме) [14].

Оценка статистической значимости различий контрольных и опытных оцениваемых параметров проведена с использованием *t*-критерия Стьюдента. Изменения исследуемых показателей считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [15].

Результаты исследования

Анализ результатов проведенного НСТ-теста после тренировки крыс нормобарической гипоксией (группа II) показал, что при данном воздействии наблюдалось значимое изменение окислительного метаболизма в нейтрофилах крови крыс (см. таблицу). Число нейтрофилов, содержащих формазан (спНСТ+), в спонтанном варианте НСТ-теста было увеличено на 48 % ($p \leq 0,001$) относительно значений этого показателя у мнимо обработанных животных (группа I). Также следует отметить, что индекс активации нейтрофилов (спИАН) в спонтанном тесте был выше контрольного на 47 % ($p \leq 0,001$). При стимуляции нейтрофилов зимозаном число формазан-положительных нейтрофилов (стНСТ+) у крыс после воздействия гипоксией достоверно не отличалось от контрольного значения, значимо не изменился и индекс активации нейтрофилов (стИАН). Коэффициент метаболической активности нейтрофилов (КМАН), а также индекс фагоцитарного резерва (ИФР), характеризующий относительную способность клеток к фагоцитозу, были достоверно снижены на 62 % ($p \leq 0,001$)

и 60 % ($p \leq 0,001$) соответственно по отношению к значениям аналогичных показателей животных контрольной группы.

Увеличение показателей НСТ-теста говорит о сдвигах во внутренней среде организма [16]. Поскольку повышенный уровень спонтанной активности НСТ-теста отражает изменение функционально-метаболической активности нейтрофилов [9], можно заключить, что воздействие на крыс нормобарической гипоксией приводило к стимуляции метаболической активности нейтрофилов крови и, тем самым, активации их фагоцитарной функции.

Параметры как спонтанного, так и стимулированного варианта НСТ-теста у животных группы III, обработанных магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 1,98 мТл, не отличались от контрольного уровня. Это свидетельствует об отсутствии значимого влияния данного фактора на окислительный метаболизм в нейтрофильных гранулоцитах крови крыс.

Воздействие магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 2,93 мТл оказало значимое влияние на метаболическую активность нейтрофилов экспериментальных животных (группа IV). Так, число формазан-положительных клеток в спонтанном тесте (спНСТ+) увеличилось на 71 % ($p \leq 0,001$) по сравнению с мнимо обработанными животными. При этом индекс активации нейтрофилов (спИАН) также был достоверно выше контрольного уровня на 73 % ($p \leq 0,001$). В стимулированном варианте НСТ-теста зафиксировано достоверное увеличение числа клеток, содержащих формазан (стНСТ+), на 33 % ($p \leq 0,001$) относительно значений аналогичного параметра у контрольных животных. Индекс активации нейтрофилов (стИАН) на 34 % ($p \leq 0,001$) превысил контрольный уровень. Высокие значения показателей спонтанного и стимулированного НСТ-теста после воздействия магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 2,93 мТл свидетельствуют о возрастании потенциальных возможностей нейтрофилов в выполнении фагоцитарной функции [17].

Метаболическая активность нейтрофилов крови крыс после действия магнитного поля, гипоксии и комбинации этих факторов

| Группа | спНСТ+ | стНСТ+ | спИАН | стИАН | КМАН | ИФР |
|--------|---------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| I | 13,37±0,50 | 27,64±1,28 | 0,15±0,01 | 0,35±0,02 | 0,50±0,03 | 0,20±0,02 |
| II | 19,83±1,01*** | 29,55±1,45 | 0,22±0,01*** | 0,34±0,01 | 0,31±0,03*** | 0,12±0,01*** |
| III | 13,53±1,28 | 24,75±1,89 | 0,15±0,01 | 0,31±0,02 | 0,45±0,04 | 0,16±0,02 |
| IV | 22,93±1,32*** | 36,81±2,04*** | 0,26±0,01*** | 0,47±0,03*** | 0,37±0,03** | 0,21±0,02 |
| V | 35,32±2,15*** | 40,25±2,39*** | 0,36±0,02*** | 0,52±0,03*** | 0,10±0,05*** | 0,16±0,03 |
| VI | 10,63±0,86** | 15,83±0,97*** | 0,11±0,01*** | 0,20±0,01*** | 0,31±0,06** | 0,10±0,01*** |

Примечание: ** – $p \leq 0,01$; *** – $p \leq 0,001$ – уровень значимости отличий по отношению к контролю; спНСТ+ – число формазан-положительных нейтрофилов в спонтанном варианте НСТ-теста; стНСТ+ – число формазан-положительных нейтрофилов в стимулированном варианте НСТ-теста; спИАН – индекс активации нейтрофилов в спонтанном варианте НСТ-теста; стИАН – индекс активации нейтрофилов в стимулированном варианте НСТ-теста; КМАН – коэффициент метаболической активности нейтрофилов; ИФР – индекс фагоцитарного резерва.

