

Ocena reaktywności leukocytów krwi obwodowej u szczurów anemizowanych

ALEKSANDRA PLISZCZAK-KRÓL, STANISŁAW GRACZYK,
JAROSŁAW KRÓL, BARTŁOMIEJ JANACZYK

Katedra Anatomii Patologicznej, Patofizjologii, Mikrobiologii i Weterynarii Sądowej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR,
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

Pliszczak-Król A., Graczyk S., Król J., Janaczyk B.

Evaluation of the reactivity of blood leukocytes in anemized rats

Summary

The reactivity of rat blood leukocytes after recurrent blood losses was examined. The blood samples were collected from the heart, three times in seven-day intervals. The volume of each sample was approximately 15% of the total blood volume. The functional changes in leukocytes were determined utilizing a test of radial segmentation of nuclei (RS) in mononuclear leukocytes and a test of *Saccharomyces cerevisiae* yeast phagocytosis. Our results demonstrate that sequential blood loss induced a decrease in the number of mononuclear cells indicating RS from 21.2% after 1st blood sampling up to 13% and 14% in following samplings: a decrease in number of phagocytic granulocytes from 49.5% after 1st blood sampling up to 41% and 39.3% after 2nd and 3rd sampling, respectively; and an increase in the number of phagocytic mononuclear blood cells from 8.5% after the 1st sampling up to 9.2% and 12.7% after the 2nd and 3rd blood samplings respectively. We affirm that this frequent blood loss modified the reactivity of blood leukocytes but did not change the WBC quantity in blood.

Keywords: radial segmentation, phagocytosis, leukocytes, anemized rats

Utrata krwi jest jedną z przyczyn prowadzących do niedokrwistości, jeżeli przekracza zdolności kompensacyjne układu krwiotwórczego lub gdy następuje w czasie krótszym od tego, jaki jest potrzebny do uruchomienia mechanizmów wyrównujących. Główne objawy kliniczne niedokrwistości to: błąd skóry i błon śluzowych, zaburzenia pracy serca (tachykardia, zaburzenia rytmu) i niewydolność krążenia, zwiększone odczuwanie zimna, osłabienie, szybkie męczenie się, senność i duszność.

Hipoksja anemiczna inicjuje pojawienie się zmian w komórkach, które mogą prowadzić do adaptacji umożliwiającej przeżycie lub do ich uszkodzenia i śmierci (4, 6, 9, 11, 17). Dobrze poznane są pokrwotoczne zmiany ilościowe i jakościowe dotyczące erytrocytów. Znane są też zmiany ilościowe leukocytów, a przede wszystkim fakt pojawienia się we krwi ich form młodocianych. Mniej natomiast wiadomo na temat funkcji tych komórek. Badając wpływ hipoksji na leukocyty u człowieka, Sanidas i wsp. (18) stwierdzili, że stopień niedoboru tlenu wpływa na morfologię i reaktywność tych komórek. Zaobserwowali pojawienie się kraterowatych ubytków w błonach zewnętrznych granulocytów, uszkodzenie błon wewnątrzkomórkowych, zmniejszenie wielkości i liczby ziarnistości cytoplazmatycznych. Leukocyty wykazywały zwiększoną zdolność adhezji do śródbłonna naczyń. Część granulocytów, bez zauważalnej przyczyny, ulegała degranulacji (18). Niedobór tlenu upośledza oddychanie komórkowe, transport przez błony, aktywuje beztlenowy tor przemian energii,

nasila produkcję wolnych rodników i zmienia wewnątrzkomórkowe stężenia jonów (4, 5, 11, 13, 16, 18, 19, 23).

Nadal nie w pełni wiadomo, w jakim stopniu i w jaki sposób towarzysząca niedokrwistości hipoksja wpływa na krążące leukocyty i ich funkcje oraz komórki opuszczające w tym czasie szpik. Dlatego celem pracy było prześledzenie, czy i w jaki sposób utrata krwi u szczurów zmienia reaktywność leukocytów krwi obwodowej.

Materiał i metody

Badaniami objęto 6 szczurów, rasy Wistar, płci męskiej, o masie ok. 300 g. Zwierzęta pochodziły z hodowli Akademii Medycznej we Wrocławiu. Przetrzymany były w klatkach, w pomieszczeniu, gdzie panowała temperatura pokojowa – 21-23°C (ok. 294-296 K). Żywnione były standardowym granulatem przeznaczonym dla dorosłych szczurów i miały swobodny dostęp do wody.

