

ORIGINAL ARTICLE

Effect of Hypothermic Exposure (+2°C, In Vitro) on the Radical Activity of Neutrophils

T.V. Polezhaeva ^{1*}, A.N. Khudyakov ¹, O.N. Solomina ¹,
O.O. Zaitseva ¹, I.G. Paturova ², S.V. Utemov ³,
K.A. Vetoschkin ³

¹ Physiology Institute at the Komi Scientific Center, 167982, Syktyvkar, Pervomayskaya str., 50, Russia

² Kirov State Medical Academy, 610027, Kirov, Karl Marx str., 112, Russia

³ Kirov Research Institute of Haematology and Blood Transfusion, 610027, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72, Russia

*E-Mail: ddic@yandex.ru

Received November 15, 2016

The possibility of using the hypothermic impact (+ 2° C, *in vitro*) as a non-drug stimulator of cell immunity was studied. Using chemiluminescence method found that in women with physiological pregnancy the radical response of neutrophils to a foreign object enhanced after cold exposure. The mechanism of radical activity is inhibited in childbirth and the threat of premature birth. In the acute period of cold injury the immunological (radical) reactivity of neutrophils venous blood of men lowered. The restoration of adaptive mechanisms starts with treatment and require subsequent rehabilitation period. This is confirmed by the weak radical response of neutrophils to a foreign object after hypothermic exposure.

Key words: hypothermic effect, radical activity of neutrophils, physiological pregnancy, childbirth, threat of premature birth, cold injury

Одним из ведущих направлений современной иммунологии является поиск немедикаментозных стимуляторов клеточного и гуморального звеньев иммунитета. Перспективным направлением в решении данного вопроса является использование различных физических факторов. В качестве компонента комплексной терапии воспалительных заболеваний, для коррекции иммунной недостаточности используют лазерное излучение. В частности, показано, что при низкоинтенсивном лазерном излучении с постоянной и переменной генерацией импульса происходит повышение функциональной активности нейтрофилов при хламидиозе (Gizinger, Dolgushin, 2008). Известно также положительное влияние на функциональное состояние нейтрофилов крови электромагнитных колебаний. Так, в экспериментах *in vitro* на крови больных раком молочной железы выявлены особенности действия различных физических факторов электромагнитной природы на показатели синтетической и фагоцитарной активности нейтрофилов (Shejko *et al.*, 2004). Мобилизация функционального состояния нейтрофилов крови происходит при определенных режимах воздействия переменного магнитного поля, низкоинтенсивного лазерного и светодиодного излучения и их сочетания. Исследовано влияние на функциональное состояние клеток различных токсонимических рангов действия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высоких частот. Установлено, что указанное воздействие не вносит заметных изменений в формирование гуморального иммунного ответа, но снижает выраженность клеточно-опосредованного иммунитета - снижает фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови интактных животных и изменяет функциональное состояние нейтрофилов очага воспаления (Gareev *et al.*, 2001).

Использование кратковременных экстремальных общих криогенных воздействий, лежащих в основе повышения общей неспецифической резистентности организма человека широко известно. Результаты научных исследований российских и европейских авторов демонстрирует универсальность методики

экстремальной криотерапии и перспективность ее использования в программах первичной и вторичной профилактики широкого круга заболеваний. Методика общей воздушной криотерапии организма человека улучшает состояние иммунитета: повышаются содержание лизосомальных белков в гранулоцитах периферической крови и уровень IgA, снижаются уровни сывороточных интерлейкинов (IL-1, IL-6) и фактора некроза опухоли (TNF- α), увеличивается число Т-лимфоцитов и активируется продукция противовоспалительных цитокинов (Agadzhanian *et al.*, 2012). В условиях *in vitro* показано, что экспозиция клеток крови здоровых людей при +2°C повышает функциональную активность нейтрофилов, а их кратковременное охлаждение до -2°C снижает ее (Polezhaeva *et al.*, 2015). Применение гипотермического фактора *in vitro* в качестве стрессового стимулятора функции клеток может стать дополнительным способом активации иммунитета, когда это необходимо.

