

На правах рукописи



ОГОРОДНИКОВА ТАТЬЯНА ЛЕОНИДОВНА

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОФАГОВ ЛЕГКИХ ПРИ
ДЕЙСТВИИ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТА IN VITRO**

**06.02.01 – диагностика болезней и терапия животных, патология, онкология и
морфология животных**

**Автореферат диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Благовещенск – 2012

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Амурская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития России

Научный руководитель доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии ГБОУ ВПО Амурская ГМА Минздравсоцразвития России Целуйко Сергей Семенович

Официальные оппоненты:

Кириков Константин Спиридонович – доктор биологических наук, доцент, ФГБОУ ВПО «Якутская государственная сельскохозяйственная академия», доцент, кафедры хирургии и анатомии животных

Миллер Татьяна Викторовна – кандидат биологических наук, ФГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университет», доцент кафедры зоогигиены и технологии производства продуктов животноводства

Ведущая организация:

ФГБОУ ВПО «Иркутская государственная сельскохозяйственная академия»

Защита состоится 29 мая 2012 г. в 14⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д 220.027.02 при ФГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университет», 675005 г. Благовещенск, ул. Политехническая, 86. тел.: (416-2) 52-32-06, тел./факс: (416-2) 52-62-80.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВПО «Дальневосточный государственный аграрный университет».

Автореферат разослан «27» 04 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Самусенко Ольга Леонидовна

2012 А
12570

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время значительно возрос интерес к макрофагам, которые рассматриваются не только в качестве клеток, обеспечивающих специфическую и неспецифическую защиту организма, но и как важнейшее звено в регуляции многих процессов (Ерохин В.В., 1987; Маянский Д.Н., 1991; Правоторов Г.В., 1996; Martinez F. O. et al., 2008).

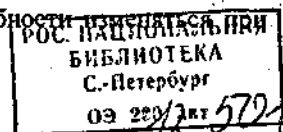
Популяция макрофагов, с одной стороны, разнородна по «вертикали» благодаря одновременному присутствию в крови моноцитов, а в тканях клеток разной степени зрелости. С другой стороны она гетерогенна «по горизонтали» так как в ее составе присутствуют разные классы органо- и тканевотипичных макрофагов (Афанасьев Ю.И. и др., 1982; Маянский Д.Н., 1990; Земсков В.М. и др., 1993; Тоголян А.А., Фрейдлин И.С., 2000.)

Существует представление, что внешние воздействия достаточной силы переводят систему мононуклеарных фагоцитов в особые режимы функционирования и эти эффекты воспроизводятся как *in vivo*, так и *in vitro*. (Шипкина Л. Н. и др., 1998; Пауков В.С. и др., 2005; Franke-Ullmann G. et al., 1996; Diemel R.V. et al., 2002.). Однако до настоящего времени неизвестно, в какой степени различаются реакции макрофагов на воздействия, при которых происходит прямое стимулирование системы мононуклеарных фагоцитов. Не вызывает сомнений то, что популяция мононуклеарных фагоцитов морфологически и функционально неоднородна, однако вопрос о гетерогенности мононуклеарных фагоцитов далек от окончательного разрешения.

Особое место в системе мононуклеарных фагоцитов занимают макрофаги легких, которые являются основными клетками, участвующими в неспецифической защите легких, осуществляя внутриклеточную гибель бактерий вследствие воздействия таких факторов, как активные продукты кислородного метаболизма и свободные радикалы на основе оксида азота.

При дефектах антиоксидантной защиты образующиеся свободные радикалы способны не только убивать инфекционные возбудители и окислять токсические вещества, но и повреждать клетки и ткани легких.

В этой связи особый интерес представляют данные об изменениях макрофагов легких при действии на них таких факторов как лазерное излучение различной длины волны и дозы, а также препаратов антиоксидантного действия. Изучение механизма действия этих факторов целесообразно исследовать на более простых моделях – клетках *in vitro*, что позволяет проводить точный учет воздействия и его результатов (Козлов, В.Л. 1997; Ильин, Д.А. 2008). В свою очередь это дополнит современные представления о мононуклеарных фагоцитах, их пластичности и способности изменяться



воздействии разнообразных факторов, которые обуславливают их гетерогенность.

Настоящая работа выполнена самостоятельно и является составной частью комплексной программы исследований кафедры гистологии, эмбриологии, цитологии ГБОУ ВПО Амурская ГМА Минздравсоцразвития России (номер государственной регистрации 01200213718).

Цель и задачи работы. Цель исследования – оценить морфологические изменения макрофагов легких при действии лазерного излучения различной длины волны и дозы, а также эмоксипина *in vitro*.

Для реализации поставленной цели были определены следующие задачи:

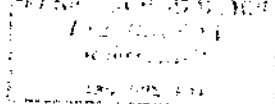
1. Дать морфологическую, гистохимическую, морфометрическую характеристику макрофагов легких интактных крыс при кратковременном культивировании.

2. Выявить особенности морфологии и функциональных изменений легочных макрофагов *in vitro* при действии красного лазерного излучения длиной волны 0,63 мкм, дозами 0,2 Дж/см² или 1 Дж/см²; инфракрасного лазерного излучения длиной волны 0,85 мкм, дозой 0,2 Дж/см² или 1 Дж/см², а также при наличии в инкубационной среде антиоксиданта – эмоксипина.

3. Оценить уровень морфологических изменений легочных макрофагов *in vitro* при действии лазера различной длины волны и дозы в комбинации с эмоксипином.

4. Количественно и качественно подтвердить наличие внутрипопуляционного полиморфизма интактных макрофагов легкого, а также макрофагов при экспериментальном действии лазерного излучения и эмоксипина *in vitro*.

Научная новизна работы. Создана модель, позволяющая объективно оценивать реакцию макрофагов легких в кратковременной культуре при различных экспериментальных воздействиях. Впервые проведено комплексное изучение макрофагов, полученных из бронхоальвеолярной жидкости с использованием светового микроскопа, электронного микроскопа, гистохимических и морфометрических методов. Полученные данные позволили доказать наличие внутрипопуляционного полиморфизма макрофагов легких у интактных животных в кратковременной культуре. Впервые изучено влияние красного и инфракрасного лазерного излучения дозой 0,2 Дж/см² и 1 Дж/см² на кратковременную культуру макрофагов. Установлено, что действие красного лазера приводит к более выраженному росту морфометрических показателей и изменениям популяционного состава. Впервые выявлено, что наличие эмоксипина в инкубационной среде снижает степень воздействия красного лазера и усиливает эффект инфракрасного лазера, о чем



свидетельствуют морфологические и морфометрические данные макрофагов в кратковременной культуре.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты данного исследования могут использоваться в экспериментальных работах, где объектом исследования являются макрофаги. На основании проведенного морфологического, электронно-микроскопического и морфометрического анализа расширены представления о макрофагах легких, а также изучена их реакция на действие красного и инфракрасного лазерного излучения различной дозы в кратковременной культуре.

