УДК:577.27:57.034:502.3(477)

АКТИВНІСТЬ ФОСФАТАЗ ЛЕЙКОЦИТІВ КРОВІ ОСІБ, ЩО МЕШКАЮТЬ В УМОВАХ ТРИВАЛОГО ТЕХНОГЕННОГО НАВАНТАЖЕННЯ (У ОКРЕМІ МІСЯЦІ РОКУ)

Колісник Н.В., Качанова Ж.С., Новикова К.В., Сенченко А.С.

Запорізький національний університет

С использованием методов цитохимии установлена зависимость активности кислой и щелочной фосфатаз нейтрофилов (КФн, ЩФн) и кислой фосфатазы лимфоцитов (КФлф) крови от сезона года. Параметры ритма колебаний фосфатаз в годовом ритме практически идентичны. Активность КФн в у.е. в 1,3–1,5 раза выше активности КФлф и ЩФн. Амлитуда колебания активности КФн составила 50 %, КФлф и ЩФн – 60 % от значений мезора ферментов. Максимум активности ферментов – декабрь–январь, минимум – июль–август. Форма кривой годового ритма ферментов отличалась от синусоидальной.

Нейтрофилы, лимфоциты, кислая и щелочная фосфатаза, годовой ритм

ВСТУП

Високий рівень захворюваності й смертності мешканців промислових міст відображує стан скомпрометованості, насамперед, імунної системи, яка забезпечує структурний гомеостаз [1]. Раніше ми повідомляли про наявність десинхронозу в річній організації ритмів показників лейкограми [2], протифазне коливання активності мієлопероксидази та катіонних білків нейтрофілів у практично здорових осіб м. Запоріжжя [3]. У цьому повідомленні представлені дані паралельного дослідження річної організації активності кислої фосфатази [КФ 3.1.3.2.] нейтрофілів і лімфоцитів (КФн і КФлф) і лужної фосфатази [КФ 3.1.3.1.] нейтрофілів (ЛФн) периферичної крові. Дані сучасної літератури [4–6] дають підставу думати про те, що головна роль фосфатаз у імунокомпетентних клітинах – участь у модуляції активності внутрішньоклітинних сигнальних шляхів, тобто участь у регуляції їхнього метаболізму й функціонального стану. Нейтрофіли та лімфоцити периферичної крові характеризують як різні шляхи гематопоезу, так й функції в імунному захисті [1].

Метою даної роботи є паралельне визначення активності фосфатаз у нейтрофілах і лімфоцитах крові мешканців промислового міста в умовах

зміни сезонів року й пов'язаних з ними змін геофізичних параметрів та стану несприятливих факторів навколишнього середовища, що є актуальним як у теоретичному, так і практичному відношеннях.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

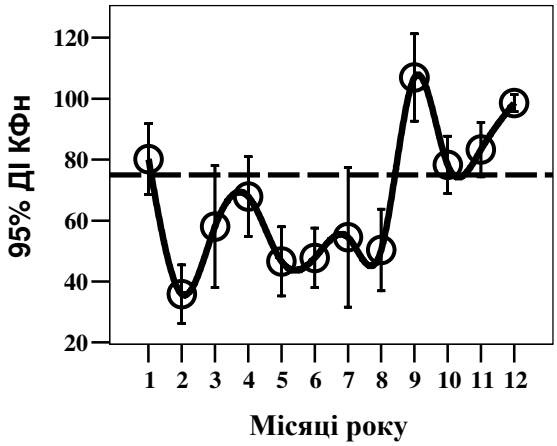
Об'єкт дослідження – мазки стабілізованої цитратом периферичної крові позаштатних донорів – чоловіків та жінок, робітників промислових підприємств м. Запоріжжя. Відповідно до вимог хронобіології [7] щомісячно протягом року та з повтором у вибіркові місяці двох наступних років з використанням методів цитохімії досліджували стан лужної фосфатази нейтрофілів (ЛФн) [8], кислої фосфатази нейтрофілів (КФн) [9] та кислої фосфатази лімфоцитів (КФлф) [9], Всього досліджено 243 особи, середній вік яких 34±8 років.