Одним из информативных методов оценки интенсивности радикального ответа нейтрофила на чужеродный агент является хемилюминесцентный метод. Необходимо отметить, что среди лейкоцитов основным продуцентом активированных форм кислорода являются нейтрофилы, поэтому при оценке хемилюминесценции крови интенсивностью свечения моноцитов и лимфоцитов пренебрегают (Panasenko *et al.*, 2005). С учетом выше сказанного целью настоящей работы явилось определение влияния гипотермического воздействия (+2°C) *in vitro* на уровень радикальной активности нейтрофилов в норме и при патологии с помощью хемилюминесцентного метода.

MATERIALS AND METHODS

Выполнены две экспериментальные серии. В первой - проведено сравнительное изучение уровня радикального ответа нейтрофилов периферической крови практически здоровых небеременных женщин репродуктивного возраста (без учета фазы цикла, n=12), беременных женщин всех триместров физиологически протекающей беременности (n=53), женщин в состоянии угрозы преждевременных родов (УПР, n=22) и женщин в первый период родов (n=10).

Во второй серии изучена радикальная активность нейтрофилов практически здоровых доноров-добровольцев мужчин (n=10) и пациентов (мужчин) с отморожениями III и IV степени кистей и стоп (n=6) при поступлении в стационар, на фоне лечения и при выписке из стационара.

В качестве стимулятора активности нейтрофилов использовали частицы латекса диаметром 0.08 мкм («Sigma-Aldrich», Германия).

Радикальную активность нейтрофилов оценивали на биолюминометре БХЛ-07 (ЦНИЛ НГМА; «ИМБИО» Нижний Новгород) до и после холодового воздействия. При автоматическом вычете уровня шума регистрировали следующие параметры: I_{max} (мВ) – максимальное значение интенсивности хемилюминесценции; S (мВ×сек) – светосумму за 30 мин, определяемую как площадь под кривой свечения пробы; T (с) – время регистрации I_{max} . Для этого 0.1 мл крови смешивали с 0.05 мл раствора латекса. Затем в измерительную кювету вносили 0.05 мл подготовленной пробы, добавляли 0.95 мл раствора Хенкса и 0.2 мл рабочего раствора люминола. Кювету помещали в измерительную камеру, включали режим перемешивания и термостатирования (+37°C). Измерение проводили в течение 30 мин.

В ряде исследований дополнительно оценивали поглотительную способность нейтрофилов по модифицированному методу С.Г. Потаповой и соавт. (Svedentsov et al., 2012) с использованием инертных частиц латекса, которые в соотношении 1:10 разводили средой Хенкса («Биолот», Россия). Разведенный латекс (0,05 мл) смешивали с 0,1 мл крови, помещали в термостат («Гном», Россия) при +37°C на 30 мин и через каждые 10 мин перемешивали. Мазки последовательно окрашивали красителями Май-Грюнвальда (эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду «Минимед-стандарт», Россия) и Романовского (азур-эозин по Романовскому «Минимед-стандарт», Россия) соответственно в течение 40 с и 30 мин. Методом световой микроскопии (объектив x100, окуляр x10) подсчитывали 100 нейтрофилов, определяли долю клеток с поглощенными частицами латекса.

Для охлаждения крови до +2°C ее разливали по 2 мл в микропробирки и выдерживали при указанной температуре в течение 30 мин в бытовом электрическом холодильнике «Саратов-1615М».

Результаты исследования подвергнуты статистическому анализу с использованием программы BioStat2009 Professional. 5.8.4. (фирма Analyst Soft). Нормальность распределения рядов определяли по критерию Шапиро-Уилка. Результаты представлены в виде медианы, 25-ого и 75-ого процентилей. Для выявления статистической значимости различий ($p < 0.05$) между группами использовали непараметрический критерий Мана-Уитни, в группе между данными до и после гипотермического воздействия критерий Вилкоксона (Glanz, 1998).