Практическую ценность представляют данные о реакции макрофагов при действии лазерного излучения и эмоксипина. Это дает возможность для расчета дозы воздействия при проведении экспериментальных работ и оказании лечебных мероприятий, а также позволяет приблизиться к пониманию механизма действия лазерного излучения на биообъекты.

Фактические данные и теоретические обобщения могут использоваться в научной и педагогической работе ряда лабораторий и кафедр медицинских и ветеринарных вузов, биологических отделений университетов.

Опубликованные материалы работы используются в учебном процессе и научных исследованиях кафедр гистологии, эмбриологии, цитологии, госпитальной терапии, фармакологии, ЦНИЛа Амурской ГМА, кафедры зоологии ФГБОУ ВПО «БГПУ», кафедры безопасности жизнедеятельности ФГБОУ ВПО «ДальГАУ», в научно-исследовательской работе отдела «Инновационные методы диагностики и терапии, морфологии и патологии» ГНУ Дальневосточный зональный научно-исследовательский ветеринарный институт Россельхозакадемии, лаборатории «Функциональные методы исследования дыхательной системы» ФГБОУ ДНЦ ФПД СО РАМН.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Дана морфологическая и морфометрическая характеристика макрофагов легких *in vitro* в контроле и при экспериментальных воздействиях. Показано, что эффект воздействия лазерного излучения на макрофаги *in vitro*, зависит от спектральной характеристики и дозы лазерного излучения.
2. Установлена гетерогенность популяционного состава макрофагов легких в кратковременной культуре при экспериментальных воздействиях.
3. Установлено, что присутствие эмоксипина в инкубационной среде приводит к изменению морфологических и морфометрических показателей, а также популяционного состава макрофагов, при этом снижая побочные эффекты красного лазерного излучения и потенцируя эффект воздействия инфракрасного лазера на клетки.

Апробация работы. Основные положения исследования и материалы диссертации представлены и обсуждены на научных конференциях и форумах регионального и международного уровня: русско-японском международном симпозиуме (Благовещенск, 2000); региональной научно-практической конференции «Молодежь XXI века: шаг в будущее» (Благовещенск, 2004); японско-русских международных симпозиумах (Kanazawa, 2001; Niigata, 2004); на 6-й международной научно-практической конференции «Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины» (Астрахань, 2008); на 2-ом интернациональном китайско-японско-корейском биомедицинском форуме (Харбин, 2010); заочной научно-практической конференции «Должановские чтения» (Воронеж, 2011); 8-ом российско-китайском симпозиуме «Современные проблемы нанофармакологии» (Благовещенск, 2011).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 151 страницах. Содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований, обсуждение результатов, выводы. Список использованной литературы включает 225 источников, в том числе 91 источник иностранных авторов. Работа иллюстрирована 34 таблицами и 54 рисунками.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных статей, из них 3 статьи в издательствах, рекомендуемых ВАК, 1 методические рекомендации.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В основу работы положены результаты экспериментальных исследований, проведенных на культуре макрофагов беспородных белых крыс – самцов. Объектом исследования были макрофаги легких. Материалом – бронхоальвеолярная жидкость, откуда выделяли клетки, а предметом исследования служила кратковременная культура макрофагов.

Бронхоальвеолярная жидкость для экспериментальных исследований забиралась у животных в стандартных условиях. Для наступления наркотического эффекта крысе вводили внутримышечно 1% раствор калипсола, после чего в просвет трахеи вводили 6 мл среды 199, проводили забор жидкости, которую вносили в микрокамеру и центрифугировали при 800 оборотах в течение 5 минут, для получения монослая клеток. Данный способ осуществлялся с помощью оригинального устройства (Целуйко С.С. и др. 2001). Для отделения макрофагов от других клеточных элементов их промывали средой 199.

Источником лазерного излучения служил аппарат «Мустанг» с длиной волны 0,63 мкм (красный лазер) и 0,85 мкм (инфракрасный лазер). Суммарная доза облучения была 0,2 и 1 Дж/см², такая доза является низкоэнергетической (Гамалея

Н.Ф., 1996;). Кроме этого применяли сочетанное воздействие лазерного излучения и эмоксипина. Эмоксипин относится к препаратам, ингибирующим свободнорадикальное окисление, а также обладает мембранопротекторным эффектом (Гуськова Т.А., Либерман С.С., 1994).

На полученный монослой макрофагов воздействовали лазером, затем инкубировали в питательной среде 199 в течение трех часов при 37°C, либо в инкубационную среду дополнительно добавляли эмоксипин в концентрации 10⁻⁴ М. Животные, используемые в эксперименте, были разделены на 10 групп (табл.1).

Таблица 1 – Экспериментальные группы

| № группы | Шифр | Краткая характеристика экспериментального материала | Кол-во животных |
|----------|-----------|--|-----------------|
| 1 | К | Культура макрофагов контрольной группы, инкубированная в среде 199 | 9 |
| 2 | КЛ 0,2 | Культура макрофагов при действии КЛ дозой 0,2 Дж/см ² , инкубированная в среде 199 | 10 |
| 3 | КЛ 1 | Культура макрофагов при действии КЛ дозой 1 Дж/см ² , инкубированная в среде 199 | 10 |
| 4 | ИКЛ 0,2 | Культура макрофагов при действии ИКЛ дозой 0,2 Дж/см ² , инкубированная в среде 199 | 10 |
| 5 | ИКЛ 1 | Культура макрофагов при действии ИКЛ дозой 1 Дж/см ² , инкубированная в среде 199 | 10 |
| 6 | Э | Культура макрофагов, инкубированная в среде 199 с эмоксипином | 10 |
| 7 | КЛ 0,2+Э | Культура макрофагов при действии КЛ дозой 0,2 Дж/см ² , инкубированная в среде 199 с эмоксипином | 10 |
| 8 | КЛ 1+Э | Культура макрофагов при действии КЛ дозой 0,2 Дж/см ² , инкубированная в среде 199 с эмоксипином | 10 |
| 9 | ИКЛ 0,2+Э | Культура макрофагов при действии ИКЛ дозой 0,2 Дж/см ² , инкубированная в среде 199 с эмоксипином | 10 |
| 10 | ИКЛ 1+Э | Культура макрофагов при действии ИКЛ дозой 0,2 Дж/см ² , инкубированная в среде 199 с эмоксипином | 10 |

По окончании экспериментального воздействия препараты кратковременной культуры окрашивали гематоксилином и эозином, азури II и эозином для световой микроскопии и морфометрирования. Исследование кислой фосфомонэстеразы по Гомори (КФ 3.1.3.2) в монослое проводили при рН 5,2, время инкубации 25 минут, активность фермента оценивали по наличию гранул сульфида свинца.

