

- блица З  
концентрацию
- $\times 10^3$
- Брадикинин  
(0,25 мг/кг)
- 6  
64,2  
4,1  
48,7  
3,9  
0,04
- связь между  
брадикинином  
происходит  
нний синтез  
ко механизму  
дет предме-
- (0,5 мг/кг)  
крови крыс.  
(5 мг/кг), а  
слюна) сни-  
зуретическо-  
е минерало-  
вности коры  
одной функци-
- ехи физиол.  
канд. мед.  
и. М., 1969.  
надпочечни-  
л, с. 16—18.  
и кининазы  
ак ССРР,  
тоды в ме-  
биологиче-
9. Cline M. J. Plasma kinins and cortisol: a possible explanation of the anti-inflammatory action of cortisol.— *Science*, 1966, 153, p. 1135—1138.
  10. Frey E. K., Kraut H., Werle E. et al. Das kallikrein-kinin system und seine inhibitoren. Stuttgart, Enke Verlag, 1968. 376 S.
  11. Harris M. C. Release of the antidiuretic hormone by bradykinin in rats.— *Pharm. Res. Commun.*, 1969, N 2, p. 161.
  12. Jacobson E. D. Effect of bradykinin on the kidney and gastrointestinal organs.— In: *Handbook of Experimental Pharmacol.* Berlin, 1970, 25, p. 385—388.
  13. Rocha e Silva M., Malnic G. Release of antidiuretic hormone (ADH) by bradykinin.— *J. Pharm. exp. Therap.*, 1964, 146, N 1, p. 24—32.
  14. Stürmer E., Berde B. Kallidin u. Bradikinin. Vergleichende pharmakologische Untersuchungen.— *Arch. exp. Path. Pharm.*, 1962, 243, p. 355—356.

Одесский медицинский институт

Всесоюзный селекционно-генетический институт, Одесса

Поступила в редакцию  
9. XI 1978 г.

УДК 616.002.1:576.8.097.32:612.015.12

Р. У. Липшиц, А. П. Белозоров

## ЭКЗОЦИТОЗ ФЕРМЕНТОВ ЛЕЙКОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПРИ ГИПЕРЕРГИЧЕСКОМ ВОСПАЛЕНИИ

В патогенезе острого воспаления большое значение принадлежит лизосомальным факторам нейтрофилов, выполняющим функцию медиаторов воспалительной реакции. К ним относятся кислые и нейтральные протеазы, эластаза, коллагеназа, кининобразующие и гиалуронидазоподобные ферменты, катионные белки, медленно реагирующее вещество, сходное с простагландинами, анионное вещество и др. Выделение этих медиаторов в очаге воспаления оказывает повреждающее действие на основное вещество соединительной ткани и терминальное сосудистое ложе, повышает проницаемость сосудов, вызывает образование или выделение других медиаторов воспаления — гистамина, кининов, активацию комплемента. Литературные данные свидетельствуют о повышенной активности лизосомальных ферментов в очаге воспаления [1, 5]. Экзоцитоз лизосомальных ферментов — проявление активной клеточной функции. Показана связь процессов экзоцитоза с внутриклеточной концентрацией цАМФ и цГМФ.

В настоящее время изучено, главным образом, выделение лизосомальных ферментов из лейкоцитов экссудата. В литературе нет данных о процессах экзоцитоза из лейкоцитов периферической крови при гиперергическом воспалении. В связи с этим было предпринято изучение спонтанного и индуцированного выделения лизосомальных ферментов из лейкоцитов, полученных из периферической крови животных с экспериментально вызванным гиперергическим воспалением.

### Методика исследований

Исследование проведено на 32 кроликах весом 1,7—2,3 кг. Животных сенсибилизовали повторными внутрикожными инъекциями 3,0 мл нормальной лошадиной сыворотки с интервалом 5 дней. Разрешающей инъекцией служила 3—5 инъекция сыворотки, после которой обычно развивался феномен Артюса. Выделение лейкоцитов периферической крови производилось по Хенсону [7]. Из краевой вены уха получали 10 мл крови в 3,5 мл смеси 3,7 % ЭДТА (2 части) и физиологического раствора (5 частей), добавляли 10 мл 3 % желатина и через 20 мин после осаждения эритроцитов отделяли взвесь лейкоцитов в плазме и центрифугировали при 400 g 10 мин. Эритроциты гемолизировали взвешиванием осадка в 0,87 % растворе  $\text{NH}_4\text{Cl}$  с pH 7,2. Через 5 мин пробы центрифугировали 10 мин при 200 g. Последующая обработка производилась при 4 °C. Лейкоциты отмывали смесью физиологического раствора с фосфатным буфером и взвешивали в концентрации  $2 \cdot 10^7$  клеток в мл раствора Тироде с pH 7,2, содержащем 0,01 M Трис-буфера,  $5 \cdot 10^{-3}$  M глюкозы и 0,25 % бычьего сывороточного альбумина. Стимуляция экзоцитоза производилась опсонизированным зимозаном. Зимозан отмыва-

