

УДК 612.419:616.15

А. В. Караулов, В. Н. Фраш

ПРИМЕНЕНИЕ АДРЕНАЛИНОВОЙ И ПИРОГЕНАЛОВОЙ ПРОБ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕЙКОЦИТОВ У КРЫС В НОРМЕ И ПРИ БЕНЗОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Известно, что количество лейкоцитов в крови, определяемое при обычном лабораторном анализе, зависит не только от величины продукции лейкоцитов, но и от скорости вымывания их из органов гемопоэза и кровяных депо, продолжительности внутрисосудистого пребывания, соотношения между циркулирующим и пристеночным пулами и, возможно, других факторов. Для изучения роли этих факторов в кинетике лейкоцитов предложены разные методы, в частности, адреналиновая и пирогеналовая пробы. Нами использованы указанные пробы для изучения кинетики лейкоцитов у крыс в норме и при бензольной интоксикации (БИ), характеризующейся сложными изменениями регуляции в системе крови [3, 8, 10, 13, 14]. В литературе имеются лишь единичные сообщения о результатах раздельного применения у животных в норме адреналиновой [9, 15] и пирогеналовой [1, 6] проб, данных же такого рода в отношении БИ нет.

Методика исследований

Опыты проводились на белых крысах весом 200—250 г. Бензол вводили подкожно в течение 30 дней в дозе 2 мл/кг. Адреналин вводили крысам в норме и при БИ подкожно однократно в дозе 0,25 мл/кг; лейкоциты и лейкоцитарную формулу изучали через 15, 30, 60, 90, 120 и 180 мин [2, 9]. Пирогенал (производства Московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи) вводили внутривенно в дозе 20 МПД/кг в физиологическом растворе, анализы крови проводились через 2, 4, 6, 8, 10 и 24 ч. В контроле эти же показатели определяли после введения физиологического раствора. Определяли также клеточный состав костного мозга в динамике БИ [7], индекс метки клеток нейтрофильного ряда по H^3 -тимидину, интенсивность включения глицина- C^{14} в тотальный белок, а также нейтрофилопоэтическую активность сыворотки крови у крыс в норме и при БИ [5]. H^3 -тимидин вводили однократно (импульсная метка) внутривенно в дозе 2 мкКи/г. Через час животных забивали, полученные мазки костного мозга заливали эмульсией типа Р (НИИ химфотопроект, Москва), экспозицию проводили при 4°С в течение трех нед. После проявления подсчитывали процент меченных клеток данного вида (индекс метки). Глицин- C^{14} вводили внутривенно по 25 мкКи на 100 г веса, через 6 ч животных забивали и определяли удельную активность тотального белка костного мозга (осажденного трихлоруксусной кислотой) на радиометре УМФ-1500-М с торцовым счетчиком СБТ-3. Расчет вели в имп/мин/мг белка.

Результаты исследований и их обсуждение

У крыс в норме введение адреналина вызывало двухфазную реакцию числа лейкоцитов — вначале увеличивалось количество лимфоцитов с максимумом на 15 мин после инъекции, позже, с максимумом на 3 ч возрастали и нейтрофилы. Этот прирост, характеризующий размер пристеночного пула, составил для лимфоцитов 7,6 тыс/мкл, для нейтрофилов — 18,2 тыс/мкл, т. е. у нормальных крыс пристеночный пул составляет соответственно 46 и 413% от циркулирующего (табл. 1).

У животных с БИ функциональные пробы проводились двукратно — в период повышенного количества лейкоцитов (первая неделя введения бензола) и во время их снижения (третья — четвертая недели). Двух-фазный характер реакции на адреналин при БИ не менялся, но выраженность ее стала иной, а именно, уменьшался прирост количества лейкоцитов в ответ на введение адреналина, т. е. при БИ уменьшался размер пристеночного пула лейкоцитов.

При этом интересно, что в период лейкоцитоза пристеночный пул у крыс с БИ был меньше, чем в период лейкопении — для нейтрофилов соответственно 7,1 и 12,0 тыс/мкл, для лимфоцитов — 1,4 и 2,2 тыс/мкл (табл. 1).