Обработка материала для растровой электронной микроскопии проводили по методу Ю.А. Ровенского (1979), просмотр препаратов осуществлялся на микроскопе S3400-Япония.

Материал для электронной микроскопии обрабатывали по методике J.J.Coalson, V.T.Vinteret et.al. (1986). Полутонкие и ультратонкие срезы получали на ультрамикротоме «LKB NOWA 8800» (Швеция). Полутонкие срезы окрашивались метиленовым синим по методу Sato (1980). Электронномикроскопическое исследование и фотографирование проводили на электронных микроскопах «Technai G2 Spirit Twin»-Голандия.

Морфометрия клеток осуществлялась на программно-аппаратном комплексе анализа изображений, состоящего из персонального компьютера, к которому была создана программа для морфометрических исследований «Морфометр», светового микроскопа с рисовально-проеекционным аппаратом PA-7 и компьютерной мыши со световым маркером. Измерения клеток проводили на препаратах кратковременной культуры. В каждой группе были проведены измерения 50 макрофагов (клетка и ядро) по показателям: периметр, площадь, ориентация, элонгация, компактность, квадратичность, сферичность, округлость, X-проекция, Y-проекция, длина, ширина, ядерно-цитоплазматическое соотношение.

Для статистической обработки количественных данных использовали программное обеспечение «Автоматизированная система диспансеризации» (Ульянычев Н.В., 1992). Гипотезу нормальности распределения значений в выборках проверяли с использованием теста Колмогорова-Смирнова, после чего выборки сравнивались при помощи t-критерия Стьюдента. Количественные данные представлены в виде $M \pm m$, где M – среднее значение, m – ошибка среднего. Учитывались значения, по которым выборки различались на 95% и более (Авгандилов Г.Г., 1990).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В нашей работе разработана модель, позволяющая выделять макрофаги легких, поддерживать их жизнеспособность в кратковременной культуре и с помощью морфологических, морфометрических и гистохимических методов объективно оценивать изменения, происходящие в клетках при экспериментальных воздействиях. Несмотря на то, что морфологические и гистохимические особенности строения и функционирования макрофагов легких были освещены разными исследователями, до сих пор неизвестно, что лежит в основе гетерогенности и какими возможностями обладают различные популяционные группы макрофагов (Маянский А.Н., 1983; Пауков В.С., 2005; Плехова Н.Г., 2011).

Нами проведено исследование внутрипопуляционного состава макрофагов легких при действии красного и инфракрасного лазерного излучения в

зависимости от дозы; при добавлении в инкубационную среду эмоксипина, а также при их сочетанном применении.

В ходе морфометрических исследований были выявлены наиболее информативные показатели макрофагов, что дало основание объективно оценить уровень реакции этих клеток в условиях эксперимента. Исходя из полученных данных, наибольшей информативностью обладали следующие показатели: площадь, длина, ширина и округлость клеток и их ядер.

3.1 Морфологическая оценка макрофагов контрольной группы

Макрофаги легких это округлые, достаточно крупные клетки, со светло базофильной цитоплазмой, хорошо развитой ультраструктурой. На поверхности плазмолеммы находятся многочисленные складки и инвагинации, ядро овальной формы, имеет выемку. При световой микроскопии полутонких срезов выявлены светлые и темные макрофаги, последние имели большее количество инвагинаций цитоплазмы.

Количественные характеристики по показателям площади, длины, ширины и округлости макрофагов контрольной группы и их ядер представлены в таблице 2.

Анализ количественных данных показал, что в бронхоальвеолярной жидкости присутствуют макрофаги с различной площадью ядра и цитоплазмы. С помощью морфометрических показателей площади клетки и площади ядра популяция макрофагов лёгких была разделена на 3 группы – малые, средние и крупные. В популяции макрофагов контрольной группы преобладают клетки со средними значениями площади клетки – процент их количества составил 84%, в то время, как малых клеток было 12%, а крупных клеток только 4% (рис. 1, а).

По площади ядер преобладают макрофаги с ядрами средних размеров, процент количества их 68%, доля макрофагов с крупными ядрами равна 22%, на долю клеток с малыми ядрами пришлось 10% (рис. 1, б).

По результатам электронномикроскопического изучения, было выявлено 5 морфофункциональных типов макрофагов, имеющих особенности строения плазмолеммы, цитоплазмы и ядра.

К первому малодифференцированному типу отнесены клетки переходной формы между моноцитами и макрофагами.

У клеток второго типа имеется хорошо развитый аппарат белкового синтеза в виде многочисленных цистерн эндоплазматической сети, свободных рибосом и полисом, то есть у них преобладает синтетическая функция. Это группа была описана рядом авторов (Karr, Я., 1978; Chandler D. B., 1987; Gordon S., 1987).

Ультраструктурными признаками макрофагов третьего типа является хорошо развитый лизосомальный аппарат. Количество этих клеток был наибольшим. В большинстве макрофагов реакция на кислую фосфомоноэстеразу была незначительна, что согласуется с данными электронной микроскопии, которые указывают на присутствие в макрофагах третьего типа в основном первичных лизосом (Райхлин Н.Т., 1971; Покровский А.А., 1976).

Четвертая группа макрофагов имела признаки характерные, по мнению авторов (Романова Л.К. 1991; Хаитов Р.М., 2000; Ильин Д.А., 2004), для активно фагоцитирующих клеток.

Для дегенерирующих клеток пятого типа характерно формирование участков деградации цитоплазматического матрикса и ядра.

Полученные нами результаты согласуются с данными авторов, проводивших исследования популяции макрофагов из бронхоальвеолярной жидкости при патологии органов дыхания, в которых показано наличие разных типов клеток в зависимости от нозологической формы заболеваний легких (Полосухин А.М., 1995; Лепеха Л.Н., 2003; Филиппов В.П., 2006; Бабайлов М.С., 2011).

