

УДК 616.379-008.64-07:616.115.34-07

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРІЙНОЇ КРОВІ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ У ЩУРІВ****І. Бродяк, Н. Сибірна***Львівський національний університет імені Івана Франка  
вул. Грушевського, 4, м. Львів 79005, Україна*

Аналіз співвідношення клітинних елементів у лейкоцитарній формулі периферійної крові засвідчив, що в разі експериментального цукрового діабету розвивається інтоксикація, пов'язана з автоімунними процесами. З'ясовано, що у тварин з такою хворобою, яким вводили L-аргінін та аміногуанідин, показники лейкоцитарної формули та лейкоцитарних індексів нормалізуються до рівня значень у контрольних щурів, що не отримували зазначених речовин. Уведення L-аргініну та аміногуанідину приводило до суттєвого зниження індексу апоптозу у контрольних та хворих тварин. Це свідчить про коригувальний та протекторний ефекти цих чинників.

*Ключові слова:* мононуклеарні лейкоцити, нейтрофільні гранулоцити, апоптоз, L-аргінін, аміногуанідин, експериментальний цукровий діабет.

Імунологічну реактивність лейкоцитів крові можна схарактеризувати їхніми морфологічними особливостями, структурною організацією та функціональним станом [16]. За кількісно-якісною оцінкою змін лейкоцитарної формули периферійної крові формуються уявлення про адаптаційні реакції організму. Інтегральні гематологічні індекси, за основу яких узяті визначення співвідношення клітин формули крові, дають змогу в динаміці оцінити стан неспецифічної та специфічної ланок імунітету, визначити ступінь інтоксикації організму та ефективність терапії низки захворювань [4, 9]. Отже, показники лейкоцитарної формули та лейкоцитарних індексів периферійної крові є важливими додатковими методами дослідження захворювань різної етіології, у тому числі й цукрового діабету (ЦД).

Ми довели, що ЦД першого типу супроводжується змінами в лейкоцитарній формулі крові: збільшується вміст лімфоцитів та зменшується кількість нейтрофільних гранулоцитів (НГ) [13]. Стан протиінфекційного захисту організму значно залежить від ефективної дії НГ крові, які мають антимікробну цитотоксичність, високу реактивність, беруть участь у первинних реакціях імунного гомеостазу. Зміни в загальній кількості лейкоцитів та в їхньому співвідношенні, порушення їхніх функціональних властивостей є імовірними причинами порушення імунного статусу хворих на ЦД першого типу.

Програмована смерть клітин, або апоптоз, – актуальне питання клітинної біології. Особливе місце посідає проблема з'ясування механізмів апоптозу поліморфно-ядерних та мононуклеарних лейкоцитів, які беруть участь в ефективному (за участю мікрофагально-макрофагальної системи) та афективному (за участю лімфоцитів) захистах від інфекційних захворювань і стабілізації внутрішнього середовища організму. Дослідження в цій галузі є досить інтенсивними, оскільки вирішення проблеми тривалості життя клітини прямо стосується до підтримання гомеостазу в багатоклітинному організмі і, відповідно, біомедичної корекції цього процесу у випадку різних захворювань. Апоптоз можуть запускати як специфічні (цитокіни, гормони), так і неспецифічні сигнали (віруси, радіація, вплив активних форм кисню). У разі дії цих чинників на клітину відбувається активація

багатьох сигнальних шляхів, які приводять до нейтралізації негативних впливів чи до елімінації клітини. В розвитку апоптичного процесу беруть участь сигнальні молекули, які регулюють і інші важливі функції організму [5].

До фізіологічних чинників, які можуть запускати в клітинах апоптичну програму, належать оксид азоту (NO). Оксид азоту – ключова сигнальна молекула, яка регулює функції серцево-судинної, нервової та імунної систем організму. Головною функцією оксиду азоту в імунокомпетентних клітинах крові (ІКК) є збалансування ефекту проліферації клітин, елімінація пошкоджених та неопластичних клітин, селекція лімфоцитів, за якої відбувається виділення аутореактивних клонів [1, 3]. Активація апоптозу в лейкоцитах периферійної крові – один із ключових моментів розвитку багатьох захворювань людини, таких як атеросклероз, СНІД, атрофія органів та ін. Унікальна хімічна природа і велика кількість внутрішньоклітинних мішеней для NO та його фізіологічно активних окислено-відновлених форм породжують питання: як і наскільки специфічно опосередковується цитотоксична дія оксиду азоту на клітину. Дослідження впливу донорів NO та інгібіторів синтезу цієї молекули є перспективним напрямом для вивчення механізмів запуску та реалізації апоптичної програми в чутливих клітинах-мішенях. Один із підходів для з'ясування цитотоксичної активності оксиду азоту – використання експериментальних моделей [5].

Наша мета – дослідження морфофункціонального стану мононуклеарних та поліморфно-ядерних клітин периферійної крові у контрольних щурів і з експериментальним цукровим діабетом (ЕЦД) на фоні введення головного субстрату NO-синтази – L-аргініну та аміногуанідину (AG) – селективного інгібітора індукційної ізоформи синтази оксиду азоту (iNOS). Головними завданнями роботи було виявлення змін у лейкоцитарній формулі, імунореактивності лейкоцитів крові (за гематологічними інтегральними індексами) та у процесі апоптозу цих клітин під впливом системи L-аргінін / NO.