RESULTS AND DISCUSSION

При анализе полученных данных первой экспериментальной серии необходимо отметить, что в отношении функциональной активности нейтрофилов при беременности данные литературы немногочисленны и неоднозначны. Согласно одним авторам, при беременности у нейтрофилов снижается способность к хемотаксису (Björkstén et al., 1978) и к фагоцитозу (Lampé et al., 2015). Это снижение рассматривается авторами, как часть материнской иммуносупрессии, которая имеет важное значение для защиты полуаллогенного плода. Другие авторы утверждают, что функциональная активность нейтрофилов при беременности, наоборот, возрастает. В частности показано, что при беременности возрастает количество НСТ-позитивных нейтрофилов и оно достигает максимума в родах (Mayanskij, Mayanskij, 1989), либо возрастает способность нейтрофилов поглощать микрочастицы латекса при стабильном уровне НСТ-позитивных нейтрофилов (Dmitrieva et al., 2012). Отмечено, что при физиологической беременности врожденный иммунитет активизируется, подобно тому, как этот происходит при сепсисе (Naccasha et al., 2001). При этом показатели, отражающие базовое содержание внутриклеточных активных форм кислорода, интенсивность окислительного взрыва, а также значения индекса

стимуляции были выше у женщин с острыми инфекциями, чем у здоровых беременных женщин, у небеременных женщин данные показатели были ниже чем при беременности. Авторы установили, что физиологически протекающая беременность связана с фенотипическими и метаболическими изменениями гранулоцитов и моноцитов, которые подобны тем, что возникают при инфекции, но менее выражены.

Установлено, что при беременности относительное содержание нейтрофилов повышается и достигает максимального значения в первый период родов, при угрозах преждевременных родов (УПР) количество нейтрофилов, соответствует второму и третьему триместрам физиологически протекающей беременности (табл. 1). При оценке поглотительной способности нейтрофилов установлено, что при наступлении беременности, на протяжении всего ее физиологического течения и в родах уровень фагоцитарноактивных нейтрофилов повышается и не изменяется статистически значимо при УПР. Данное звено иммунного ответа является наиболее ранним в эволюционном плане и, вероятно, механизмы его обеспечивающие достаточно стабильны.

Показано, что радикальный ответ нейтрофилов на появление в среде чужеродного объекта – латекса у небеременных женщин соответствует уровню первого триместра беременности и статистически значимо снижается в первый период родов (табл. 2). У женщин в состоянии УПР радикальная активность нейтрофилов значимо выше чем у женщин в родах. Таким образом, полученные результаты согласуются с данными литературы о том, что при преждевременных родах в нейтрофилах и моноцитах повышается продукция кислорода и свободных радикалов (Gervasi *et al.*, 2001).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что при физиологически протекающей беременности к моменту наступления родов повышается относительно других популяций лейкоцитов уровень нейтрофилов и сохраняется высокая способность к образованию фагосом. Возникает вопрос для дискуссии – почему в родах

при высоком уровне нейтрофилов в периферической крови и их высокой фагоцитарной активности радикальный ответ на чужеродный агент значимо снижен. Ряд исследователей полагает (Lurpi *et al.*, 2004), что начало родов связано с миграцией лейкоцитов, в том числе нейтрофилов в репродуктивный тракт. Периферические лейкоциты, войдя в миометрий, продуцируют цитокины, которые вносят свой вклад в инициацию родов (Shynlova *et al.*, 2013), возможно, участием в созревании шейки матки (Chwalisz, 1994). Вероятно, в большей степени миграции подвержена «популяция» нейтрофилов с высоким потенциалом радикального ответа, оставшиеся в кровяном русле сохраняют высокую фагоцитарную активность и обладают низкой радикальной.

Выявлено также, что способность нейтрофилов образовывать фагосомы с латексом (фагоцитарная активность) у разных групп женщин при гипотермии (+2°C, 30 мин) не меняется, что еще раз свидетельствует о стабильности механизмов такой формы двигательной активности, как цитоплазматическая экспансия – образование псевдоподий за счет актина.

По показателям хемилиминограммы выявлено, что гипотермическое воздействие (+2°C, 30 мин) способствовала более выраженному радикальному процессу у небеременных женщин, при наступлении беременности и до ее естественного завершения – родов (рис. 1). В родах и при УПР охлаждение клеток не оказывает данного эффекта. Полученные результаты свидетельствуют о том, что резервные возможности иммунного ответа организма женщины при физиологически протекающей беременности задействованы не полностью и холодное воздействие +2°C, выступая в роли стрессора, вызывает их активацию, в то время как в родах и при УПР у нейтрофилов периферической крови выявлены признаки перенапряжения адаптивных механизмов.