Krew od szczurów pobierano w znieczuleniu ogólnym z sera trzykrotnie, każdorazowo w ilości ok. 2,5 ml, w odstępach siedmiodniowych (I i II pobranie krwi były upustami anemizującymi, III pobranie stanowiło upust diagnostyczny). W celu uniknięcia zaburzeń hemodynamicznych, każdorazowo po zakończeniu pobierania krwi podawano szczurom podskórnie ogrzany do temp. 37°C (310 K) płyn izotoniczny w ilości 5 ml. Przyjmując siedmiodniowy odstęp czasu pomiędzy kolejnymi upustami krwi kierowano się danymi wskazującymi, iż jest to okres czasu pozwalający na uniknięcie zaburzeń hemodynamicznych, a jednocześnie w tym przedziale czasowym występuje szczyt możliwości wyrównawczych ze strony układu krwio-

twórczego (1, 8). Pobrana krew, chroniona przed krzepnięciem (10 j heparyny/1 ml krwi), stanowiła materiał do badań.

Reakcję układu krwiotwórczego na upusty krwi anemizujące monitorowano na podstawie: liczby erytrocytów (RBC – red blood cell) i leukocytów (WBC – white blood cell), wartości hematokrytu (PCV – packed cell volume), poziomu hemoglobiny (HGB), średniej objętości krwinki czerwonej (MCV – mean corpuscular volume), średniej masy hemoglobiny w krwince czerwonej (MCH – mean corpuscular haemoglobin), średniego stężenia hemoglobiny w krwince czerwonej (MCHC – mean corpuscular haemoglobin concentration), odsetka retikulocytów oraz leukogramu.

Reaktywność leukocytów krwi oceniano na podstawie:

- zdolności komórek jednojądrzastych krwi do tworzenia radialnej segmentacji jąder (test spontanicznej i indukowanej radialnej segmentacji jąder – radial segmentation – RS),
- zdolności leukocytów do fagocytozy (test fagocytarny z użyciem komórek drożdży).

Test spontanicznej i indukowanej radialnej segmentacji (RS) wykonano wg metody Söderströma i wsp. (21) w modyfikacji własnej (10). Krew dzielono na dwie równe części, po 0,8 ml każda. Jedna stanowiła kontrolę (RS spontaniczna). Do drugiej dodawano 0,2 ml mieszaniny szczawianów potasu i amonu sporządzonej w stosunku 1 : 1 (RS indukowana). Obie próbki inkubowano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej – 21-23°C (ok. 294-296 K). Po inkubacji krew odwirowywano, a z uzyskanego kożuszka białokrwinkowego wykonywano rozmazy (po 2 od każdego szczura), które barwiono metodą panoptyczną Pappenheima. W każdym rozmazie liczone 200 napotkanych komórek jednojądrzastych, różnicując je na RS-dodatnie (RS+) i RS-ujemne (RS-). Za RS+ przyjmowano te komórki, których jądra posiadały szczeliny o głębokości przynajmniej 1/3 jego średnicy (ryc. 2).

Test fagocytozy z użyciem drożdży wykonano wg metody Slapnickovej i wsp. (20). Próbkę zawierającą 1 ml krwi inkubowano z dodatkiem 100 µl zawiesiny komórek drożdży (*Saccharomyces cerevisiae*), w temperaturze 37°C (310 K) przez 15 minut. Po inkubacji z każdej próbki sporządzano po 2 rozmazy, które następnie barwiono metodą panoptyczną Pappenheima. W każdym rozmazie liczone 200 napotkanych neutrocytów. W trakcie analizy rozmazów, stwierdzano obecność sfagocytowanych drożdży, także w komórkach jednojądrzastych i dlatego dodatkowo w ocenie uwzględniano też 200 napotkanych komórek tej populacji. W obu liczonych populacjach komórki różnicowano na Fag-dodatnie (Fag+) i Fag-ujemne (Fag-). Za Fag+ przyjmowano te komórki, w których stwierdzano obecność sfagocytowanych komórek drożdżowych (ryc. 4 i ryc. 6).