Експерименти проведено на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 120–140 г. Дослідження на лабораторних тваринах виконували згідно з етичним кодексом МОЗ України. Тваринам забезпечували вільний доступ до їжі та води з перебуванням у стандартних умовах (12-годинна зміна світла і темряви). ЕЦД у щурів викликали введенням стрептозотозину фірми “Sigma” (США) з розрахунку 7 мг на 100 г маси тіла внутрішньочеревно. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, яку визначали з використанням набору реактивів “Lachema” (Чехія). В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози 14–16 ммоль/л. Через 72 год з моменту індукції діабету тваринам починали *per os* з питною водою вводити досліджувані речовини: L-аргінін (“Reanal”, Угорщина) у концентрації 1,25 г/л протягом 14 днів та AG (“Sigma”, США) у концентрації 1 г/л протягом 30 днів.

Щурів ефірним наркозом вводили в хірургічну стадію. Забір крові для виділення ІКК проводили на гепарині (кінцеве розведення гепарин : цільна кров = 1:100).

Визначали лейкоцитарну формулу периферійної крові та інтегральні гематологічні індекси: лейкоцитарний індекс (ЛІ; відображає співвідношення гуморального і клітинного рівнів імунної системи), лімфоцитарно-гранулоцитарний індекс (ЛГІ; дає змогу диференціювати автоінтоксикацію та інфекційну інтоксикацію), індекс співвідношення нейтрофілів і моноцитів (ІСНМ; за його змінами характеризують співвідношення компонентів мікрофагально-макрофагальної системи), індекс співвідношення лімфоцитів і моноцитів (ІСЛМ; відображає взаємне співвідношення афективного та ефективного рівнів імунологічного процесу), індекс співвідношення лімфоцитів і еозинофілів (ІСЛЕ; орієнтовно характеризує процеси гіперчутливості негайного та сповільненого типу), лейкоцитарний

індекс інтоксикації (ЛІ; його зростання свідчить про підвищення рівня ендогенної інтоксикації та активацію процесів тканинного розпаду), індекс зсуву лейкоцитів (ІЗЛ; його підвищення є ознакою активного запального процесу і порушення імунологічної реактивності), індекс співвідношення нейтрофілів і лімфоцитів (ІСНЛ; відображає співвідношення клітин неспецифічного та специфічного захисту) [9]. Для всіх обстежуваних груп проводили клінічний аналіз крові з морфологічною оцінкою ознак апоптозу. Мазки з лейкоконцентрату фіксували метанолом та профарбовували за Романовським – Гимзою [14]. Оцінювали кількість нейтрофільних та мононуклеарних лейкоцитів з дегенеративними змінами в ядрі та цитоплазмі. Виявляли токсичну зернистість у цитоплазмі, вакуолізацію цитоплазми і ядра, пікноз, фрагментацію та каріорексис ядра, цейозис мембрани, зменшення розміру клітин [18]. Морфологічні ознаки апоптозу кількісно виражали як відсоток клітин з досліджуваною ознакою апоптозу на 200 клітин, виявлених у різних полях зору мікроскопа. Суму морфологічних ознак апоптозу, виражених у відсотках, приймали за індекс апоптозу [6, 10].

Результати досліджень опрацьовували статистично з використання середнього арифметичного та стандартної похибки ( $M \pm m$ ), а також достовірного інтервалу, який використовували в разі оцінки ступеня вірогідності ( $p$ ) за допомогою критерію  $t$  Стьюдента. Розбіжності вважали статистично вірогідними при  $p < 0,05$ .

Для попередньої оцінки стану різних ланок імунної системи контрольних щурів та в разі ЕЦД проаналізовано зміни в лейкоцитарній формулі периферійної крові (табл. 1). У лейкоцитарній формулі контрольної групи та групи з діабетом привертає увагу зменшення вмісту сегментоядерних нейтрофілів (на 41% щодо контрольних показників) та вірогідне збільшення кількості лімфоцитів (на 11%). Вміст паличкоядерних нейтрофілів, еозинофілів і базофілів, а також моноцитів не відрізняється від цих показників контрольної групи.

Водночас у разі ЕЦД суттєво збільшуються ЛІ (в 1,9 раза), ЛПІ (у 1,6 раза) та ІСНЛ (у 4 рази) (рис. 1). Ці індекси на клітинному рівні інтеграції організму відображають співвідношення неспецифічного і специфічного рівнів імунного захисту й дають змогу диференціювати автоінтоксикацію та інфекційну інтоксикацію [9, 15]. Збільшення ЛІ та ІСНЛ свідчить про пригнічення клітинного та активацію гуморального імунного захисту. Така зміна зумовлена відносним лімфоцитозом, а саме: підвищенням вмісту лімфоцитів на

Таблиця 1  
Показники лейкоцитарної формули крові у контрольних щурів та тварин у разі експериментального цукрового діабету, %;  $M \pm m$ ;  $n=8-13$

Лейкоцити	Контроль	Контроль + L-аргінін	Контроль + AG	ЕЦД	ЕЦД + L-аргінін	ЕЦД + AG
Паличкоядерні нейтрофіли	1,4 ± 0,3	0,8 ± 0,2	1,5 ± 0,3	1,8 ± 0,4	1,8 ± 0,5	1,6 ± 0,4
Сегментоядерні нейтрофіли	20,6 ± 2,0	28,0 ± 1,9*	22,7 ± 0,8	12,2 ± 1,3*	21,2 ± 2,1**	20,0 ± 1,7**
Лімфоцити	70,6 ± 2,2	60,0 ± 1,8*	60,0 ± 2,1*	78,4 ± 2,1*	66,5 ± 1,6**	65,2 ± 2,1**
Моноцити	5,8 ± 0,8	8,8 ± 0,4*	8,7 ± 0,7*	5,6 ± 0,9	10,1 ± 0,8**	8,4 ± 0,8**
Еозинофіли	1,7 ± 0,3	2,4 ± 0,2	7,1 ± 1,4*	2,6 ± 0,4	0,5 ± 0,2**	4,8 ± 0,6**
Базофіли	$\frac{3}{4}$	-	-	$\frac{3}{4}$	-	-

Тут і далі \* різниця вірогідна порівняно з контролем,  $p < 0,05$ ; \*\* – різниця вірогідна порівняно зі стрептозоточиновим діабетом,  $p < 0,05$ .