Во второй серии изучена радикальная активность нейтрофилов практически здоровых доноров-добровольцев мужчин и пациентов (мужчин) с отморожениями III и IV конечностей. Необходимо

отметить, что несмотря на современные успехи в терапии пострадавших от холода, результаты их лечения остаются удовлетворительными и выведение от 20 до 84% больных на инвалидность после перенесенных глубоких отморожений конечностей имеет большую социально-экономическую значимость. В острый период холодовой травмы адаптивные механизмы организма находятся на уровне перенапряжения, что проявляется в снижении иммунологической реактивности организма (Gol'derova, Zakharova, 2007). В наших исследованиях мы подтвердили данную особенность (рис. 3). Действительно в первые 1-4 дня после отморожения уровень радикального ответа нейтрофилов на латекс был статистически значимо ниже чем у здоровых мужчин. И если нейтрофилы последних реагировали на гипотермическое воздействие повышением радикального ответа, то у пациентов с отморожениями радикальный ответ снижался. Согласно данным литературы через 7-10 дней после отморожения пациентам рекомендуется назначение иммуностимуляторов клеточного и гуморального иммунитета (Gol'derova, Zakharova, 2007).

Установлено, что на фоне комплексного лечения пациентов, включающего отечественный иммуномодулятор полиоксидоний радикальный ответ нейтрофилов существенно возростал, достигая уровня здорового донора, при этом появлялась положительная реакция на гипотермию – повышался уровень радикальной активности, что свидетельствует о появлении у пострадавших с глубокими отморожениями конечностей резервных адаптационных механизмов. Однако, несмотря на определенный положительный эффект трансфузионной терапии, пострадавшие и в дальнейшем нуждаются в проведении иммунореабилитационных мероприятий. Об этом свидетельствуют данные о том, что при выписке из стационара радикальный ответ нейтрофилов на чужеродный объект был ниже, чем на фоне лечения, но выше, чем при поступлении в стационар и статистически значимо повышался при гипотермическом воздействии. Выявленная особенность указывает на необходимость проведения дальнейших реабилитационных мероприятий.

Table 1. Относительное содержание и фагоцитарная активность нейтрофилов венозной крови беременных женщин, женщин в родах и с угрозой преждевременных родов (% , медиана, 25-й и 75-й центили)

Группы женщин		n	Относительное содержание	Фагоцитарная активность
№	Этап репродукции			
1	Отсутствие беременности	10	49 (40; 58)	63 (49; 75)
2	Беременность I (5-13 нед)	9	58 (56.5; 64.8)	96 ¹ (94.3; 98.8)
3	Беременность II (14-27 нед)	6	70 ^{1,2} (67.5; 75)	94 ¹ (92; 97)
4	Беременность III (28-38 нед)	9	65 (59; 75.3)	87 ^{1,2} (81.3; 92)
5	Роды (I период)	10	77.5 ^{1,2,4} (74; 85)	94 ¹ (92; 99)
6	Угроза преждевременных родов (23-35 нед)	9	66 (59.5; 83.8)	96 ¹ (88.3; 97)

Примечание - различие с указанной группой статистически значимо по критерию Мана-Уитни ($p < 0.05$).