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej przy zastosowaniu testu t-Studenta.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań hematologicznych, zebrane w tab. 1 i 2, wskazują, że anemizacja szczurów wg przyjętej procedury nie miała wpływu na liczbę erytrocytów, wartość hematokrytu i stężenie hemoglobiny. Ich wartości, jak też wartości MCV, MCH, MCHC były zbliżone do wartości wyjściowych (tab. 1) i mieściły się w zakresach referencyjnych, charakterystycznych dla szczurów (1, 8). Nie zmieniła się też znacząco ogólna liczba i udział procentowy leukocytów (tab. 2). Brak zmian ilościowych wskazuje, że szpik w czasie 7 dni między kolejnymi upustami odtwarzał utraconą pulę komórek. Jednak następstwem prowadzonych upustów były zmiany jakościowe w komórkach krwi krążącej. Nasilonej anizopoikilocytozie (zmiana kształtu i wielkości erytrocytów) towarzyszył wzrost od-

Tab. 1. Średnia liczba erytrocytów oraz wartości charakteryzujące krwinki czerwone u szczurów doświadczalnych

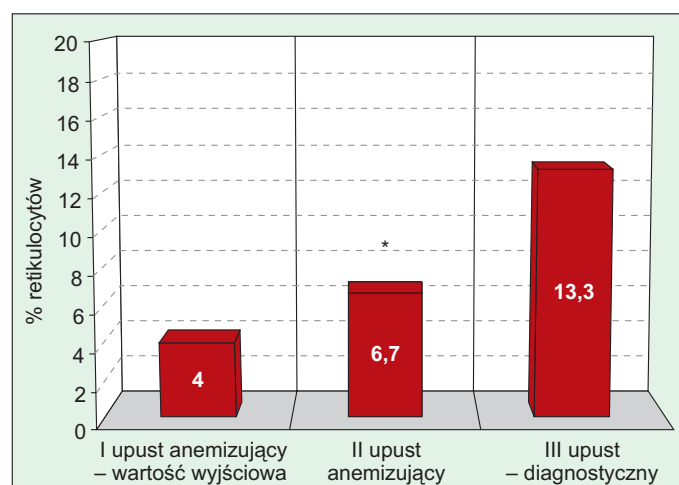
Parametry	I upust anemizujący (wartości wyjściowe)	II upust anemizujący	III upust – diagnostyczny
RBC ($10^{12}/l$)	7,0	6,9	7,0
PCV (%)	38,0	40,0	40,0
HGB (g/dl)	12,2	13,4	11,9
MCV (fl)	51,4	57,8	57,8
MCH (pg)	17,6	19,8	17,7
MCHC (%)	34,2	33,5	30,0
Retikulocyty (%)	4,0	6,7	13,3

Objaśnienia: RBC – liczba erytrocytów, PCV – hematokryt, HGB – hemoglobina, MCV – średnia objętość krwinki czerwonej, MCH – średnia masa hemoglobiny w krwince czerwonej, MCHC – średnie stężenie hemoglobiny w krwince czerwonej

Tab. 2. Średnia liczba leukocytów oraz wzór odsetkowy krwinek białych u szczurów doświadczalnych

Parametry	I upust anemizujący (wartości wyjściowe)	II upust anemizujący	III upust – diagnostyczny
WBC ($10^9/l$)	7,7	8,6	7,0
Leukogram:			
neutrocyty (%)	32	27	37
bazocyty (%)	0	1	0
eozynocyty (%)	8	4	6
monocyty (%)	1	2	2
limfocyty (%)	59	66	55