3.2 Морфологическая оценка макрофагов группы эмоксипин

Известно, что эмоксипин обладает антирадикальной и антиокислительной активностью (Штарберг С.А. и др., 1996). В основе биологического действия эмоксипина наряду с антирадикальными свойствами лежит его мембранопротекторный эффект, то есть способность нормализовать структуру и функциональную активность биомембран (Суслина З.А., 1991).

При анализе группы эмоксипин было выявлено, что клетки по общеморфологическим признакам сходны с макрофагами контрольной группы. В крупных макрофагах присутствуют обычно мелкие вакуоли, границы клеток выглядят несколько не ровными. Клеточная оболочка образует немногочисленные мелкие выросты.

На основании изучения количественных показателей по сравнению с контрольной группой, выявлено изменение популяционного состава макрофагов по всем показателям. Статистически значимо возрастают такие показатели, как площадь, длина, ширина и округлость клеток (табл. 2). Все количественные характеристики ядер макрофагов при добавлении в среду эмоксипина также увеличиваются ($P < 0,05$). Это приводит к смещению ядерно-цитоплазматического соотношения в сторону ядра.

При изучении популяционного состава макрофагов данной группы обращает внимание значительное увеличение процента количества крупных и малых макрофагов (рис. 1, а). По сравнению с контролем доля малых макрофагов увеличивается в 1,66 раз, а доля крупных макрофагов увеличивается в 5 раз, что, соответственно, приводит к снижению до 60% доли средних клеток (рис. 1, а).

Процент количества макрофагов со средними ядрами остается таким же, как и в контроле, процент количества макрофагов с малыми ядрами увеличивается в 2 раза, а с крупными ядрами, наоборот, уменьшается в 1,83 раза (рис. 1, б).

Электронномикроскопически выявлено увеличение клеток второго типа с преобладанием синтетической активности, то есть эмоксипин оказывает стимулирующее влияние на биосинтетические процессы в клетке (Голиков А.П., 1992.). Активность кислой фосфомоноэстеразы практически не отличается от таковой в контрольной группе.

Молекулярные и биохимические особенности действия эмоксипина объясняют его стабилизирующее влияние на мембраны клеток, включая плазмолемму, эндоплазматическую сеть и кариолемму. Группа макрофагов при действии эмоксипина послужила своеобразным контролем для определения и оценки уровня реакции клеток *in vitro* на действие лазера с учетом, по мнению ряда авторов его прооксидантного эффекта (Кодинцев, В.В., 2000; Доровских, В.А., 2005).

3.3 Морфологическая оценка макрофагов при действии красного лазера при различных дозах и совместно с эмоксипином

В доступной научной литературе мы не нашли данных о действии КЛ в используемых дозах при изучении культуры макрофагов легких. В исследованиях Каги Т.И. (1995), изучавшей синтез ДНК в культуре клеток при облучении с длиной волны 0,63 мкм было выявлено, что оптимальной является доза от 0,01 до 0,3 Дж/см². По мнению других авторов, проводивших морфологические исследования, предельно допустимой дозой при длине волны 0,63 мкм считается доза 10 Дж/см² (Байбеков И.М., 1991; Васильев И.В., 1997; Самойлов Н.Г., 2000; Klebanov G.I., 1998).

Сравнивая экспериментальные результаты с контрольными мы наблюдаем, что при действии КЛ дозой 0,2 Дж/см² выявляются изменения большинства макрофагов.

На светооптическом уровне отмечается появление значительного числа очень крупных макрофагов, имеющих светлую, вакуолизированную цитоплазму, что связано с наличием крупных вакуолей и малого числа

включений. Увеличилось число дегенерирующих клеток с неровными границами, неомогенной цитоплазмой и пикнотическим ядром.

Анализ количественных данных показал увеличение всех количественных характеристик макрофагов (табл.2).

Таблица 2 - Количественные показатели клетки и ядра макрофагов в контрольной и экспериментальных группах ($M \pm m$), $n=50$.

| Эксперименты | К | Э | КЛ доза 0,2 Дж/см ² | | КЛ доза 1 Дж/см ² | | P |
|---------------------------|----------------|----------------|--------------------------------|----------------|------------------------------|----------------|--|
| | | | КЛ | КЛ+Э | КЛ | КЛ+Э | |
| Группы | I | II | III | IV | V | VI | |
| Клетка | | | | | | | |
| Площадь, мкм ² | 50,04± 2,07 | 86,81± 3,90 | 123,88± 6,93 | 96,20± 4,90 | 92,56± 5,45 | 90,41± 4,58 | P _{1,4} <0,01 P ₅ >0,05 |
| Длина, мкм | 8,77± 0,26 | 11,09± 0,30 | 13,77± 0,50 | 12,15± 0,41 | 12,92± 0,55 | 11,55± 0,43 | P _{1,2,3} <0,01 P _{4,5} >0,05 |
| Ширина, мкм | 5,55± 0,25 | 8,19± 0,31 | 8,00± 0,38 | 7,43± 0,35 | 6,84± 0,36 | 7,63± 0,35 | P _{1,3} <0,05 P ₂ <0,01 P _{4,5} >0,05 |
| Округлость, ед | 3,45± 0,09 | 4,70± 0,11 | 5,66± 0,17 | 4,93± 0,16 | 4,70± 0,14 | 4,75± 0,16 | P _{1,2} <0,01 P _{3,4} <0,05 P ₅ >0,05 |
| Ядро | | | | | | | |
| Площадь, мкм ² | 12,37± 0,62 | 23,68± 1,29 | 26,23± 1,30 | 24,52± 1,40 | 27,12± 1,13 | 26,76± 1,43 | P _{1,2,3} <0,01 P _{4,5} >0,05 |
| Длина, мкм | 4,71± 0,15 | 6,78± 0,19 | 6,85± 0,29 | 6,92± 0,35 | 2,28± 0,25 | 7,22± 0,25 | P _{1,3} <0,05 P ₂ <0,01 P _{4,5} >0,05 |
| Ширина, мкм | 2,92± 0,14 | 3,63± 0,18 | 3,04± 0,14 | 4,12± 0,20 | 3,99± 0,20 | 4,00± 0,20 | P _{1,3,4} <0,05 P _{2,5} >0,05 |
| Округлость, ед | 1,63± 0,15 | 2,29± 0,08 | 2,48± 0,08 | 2,39± 0,13 | 2,47± 0,07 | 2,44± 0,10 | P _{1,2,3} <0,05 P _{4,5} >0,05 |

Примечание: в таблице 2 и 3 P₁ – уровень доверительной вероятности при сравнении I и II групп, P₂ – I и III групп, P₃ – I и V групп, P₄ – III и IV групп, P₅ – V и VI групп. К – контроль, Э – эмоксин.