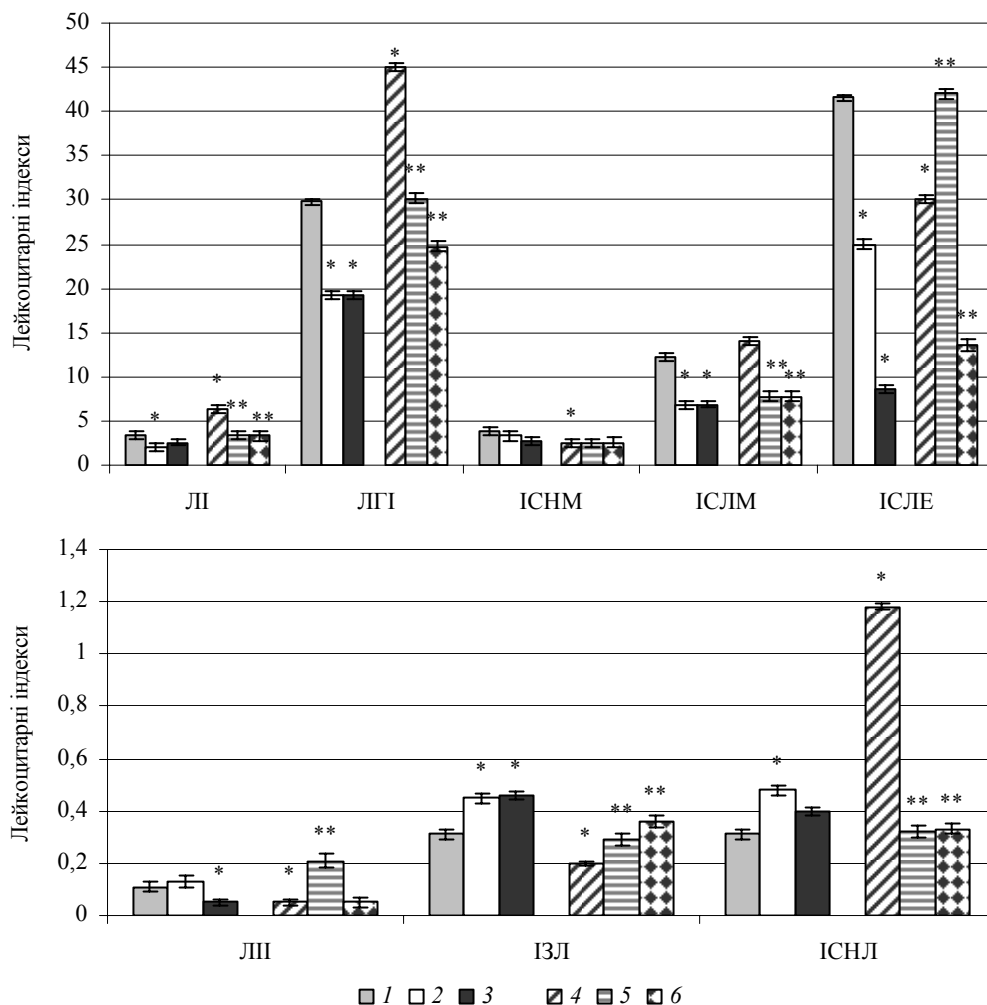


Рис. 1. Лейкоцитарні індекси периферійної крові контрольних щурів та тварин з експериментальним цукровим діабетом ( $M \pm m$ ;  $n=8$ ): 1 – контроль; 2 – контроль + L-аргінін; 3 – контроль + AG; 4 – ЕЦД; 5 – ЕЦД + L-аргінін; 6 – ЕЦД + AG.

фоні зменшення вмісту сегментоядерних нейтрофілів. На відміну від НГ, головна функція яких полягає у первинному захисті організму від патогенних чинників, лімфоцити беруть участь у всіх імунних реакціях, у тому числі й у формуванні автоімунної відповіді [8, 9]. Отже, можна попередньо стверджувати, що в разі ЕЦД у щурів показники лейкоцитарної формули та лейкоцитарних індексів свідчать про розвиток автоінтоксикаційних процесів. За умов ЕЦД простежується (див. рис. 1) зменшення ІСНМ (в 1,5 раза), ІСЛЕ (в 1,4 раза), ЛП (в 2,2 раза), ІЗЛ (в 1,6 раза), що може бути пов'язане більше з патогенетичними процесами, в основі яких є активації макрофагоцитарної системи та пригнічення мікрофагоцитарної.

Виявлені зміни, на нашу думку, безперечно доводять, що у щурів з ЕЦД нема активного запального процесу. Однак розглянутий ІСЛЕ відображає розвиток в організмі гіперчутливості сповільненого типу.