Статистичний аналіз даних здійснювали з використанням пакету прикладних програм (ППП) SPSS, версія 13 та STATISTICA, версія 7 в ОС Windows XP. Розраховували середньо місячні показники активності ферментів, їхній 95%-вий довірчий інтервал (ДІ). Аналіз впливу місяцю року на рівень активності ферментів та достовірність відмінностей проводили за допомогою однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) та апостеріорних множинних порівнянь – тест найменшої значимої різниці. Достовірність відмінностей показників у конкретному місяці від середньорічної визначали за допомогою Т-тесту однієї вибірки та тесту Мана-Уїтні. Достовірними вважали відмінності з $p<0,01$. Графічний аналіз даних здійснювали з використанням модуля "Величина помилки".

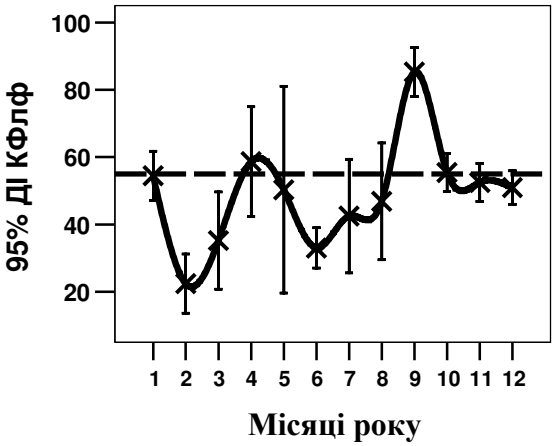
РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Відповідно до даних ANOVA (табл. 1), на активність досліджуваних фосфатаз як у нейтрофілах, так і лімфоцитах високо достовірно впливає місяць року.

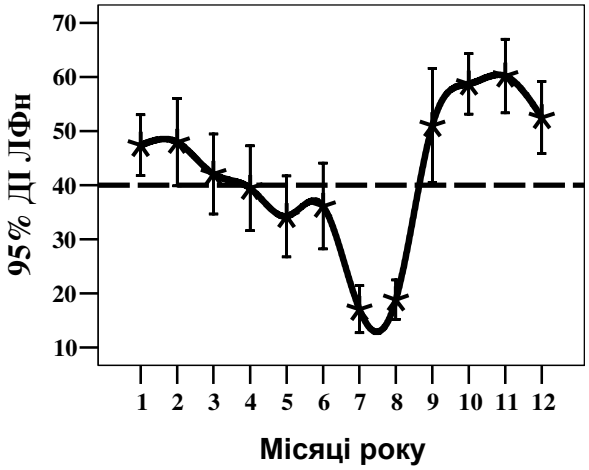
Щомісячна динаміка змін досліджуваних ферментів, достовірність відмінностей значення того чи іншого ферменту в кожному місяці порівняно з іншими місяцями року (множинні апостеріорні порівняння), середньорічне значення кожного ферменту (– – – лінія) відображені на рис.



P_{1-2}<0,01; P_{1-3}<0,01; P_{1-5}<0,01; P_{1-6}<0,01; P_{1-7} <0,01; P_{1-8}<0,01; P_{1-9} <0,01; P_{1-12}<0,01; P_{2-3}<0,01; P_{2-4}<0,01; P_{2-9} <0,01; P_{2-10} <0,01; P_{2-11}<0,01; P_{2-12}<0,01;P_{3-9} <0,01; P_{3-10} <0,01; P_{3-11}<0,01; P_{3-12}<0,01; P_{4-5}<0,01; P_{4-6}<0,01; P_{4-9} <0,01; P_{4-10} <0,01; P_{4-12}<0,01; P_{5-9} <0,01; P_{5-10} <0,01; P_{5-15}<0,01; P_{5-12}<0,01; P_{6-9} <0,01; P_{6-10} <0,01; P_{6-11}<0,01; P_{6-12}<0,01;P_{7-9} <0,01; P_{7-10} <0,01; P_{7-11}<0,01; P_{7-12}<0,01; P_{8-9} <0,01; P_{8-10} <0,01; P_{8-11}<0,01; P_{8-12}<0,01; P_{9-10} <0,01; P_{9-11}<0,01; P_{9-12}<0,01; P_{10-12}<0,01; P_{11-12}<0,01.



P_{1-2}<0,01; P_{1-3}<0,01; P_{1-6}<0,01; P_{1-9} <0,01; P_{2-4}<0,01; P_{2-5}<0,01; P_{2-7} <0,01; P_{2-8}<0,01; P_{2-9} <0,01; P_{2-10} <0,01; P_{2-11}<0,01; P_{2-12}<0,01; P_{3-4}<0,01; P_{3-9} <0,01; P_{3-10} <0,01; P_{3-11}<0,01; P_{3-12}<0,01; P_{4-6}<0,01; P_{4-9} <0,01; P_{5-6}<0,01; P_{5-9} <0,05; P_{6-9} <0,01; P_{6-10} <0,01; P_{6-11}<0,01; P_{6-12}<0,01; P_{7-9} <0,01; P_{8-9} <0,01; P_{9-10} <0,01; P_{9-11}<0,01; P_{9-12}<0,01.