Анализ результатов исследования активности спонтанного НСТ-теста в нейтрофильных гранулоцитах крови крыс, подвергнутых комбинированному действию гипоксической тренировки и магнитного поля со средним значением модуля магнитной индукции 1,98 мТл (группа V), выявил увеличение числа формазан-положительных клеток (спНСТ+) в крови животных этой группы на 164 % ($p \leq 0,001$), а индекс активации нейтрофилов (спИАН) при этом возрос на 140 % ($p \leq 0,001$), что может свидетельствовать о возрастании цитотоксического потенциала нейтрофилов вследствие увеличения их функциональной активности [18]. В стимулированном варианте НСТ-теста количество клеток, содержащих формазан (стНСТ+), возросло на 46 % ($p \leq 0,001$), при этом значения индекса активации нейтрофилов (стИАН) превысили контрольный уровень на 49 % ($p \leq 0,001$), что можно рассматривать как высокую готовность нейтрофилов к завершённому фагоцитозу [18]. Значительно снижался коэффициент метаболической активности (КМАН) – в 5 раз ($p \leq 0,001$), а индекс фагоцитарного резерва (ИФР) уменьшался на 20 % ($p \leq 0,001$), что связано с более выраженным увеличением значения параметров спонтанного варианта НСТ-теста. Таким образом, комбинированное воздействие нормобарической гипоксией и магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 1,98 мТл приводило к повышению неспецифической резистентности организма.

Адаптация к умеренной нормобарической гипоксии в комбинации с магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 2,93 мТл (группа VI) также оказала значимое влияние на фагоцитарную активность нейтрофилов крови экспериментальных животных (см. таблицу): спонтанный НСТ-тест показал снижение цитотоксического потенциала нейтрофилов. Так, процент формазан-положительных клеток (спНСТ+) был ниже контрольного уровня на 20 % ($p \leq 0,001$), а индекс активации нейтрофилов (спИАН) – на 27 % ($p \leq 0,001$). Стимулированный НСТ-тест показал возможность незначительной стимуляции метаболической активности нейтрофилов, поскольку число формазан-положительных клеток (стНСТ+) снизилось на 43 % ($p \leq 0,001$). Индекс активации нейтрофилов (стИАН) также снизился на 43 % ($p \leq 0,001$) по отношению к контрольным значениям. Показатель фагоцитарного резерва (ИФР) и коэффициент метаболической активности (КМАН) были ниже контрольных значений на 50 % ($p \leq 0,001$) и 38 % ($p \leq 0,01$) соответственно. Из приведенных данных следует, что воздействие магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 2,93 мТл на животных, предварительно подвергнутых действию нормобарической гипоксии, приводило к снижению метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов и нивелировало адаптивные реакции организма, сформированные к умеренной гипоксии.

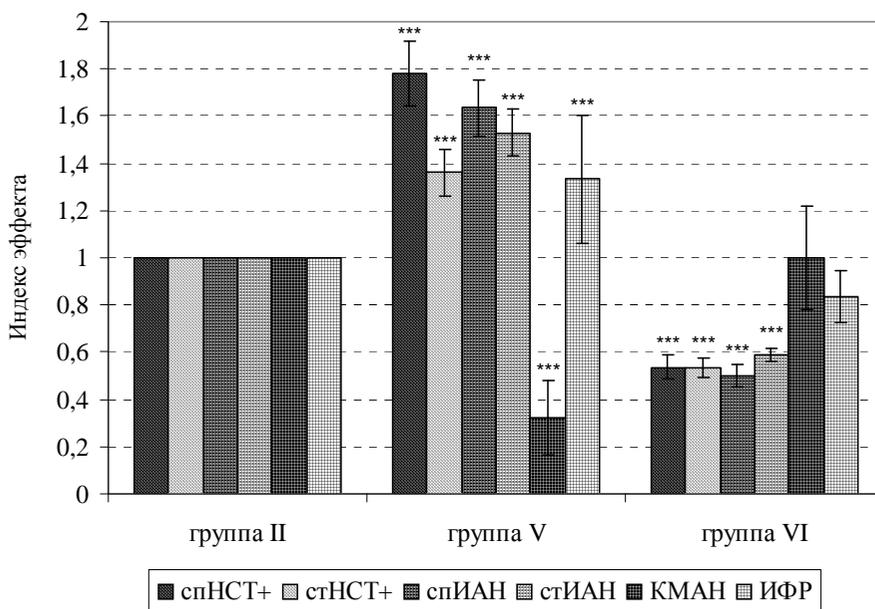
При сравнении результатов оценки изменения метаболической активности нейтрофилов, полученных в группе крыс после тренировки нормобарической