ли в физиологическом растворе и взвешивали в свежей крольчье сыворотке в концентрации 5 мг/мл. После инкубации в течение 20 мин при 30 °С зимозан отмывали три раза физиологическим раствором и взвешивали в растворе Тироде в концентрации 2,5 мг/мл. К 0,1 мл взвеси лейкоцитов добавляли 0,01 мл взвеси зимозана и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. При определении спонтанного высвобождения ферментов к взвеси лейкоцитов добавляли раствор Тироде. После окончания инкубации взвесь клеток центрифугировали 5 мин при 200 г и в супернатанте определяли активность выделившихся из клеток ферментов. Осадок гомогенизировали в физиологическом растворе, содержащем 0,2 % Тритона X100, центрифугировали 5 мин при 200 г и определяли в супернатанте активность ферментов. Сумма выделившейся из клеток и связанный с клетками активностей приравнивалась к 100 %. Маркерами лизосомальных ферментов служили  $\beta$ -глюкуронидаза, активность которой определялась по модифицированному микрометоду [6], и кислая фосфатаза, определяемая по [2].

Статистическая обработка производилась по Стьюденту [4].

### Результаты исследований и их обсуждение

Исследование экзоцитоза ферментов было проведено через 2,5 ч, 24 ч и 3 сут после разрешающей инъекции. Полученные результаты приведены в табл. 1 и 2.

Как видно из данных, приведенных в табл. 1, при гиперергическом воспалении отмечается повышенное спонтанное высвобождение  $\beta$ -глюкуронидазы из лейкоцитов

Таблица 1

Выделение  $\beta$ -глюкуронидазы лейкоцитами периферической крови при гиперергическом воспалении (в % от общей активности)

| Время исследования<br>после разрешающей инъекции | <i>n</i> | Спонтанное<br>высвобождение | Высвобождение<br>с зимозаном | Индукционное<br>высвобождение** |
|--|----------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 2,5 ч  | 6        | 13,4±3,3*                   | 38,0±6,9                     | 24,6±7,7                        |
| 24 ч   | 6        | 12,8±3,2*                   | 35,2±15,0                    | 22,6±16,0                       |
| 3 сут  | 6        | 14,3±3,6*                   | 35,0±4,8                     | 21,0±8,0                        |
| Контроль   | 10       | 4,5±2,7                     | 37,2±10                      | 32,7±11,2                       |

\* — различие между опытом и контролем статистически достоверно,  $p<0,05$ ; \*\* — индуцированное высвобождение определялось как разность высвобождения с зимозаном и спонтанного высвобождения.

Таблица 2

Выделение кислой фосфатазы лейкоцитами периферической крови при гиперергическом воспалении (в % от общей активности)

| Время исследования<br>после разрешающей инъекции | <i>n</i> | Спонтанное<br>высвобождение | Высвобождение<br>с зимозаном | Индукционное<br>высвобождение** |
|--|----------|-----------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| 2,5 ч  | 6        | 5,1±2,1                     | 10,5±6,0                     | 5,4±4,2                         |
| 24 ч   | 6        | 6,5±3,7                     | 11,9±6,5                     | 5,4±5,5                         |
| 3 сут  | 6        | 5,8±2,5                     | 9,6±2,3                      | 3,8±3,3                         |
| Контроль   | 10       | 3,8±0,9                     | 6,6±1,4                      | 2,8±1,7                         |

периферической крови, инкубированных *in vitro*. Высвобождение  $\beta$ -глюкуронидазы в присутствии зимозана мало отличалось в опытной и контрольной группах. Индуцированный экзоцитоз был снижен за счет повышения спонтанного.

Спонтанное высвобождение кислой фосфатазы у животных с феноменом Артюса также повышалось, но в меньшей степени, чем  $\beta$ -глюкуронидазы (табл. 2). Малая выраженность изменений со стороны кислой фосфатазы может быть объяснена тем,

### Экзоцитоз ферментов лейкоцитов

что метод Лоури—Покровского, определяет не только лизосомальную фосфатазу, локализующуюся в микросомах. За счет фосфатаз, не связанных с лизосомами, оказывается заниженной, поскольку

Усиление спонтанного выделения следствием: 1) активации процессов транспортных мембранных в результате повреждения со стороны специфического маркера сравнению с кислой фосфатазой по ферментов связано с активацией экзоцитоза.

Причиной активации экзоцитоза в гиперергическом воспалении может быть не только связанные с феноменом Артюса системы комплемента.