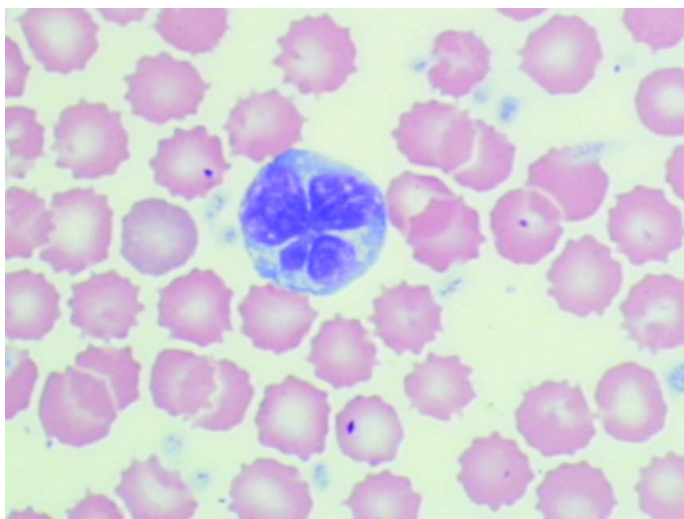
Objaśnienia: WBC – liczba leukocytów



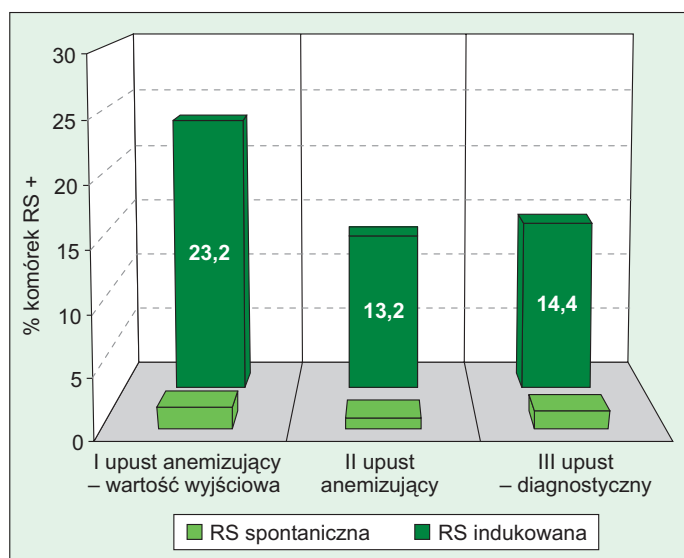
Ryc. 1. Odsetek retikulocytów we krwi u szczurów doświadczalnych

Objaśnienie: * różnica statystycznie istotna ($p \leq 0,05$) pomiędzy I i II upustem krwi

setka retikulocytów. Odsetek tych form erytrocytów z 4% (wartość wyjściowa) wzrósł do 6,7% po II i 13,3% po III upuszczeniu krwi (ryc. 1). Zmieniła się również zdolność



Ryc. 2. Komórka jednojądrzasta krwi, której jądro uległo radialnej segmentacji

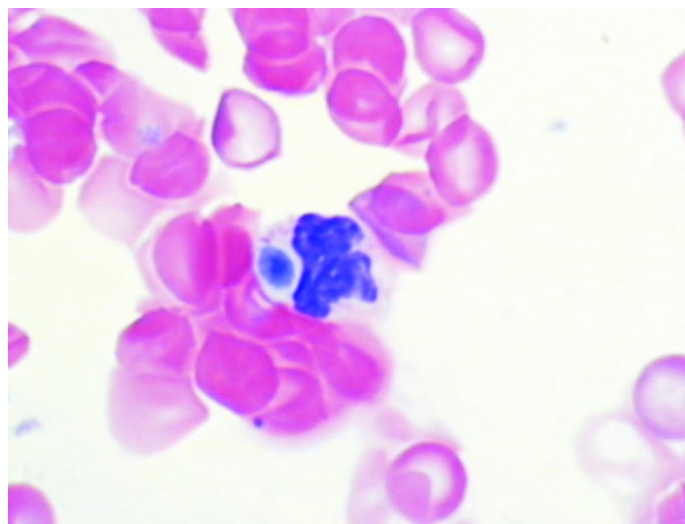


Ryc. 3. Radialna segmentacja (RS) jąder komórek jednojądrzastych krwi u szczurów doświadczalnych