У контрольній групі тварин, яким вводили L-аргінін, привертає увагу зниження вмісту лімфоцитів на 15% та збільшення кількості моноцитів і НГ, відповідно, на 52 та 36% порівняно з контрольними показниками (див. табл. 1). З'ясовано, що у щурів з ЕЦД на фоні впливу L-аргініну підвищується вміст сегментоядерних нейтрофілів та моноцитів майже в 2 рази, а також зменшується кількість лімфоцитів у 1,2 раза та еозинофілів у 5 разів щодо показників за умов стрептозотоцинового діабету (див. табл. 1). Аналіз лейкоцитарної формули засвідчив, що введення L-аргініну привело до збільшення кількості клітин мікрофагально-макрофагального захисту організму та зниження вмісту лімфоцитів як у контролі, так і в разі ЕЦД.

На фоні введення L-аргініну (див. рис. 1) у контрольних тварин зафіксовано: зменшення ЛП (в 1,6 раза) та збільшення ІСНЛ (в 1,5 раза), що є ознакою пригнічення гуморального та активації неспецифічного клітинного рівня імунного захисту, а зменшення ІСЛМ (в 1,8 раза) призводить до переважання ефективного рівня імунного захисту над афективним і, як наслідок, маємо зменшення ЛПІ (в 1,6 раза), що відображає пригнічення автоімунної відповіді. З огляду на переважання клітинного імунного захисту над гуморальним відбувається збільшення ІЗЛ (в 1,5 раза) та зменшення ІСЛЕ (в 1,7 раза); це означає, що введення L-аргініну контрольним щурам призвело до розвитку активного запального процесу, порушення імунологічної реактивності та пригнічення процесів гіперчутливості негайного типу. Отже, про можливість розвитку в організмі контрольних тварин під впливом L-аргініну запального та деструктивного процесу свідчить підвищення відсоткового вмісту нейтрофілів і моноцитів та ІЗЛ вище нормальних показників. Запальна реакція зумовлює перехід НГ в активований стан, за якого зростає потужність "респіраторного вибуху". Це, відповідно, призводить до збільшеного продукування клітинами активних форм кисню, інтерлейкінів, лейкотрієнів та інших біологічно активних речовин. Вони можуть бути ініціаторами виходу клітин з кістково-мозкового депо і стимулювати гранулоцитоз. Унаслідок цього виникає нейтрофільний лейкоцитоз і з'являються активніші клітини у циркуляційному руслі [4].

Під час аналізування лейкоцитарних індексів у тварин зі стрептозотоциніндукованим діабетом на фоні введення L-аргініну порівняно зі щурами, хворими на діабет, зареєстровано (див. рис. 1) збільшення ЛП (в 4 рази), ІЗЛ (в 1,5 раза) та ІСЛЕ (в 1,5 раза). Така динаміка змін досліджуваних показників свідчить про підвищення рівня ендогенної інтоксикації, що призводить до порушення імунологічної реактивності, активації процесів тканинного розпаду, який спричинює розвиток запального процесу, та інгібування процесів гіперчутливості сповільненого типу. У цій же дослідній групі (див. рис. 1) відбувається зменшення ЛП (в 1,9 раза), ЛПІ (в 1,6 раза), ІСНЛ (в 3,7 раза) та ІСЛМ (в 1,8 раза). Зазначимо, що введення L-аргініну тваринам з ЕЦД приводило до зменшення значень розглянутих вище лейкоцитарних індексів до рівня показників у контрольних щурів.

Отже, вплив L-аргініну на ІКК за показниками лейкоцитарної формули в разі ЕЦД був аналогічним до впливу на клітини контрольних щурів. Експериментами доведено, що у тварин зі стрептозотоциніндукованим діабетом досліджувана амінокислота має виражений протекторний ефект на лейкоцити периферійної крові, зумовлюючи нормалізацію відсоткового вмісту НГ та лімфоцитів, а також ЛП, ЛПІ, ІЗЛ, ІСНЛ, ІСЛЕ до рівня значень у контрольних тварин, які не отримували L-аргініну. Такі зміни відображають поліпшення функціонування неспецифічної та специфічної ланки імунного захисту організму в разі ЕЦД.

На наступному етапі досліджено лейкоцитарну формулу в разі введення АГ (див. табл. 1). Особливо наголосимо на змінах одного напрямку у вмісті мононуклеарних лейкоцитів та еозинофільних гранулоцитів на фоні дії АГ як у контролі, так і за умов ЕЦД. В обох досліджуваних групах кількість лімфоцитів зменшила на 16%, вміст моноцитів збільшився на 50%. Вміст еозинофілів збільшився в 4 рази у контролі та в 1,8 рази в разі ЕЦД. На фоні введення АГ кількість паличкоядерних нейтрофілів не змінюється у групах порівняння, проте зафіксовано підвищення вмісту НГ на 64% лише за умов стрептозотоцинового діабету (див. табл. 1).

Під впливом АГ в лейкоцитарних індексах контрольних щурів виявлено: зменшення ЛГІ в 1,6 рази, ЛШ в 2,2 рази та збільшення ІЗЛ в 1,6 рази щодо контрольних показників (вказують на наявність екзогенної інтоксикації організму і, як наслідок, на розвиток запального процесу та порушення імунологічної реактивності); зменшення ІСЛМ та ІСЛЕ, відповідно, в 1,8 і 4,9 рази свідчить про переважання ефективного імунного захисту над афективним та про інтенсивний розвиток гіперчутливості сповільненого типу. Показники ЛІ, ІСНМ та ІСНЛ не відрізнялися від показників контрольної групи (див. рис. 1).