Причем облучение культуры макрофагов КЛ в дозе 0,2 Дж/см² вызывало более значительные изменения клеток, чем при облучении КЛ в дозе 1 Дж/см². Площадь макрофагов при облучении КЛ в дозе 0,2 Дж/см² резко возрастает в 2,48 раза и имеет самую большую величину среди всех экспериментальных групп (табл. 2). При действии на макрофаги КЛ дозой 1 Дж/см² мы наблюдаем, что площадь макрофагов увеличилась в 1,85 раз (табл. 2). Кроме площади при

облучении макрофагов КЛ в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$ статистически значимо увеличиваются показатели длины, ширины и округлости клеток (табл. 2).

Площадь ядер макрофагов также увеличивается: при облучении КЛ в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$ в 2,12 раза, при облучении КЛ в дозе 1 Дж/см^2 в 2,19 раз. Длина и округлость ядра макрофагов тоже статистически значимо увеличиваются по сравнению с контролем при обеих дозах КЛ (табл. 2).

Облучение культуры клеток КЛ приводит к увеличению в популяции крупных макрофагов: при облучении КЛ в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$ доля крупных макрофагов увеличивается в 4,5 раза, доля малых клеток увеличивается в 2,09 раз, что в совокупности приводит к уменьшению доли средних макрофагов до 56%. При облучении КЛ в дозе 1 Дж/см^2 доля крупных клеток увеличивается в 7 раз (рис. 1, а), малых клеток становится больше в 1,34 раза, за счет чего доля средних макрофагов уменьшается до 46% (рис. 1, а).

Популяционный состав макрофагов по площади ядра при облучении КЛ в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$ практически не меняется, при облучении КЛ в дозе 1 Дж/см^2 увеличивается доля средних клеток за счет уменьшения клеток с крупными ядрами (рис. 1, б). Ядерно-цитоплазматическое соотношение при действии на макрофаги КЛ дозой $0,2 \text{ Дж/см}^2$ сдвигается в сторону цитоплазмы, в то время как доза 1 Дж/см^2 изменяет этот показатель в сторону ядра, что связано с уменьшением размера цитоплазмы клеток в этой экспериментальной группе.

Большинство исследователей считают, что биологическое действие лазера является дозозависимым (Бриль, Г.Е., 1996; Волков В.В., 1997; Berki, T., 1985.). В наших исследованиях показано, что к более значительному увеличению всех показателей клетки и большинства параметров ядра приводит действие красного лазера в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$ по сравнению с дозой облучения КЛ 1 Дж/см^2 .

Доза красного лазера $0,2 \text{ Дж/см}^2$ оказала сильное влияние на структуры цитоплазмы: происходит набухание митохондрий, что указывает на структурно-функциональное истощение энергетического потенциала клеток и это совпадает с мнением ряда авторов, считающих, что КЛ увеличивает мембранный потенциал митохондрий и протонный градиент, что в свою очередь увеличивает скорость обмена АДФ/АТФ, поэтому критической мишенью являются митохондрии, что подтверждается результатами экспериментов по облучению клеток (Hilf A., 1986; Manteifel V., 1997).

При анализе электроннограмм было выявлено, что макрофаги представлены в основном клетками третьего типа, содержали многочисленные мелкие лизосомоподобные гранулы, вакуоли различного размера. Причем для группы макрофагов, облученных КЛ в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$, были характерны крупные вакуоли, имеющие сливной характер. Плазмолемма макрофагов образует

немногочисленные широкие цитоплазматические выросты разной длины. Реже встречаются макрофаги четвертого морфофункционального типа.

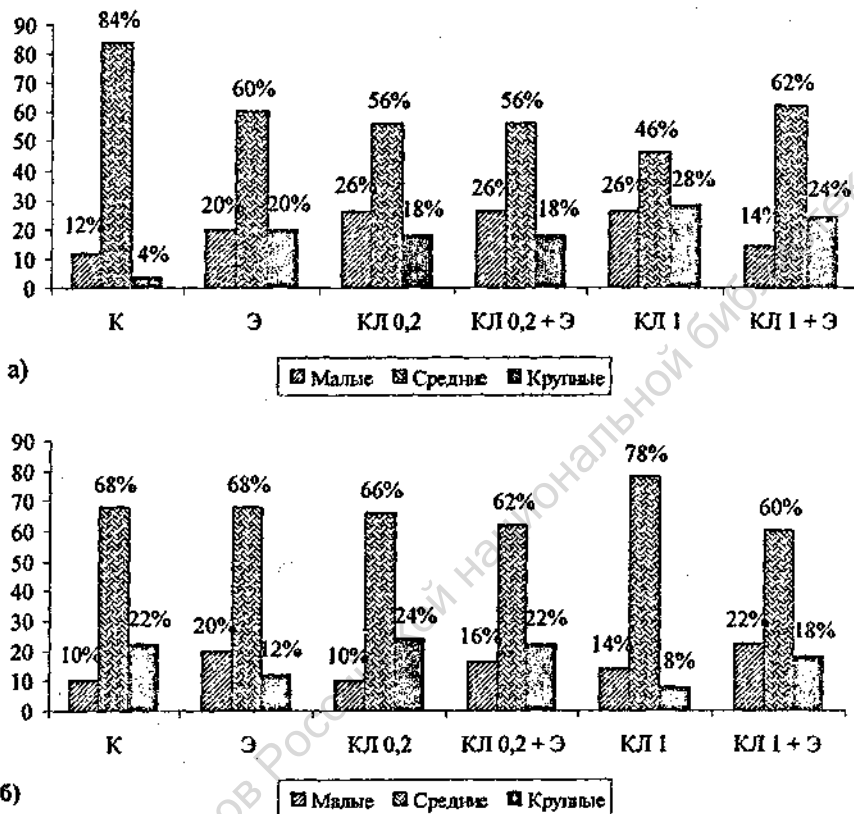


Рис. 1, а, б. Популяционный состав (% количества) малых, средних и крупных макрофагов по площади клетки (а) и ядра (б). К – контроль, Э – эмоксипин.

При воздействии красного лазера $0,2 \text{ Дж/см}^2$ в присутствии эмоксипина появляются макрофаги, в которых выявляется достаточно большое количество лизосом, при этом активность реакции на кислую фосфоинозитеразу средняя по интенсивности.