Таблица 1

Адреналиновая проба в разные периоды БИ у крыс ($\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$)

Исследуемые показатели	Достоверность	Крысы в норме (n=10)	Крысы с БИ	
			период лейкоцитоза (n=10)	период лейкопении (n=9)
Количество нейтрофилов до проведения пробы (тыс/мкл)		4,4±0,7	6,0±0,5	11,6±0,4
	p_1		<0,01	<0,001
	p_2			<0,01
Прирост нейтрофилов через 3 ч после введения адреналина		+18,2±3,0	+7,1±1,0	+12,0±1,1
	r_1		<0,01	<0,01
	p_2			<0,001
Количество лимфоцитов до проведения пробы (тыс/мкл)		16,7±3,1	19,6±1,6	6,7±0,6
	p_1		>0,1	<0,001
	p_2			<0,001
Прирост лимфоцитов через 15 мин после введения адреналина		+7,6±1,2	+1,4±0,4	+2,2±0,5
	p_1		<0,001	<0,001
	p_2			>0,1

Примечание: p_1 и p_2 — достоверность различий соответственно к данным, полученным у крыс в норме и при БИ в период лейкоцитоза.

Таблица 2

Пирогенальная проба крыс в норме и при БИ

Число нейтрофилов (тыс/мкл)	Крысы в норме (n=12)	Крысы с БИ				
		период лейкоцитоза (n=10)		период лейкопении (n=7)		
		$\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$	p_{Σ}	$\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$	p_1	p_2
До проведения пробы	1,9±0,1	3,2±0,4	<0,001	1,2±0,2	<0,01	<0,001
Через 6—8 ч после введения пирогенала (прирост)	+5,7±0,6	+4,0±0,3	<0,01	+2,5±0,1	<0,001	<0,001

Введение нормальным крысам пирогенала вызывало нейтрофильный лейкоцитоз, максимум которого приходился на 6—8 ч после инъекции и составил 400% от исходного количества нейтрофилов (табл. 2). Количество лимфоцитов и других форменных элементов крови при этом существенно не изменялось.

При БИ введение пирогенала давало достоверно меньшую нейтрофильную реакцию как в период периферического нейтрофилеза, так и

во время нейтрофилопении, что, очевидно, свидетельствует об уменьшении запасов этих клеток в костном мозге.

Несмотря на увеличение числа нейтрофилов в периферической крови в первую неделю БИ (табл. 1 и 2), общее число ядросодержащих клеток в костном мозге снижалось уже с самого начала опыта (табл. 3). Параллельно уменьшалось общее количество клеток нейтрофильного ряда, причем это снижение происходило преимущественно за счет зрелых клеток—палочко- и сегментоядерных нейтрофилов, что косвенно подтверждает данные пирогеналовой пробы об уменьшении запасов нейтрофилов в костном мозге по мере развития БИ. Это уменьшение связано, в свою очередь, с угнетением продукции клеток в нейтрофильном митотическом пуле — промиелоцитах и миелоцитах, о чем свидетельствует снижение индекса их метки по H^3 -тимидину, а также уменьшение включения меченой аминокислоты глицина в тотальный белок костного мозга. Как видно из табл. 3, снижение пролиферативной активности нейтрофилопоэза начиналось уже после первых инъекций бензола. Ранее нами при БИ было обнаружено угнетение пролиферации клеток костного мозга с помощью колхицинового метода и расчета на основании данных миелограмм и митотических индексов [7].