За умов ЕЦД у разі введення досліджуваного інгібітора серед показників інтегральних гематологічних індексів (ІСНМ, ЛГІ, ІСЛМ, ІСЛЕ, ІЗЛ) простежено такі ж зміни, як і в контрольних щурів, які отримували АГ (див. рис. 1). Без змін залишилися ЛШ і зменшилися ЛІ та ІСНЛ (відповідно, в 1,9 та 3,7 рази щодо показників за умов діабету), що свідчить про активацію неспецифічного імунного захисту шляхом збільшення кількості НГ та зниження вмісту лімфоцитів.

Для підтримки оптимального клітинного балансу в імунній системі наявний механізм запрограмованої клітинної смерті, що зумовлює тонкий баланс між ефективним функціонуванням та своєчасним і безпечним видаленням цих потенційно небезпечних клітин [11]. Однак швидке видалення апоптичних клітин із кровоплину фагоцитами є суттєвою перешкодою для детальної оцінки частоти клітинної смерті. Тому дослідження апоптозу клітин крові зазвичай ґрунтується на виявленні ранніх маркерів цього процесу [17]. У фізіологічних умовах оксид азоту, синтезований NO-синтазою з L-аргініну, здатний виявляти цитотоксичний ефект, активуючи процес апоптозу [2]. Дослідження впливу L-аргініну (донора оксиду азоту) та АГ (селективного інгібітора iNOS) на апоптоз ІКК у разі ЕЦД стало етапом наших експериментів.

Дослідженнями морфологічних ознак апоптозу за умов ЕЦД виявлено, що важливими дегенеративними змінами в мононуклеарах є пікноз, фрагментація та каріорексис ядра (зростає в 1,3 рази щодо контрольних показників), зменшення розміру клітини (у 3 рази) (табл. 2), а в клітинах нейтрофільного ряду – пікноз, фрагментація та каріорексис ядра (в 1,6 рази), цейозис мембрани (в 2,6 рази) і вакуолізація ядра (у 2 рази) (табл. 3). Як відомо [17, 18], збільшення цейозису мембрани та утворення численних псевдоподій і виступів є однією з ранніх ознак як апоптичного процесу, так і посилення реактивності в разі активації НГ. Клітини з поодинокими та численними відростками зовнішньої мембрани відповідають стану фагоцитарної активності, полегшують контакт активованих НГ з об'єктами фагоцитозу. Однак неодноразове повторення цього процесу призводить до різкого зменшення кількості псевдоподій і водночас зменшує можливість плазмолемі до захоплення об'єктів фагоцитозу.

У клітинах мононуклеарного ряду також менш інтенсивно виявляються такі ознаки: вакуолізація ядра (знижується в 1,4 рази порівняно з контролем) і токсична зерни-

Таблиця 2

Розподіл морфологічних апоптичних ознак мононуклеарних лейкоцитів крові у контрольних щурів і тварин у разі експериментального цукрового діабету, %;  $M \pm m$ ;  $n=8$

Ознаки	Контроль	Контроль + L-аргінін	Контроль + AG	ЕЦД	ЕЦД + L-аргінін	ЕЦД + AG
Пікноз, фрагментація, каріорексис ядра	4,5 ± 0,5	7,7 ± 0,8*	2,3 ± 0,3*	5,9 ± 0,6	5,4 ± 0,6	2,4 ± 0,2**
Цейозис мембрани	3,2 ± 0,3	4,5 ± 0,5	0,7 ± 0,3*	3,5 ± 0,5	2,3 ± 0,2	0,9 ± 0,3**
Вакуолізація ядра	1,3 ± 0,1	3,8 ± 0,3*	1,4 ± 0,3	0,9 ± 0,1*	3,3 ± 0,3**	1,1 ± 0,4
Вакуалізація цитоплазми	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,2	0,4 ± 0,2*	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,3	0,3 ± 0,1**
Токсична зернистість	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,20 ± 0,06*	0,4 ± 0,1*	0,2 ± 0,1	0,9 ± 0,2
Зменшення розміру клітини	0,6 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1	1,8 ± 0,2*	0,3 ± 0,1**	0,2 ± 0,1**

тість (у 2,5 раза) (див. табл. 2). Більшість лейкоцитів крові, що забезпечують неспецифічний та специфічний клітинний захист, перебувають у функціонально інертному стані, зберігаючи бактерицидний потенціал. Менша частина з них має ознаки активації: цейозис мембрани, фагосоми, спустошені гранули та ін. [17]. Отже, у разі ЕЦД у щурів клітинам лейкоцитарного ряду властивий не лише стан субактивації, а й порушена функціональна активність.