При сочетанном действии эмоксипина и КЛ дозой $0,2 \text{ Дж/см}^2$ отмечено статистически значимое снижение таких количественных показателей макрофагов, как площадь и округлость клетки (табл.2). Ядра клеток становятся шире, однако площадь, длина и округлость ядер не изменяются (табл. 2). При облучении макрофагов КЛ в дозе 1 Дж/см^2 добавление эмоксипина в инкубационную среду не

вызывает статистически значимых изменений клеток и ядер (табл. 2). Популяционный состав макрофагов при действии обеих доз КЛ в комбинации с эмоксипином практически не меняется (рис. 1, а, б).

При анализе морфологических, количественных данных и популяционного состава макрофагов была выявлена высокая степень воздействия лазера в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$, что указывает на проявление прооксидантной активности лазерного излучения, которая, вероятно связана с энергетической нагрузкой на липидный бислой мембраны. Учитывая степень выраженности морфологических и морфометрических изменений клеток при действии лазера в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$ можно считать ее предельной дозой, тормозящей морфообразовательные процессы. В то время как доза 1 Дж/см^2 проявляет все свойства, присущие для оптимальной дозы, стимулирующей образование внутриклеточных структур, что согласуется с мнением ряда авторов (Илларионов В.В., 1992).

Добавление в среду эмоксипина приводит к снижению прооксидантной активности лазера благодаря способности препарата активно вступать в реакцию связывания свободных радикалов, уменьшая таким образом отрицательный эффект лазерного излучения, особенно при дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$.

3.4 Морфологическая оценка макрофагов при действии инфракрасного лазера при различных дозах и совместно с эмоксипином

В отличие от биологических эффектов КЛ механизм действия ближнего ИКЛ (длина волны $0,8 - 1,3 \text{ мкм}$) определяется малой энергией его квантов. Этой энергии достаточно для активации ферментов, играющих важную роль при запуске физиологических реакций на различных уровнях (Козлов, В.Л. 1993).

В условиях эксперимента, при действии ИКЛ дозой $0,2 \text{ Дж/см}^2$ обращает на себя внимание появление в цитоплазме макрофагов фагоцитированных частиц. Плазмалемма крупных и средних макрофагов имеет нечеткие контуры, образующие многочисленные, разной длины выросты, что наглядно видно при изучении электроннограмм. Это же характерно и для макрофагов при действии на них ИКЛ дозой 1 Дж/см^2 .

Исследования ряда авторов показали, что при воздействии лазером происходит очищение поверхностей биомембран клеток, благодаря чему восстанавливается нормальная проницаемость. Данные изменения обусловлены деполяризацией мембраны. Считают, что первичным акцептором лазерной энергии на клетки *in vitro* являются активные формы кислорода, которые, воздействуя на клеточные мембраны, приводят к повышению их энергетической активности и накоплению

АТФ. Это дает возможность клетке образовывать длинные отростки и активной участвовать в процессах фагоцитоза (Ларюшин, А.Л. 1997; Кагу Т.И., 1995).

При действии ИКЛ дозой 0,2 Дж/см² площадь макрофагов возрастает в 1,87 раз, а при ИКЛ дозой 1 Дж/см² площадь увеличивается в 1,3 раза (табл. 3). Кроме площади клеток статистически значимо увеличиваются длина, ширина и округлость макрофагов (табл. 3).

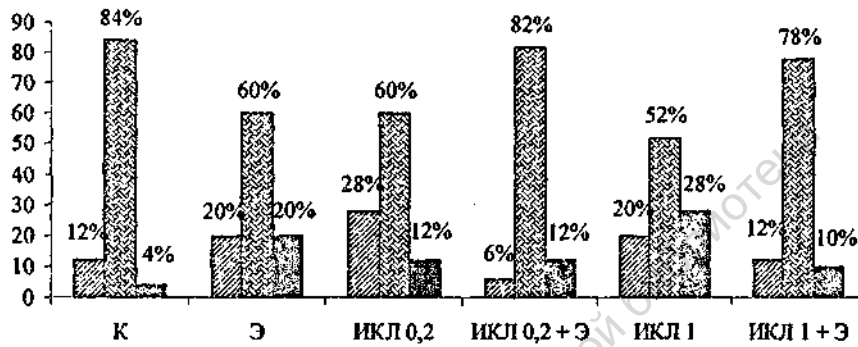
Таблица 3 - Количественные показатели клетки и ядра в контрольной и экспериментальных группах (M±m), n=50.

| Эксперименты | К | Э | ИКЛ доза 0,2 Дж/см ² | | ИКЛ доза 1 Дж/см ² | | P |
|---------------------------|----------------|----------------|------------------------------------|-----------------|----------------------------------|-----------------|--|
| | | | ИКЛ | ИКЛ+Э | ИКЛ | ИКЛ+Э | |
| Группы | I | II | III | IV | V | VI | |
| Клетка | | | | | | | |
| Площадь, мкм ² | 50,04± 2,07 | 86,81± 3,90 | 93,73± 5,32 | 102,36± 4,99 | 64,82± 3,76 | 109,98± 4,88 | P _{1,2,4,5} <0,01 P ₃ <0,05 |
| Длина, мкм | 8,77± 0,26 | 11,09± 0,30 | 13,28± 0,65 | 12,26± 0,41 | 9,94± 0,27 | 12,74± 0,46 | P _{1,2,5} <0,01 P _{3,4} <0,05 |
| Ширина, мкм | 5,55± 0,25 | 8,19± 0,31 | 7,39± 0,38 | 7,71± 0,34 | 6,39± 0,37 | 8,58± 0,45 | P _{1,2} <0,01 P _{3,5} <0,05 P ₄ >0,05 |
| Округлость, ед | 3,45± 0,09 | 4,70± 0,11 | 4,78± 0,20 | 5,07± 0,15 | 3,95± 0,14 | 5,18± 0,16 | P _{1,2,3,5} <0,05 P ₄ >0,05 |
| Ядро | | | | | | | |
| Площадь, мкм ² | 12,37± 0,62 | 23,68± 1,29 | 19,90± 1,57 | 24,38± 1,08 | 16,39± 0,90 | 23,59± 0,09 | P _{1,4} <0,05 P ₅ <0,01 |
| Длина, мкм | 4,71± 0,15 | 6,78± 0,19 | 6,51± 0,39 | 6,54± 0,16 | 5,80± 0,19 | 6,67± 0,22 | P _{1,2,3,5} <0,05 P ₄ >0,05 |
| Ширина, мкм | 2,92± 0,14 | 3,63± 0,18 | 3,51± 0,20 | 3,80± 0,17 | 3,04± 0,14 | 3,91± 0,17 | P _{1,2,5} <0,05 P _{3,4} >0,05 |
| Округлость, ед | 1,63± 0,15 | 2,29± 0,08 | 2,10± 0,14 | 2,40± 0,07 | 1,83± 0,67 | 2,7± 0,06 | P _{1,2,5} <0,05 P _{3,4} >0,05 |

При действии ИКЛ дозой 0,2 Дж/см² статистически значимо увеличиваются все количественные характеристики ядер макрофагов (табл. 3), нередко встречаются двуядерные клетки. При облучении ИКЛ дозой 1 Дж/см² статистически значимо увеличиваются только площадь и длина ядер (табл. 3).