гипоксией (группа II), с аналогичными показателями у животных, подвергавшихся комбинированному действию умеренной гипоксии и магнитного поля (группы V и VI), выявлены некоторые отличия (см. рисунок).

При проведении спонтанного НСТ-теста в нейтрофилах крови крыс, подвергнутых комбинированному действию нормобарической гипоксии и магнитного поля со средним значением модуля магнитной индукции 1,98 мТл, получено увеличение процента формазан-положительных клеток (спНСТ+) на 78 % ($p \leq 0,001$), а значения индекса активации нейтрофилов (спИАН) на 64 % ($p \leq 0,001$) по сравнению со значениями аналогичных показателей у животных, подвергнутых действию только гипоксической тренировки. В стимулированном варианте НСТ-теста число нейтрофилов, содержащих формазан (стНСТ+), было больше на 36 % ($p \leq 0,001$), а значение индекса активации нейтрофилов (стИАН) выше на 53 % ($p \leq 0,001$) по сравнению со значениями животных группы II. При этом коэффициент метаболической активности нейтрофилов (КМАН) был достоверно ниже на 310 % ($p \leq 0,001$), а значение индекса фагоцитарного резерва (ИФР) превышало на 33 % ($p \leq 0,001$) показатели группы II. Из вышесказанного следует, что комбинированное воздействие нормобарической гипоксией и магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 1,98 мТл приводило к значительно более выраженному повышению неспецифической резистентности организма по сравнению с воздействием только гипоксической тренировки. Учитывая, что изолированное действие магнитного поля с указанными параметрами не оказало влияния на кислород-зависимый метаболизм нейтрофильных лейкоцитов крови крыс, полученный эффект тем более интересен.

В крови крыс группы VI процент формазан-положительных клеток как в спонтанном (спНСТ+), так и в стимулированном (стНСТ+) варианте НСТ-теста понизился на 46 % с одинаковой значимостью ($p \leq 0,001$), а индексы спонтанной и стимулированной активации нейтрофилов (спИАН и стИАН) снизились на 50 % ($p \leq 0,001$) и 41 % ($p \leq 0,001$) соответственно по сравнению с результатами группы II. Однако достоверных различий в значениях показателей фагоцитарного резерва (ИФР) и коэффициента метаболической активности нейтрофилов (КМАН) не выявлено. Результаты сравнения свидетельствуют о том, что дополнительная обработка магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 2,93 мТл крыс, адаптированных к умеренной нормобарической гипоксии, приводила к угнетению активности кислород-зависимых процессов в нейтрофилах крови. Это может быть связано с рецепторной перестройкой нейтрофильных гранулоцитов либо с выбросом из депо большого количества молодых нейтрофилов, обладающих несовершенным рецепторным аппаратом [11].

Таким образом, у животных, прошедших гипоксическую тренировку, направленность и степень изменения кислородзависимого метаболизма в нейтрофильных лейкоцитах крови после дополнительного воздействия магнитного поля зависит от выбора его параметров.



Модификация действия гипоксической тренировки магнитным полем по оценке кислородзависимого метаболизма нейтрофилов: *** – $p \leq 0,001$, уровень значимости отличий по отношению к группе II

Выводы

1. Адаптация к умеренной нормобарической гипоксии приводила к увеличению исходного уровня поглотительной способности нейтрофильных лейкоцитов периферической крови, повышая тем самым активность клеточного звена неспецифической резистентности организма.

2. Магнитное поле со средним значением модуля магнитной индукции 2,93 мТл вызывало существенную стимуляцию метаболической активности гранулярных нейтрофилов, обуславливая биоцидность фагоцитов, тогда как воздействие магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 1,98 мТл не приводило к значимым изменениям кислородзависимого метаболизма в нейтрофилах крови крыс.