За умов стрептозотоцинового діабету простежено збільшення індексу апоптозу в клітинах мононуклеарного та поліморфноядерного ряду, відповідно, на 44 і 78% порівняно з контрольними щурами (рис. 2). Тобто індекс апоптозу за морфологічними ознаками в разі ЕЦД у мононуклеарах був меншим, ніж у НГ. Уважають, що більшість зрі-

Таблиця 3

Розподіл морфологічних апоптичних ознак поліморфноядерних лейкоцитів крові у нормі та в разі експериментального цукрового діабету, %;  $M \pm m$ ;  $n=8$

Ознаки	Контроль	Контроль + L-аргінін	Контроль + AG	ЕЦД	ЕЦД + L-аргінін	ЕЦД + AG
Пікноз, фрагментація, каріорексис ядра	14,3 ± 1,7	11,9 ± 1,4	4,5 ± 0,6*	23,5 ± 2,5*	10,8 ± 1,1**	4,1 ± 0,3**
Цейозис мембрани	1,3 ± 0,4	0,8 ± 0,1	–	3,4 ± 0,4*	2,5 ± 0,4	–
Вакуолізація ядра	1,8 ± 0,3	2,7 ± 0,3	1,9 ± 0,3	3,7 ± 0,4*	–	0,6 ± 0,4**
Вакуалізація цитоплазми	2,7 ± 0,3	5,1 ± 0,6*	–	3,1 ± 0,4	3,4 ± 0,4	0,6 ± 0,3**
Токсична зернистість	4,3 ± 0,5	3,2 ± 0,4	1,3 ± 0,06*	3,2 ± 0,4	0,5 ± 0,1**	–
Зменшення розміру клітини	0,6 ± 0,1	–	–	0,3 ± 0,1	–	–

лих лімфоцитів та моноцитів, які циркулюють, стійкі до індукції апоптозу [1, 6]. Імовірно, підвищення чутливості НГ до чинників, які активують апоптоз, пов'язане з коротким життєвим циклом цих клітин. У випадку фізіологічної смерті НГ реалізують функцію ізоляції власних токсичних ензимів. Отже, апоптоз сегментоядерних нейтрофілів у вогнищі запалення знижує некротичне пошкодження тканин, інгібує запальний процес, підтримує довготривалу дію механізмів імунної відповіді та формує менш травматичну захисну реакцію організму [12].

Розподіл морфологічних апоптичних ознак мононуклеарних лейкоцитів у контрольних тварин на фоні введення L-аргініну засвідчує, що переважними дегенеративними змінами є пікноз, фрагментація і каріорексис ядра та цейозис мембрани. Ці показники зростають у 1,7 та 2,9 раза, відповідно (див. табл. 2). У контрольній групі під впливом L-аргініну в клітинах нейтрофільного ряду в 1,9 раза зростає лише така морфологічна ознака, як вакуолізація цитоплазми (див. табл. 3). Збільшення кількості фагосом, вакуолей і піноцитозних пухирців, особливо по периферії цитоплазми, є ознакою посилення проникності клітинної мембрани й активації дегенеративних явищ у НГ [17]. Зазначимо, що індекс апоптозу контрольних тварин на фоні введення L-аргініну в клітинах мононуклеарного та нейтрофільного ряду вірогідно не змінювався (див. рис. 2).

Дослідженням морфологічних ознак апоптозу ІКК периферійної крові щурів зі стрептозотоциновим діабетом на фоні введення L-аргініну доведено, що в мононуклеарах зростає вакуолізація ядра (в 3,7 раза порівняно з діабетом) та знижується в 6 разів така ознака, як зменшення розміру клітини (див. табл. 2). У клітинах нейтрофільного ряду виявлено, що пікноз, фрагментація і каріорексис ядра знижуються в 2,2 раза, а токсична зернистість – у 6 разів щодо показників у щурів з ЕЦД, які не отримували L-аргініну, також серед досліджуваних параметрів не виявлялися вакуолізація ядра та зменшення розміру клітини (див. табл. 3). Як свідчать літературні дані [17], для характеристики потенційних можливостей антимікробного захисту системи НГ важливе

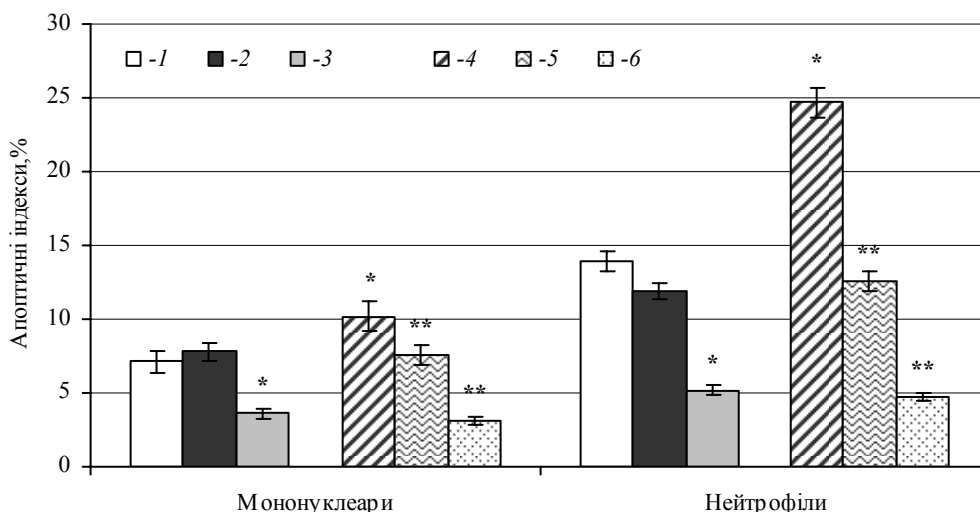


Рис. 2. Індекси апоптозу за морфологічними ознаками імунокомпетентних клітин крові контрольних щурів та з експериментальним цукровим діабетом,  $M \pm m$ ;  $n=11$ : 1 – контроль; 2 – контроль + L-аргінін; 3 – контроль AG; 4 – ЕЦД; 5 – ЕЦД + L-аргінін; 6 – ЕЦД + AG.