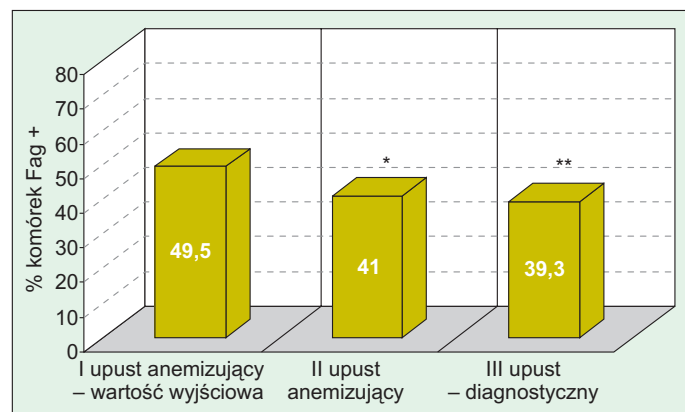
leukocytów jednojądrzastych do tworzenia radialnej segmentacji jądra (RS). Radialna segmentacja jest zjawiskiem występującym przede wszystkim w komórkach jednojądrzastych krwi (limfocyty i monocyty). Polega na pojawieniu się w jądrze komórki głębokich szczelin, zbiegających się koncentrycznie w centrum jądra. Szczeliny te powstają na skutek zwiększonej, ale przebiegającej w odpowiednim tempie, depolimeryzacji mikrotubuli cytoszkieletu komórkowego (ryc. 2) (14, 15, 21, 22). Zaobserwowano, że po II i III upuście krwi, odsetek komórek ze spontaniczną, jak i indukowaną RS obniżył się. Odsetek komórek wykazujących RS indukowaną z 23,2% (wartość wyjściowa) obniżył się do 13,2% po II i 14,4% po III pobraniu krwi (ryc. 3). Osłabienie zdolności limfocytów i monocytów do tworzenia RS może być związane ze stabilizacją mikrotubuli uwarunkowaną spowolnieniem lub wręcz zatrzymaniem ich depolimeryzacji. Obniżenie dysocjacji tubuliny z mikrotubuli obserwowano wraz z obniżeniem w komórkach stężenia ATP (2). Jedną z najczęstszych przyczyn nagłego obniżenia się stężenia ATP w komórkach bywa właśnie niewystarczające zaopatrzenie ich w tlen

(13). Stabilizację mikrotubuli cytoszkieletu pojawiającą się w wyniku hipoksji obserwowali w komórkach nowotworowych San-Oh Yoon i wsp. (17).

U szczurów doświadczalnych obserwowano także osłabienie zdolności neutrocytów krwi do fagocytozy drożdży. Liczba granulocytów zawierających sfagocytowane komórki drożdży, w porównaniu z wartościami wyjściowymi, obniżyła się o 17,2% po II i o 20,2% po III pobraniu krwi (ryc. 5). Może to być spowodowane pojawiającymi się w hipoksji anemicznej: naruszeniem labilności mikrotubuli, które w granulocytach wydają się bardziej wrażliwe na niesprzyjające warunki niż w monocytach i makrofagach (12), dezintegracją cytoszkieletu aktynowego i naruszeniem struktury błon komórkowych utrudniającymi tworzenie fagosomów (4), obniżeniem pH poniżej optymalnego dla enzymów lizosomalnych (11) oraz degranulacją samych neutrofilów (18). Natomiast zwiększoną aktywność fagocytarną w stosunku do użytych drożdży wykazywały komórki jednojądrzaste. Odsetek fagocytujących komórek jednojądrzastych wzrósł o 8,2% po II i o aż 49,4% po III upuście krwi (ryc. 7). Nasilenie zdolności tych komórek do fagocytozy zgodne jest z obserwacjami innych auto-