P_{1-5}<0,01; P_{1-6}<0,01; P_{1-7} <0,01; P_{1-8}<0,01; P_{1-10} <0,01; P_{1-11}<0,01; P_{2-5}<0,01; P_{2-6}<0,01; P_{2-7} <0,01; P_{2-8}<0,01; P_{2-10}<0,01; P_{2-11}<0,01; P_{3-7} <0,01; P_{3-8}<0,01; P_{3-10} <0,01; P_{3-11}<0,01; P_{3-12}<0,01; P_{4-7} <0,01; P_{4-8}<0,01; P_{4-9}<0,01; P_{4-10} <0,01; P_{4-11}<0,01; P_{4-12}<0,01; P_{5-7} <0,01; P_{5-8}<0,01; P_{5-9}<0,01; P_{5-10} <0,01; P_{5-11}<0,01; P_{5-12}<0,01; P_{6-7} <0,01; P_{6-8}<0,01; P_{6-9} <0,01; P_{6-10} <0,01; P_{6-11}<0,01; P_{6-12}<0,01; P_{7-9} <0,01; P_{7-10} <0,01; P_{7-11}<0,01; P_{7-12}<0,01; P_{8-9} <0,01; P_{8-10}<0,01; P_{8-11}<0,01; P_{8-12}<0,01.

Рисунок 1 – Стан активності КФн, КФлф, ЛФн периферичної крові працездатних осіб мешканців промислового міста протягом року

У відповідності цих даних, річна динаміка змін активності КФн, КФлф, ЛФн має виражений коливальний характер. При цьому фази коливань трьох фосфатаз погоджені. Активність КФн у 1,3 рази перевищує активність КФлф та ЛФн.

Амплітуда коливань активності КФн від середньорічного значення (мезор) склала 50 %, КФлф – 60 %, ЛФн – близько 60 %. Мінімум активності фосфатаз відзначається в липні – серпні, максимум доводиться на листопад – грудень. Таким чинам, можна стверджувати про наявність річного ритму проявів активності фосфатаз нейтрофілів та лімфоцитів. Але ритм коливань активності ферментів не має вираженого синусоїдального характеру, що відображує вплив несприятливих факторів навколишнього середовища на метаболічний стан імунокомпетентних клітин крові, його адаптивні перебудови. Останні найбільш виражені у весняні місяці року.

Таблиця 1 – Дані впливу місяцю року на активність КФн, ЩФн та КФлф крові працездатних осіб, що мешкають в умовах важкого техногенного навантаження (ANOVA)

Фермент	Порівняння	F	Достовірність відмінностей (P <)
КФн	Між групами	12,965	,000
КФлф	Між групами	8,149	,000
ЛФн	Між групами	13,935	,000

Відомо, що КФн локалізована у специфічних гранулах нейтрофілів та у лізосомах лімфоцитів, ЛФн – міститься тільки у нейтрофілах і локалізована у мембранах – плазматичної та мембранах гранул цих клітин [11–13]. У відповідності з даними літератури КФн виконує функцію дефосфорилування головним чином продуктів гідролізу ДНК та РНК фагоцитованих мікробів [10]. ЛФн, як і КФлф здійснює дефосфорилування у процесах внутрішньоклітинної передачі сигналів з мембранних рецепторів («нагору за течією»). Про участь ЛФн у регуляції метаболізму в нейтрофілах свідчать дані про блокування ферментом утворення активних форм кисню активованими клітинами [14]. Це положення підтверджують і наші дані: максимум активності мієлопероксидази у річному ритмі [3] співпадає з мінімумом активності ЛФн. Про участь КФлф у регуляції

внутрішньоклітинних сигналів повідомляють [15]. У контексті викладених подань літератури про функції фосфатаз в імунокомпетентних клітинах, представляли інтерес дані кореляційного аналізу, що відображують наявність або відсутність функціональних зв'язків між досліджуваними ферментами в клітинах. Результати кореляційного аналізу відповідно Пірсону відображені в табл. 2.