значення має наявність у цитоплазмі НГ азурофільних та специфічних гранул. До зменшення зернистості цитоплазми субактивованих НГ за умов ЕЦД призводить мобілізація гранул, утворення сполучень гранула – мікротрубочка, необхідних для транспортування цих структур до місця фагоцитозу, дегрануляція та поява напівпорожних і порожних гранул.

За умов стрептозотоцинового діабету під впливом L-аргініну простежено зменшення індексу апоптозу для мононуклеарних лейкоцитів в 1,2 раза, а для сегментоядерних нейтрофілів в 1,6 раза порівняно з ЕЦД (див. рис. 2). Імовірно, підвищена апоптична стійкість НГ пов'язана, з одного боку, з високим вмістом цих клітин у разі ЕЦД на фоні впливу L-аргініну, а з іншого, – зі зниженням активності конститутивної NOS та вірогідним зменшенням вмісту продуктів циклу оксиду азоту [2]. Продукти циклу NO, як відомо, здатні викликати або процес нітрозилування (утворюються нітрозозаміни, S-нітрозотіоли, дезаміновані основи ДНК), або оксидативний стрес (спричинює безліч внутрішньоклітинних змін, у тім числі апоптоз) [5, 7].

У табл. 2 наведено результати розподілу морфологічних апоптичних ознак мононуклеарних лейкоцитів на фоні введення AG. У контролі в разі введення досліджуваного інгібітора в мононуклеарах зменшувалися такі дегенеративні ознаки: пікноз, фрагментація і каріорексис ядра в 2 рази, цейозис мембрани в 4,6 рази, вакуолізація цитоплазми в 4 рази, токсична зернистість у 5 разів щодо ознак у контрольних тварин. У клітинах нейтрофільного ряду зафіксовано аналогічні зміни (див. табл. 3): пікноз, фрагментація і каріорексис ядра зменшуються в 3,2 рази, а токсична зернистість – у 3,3 рази. Характерним для активованих НГ є зменшення кількості гранул та збільшення кількості вакуолярних структур. Наявність у розподілі морфологічних ознак значної кількості клітин зі зниженим вмістом гранул та деструктивно-дегенеративними змінами є важливим критерієм функціональної неповноцінності бактерицидної системи НГ [17]. Серед досліджуваних параметрів не виявлено таких ознак, як цейозис мембрани, вакуолізація цитоплазми та зменшення розміру клітини (див. табл. 3). У контрольній групі у випадку дії AG апоптичний індекс за морфологічними ознаками для мононуклеарів зменшувався у 2 рази, а для НГ – у 2,7 рази щодо показників у нормі (див. рис. 2).

У разі стрептозотоцинового діабету на фоні введення AG в мононуклеарах зменшувалися такі дегенеративні ознаки: пікноз, фрагментація і каріорексис ядра в 2,5 рази, цейозис мембрани в 3,9 рази, вакуолізація цитоплазми в 5 разів, розмір клітини в 9 разів щодо ознак за умов діабету (див. табл. 2). У поліморфноядерних лейкоцитах зменшувалися всі досліджувані ознаки апоптозу: пікноз, фрагментація і каріорексис ядра, вакуолізація ядра та вакуолізація цитоплазми – відповідно, в 5,7, 6,2 та 5,2 рази порівняно з показниками у групі хворих тварин, які не отримували AG (див. табл. 3). На підставі аналізу динаміки змін індексу апоптозу за морфологічними ознаками в ІКК щурів з ЕЦД зазначимо, що AG значно вплинув на досліджуваний показник: у мононуклеарах апоптичний індекс зменшився в 3,2 рази, а в нейтрофілах – у 5,3 рази (див. рис. 2). Як бачимо, інгібітор iNOS у лейкоцитах крові за умов цієї патології виявив значно потужнішу інгібувальну дію, на відміну від ситуації в цих клітинах контрольних щурів. Як свідчить наші попередні дослідження, протекторний вплив AG на ІКК у разі ЕЦД виявляється внаслідок меншого продукування NO індукційною ізоформою синтази оксиду азоту.

Отже, виконаний нами розрахунок співвідношення клітинних елементів лейкоцитарної формули крові засвідчив, що на фоні активації функцій афективних клітин та

складних імунологічних порушень мікрофагально-макрофагальної системи, які є неспецифічними у разі ЕЦД виявляється інтоксикація, пов'язана з автоімунним процесом.

Вплив L-аргініну на ІКК за показниками лейкоцитарної формули в разі ЕЦД був аналогічним до впливу на клітини контрольних щурів. Зафіксована нами динаміка змін показників під дією L-аргініну та АГ в умовах *in vivo* доводить, що досліджувані речовини мають виражену імуотропну дію: зареєстровано активування неспецифічних та ефективних чинників захисту (мікрофагально-макрофагальна система) і пригнічення гуморального статусу імунної системи організму тварин. За умов уведення L-аргініну та АГ контрольній групі тварин простежено підвищення рівня екзогенної інтоксикації, розвинувся запальний процес, який супроводжувався як високою автоінтоксикацією з огляду на наявність продуктів метаболізму власного організму, так і недостатністю функціонування імунної системи. З'ясовано, що у тварин з ЕЦД, яким вводили L-аргінін та АГ, показники лейкоцитарної формули та лейкоцитарних індексів нормалізувалися до рівня значень у контрольних щурів, які не отримували зазначених речовин. Це свідчить про коригувальний та протекторний ефекти цих чинників.