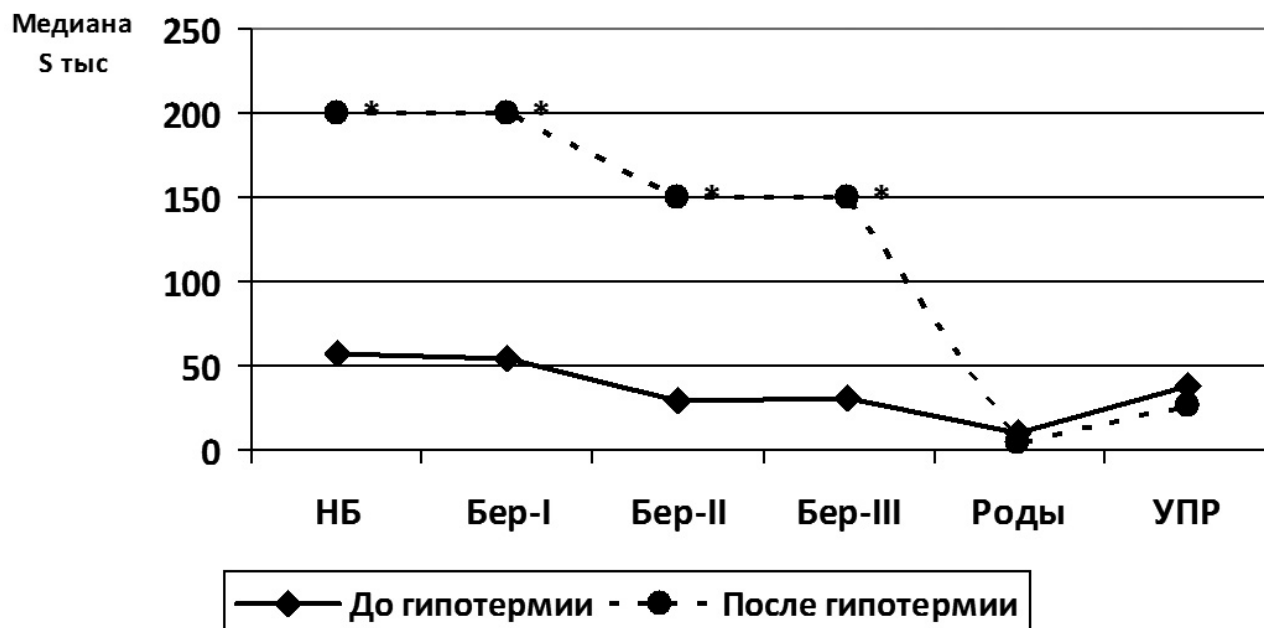


Figure 1. Влияние гипотермии (+2°C) на радикальный ответ нейтрофилов небеременных женщин (НБ), беременных разных триместров (Б-I, Б-II, Б-III), женщин в родах и при угрозах преждевременных родов (УПР) по показателю медианы светосуммы (тыс.). * - статистически значимое отличие в группе от данных до гипотермического воздействия по критерию Вилкоксона ($p < 0.05$), трансформированных пустым вектором (pVI); растений, трансгенных по *gox* (линии L, F, M).

Table 2. Показатели хемилюминограмм (S , I_{max} , T_{max}), характеризующих образование свободных радикалов нейтрофилами венозной крови беременных женщин, рожениц и беременных с угрозой преждевременных родов (медиана, 25-й и 75-й центили).

Группы женщин		n	S (МВ/с), тыс	I_{max} (МВ)	T_{max} (с)
№	Этап репродукции				
1	Отсутствие беременности	12	58 (44; 65)	57 (34; 62)	300 (65; 900)
2	Беременность I (5-13 нед)	14	54,8 (32.1; 90.2)	82.5 (36; 150.5)	217 (92; 615)
3	Беременность II (14-27 нед)	14	29.2 (16.1; 55.1)	30.5 (21; 71)	975 ^{1, 2} (750; 1200)
4	Беременность III (28-38 нед)	15	30.9 (18.9; 61.5)	40 (14; 92.8)	662 (242.5; 1046.5)
5	Роды (I период)	10	16.2 ^{1, 2, 4} (10.7; 25.7)	21 ^{1, 2, 3, 4} (13.5; 25)	1150 ^{1, 2, 4} (1050; 1450)
6	Угроза преждевременных родов (23-35 нед)	22	42 ⁵ (25.1; 54.3)	34 ⁵ (21.8; 51.3)	921 ^{1, 2, 5} (172; 1256)

Примечание: S - светосумма за 30 мин, определяемая как площадь под кривой свечения пробы; I_{max} - максимальное значение интенсивности хемилюминесценции; T - время регистрации достижения I_{max} ; различие с указанной группой статистически значимо по критерию Мана-Уитни ($p < 0.05$).