Таблица 3

Показатели костного мозга в динамике БИ у крыс ($\bar{X} \pm s_{\bar{X}}$)

Исследуемые показатели	Уровень контроля	Сроки опыта (дни)		
		3—7	12	30
Миелокарициты	45,0 $\pm$ 2,6 100%	37,0 $\pm$ 4,0 82%	25,0 $\pm$ 2,0** 56%	30,0 $\pm$ 1,0* 67%
Сумма клеток нейтрофильного ряда (млн)	25,0 $\pm$ 1,2 100%	16,0 $\pm$ 0,5* 64%	14,2 $\pm$ 1,1* 54%	15,1 $\pm$ 1,2** 60%
Палочко- и сегментоядерные нейтрофилы (млн)	16,1 $\pm$ 1,1 100%	11,0 $\pm$ 0,7** 69%	8,8 $\pm$ 0,7* 55%	9,0 $\pm$ 0,5 54%
Индекс метки миелоцитов и промиелоцитов (%)	42,2 $\pm$ 3,2 100%	30,0 $\pm$ 4,0*** 71%	36,4 $\pm$ 4,0 86%	32,0 $\pm$ 2,5*** 76%
Включение глицина- C^{14} (имп/мин/мг)	96,0 $\pm$ 8,1 100%	26,2 $\pm$ 4,1* 27%		22,3 $\pm$ 3,0* 23%

Примечание: * $p \leq 0,001$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,05$

Введение сыворотки крови крыс с БИ не влияло на величину нейтрофильной реакции у крыс-реципиентов — число нейтрофилов у них повышалось на $23 \pm 5\%$ по сравнению с $28 \pm 4\%$ при введении сыворотки крыс в норму.

Таким образом, применение адреналиновой и пирогеналовой проб оказалось полезным при анализе механизмов изменений лейкоцитарной картины крови при БИ. Оказалось, что уменьшение количества лейкоцитов у крыс с БИ обусловлено не только угнетением продукции клеток, но и уменьшением запасов нейтрофилов в костном мозге и размера пристеночного пула лейкоцитов. Эти дополнительные факторы и приводят к тому, что уровень лейкоцитов в периферической крови при выраженной БИ (третья—четвертая неделя опытов) недостаточно точно отражает степень угнетения нейтрофилопоэза.

Еще в большей степени несоответствие между лейкоцитарной картиной периферической крови и функциональным состоянием костного

мозга обнаружилось в начальные сроки БИ, когда в крови наблюдалось повышение числа лейкоцитов (табл. 1 и 2). Такого рода данные рассматриваются иногда как показатель стимуляции («возбуждения», «ирритации») клеточной продукции при БИ [4, 11, 16]. Однако проведенные функциональные исследования не обнаружили признаков усиления нейтрофилопоза в ранние сроки БИ—не было увеличения синтеза ДНК (по включению H^3 -тимидина), белков (по включению глицина- C^{14}), увеличения клеточности костного мозга и повышения нейтрофилопозитической активности сыворотки крови в ранние сроки БИ. (Известно, что реактивные лейкоцитозы сопровождаются повышением нейтрофилопозитической активности сыворотки [5, 12].) Адреналиновая и пирогеналовая пробы показали, что причинами увеличения количества лейкоцитов в этот период БИ могут быть, с одной стороны, наличие в это время хотя, и сниженного, но еще весьма значительного запаса нейтрофилов в костном мозге (табл. 2), а с другой—усиленный переход лейкоцитов из пристеночного пула в циркулирующий (табл. 1). По-видимому, эти перераспределительные изменения количества лейкоцитов носят компенсаторно-приспособительный характер, позволяя организму сохранять или хотя бы поддерживать уровень лейкоцитов в периферической циркуляции в условиях начинающегося угнетения их продукции в костном мозге под действием бензола.

Выводы

1. У крыс в норме введение адреналина вызывает увеличение пула циркулирующих лимфоцитов и нейтрофилов соответственно на 46 и 413%. Введение пирогенала вызывает нейтрофильный лейкоцитоз до 400% от исходного за счет выхода нейтрофилов из костномозгового депо.
2. У крыс с бензольной интоксикацией наблюдается уменьшение запасов нейтрофилов в костном мозге и перераспределение лейкоцитов между пристеночным пулом и циркулирующим в пользу циркулирующего.
3. Совместное применение пирогеналовой и адреналиновой проб целесообразно для выявления перераспределительных реакций лейкоцитов.