3. Действие гипоксической тренировки в комбинации с магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 1,98 мТл увеличивало цитотоксический потенциал нейтрофильных лейкоцитов на 164 %, что свидетельствует о повышении неспецифической резистентности организма.

4. Воздействие на крыс, прошедших гипоксическую тренировку, магнитным полем со средним значением модуля магнитной индукции 2,93 мТл приводило к снижению метаболической активности нейтрофильных гранулоцитов крови крыс на 50 %, нивелируя тем самым предварительно выработанные адаптивные реакции организма к умеренной гипоксии.

5. Эффективность гипоксической тренировки, как одного из перспективных методов универсального повышения неспецифической резистентности организма, может быть модифицирована магнитным полем с определенными параметрами.

Литература

1. Балчугов В. А., Потехина Н. Н., Анисимов С. И. Повышение неспецифической резистентности организма с помощью КВЧ-терапии // Вестник Нижегородского государственного университета им. Н. И. Лобачевского. Сер. Биология. Вып. 2, № 4. Миллиметровые волны в биологии и медицине. 2001. С. 82–86.
2. Потиевская В. И. Использование адаптации к прерывистой нормобарической гипоксии для повышения неспецифической резистентности при заболеваниях внутренних органов: Автореф. дисс. на соискание ученой степени доктора мед. наук. М., 2004.
3. Меерсон З. Ф. Адаптация к периодической гипоксии в терапии и профилактике. М.: Наука, 1989.
4. Холодов Ю. А. Реакции нервной системы человека на ЭМП. М.: Наука, 1992.
5. Девяткова Н. С. Использование импульсных электромагнитных полей для получения радиопротекторного биологического эффекта // Тез. докл. V научно-практической конф. «Радиационные поражения, перспективы развития средств защиты от ионизирующих излучений». М., 2000. С. 28.
6. Девяткова Н. С., Лобкаева Е. П., Конопляников А. Г. Применение импульсного магнитного поля для восстановления организма человека // Сб. материалов I международ. конф. «Человек и электромагнитные поля». Саров, 2005. С. 343–346.
7. Кочиева Э. Р. Оценка действия на биологические объекты электромагнитных излучений промышленной частоты: Дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. Владикавказ, 2006.
8. Горизонтов П. Д., Белоусова О. И., Федотова М. И. Стресс и система крови. М.: Медицина, 1983.

9. Проскуряков И. Г. Изменение ферментной формулы нейтрофильных лейкоцитов при острых заболеваниях органов брюшной полости: Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. мед. наук. Краснодар, 1998.

10. Зинкин В. Ю. Фотометрический НСТ-тест с нейтрофилами крови человека и его клинико-иммунологическая значимость у больных с травмой опорно-двигательного аппарата: Автореф. на соискание ученой степени канд. мед. наук. М., 2004.

11. Зинкин В. Ю., Годков М. А. Способ количественной оценки кислородзависимого метаболизма нейтрофильных гранулоцитов крови человека // Клиническая лабораторная диагностика. 2004. № 8. С. 26–29.

12. Медицинские лабораторные технологии: Справочник / Под ред. А. И. Карпищенко. Т. 2. СПб.: Интермедика, 1999.

13. Маевский Е. И., Богданова Л. А., Селезнева И. И. и др. Установление технических характеристик и выбор режимов работы генератора низкотемпературной аргоновой плазмы (НТАП). Разработка

программ микробиологических и биомедицинских испытаний, экспериментальных моделей для оценки санирующего и ранозаживляющего воздействия НТАП // Биофизика. 2009. Т. 10. С. 198–382.

14. Нагоев Б. С., Шубич М. Г. Значение теста восстановления нитросинего тетразолия для изучения функциональной активности нейтрофилов // Лаб. дело. 1981. № 4. С. 195–198.

15. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1999.

16. Новожилова О. С. Биохимические показатели крови при бронхолегочных заболеваниях: Автореф. дисс. на соискание ученой степени канд. биол. наук. Уфа, 2007.

17. Нагоева М. Х. Показатели спонтанного НСТ-теста лейкоцитов у больных бактериальной ангиной // Сб. материалов V конгресса молодых ученых и специалистов «Науки о человеке» / Под. ред. Л. М. Огородовой, Л. В. Капилевича. Томск: СибГМУ, 2004.

18. Нагоев Б. С. Очерки о нейтрофильном лейкоците. Нальчик: Изд-во «Эльбрус», 1986.