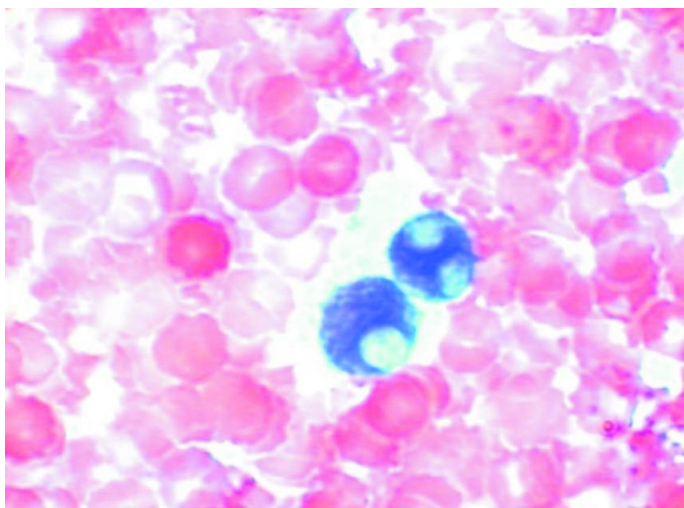


Ryc. 4. Granulocyt obojętnochłonny – wewnątrz sfagocytowana komórka drożdży

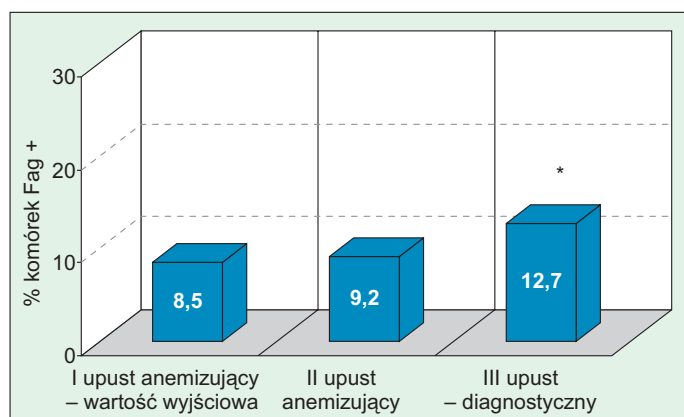


Ryc. 5. Granulocyty fagocytujące we krwi szczurów doświadczalnych

Objaśnienia: * różnica statystycznie istotna ($p \leq 0,05$) pomiędzy I i II upustem krwi; ** różnica statystycznie istotna ($p \leq 0,05$) pomiędzy I i III upustem krwi



Ryc. 6. Komórki jednojądrzaste krwi – wewnątrz sfagocytowane komórki drożdży



Ryc. 7. Komórki jednojądrzaste fagocytujące we krwi u szczurów doświadczalnych

Objaśnienie: * różnica statystycznie istotna ($p \leq 0,05$) pomiędzy I i III upustem krwi

rów (11). Jakkolwiek poglądy na temat fagocytozy komórek jednojądrzastych krwi w przebiegu hipoksji są podzielone. W środowisku obniżonej prężności tlenu makrofagi, przy zachowanej żywotności, mogą wykazywać obniżoną albo zwiększoną zdolność do fagocytozy (3, 11, 16, 19). Ta dwoistość zachowania nie została dotychczas wyjaśniona. W dużym stopniu może być zależna od wielu innych czynników, w tym od: obniżonego stężenia glukozy, degradacji błon komórkowych, naruszenia transportu błonowego, uszkodzenia mitochondriów, obniżenia procesów tlenowych i produkcji silnie toksycznych aktywnych form tlenu, reorganizacji cytoszkieletu komórkowego, obniżenia wewnątrzkomórkowego pH i napływu jonów Ca^{+2} (4, 5, 11, 13, 16, 18, 19, 23). Te skrajnie niesprzyjające warunki stają się często przyczyną śmierci komórek (4, 6, 9, 11, 16), ale mogą też uruchamiać mechanizmy adaptacji (6, 9, 11, 16), prowadząc nawet do wzrostu ich aktywności, co ma swoje odzwierciedlenie w nasileniu aktywności fagocytarnej (11).

Zmiany w leukocytach krwi, pojawiające się w warunkach poupastowej hipoksji anemicznej, w istotny sposób modulują czynność układu odpornościowego. Mogą przyczynić się do: hamowania proliferacji limfocytów (5, 7), obniżenia aktywności limfocytów T i NK (5, 7), obniżenia

zdolności makrofagów do prezentacji antygeny (11), nasilenia syntezy i uwalniania cytokin prozapalnych (3, 11, 19) i wzmożenia migracji leukocytów (13, 18, 23). Zwierzęta w hipoksji wykazują zwiększoną podatność na infekcje bakteryjne (3, 16, 19). Natomiast w jaki sposób hipoksja może zmieniać reaktywność układu odpornościowego oraz mechanizmy prowadzące do tych zmian nie są jeszcze dostatecznie poznane.

Wyniki badań własnych wskazują, że u szczurów upusty krwi (każdorazowo ok. 15% krwi krążącej) w odstępach tygodniowych prowadzą do zmian czynnościowych leukocytów, ujawniających się w zwiększonej aktywności fagocytarnej tych komórek oraz osłabionej zdolności limfocytów i monocytów do tworzenia radialnej segmentacji jądra.