Дослідження мононуклеарних та поліморфноядерних лейкоцитів хворих тварин дало змогу виявити, що апоптичний процес за інтенсивністю перевищує рівень контрольних щурів. Уведення L-аргініну та АГ призводило до суттєвого зменшення індексу апоптозу за морфологічними ознаками у контролі та в разі стрептозотоцинового діабету внаслідок зменшення цитотоксичного ефекту оксиду азоту.

1. Бродяк І. В., Барська М. Л., Сибірна Н. О. Апоптоз імунокомпетентних клітин крові при цукровому діабеті 1 типу // Лаб. діагностика. 2005. № 2. С. 22–25.
2. Бродяк І. В., Сибірна Н. О. Вплив L-аргініну на активність NO-синтази та процес окисної модифікації білків при стрептозотоциновому діабеті у щурів // Експерим. та клінічна фізіологія і біохімія. 2005. № 4. С. 43–49.
3. Бродяк І. В., Барська М. Л., Манаровська Р. С., Сибірна Н. О. Вплив системи оксиду азоту на активацію апоптозу в імунокомпетентних клітинах крові при цукровому діабеті 1-го типу // Фізіол. журнал. 2005. Т. 51. № 4. С. 79–85.
4. Гомоляко І. В., Тумасова К. П. Ультроструктурна характеристика нейтрофільних гранулоцитів крові у хворих на хронічний холецистит // Вісник морфології. 1999. № 5 (1). С. 6–8.
5. Изучение цитотоксической активности донора NO 3-нитро-4-фенилфуороксина на модели клеток HELA. <http://1.cellimm.bio.msu.ru/groups/kvf/egor.html>.
6. Ігрунова К. М., Моторна М. М., Степачов Т. І. Апоптоз мононуклеарних клітин крові у хворих з патологією серцево-судинної системи // Лаб. діагностика. 2004. № 1. С. 16–18.
7. Карімов І. З. Окисна модифікація білків і перекисне окислення ліпідів у розвитку метаболічної інтоксикації при патології // Лаб. діагностика. 2005. № 1. С. 7–13.
8. Лаповець Л. Є., Луцик Б. Д. Посібник з лабораторної імунології. Львів, 2000. 173 с.
9. Мустафина Ж. Г., Краморенко Ю. С., Кобцева В. Ю. Интегральные гематологические показатели в оценке иммунологической реактивности организма у больных с офтальмопатологией // Клин. лаб. диагностика. 1999. № 5. С. 47–49.
10. Понякина И. Д. Активация апоптоза нейтрофилов периферической крови как показатель аутоинтоксикации организма // Клин. лаб. диагностика. 2003. № 7. С. 19–21.

11. *Потапнев М. П.* Апоптоз клеток иммунной системы и его регуляция цитокинами // Иммунология. 2002. № 4. С. 237–249.
12. *Робинсон М. В., Труфакин В. А.* Апоптоз клеток иммунной системы // Успехи совр. биологии. 1991. Т. 3. Вып. 2. С. 246–259.
13. *Сибірна Н., Барська М., Гришук І.* Морфофункціональна характеристика імунокомпетентних клітин крові за умов цукрового діабету першого типу // Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол. 2004. Вип. 35. С. 77–83.
14. *Сибірна Н. О., Великий М. М.* Цитологічні та фізико-хімічні методи дослідження крові // Метод. посібник. Львів, 1997. 69 с.
15. *Скороход Н. І.* Лейкоцитарні індекси у хворих на стероїдзалежну бронхіальну астму за умов дії терапії з антиоксидантами – альфа-токоферолу ацетату та тіотриазоліну // Експерим. та клінічна фізіологія і біохімія. 1998. № 3/4. С. 49–53.
16. *Федорова М. З., Левин В. Н.* Метод комплексного исследования геометрии, площади поверхности, резервных возможностей мембраны и осморегуляции лейкоцитов крови // Клин. лаб. диагностика. 1997. № 11. С. 44–46.
17. *Чухловин А. Б.* Усиление апоптоза лейкоцитов периферической крови в связи с развитием лейкопении после интенсивной химиотерапии // Вопросы онкологии. 1999. Т. 45. № 4. С. 384–386.
18. *Cohen J. John.* Apoptosis // Immunology Today. 1993. Vol. 14. N 3. P. 126–130.

**MORFOLOGICAL AND FUNCTIONAL INVESTIGATIONS  
OF PERIFERAL BLOOD LEUCOCYTES IN RATS UNDER  
EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS**

**I. Brodyak, N. Sybirna**

*Ivan Franko L'viv National University  
e-mail: sybirna\_natalia@yahoo.com*

The analysis of the correlations between the cell levels of leucocyte formula of peripheral blood showed that intoxication is developed due to autoimmune processes under the experimental diabetes mellitus. It was shown that for diabetic animals which were treated with L-arginine and aminoguanidine the data of leucocyte formula and leucocyte indices were regulated to the level of the data in the control group, which were not treated with given substances. The injection L-arginine and aminoguanidine brought to the decrease of apoptotic index both in control group and sick animals. It shows corrected and antiapoptotic effects of the given substances.

*Key words:* mononuclear leucocytes, granulocytes neutrophiles, apoptosis, L-arginine, aminoguanidine, experimental diabetes mellitus.

Стаття надійшла до редколегії 18.11.05  
Прийнята до друку 13.06.06