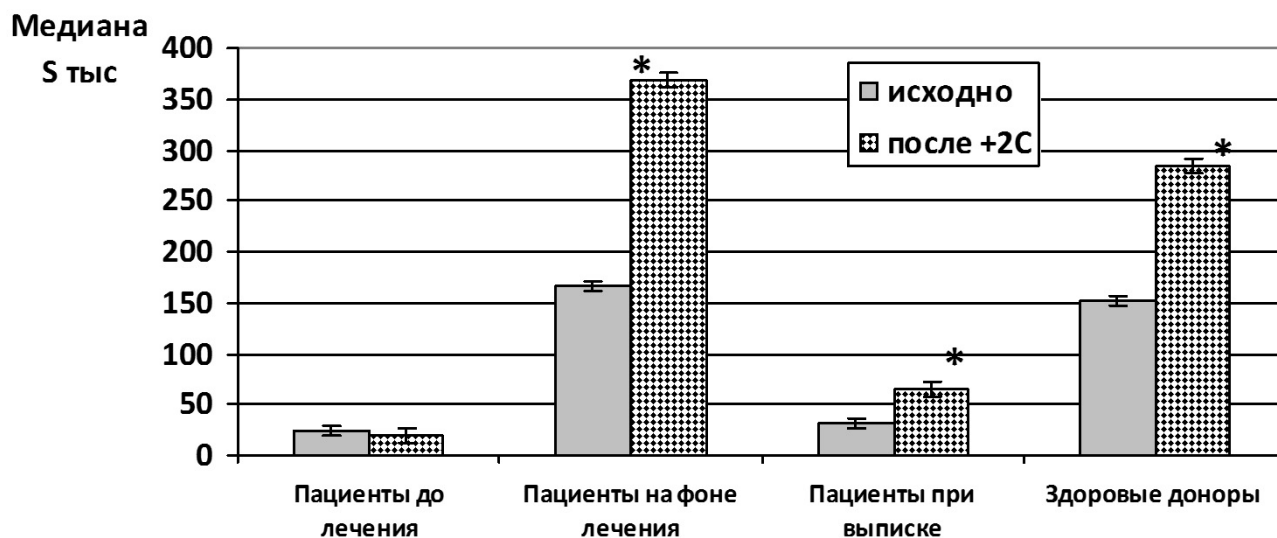


Figure 2. Влияние гипотермии (+2°C) на радикальный ответ нейтрофилов практически здоровых доноров-мужчин, пациентов с отморожениями конечностей при поступлении в стационар, на фоне лечения и при выписке по показателю медианы светосуммы (тыс.). * - статистически значимое отличие в группе от данных до гипотермического воздействия по критерию Вилкоксона ($p < 0.05$).

CONCLUSION

Изучена возможность использования гипотермического воздействия (+2°C) в качестве немедикаментозного стимулятора *in vitro* клеточного иммунитета. Показано, что у женщин при физиологически протекающей беременности до наступления естественных родов холодное стресс-воздействие повышает радикальный ответ нейтрофилов, в родах и при угрозах их преждевременного наступления механизмы обуславливающие радикальную активность нейтрофилов ингибированы. В острый период холодной травмы иммунологическая (радикальная) реактивность нейтрофилов венозной крови мужчин снижена. На фоне комплексного лечения (в том числе при использовании иммуномодулятора полиоксидония) у нейтрофилов появляется реакция на гипотермическое воздействие, что свидетельствует о восстановлении адаптивных механизмов организма.

REFERENCES

Agadzhanyan N.A., Bykov A.T. and Medalieva R. KH. (2012) Fiziologicheskie i terapevticheskie aspekty ehkstremaal'nykh obshhikh vozdushnykh kriogennykh

vozdeystviy. *Ekologiya cheloveka*, **2**, 15-21. (In Russian).

Björkstén B., Söderström T., Damber M., von Schoultz B. and Stigbrand T. (1978) Polymorphonuclear leucocyte function during pregnancy. *Scand. J. Immunol.*, **8**, 257-262.

Chwalisz K. (1994) The use of progesterone antagonists for cervical ripening and as an adjunct to labour and delivery. *Hum Reprod.*, **9**, 131-161.