Таблиця 2 – Дані кореляційного аналізу зв'язків стану активності фосфатаз протягом року

Місяць року	Ферменти	r	P<
Січень	КФн<<———>>КФлф	0,534	0,01
Лютий	кореляції відсутні		
Березень	КФн<<———>>КФлф	0,637	0,01
Квітень	КФлф<<———>>ЛФн	0,631	0,01
Травень	кореляції відсутні		
Червень	КФн<<———>>КФлф	0,581	0,01
Липень	КФн<<———>>КФлф	0,817	0,001
Серпень	КФн<<———>>КФлф	0,955	0,001
Вересень	кореляції відсутні		
Жовтень	КФн<<———>>КФлф	0,749	0,01
Листопад	КФн<<———>>КФлф	0,465	0,01
Грудень	КФлф<<———>>ЛФн	0,382	0,02

Відповідно даних табл. 2, тільки у грудні та квітні виявляється прямий зв'язок між активностями КФЛф та ЛФн, у лютому, травні та вересні кореляції відсутні, в останні місяці року виявляються сильні, дуже сильні та функціональні зв’язки між КФн та КФлф. Звісно, що серед циркулюючих зрілих лімфоцитів превалюють Т хелпери 1, цитокіни яких стимулюють головну функцію нейтрофілів – фагоцитарну активність. Таким чином, отримані нами дані відповідають загально прийнятим уявленням сучасної імунології. Цікаво, що дуже сильний зв’язок між фосфатазами нейтрофілів та лімфоцитів спостерігається у липні – серпні. Якщо прийняти до уваги, що це місяці початку масових захворювань на алергії у нашому регіоні, та

обов’язкову участь у розвитку цих реакцій як лімфоцитів, так нейтрофілів [1], то дані логічні.

Односпрямовані зміни активності ЛФн із кислими фосфатазами нейтрофілів і лімфоцитів, наявність тісних позитивних зв'язків між КФн і КФлф і практична відсутність взаємозв'язку між кислими фосфатазами й ЛФн на наш погляд відображує участь у регуляції активності ферментів у їхньому річному ритмі різних гормонів і цитокінів. Літературних відомостей з цього питання ми не зустрічали.

У світі викладеного та отриманих нами даних перспективним напрямком подальших досліджень є паралельне визначення активності фосфатаз у нейтрофілах та лімфоцитах при різних захворюваннях, де імунна складова не визиває сумніву.

ВИСНОВКИ

1. Активність КФн, КФлф та Лфн у периферичній крові практично здорових мешканців промислового міста протягом року змінюються періодично, величина періоду близька до 12 місяців; фази коливання активності фосфатаз практично погоджені.
2. Мінімум активності КФн, ЛФн і КФлф спостерігається у липні – серпні, а максимум – лютому – січні; амплітуда коливань у акрофазах для КФн дорівнює 50 %, а КФлф та ЛФн – 60 %.
3. Діапазон активності ферментів у популяції практично здорових осіб регіону складав: 7 – 173 у. о.; 4 – 193 у. о.; 2 –113 у. о. відповідно для КФн, КФлф та ЛФн, що відповідає даним літератури.

ЛІТЕРАТУРА:

1. *Ярилин А.А. Основы иммунологии. – М.: Медицина, 1999. – 605 с.*
2. *Колісник Н.В., Бордюг Л.В., Кисельова І.А. Сезонні зміни показників лейкограми мешканців промислового міста степової зони юга України // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя: ЗНУ, 2006. – Вип. 11, № 2. – С. 121–125.*
3. *Колісник Н.В,. Качанова Ж.С., Новосад Н.В., Яловенко А.С. Вплив сезонів року на активність мієлопероксидази й рівень катіонних білків у нейтрофілах периферичної крові осіб що мешкають в умовах тривалого*

техногенного навантаження // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя: Просвіта, 2008. – Вип. 13, № 1. – С. 146–152.