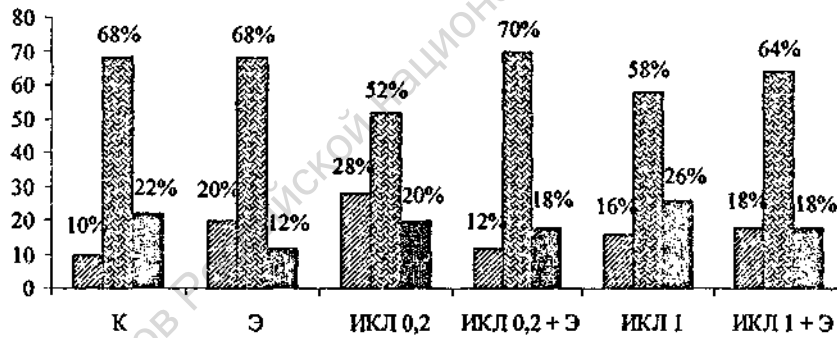
Анализ популяционного состава макрофагов показал, что при облучении ИКЛ дозой 0,2 Дж/см² увеличивается в 2,33 раза процент количества малых макрофагов, в 3 раза увеличивается доля крупных клеток, что приводит к уменьшению в популяции макрофагов клеток со средними размерами до 60% (рис. 2, а). При дозе лазера 1 Дж/см² возрастает в 1,66 раз процент количества малых макрофагов и в 7

раз увеличивается доля крупных клеток, таким образом процент количества средних макрофагов снижается до 52 % (рис. 2, а).



а)

■ Малые ■ Средние ■ Крупные



б)

■ Малые ■ Средние ■ Крупные

Рис. 2, а, б. Популяционный состав (% количества) малых, средних и крупных макрофагов по площади клетки (а) и ядра (б). К – контроль, Э – эмоксипин.

При действии ИКЛ дозой 0,2 Дж/см² увеличивается доля макрофагов с малыми ядрами в 2,8 раз, что приводит к уменьшению доли клеток со средними ядрами до 52 %, популяционный состав макрофагов по площади ядер при облучении ИКЛ в дозе 1 Дж/см² изменяется незначительно в 1,6 раз увеличивается доля макрофагов с малыми ядрами, что снижает процент количества средних ядер до 58% (рис.2,б).

Таким образом, обнаруженные изменения морфологических характеристик, количественных показателей и популяционного состава макрофагов при облучении ИКЛ свидетельствует об активации процесса адаптации клеток к

меняющемуся микроокружению (Чередеев А.Н., 1995; Ерохина В.В., 2000; Старикова Э.А., 2005; Janeway Ch. A., 2005).

В условиях сочетанного действия эмоксипина и инфракрасного лазера дозой $0,2 \text{ Дж/см}^2$, и особенно при дозе 1 Дж/см^2 отмечено увеличение числа макрофагов с типичным строением органоидов, чаще встречаются двуядерные клетки. Преобладающими являются макрофаги четвертого морфофункционального типа, в цитоплазме которых увеличено количество фагосом, на поверхности клеток сохраняются выросты цитоплазмы и достаточно высокая активность кислой фосфомоноэстеразы.

Вышеперечисленные морфологические изменения клеток в совокупности с сохранением активности кислой фосфомоноэстеразы свидетельствуют об усилении переваривающей способности клеток при наличии эмоксипина в инкубационной среде.

Сочетанное воздействие лазера дозой 1 Дж/см^2 и эмоксипина оказывает большее влияние на ядра макрофагов, в которых просматриваются ядрышки, появляются ядра с перетяжками. Выявленные морфологические изменения ядер макрофагов подтверждают результаты количественных исследований. Детальный анализ морфометрических данных показал, что при облучении макрофагов ИКЛ лазером дозой $0,2 \text{ Дж/см}^2$ с эмоксипином площадь ядра увеличивается в 1,22 раза, а при облучении в дозе 1 Дж/см^2 в 1,44 раза. Облучение клеток в дозе 1 Дж/см^2 помимо увеличения площади ядра приводит к статистически значимому увеличению длины, ширины и округлости ядра (табл. 3).

В популяционном составе происходит увеличение доли средних макрофагов при дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$ за счет уменьшения малых в 4,6 раз, при дозе 1 Дж/см^2 в основном за счет уменьшения крупных в 2,8 раз. Та же тенденция сохраняется и в популяционном составе ядер (рис. 2 а, б).

Резюмируя морфологические, морфометрические и гистохимические данные макрофагов можно предположить, что при добавлении эмоксипина в инкубационную среду лазерное излучение в дозе 1 Дж/см^2 воздействует на ядерный аппарат, активизируя морфообразовательные процессы в клетках.

Положительный эффект ИКЛ при сочетании с эмоксипином можно объяснить усилением способности молекулы препарата изменять подвижность фосфолипидов мембран при поглощении энергии кванта лазерного излучения. Благодаря этому отдельные молекулы эмоксипина активнее вступают в реакцию связывания свободных радикалов и оказывают мембранопротекторное действие (Малишевский М.В., 1992; Доровских В.А., 2005).

Задачи современной медико-биологической науки состоят не столько в морфологическом обосновании явления, как в расшифровке механизма

регуляции, без чего невозможно осуществлять управление любым процессом. В нашей работе на основании морфологического, электронно-микроскопического и морфометрического анализа были расширены представления о макрофагах легких. Изучена их реакция *in vitro* на действие красного и инфракрасного лазерного излучения различной дозы и в присутствии эмоксипина в инкубационной среде. Полученные данные позволяют приблизиться к пониманию механизма действия лазерного излучения на макрофаги. Результаты исследования можно использовать при проведении экспериментальных работ, а также в качестве объективной оценки при патологических процессах (заболевания легких) и для обоснования эффективности лазерного облучения при проведении лечебных мероприятий.