Piśmiennictwo

1. Barański S., Czerniński P., Krzemińska-Lawkowicz I., Krzymowski T., Lawkowicz W.: Układ krwiotwórczy zwierząt laboratoryjnych. PWN, Warszawa 1962, 80.
2. Bershadsky A. A. D., Gelfand V. I.: Role of ATP in the regulation of stability of cytoskeletal structures. Cell Biol. Inter. Rep. 1983, 7, 173-187.
3. Chuadry I. H., Ayala A.: Mechanism of increased susceptibility to infection following hemorrhage. Am. J. Sur. 1993, 165 (2 A suppl.), 59S-67S.
4. Chuanyu Li, Jackson R. M.: Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 2000, 282, C227-C241.
5. Conforti L., Petrovic M., Mohammad D., Lee S., Ma Q., Barone S., Filipovich A. H.: Hypoxia regulates expression and activity of Kv1.3 channels in T lymphocytes: a possible role in T cell proliferation. J. Immun. 2003, 170, 695-702.
6. Dong Z., Wang J.: Hypoxia selection of death-resistant cells. J. Biol. Chem. 2004, 279, 9215-9221.
7. Facco M., Zilli Ch., Siviero M., Ermolao A., Travain G., Baesso I., Bonamico S., Cabrelle A., Zaccaria M., Agostini C.: Modulation of immune response by the acute and chronic exposure to high altitude. Med. Sci. Sports Exercise. 2005, 37, 768.
8. Feldman B. F., Zinkl J. G., Jain N. C.: Schalm's veterinary hematology. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia 2000.
9. Gardner L. B., Qing Li, Park M. S., Flanagan W. M., Semenza G. L., Chi V. Dang: Hypoxia inhibits G/S transition through regulation of p27 expression. J. Biol. Chem. 2001, 276, 7919-7926.
10. Graczyk S., Madej J. A., Pliszczak-Król A., Nowak M., Janaczyk B.: Leukocytes function in the course of tumor progression in a rat model. Acta Sci. Pol., Med. Vet. 2004, 3, 45-51.
11. Lewis J. S., Lee J. A., Underwood J. C. E., Harris A. L., Lewis C. E.: Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. J. Leuk. Biol. 1999, 66, 889-900.
12. Min Ding, Robinson J. M., Behrens B. C., Vandre D. D.: The microtubule cytoskeleton in human phagocytic leukocytes is a highly dynamic structure. Eur. J. Cell Biol. 1995, 66, 234-245.
13. Park J. H., Okayama N., Gute D., Krasmanovic A., Battarbee H., Alexander J. S.: Hypoxia/aglycemia increases endothelial permeability: role of second messengers and cytoskeleton. Am. J. Physiol. 1999, 277, C1066-C1074.
14. Pliszczak-Król A.: Wpływ ACTH na RS jąder i aktywność fosfatazy kwasnej w aktywowanych antygenem limfocytach krwi ptaków. Medycyna Wet. 2001, 57, 676-679.
15. Pliszczak-Król A.: Rola centralnych i obwodowych narządów limfatycznych w powstawaniu radialnej segmentacji (RS) jąder oraz kształtowaniu aktywności fosfatazy kwasnej w limfocytach krwi kurcząt immunizowanych. Acta Sci. Pol., Med. Vet. 2002, 1, 81-101.
16. SaiRam M., Sharma S. K., Dipti P., Pauline T., Kain A. K., Mongia S. S., Bansal A., Patra B. D., Ilavazhagan G., Devendra K., Selvamurthy W.: Effect of hypobaric hypoxia on immune function in albino rats. Int. J. Biometeorol. 1998, 42, 55-59.
17. San-Oh Yoon, Sejeong Shin, Mercurio A. M.: Hypoxia stimulates carcinoma invasion by stabilizing microtubules and promoting the Rab11 trafficking of the $\alpha 6 \beta 4$ integrin. Cancer Res. 2005, 65, 2761-2769.
18. Sanidas D., Garnham A., Mian R.: Activation of human leukocytes by acute hypoxia. Exp. Physiol. 2000, 85, 263-266.
19. Scannell G.: Leukocytes responses to hypoxic/ischemic conditions. New Horiz. 1996, 4, 179-183.
20. Slapnickova M., Berger J.: Rat neutrophil phagocytosis following feed restriction. Comp. Clin. Path. 2002, 11, 172-177.
21. Söderström U.-B., Norberg B., Brandt L.: The oxalate-induced radial segmentation of the nuclei in peripheral blood lymphocytes of different size. Scan. J. Haematol. 1976, 17, 57-61.
22. Suiko Ito: Study on the in vitro Rieder cell. Scand. J. Haematol. 1974, 12, 355-365.
23. Wood J. G., Johnson J. S., Mattioli L. F., Gonzalez N. C.: Systemic hypoxia increases leukocyte emigration and vascular permeability in conscious rats. J. Appl. Physiol. 2000, 89, 1561-1568.

Adres autora: dr Aleksandra Pliszczak-Król, ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław; e-mail: olapk@ozi.ar.wroc.pl