Dmitrieva S.L., Khlybova S.V. and Tsirkin V.I. (2012) Rol' adrenergicheskogo mekhanizma v regulyatsii sokratitel'noj deyatelnosti matki pri beremennosti i v rodakh. *Vyatskij meditsinskij vestnik*, **1**, 50-53. (In Russian).

Gapeev A.B., Lushnikov K.V. and Sadovnikov V.B. (2001) Vliyanie krajnevysokochastotnogo ehlektromagnitnogo izlucheniya nizkoj intensivnosti na fagotsitarnuyu aktivnost' nejtrofilov perifericheskoy krovi v sistemakh in vivo i in vitro. *Vestnik novykh med. tekhnologij*, **8**, 14-16. (In Russian).

Gervasi M., Chaiworapongsa T., Naccasha N., Blackwell S., Yoon B., Maymon E. and Romero R. (2001) Phenotypic and metabolic characteristics of maternal monocytes and granulocytes in preterm

- labor with intact membranes. *Am J Obstet Gynecol.*, **185**, 1124-1129.
- Gizinger O.A., Dolgushin I.I. (2008) Nizkointensivnyj lazer v korrektsii disfunktsij nejtrofil'nykh granulotsitov patsientov s tservitsitom khlamidijnoj ehtiologii v ehksperimente. *Immunologiya*, **6**, 346-349. (In Russian).
- Glanz S. (1998) Mediko–biologicheskaya statistika. M., Praktika, 459 p. (In Russian).
- Gol'derova A.S., Zakharova F.A. (2007) Sostoyanie immunnogo statusa bol'nykh s otmorozheniyami v respublike Sakha (Yakutiya). *Yakutskij meditsinskij zhurnal*, **3**, 26-28.
- Lampé R., Kövér Á., Szűcs S., Pál L., Árnýas E., Ádány R. and Póka R. (2015) Phagocytic index of neutrophil granulocytes and monocytes in healthy and preeclamptic pregnancy. *J Reprod Immunol*, **107**, 26-30.
- Luppi P., Irwin T., Simhan H. and Deloia J. (2004) Expression on circulating leukocytes increases in preparation for parturition. *Am J Reprod Immunol.*, **52**, 323-329.
- Mayanskij A.N., Mayanskij D.N. (1989) Ocherki o nejtrofile i makrofage. Novosibirsk: Nauka. 344 p. (In Russian).
- Naccasha N., Gervasi M., Chaiworapongsa T., Berman S., Yoon B., Maymon E. and Romero R. (2001) Phenotypic and metabolic characteristics of monocytes and granulocytes in normal pregnancy and maternal infection. *Am J Obstet Gynecol.*, **185**, 1118-1123.
- Panasenko L.M., Krasnova E.I. and Efremov A.V. (2005) Klinicheskoe znachenie khemilyuminestsentnogo otveta lejokotsitov krovi pri koklyushe. *Byulleten' SO RAMN.* **117(3)**. 44-47. (In Russian).
- Polezhaeva T.V., Zajtseva O.O., KHudyakov A.N. and Solomina O.N. (2015) Vliyanie kholodovogo vozdejstviya in vitro na fagotsitarnuyu aktivnost' nejtrofilov krovi cheloveka. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine*, **1**, 29-32. (In Russian).
- Shejko E.A., Shikhlyarova A.I., Zlatnik E.Yu. Zakora G.I. and Nikipelova E.A. (2004) Elektromagnitnye kolebaniya kak faktor, moduliruyushhij funktsional'noe sostoyanie nejtrofilov krovi. *BEBiM.*, **137**, 569-572. (In Russian).
- Shynlova O., Nedd-Roderique T., Li Y., Dorogin A. and Lye S. (2013) Myometrial immune cells contribute to term parturition, preterm labour and post-partum involution in mice. *J Cell Mol Med.*, **17**, 90-102.
- Svedentsov E.P., Laptev D.S., Polezhaeva T.V., Zajtseva O.O., KHudyakov A.N. and Solomina O.N. (2012) Sokhranenie lejokotsitov v usloviyakh umerenno nizkikh temperatur. *Fiziologiya cheloveka*, **38**, 124-128. (In Russian).