4. ВЫВОДЫ

1. С помощью современных методов анализа были выявлены морфологические, морфометрические и гистохимические критерии, позволяющие объективно оценивать реакцию макрофагов легких в кратковременной культуре при экспериментальных воздействиях.

2. Электронномикроскопические и морфометрические данные указывают на гетерогенность в популяции макрофагов легких. Особенности строения цитоплазмы позволили описать пять морфофункциональных типов. С помощью морфометрического анализа были выделены группы малых, средних и крупных макрофагов.

3. Действие КЛ в обеих дозах приводит к изменениям морфологии, количественных характеристик и популяционного состава макрофагов легких, так число крупных клеток при облучении в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$ возрастает в 4,5 раза, в дозе 1 Дж/см^2 в 7 раз. Степень выраженности морфологических и морфометрических изменений при действии КЛ в дозе $0,2 \text{ Дж/см}^2$, приводит к увеличению всех показателей клетки и большинства параметров ядра, что с одновременным нарастанием деструктивных процессов в цитоплазме, позволяет считать эту дозу предельной. Лазерное излучение в 1 Дж/см^2 обеспечивает сохранение внутриклеточных структур макрофагов, то есть проявляет свойства, присущие для оптимальной дозы.

4. Изменения морфологических характеристик макрофагов легких при облучении ИКЛ в обеих дозах проявляются усилением процесса фагоцитоза, повышением активности лизосомальных ферментов, а также изменением количественных показателей и популяционного состава клеток, что

свидетельствует об усилении функциональной активности макрофагов, расширяющей их адаптационные возможности, особенно в дозе 0,2 Дж/см².

5. Добавление в инкубационную среду эмоксилина при облучении макрофагов КЛ приводит к уменьшению деструктивных изменений в цитоплазме и нормализации структуры митохондрий, снижая таким образом побочные эффекты КЛ, особенно в дозе 0,2 Дж/см². Изменения количественных и качественных параметров макрофагов, активация синтетических процессов в клетке, путем воздействия на ядерный аппарат, свидетельствует о потенцировании биостимулирующего действия ИКЛ в присутствии эмоксилина, преимущественно в дозе 1 Дж/см². Наиболее значимые изменения при этом наблюдаются со стороны средних макрофагов.

Список работ опубликованных по теме диссертации

1. Tseluyko, S.S. Informational characteristics of action of laser emission on the cells of bronchoalveolar lavage / S.S. Tseluyko, S.V. Zinovyev, T.L. Ogorodnikova // The 8th Russia – Japan International Medical Symposium. – Blagoveshensk, 2000. – P. 98.
2. Zinovyev, S.V. Algorithm of citomorphological estimation of laser radiation of respiratori organs / S.V. Zinovyev, S.S. Tseluyko, A.V. Prokopenko, T.L. Ogorodnikova // The Ninth International Symposium of the Medical Exchange. - Jime Kanazawa, 2001. – P. 219.
3. Целуйко, С.С. Микрометод культивирования альвеолярных макрофагов – новый способ диагностики бронхальной астмы / С.С. Целуйко, С.В. Зиновьев, Т.Л. Огородникова // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – Благовещенск 2001. – Вып. 9. – С.15-16.
4. Огородникова, Т.Л. Морфометрическая характеристика альвеолярных макрофагов в норме и при воздействии лазерного излучения *in vitro* / Т.Л. Огородникова // Материалы пятой региональной научно-практической конференции: Молодежь XXI века: шаг в будущее. – Благовещенск, 2004. – Том 3. – С.65-67.
5. Ogorodnikova, T.L. Morphometrical criteria of laser radiation influence on pulmonary macrophages *in vitro* / T.L. Ogorodnikova // The Eleventh International Symposium of the Japan – Russia Medical Exchange. – Niigata, 2004. – P. 341.
6. Огородникова, Т.Л. Структурная гетерогенность альвеолярных макрофагов в норме и при лазерном воздействии *in vitro* / Т.Л. Огородникова // Бюллетень физиологии и патологии дыхания. – Благовещенск 2004. – Вып. 19. – С.34-36.

7. Огородникова, Т.Л. Популяционный состав альвеолярных макрофагов при экспериментальном воздействии *in vitro* / Т.Л. Огородникова // Материалы 6-й Международной научно-практической конференции: Достижения фундаментальных наук в решении актуальных проблем медицины. – Астраханский медицинский журнал. – Том 3. - №3. - Астрахань, 2008. – С.118-120.

8. Ogorodnikova, T.L. The Influence of Experimental Factor on Structural Rearrangement of Alveolar Macrophages *in vitro* / T.L. Ogorodnikova // The 2nd China, Japan and Korea international conference for TCM and The 7th Sino-Russia Biomedical Forum. – Harbin, China, 2010. – P. 135.

9. Огородникова, Т.Л. Альвеолярные макрофаги: изменение популяционного состава при экспериментальном воздействии / Т.Л. Огородникова // Вестник новых медицинских технологий. – Тула, 2010. - Том XVII, № 2. – С.74-75.

10. Зиновьев, С.В. Способ цитологического исследования бронхоальвеолярной жидкости / С.В. Зиновьев, Т.Л. Огородникова, А.В. Прокопенко, В.С. Козлова // Методические рекомендации. – Благовещенск, 2010. – С. 22 (на правах рукописи).

11. Ogorodnikova, T.L. The structural rearrangement of alveolar macrophages under influence of emoxipine *in vitro* / T.L. Ogorodnikova // The 8th Russia – China Pharmaceutical Forum «Modern Problems of Nanopharmacology». - Blagoveshensk, 2011. – P. 74-75.

Краткий указатель использованных условных сокращений

ИКЛ – инфракрасный лазер

КЛ – красный лазер

Огородникова
Татьяна Леонидовна

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОФАГОВ ЛЕГКИХ ПРИ
ДЕЙСТВИИ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ И АНТИОКСИДАНТА IN VITRO**

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Подписано в печать 20.04.2012. Бумага офсетная.
Формат 60x90/16. Бумага «Госзнак». Гарнитура тип Таймс.
Тираж 100 экз. Заказ № 351.
Отпечатано в типографии ООО «Поли-М» г. Благовещенск, ул. Кузнечная, 23

Из фондов Российской национальной библиотеки

2012A
12520

12-12520

Из фондов Российской национальной библиотеки