Литература

1. Зубенкова Э. С., Илюхин А. В., Маркелов Б. А. Изучение кинетики зрелых гранулоцитов у собак в условиях длительного гамма-облучения.— Вопросы радиобиологии и биологического действия цитостатических препаратов. Томск, 1971, с. 119—124.
2. Кассирский И. А., Денищикова Д. И. Физиологические нормы лейкоцитов и проблема leucopenia innopens. М., «Медицина», 144 с.
3. Мелюхина Л. В. Реактивные изменения клеточных элементов рыхлой неоформленной соединительной ткани и органов кроветворения под влиянием бензола.— Архив анат., гистол. и эмбриол. 1968, № 9, с. 47—55.
4. Ревнова Н. В. Функциональное состояние костномозгового кроветворения при некоторых формах хронических профессиональных отравлений бензолом и его гомологами.— Гигиена труда, 1965, № 2, с. 17—22.
5. Скуратов В. Л., Осипенко А. В., Фраш В. Н. Про вплив лейкопестинів на лейкопез.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1974, № 1, с. 95—99.
6. Суби В. О. Лейкоцитарная реакция периферической крови на пирогенал и ее прогностическое значение при применении сарколизина в эксперименте.— Пирогенал, М., 1965, с. 185—193.
7. Фраш В. Н. Про проліферативну активність кісткового мозку щурів у нормі та при пригніченні кроветворення бензолом.— Фізіол. журн. АН УРСР, 1975, № 5, с. 618—623.
8. Фраш В. Н. Об оценке изменений кроветворения при хроническом воздействии малых доз бензола.— Вопросы гигиены труда в производстве и использовании кокса и каменноугольного пека. М., 1977, с. 102—108.
9. Хилько А. С., Мадиевский Ю. М. Методика проведения адреналиновой пробы и ее показатели у практически здоровых людей.— Лабор. дело, 1972, № 3, с. 161—164.

10. Barta I. Über die Tätigkeit des leukopoietischen Systems bei Infektionskrankheiten.— *Folia haematol.*, 1933, 50, S. 287—312.
11. Latta J. S., Davies L. T. Effects on the blood and hemopoietic organs of the albino rats of repeated administrations of benzene.— *Arch. Pathol.* 1941, 31, p. 55—67.
12. Nowell P. S. Stimulation of mitosis in rat marrow cultures by serum from infected rats.— *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 1959, 101, p. 347—350.
13. Sartorius F., Sudhues M. Studien bei experimenteller chronischer Benzolvergiftung.— *Arch. Hygiene*, 1933, 110, 245—265.
14. Snyder R., Kocsis J. J. Current concepts of chronic benzene toxicity.— *CRC Critic. rev. in toxicol.* 1975, 3, p. 265—288.
15. Steel C. M., French E. B., Aitchison W. R. C. Studies on adrenaline-induced leucocytosis in normal man. I. The role of the spleen and of the thoracic duct.— *Brit. j. haematol.* 1971, 21, p. 413—421.
16. Wirschaftler L. T., Bischel M. G. Reticuloendothelial response to benzene.— *Arch. environ. health.* 1960, 21, p. 10—16.

Свердловский институт гигиены труда
и профзаболеваний

Поступила в редакцию
18.VIII 1977 г.

A. V. Karaulov, V. N. Frash

USE OF EPINEPHRINE AND PYROGENAL TESTS FOR STUDY OF LEUCOCYTES REDISTRIBUTION IN NORMAL RATS AND THOSE WITH BENZENE INTOXICATION

Summary

Administration of single dose of epinephrine or pyrogenal to rats with benzene intoxication induced a less leucocytic reaction in comparison to normal ones. Incorporation of H_3 -thymidine into promyelocytes and myelocytes and of glycine- ^{14}C into bone marrow proteins decrease as well. So, the number of leucocytes in peripheral blood with benzene intoxication depends not only on a degree of bone marrow inhibition, but also on a decrease of parietal intravascular pool as well as on a decrease of neutrophilic reserves in bone marrow.

Institute of Labour Hygiene and Professional
Diseases, Sverdlovsk