4. *Ozawa K., Nakata, K. Mizuno et al. Negative autoregulation of Src homology region 2-domain-containing phosphatase-1 in rat basophilic leukemia-2H3 cells // Intern. Imm. – 2007. – Vol. 19. – № 9. – P. 1049–1061.*
5. *Sakalauskiene J., Ivanauskiene E., Zekonis G., et al. Alkaline Phosphatase Activity Changes of Blood Neutrophil Leukocytes Among Patients Suffering from Diabetes Mellitus Type I and Periodontal Diseases // Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal. – 2004. – Vol.6. – P. 55–58.*
6. *Alvarado-Kristensson M., Andersson T. Protein Phosphatase 2A Regulates Apoptosis in Neutrophils by Dephosphorylating Both p38 MAPK and Its Substrate Caspase 3 // J. Biol. Chem. – 2005. – Vol. 280. – № 7. – P. 6238–6244.*
7. *Хронобиология и хрономедицина. Руководство // Под ред. Ф.И. Комарова. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.*
8. *Keplow LS. A histochemical procedure for localizing and evaluating leukocyte alkaline phosphatase activity sn smears of blood and marrow // Blood. – 1955. – Vol.10. – P.1023–1029.*
9. *Рубенс Ю.Ф., Буйкис И.М. Цитохимический метод определения активности кислой фосфатазы лейкоцитов // Вопросы лейкозологии. – 1969. – №1. – С. 377–383.*
10. *Shubiz M.G. Role of alkaline phosphatase of the neutrophils for their phagocytic function // Bull Exp.Biol.Med. – 1972. – Vol.74, № 5. – P. 1408–1412.*
11. *Pellme S., Dahlgre NC., Karlsson A. The two neutrophil plasma membrane markers alkaline phosphatase and HLA class I antigen localize differently in granule-deficient cytoplasts. An ideal plasma membrane marker in human neutrophils is still lacking // J. Immunol. methods. – 2007. – Vol. 325. – P. 1562–1570.*
12. *Scott C.S., Cordingley R.J., Roberts B.E. et al. Relation of neutrophil alkaline phosphatase activityto Fc-IgG receptor development in human blood and bone marrow // J. Clin Pathol. – 1982. – Vol. 35. – P. 967–971.*
13. *Bednarska K., Klink M., and Sulowska Z.Application of Intracellular Alkaline Phosphatase Activity Measurement in Detection of Neutrophil Adherence In Vitro // Mediators Inflamm. – 2006. – Vol. 2006. – №4.– P. 19307–193012.*

14. *Ding J. and Badwey JA. Effects of antagonists of protein phosphatases on superoxide release by neutrophils // J. Biol. Chem. – 1992. – Vol. 267. – № 9. – P. 6442–6448.*
15. *Wang Y., Vachon E., Zhang J. Tyrosine phosphatase MEG2 modulates murine development and platelet and lymphocyte activation through secretory vesicle function // Exp Med. – 2005. – Vol. 202. – № 11. – P. 1587–1597.*

INFLUENCE OF A SEASON OF YEAR ON ACTIVITY PHOSPHATASES LEUCOCYTES OF A BLOOD OF PERSONS WHICH LIVE IN CONDITIONS OF A LONG TECHNOGENIC LOAD

Kolesnik N.V., Kachanova Z.S., Novikova K.V., Senchenko A.S.

With use of methods of cytochemistry dependence of activity acidic and alkaline phosphatase neutrophils (APn) and acidic phosphatase lymphocytes (AcPl) and neutrophils (AcPn) bloods from a season is established. Parameters of a rhythm of fluctuations phosphatases in an annual rhythm are practically identical. Activity AcPn in 1,3–1,5 times of activity AcPl and APn. Amplitude fluctuations of activity AcPn has made 50 %, AcPl and APn – 60 % from value mezora enzymes. A maximum of activity of enzymes – december – january, a minimum – july–august. The form of a curve of an annual rhythm of enzymes differed from sine wave.

УДК:577.27:57.034:502.3(477)
Колісник Н.В., Качанова Ж.С., Новикова К.В., Сенченко А.С. Активність фосфатаз лейкоцитів крові осіб, що мешкають в умовах тривалого техногенного навантаження (у окремі місяці року) // Питання біоіндикації та екології. – Запоріжжя: ЗНУ, 2008. – Вип. 13, № 2. – С. 175–182.

З використанням методів цитохімії встановлена залежність активності кислої й лужної фосфатаз нейтрофілів (КФн, ЛФн) і кислої фосфатази лімфоцитів (КФлф) крові від сезону року. Параметри річного ритму коливань досліджуваних фосфатаз у працездатних особ практично ідентичні. Амплітуда коливань активності КФн склала 50 %, КФлф і ЛФн – 60 % від їхніх середньорічних значень. Максимум активності ферментів – грудень –

січень, мінімум – липень – серпень. Форма кривої річного ритму ферментів відрізнялася від синусоїдальної. Активність КФн в у.о. в 1,3–1,5 рази вище за активність КФлф і ЛФн. Позитивна кореляція активності КФн та КФлф виявляється протягом року, але у червні – серпні вона має функціональний характер.

Бібл. 15 Табл. 2. Рис. 1.