По-видимому, основным источником ставляющими более 50 % в лейкоцитарных моноцитах.

Снижение индуцированного высвобождения активированные *in vivo* лейкоциты в результате воздействия частиц зимозана.

1. При гиперергическом воспалении кислой крови, инкубированные *in vitro*,  $\beta$ -глюкуронидазу и кислую фосфатазу в степени со стороны  $\beta$ -глюкуронидазы периферической крови.

2. Одновременно с повышением экзоцитоза, индуцированного опсонизирующим, что стимулированные *in vivo* лейкоциты рующее воздействие зимозана.

- Липшиц Р. У., Белозеров А. П. К гиперергического воспаления.—Иммунология, 1969, 652 с.
- Покровский А. А. (ред.) Биохимия, 1969, 652 с.
- Покровский А. А., Тутельян В. А. Л
- Урбах В. Ю., Биометрические методы
- Амандола Г., Ди Роза М., Sorrentino, release in rat carrageenin pleurisy
- Talalay P., Fishman W. H., Huggins, glucuronic acid as substrate for the 1946, 166, p. 754—773.
- Henson P. M., Oades Z. G., Stimulated immunoglobulin aggregates.—J. Clin.

Кафедра патологической физиологии Харьковского медицинского института

что метод Лоури—Покровского, основанный на гидролизе *n*-нитрофенилфосфата, определяет не только лизосомальную 2 $\beta$ -глицерофосфатазу, но и неспецифические фосфатазы, локализующиеся в микросомальной фракции и плазматической мемbrane [3]. За счет фосфатаз, не связанных с лизосомами, выделившаяся из клетки активность оказывается заниженной, поскольку она выражается в процентах от общей активности.

Усиление спонтанного выделения ферментов лизосом из лейкоцитов может быть следствием: 1) активации процессов экзоцитоза или 2) повышения проницаемости клеточных мембран в результате повреждения клетки. Большая выраженность изменений со стороны специфического маркера лизосомальных ферментов  $\beta$ -глюкуронидазы по сравнению с кислой фосфатазой позволяет предположить, что спонтанное выделение ферментов связано с активацией экзоцитоза.

Причиной активации экзоцитоза в лейкоцитах периферической крови при гиперергическом воспалении может быть неспецифический эффект воспалительной реакции, а также связанные с феноменом Артюса действие иммунных комплексов или активация системы комплемента.

По-видимому, основным источником ферментов являются псевдоэозинофилы, составляющие более 50 % в лейкоцитарной взвеси, наряду с 25—30 % лимфоцитов и 10 % моноцитов.

Снижение индуцированного высвобождения ферментов можно объяснить тем, что активированные *in vivo* лейкоциты не отвечают на дополнительное стимулирующее воздействие частиц зимозана.

### Выводы

1. При гиперергическом воспалении — феномене Артюса лейкоциты периферической крови, инкубированные *in vitro*, спонтанно высвобождают лизосомальные ферменты —  $\beta$ -глюкуронидазу и кислую фосфатазу. Спонтанный экзоцитоз выражен в большей степени со стороны  $\beta$ -глюкуронидазы и связан, по-видимому, с активацией лейкоцитов периферической крови.

2. Одновременно с повышением спонтанного экзоцитоза отмечается снижение экзоцитоза, индуцированного опсонизированным зимозаном. По-видимому, это связано с тем, что стимулированные *in vivo* лейкоциты не отвечают на дополнительное стимулирующее воздействие зимозана.

### Литература

1. Липшиц Р. У., Белозоров А. П. Кислая фосфатаза и  $\beta$ -глюкуронидаза в очаге гипергического воспаления.— Иммунология и аллергология, Киев, 1977, с. 119—121.
2. Покровский А. А. (ред.) Биохимические методы исследования в клинике. М.: Медицина, 1969, 652 с.
3. Покровский А. А., Тутельян В. А. Лизосомы. М.: Наука, 1976. 382 с.
4. Урбах В. Ю. Биометрические методы. М.: Наука, 415 с.
5. Amendola G., Di Rosa M., Sorrentino L. Leucocyte migration and lysosomal enzymes release in rat carrageenan pleurisy.— Agents and Actions, 1975, N 5/3, p. 250—255.
6. Talalay P., Fishman W. H., Huggins C. Chromogenic substances: II. Phenolphthalein glucuronic acid as substrate for the assay of glucuronidase activity.— J. Biol. Chem., 1946, 166, p. 754—773.
7. Henson P. M., Oades Z. G., Stimulation of human neutrophils by soluble and insoluble immunoglobulin aggregates.— J. Clin. Invest. 1975, 56, p. 1053—1061.

Кафедра патологической физиологии  
Харьковского медицинского института

Поступила в редакцию  
5.VII 1978 г.