

УДК 612.112.91:612.14

Е. В. Скрипка

ВЛИЯНИЕ КРОВОПОТЕРИ НА ИЗМЕНЕНИЕ АКТИВНОСТИ ЛИЗОСОМАЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ НЕЙТРОФИЛОВ И УРОВЕНЬ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ

При воздействии на организм различных повреждающих факторов неинфекционной природы наблюдается активация миелоидного кроветворения, сопровождаемая нейтрофильным лейкоцитозом в периферической крови [1, 2, 3]. Однако механизм этой неспецифической реакции на чрезвычайные раздражители объяснения не получил.

Известна способность лизосомальных ферментов как к вазодилатации, так и к вазоконстрикции [6]. Первая, вероятно, обуславливается свойством ферментов активировать опосредованно через фактор Хатемана калликреиновую систему [4] и кининоген [12]. Сосудосуживающее действие, очевидно, реализуется принадлежащим к лизосомальным энзимам ренином, а также косвенно лизосомальными ферментами, обладающими кининазными свойствами [12]. Следует полагать, что способность нейтрофильных лейкоцитов как к кининообразующей, так и кининазной активности [10] связана непосредственно с этими свойствами лизосомальных ферментов.

Изложенные данные, свидетельствующие об участии ферментов лизосом в различных гуморально-регуляторных процессах, позволяют допустить возможность участия лизосомальных энзимов нейтрофильных лейкоцитов в регуляции артериального давления.

Методика исследований

Эксперименты поставлены на 32 кроликах массой 2,5—3 кг. Животные были разделены на две серии: I — контрольная (22 кролика) — животные с кровопотерей, составляющей 15 % общей массы циркулирующей крови; II — опытная (10 кроликов) — животные с аналогичной кровопотерей в условиях стабилизации мембран лизосом. Животные I серии были разделены на две группы. У животных первой группы I и II серии в периферической крови определяли количество лейкоцитов в единице объема, лейкоцитарную и лизосомально-катионную формулы; вычисляли абсолютное количество нейтрофильных лейкоцитов в единице объема. В костном мозге определяли количество миелокариоцитов в единице объема костномозговой ткани, подсчитывали миелограмму; вычисляли абсолютное количество клеток миелоидного ряда, клеток пролиферирующего и созревающего пула в единице объема костномозговой ткани. Количество лейкоцитов и миелокариоцитов в единице объема подсчитывали в камере Горяева. Мазки крови и костного мозга окрашивали по Паппенгейму. Лизосомы нейтрофильных лейкоцитов — красителем Мая — Грюнвальда [11] (в течение 4—5 мин после предварительной фиксации метанолом; мазки промывали дистиллированной водой и высушивали). Катионные белки окрашивали световым зеленым по методике, разработанной в нашей лаборатории: фиксированные в течение 5 мин метанолом мазки погружали на 15 мин в спиртовой раствор красителя, приготовленный по схеме [11], после чего их быстро ополаскивали дистиллированной водой и в течение последующих 30 с докрашивали 0,25 % -ным водным раствором азур А; затем краситель смывали дистиллированной водой и высушивали мазки. Показатели периферической крови и миелопоэза исследовали: у животных первой группы I серии до кровопотери, через 3 ч и через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 сут после кровопотери; у животных II серии — до введения стабилизатора лизосомальных мембран, на 3 сут введения, непосредственно перед воспроизведением кровопотери, и через 1, 2, 3 сут после кровопотери.

Кровопотерю, равную 15 % от общего объема циркулирующей крови, воспроизводили под местным обезболиванием из общей сонной артерии.

Стабилизацию мембран лизосом у животных II серии вызывали внутривенным введением 10 % раствора салицилата натрия [5, 9], из расчета — 1 мл/кг. Стабилизатор вводили в течение 6 дней, из них — 3 дня — до операции.

У кроликов второй группы I и II серии изучали динамику артериального давления: у животных I серии — до кровопотери, непосредственно после кровопотери, через 3 ч и 1, 2 сут после кровопотери; у животных II серии — до кровопотери, непосредственно после и через 3 сут после кровопотери. Артериальное давление регистрировали с помощью электроманометра, соединенного с канюлей, введенной в общую сонную артерию.

Полученные данные обработаны статистически.

Результаты исследований и их обсуждение

Из табл. 1 следует, что у животных первой группы I серии уже через 3 ч после кровопотери наблюдался абсолютный нейтрофильный лейкоцитоз, который достигал максимального уровня через 1 сут и сохранялся в течение трех последующих суток. Через 5 сут исследуемые показатели восстанавливались до исходного уровня.

У животных II серии введение стабилизатора в течение трех дней до операции не вызывало изменения изучаемых показателей периферической крови и костного мозга. Через 1 сут после кровопотери наблюдался нейтрофильный лейкоцитоз. Максимального уровня он достигал через 2 сут, но уже в последующие сутки наблюдалось восстановление показателей до исходного уровня (табл. 1).

Из табл. 2 следует, что при окраске лизосом красителем Мая — Грюнвальда у животных контрольной серии в ранние сроки после кровопотери в нейтрофилах их количество уменьшалось. Так, число нейтрофильных лейкоцитов с полным набором лизосом (более 30) снижалось до 60,8 % уже через 3 ч после операции. У животных опытной серии через 1 сут после кровопотери 95 % нейтрофилов содержали полный набор лизосом. И в контрольной, и в опытной сериях процесс дегрануляции максимально нарастал через 2 сут после кровопотери. Однако, в контрольной серии количество нейтрофилов, практически не содержащих лизосом, достигало в этот срок 74,5 %, тогда как в опытной — лишь 12 %. Через 2 сут артериальное давление, снижавшееся непосредственно после кровопотери в обеих сериях, в контрольной серии восстанавливалось до исходного уровня, а в опытной — было ниже исходного на 20 мм рт. ст. и через 3 сут после операции (табл. 4), когда процесс восстановления лизосомального аппарата у животных этой серии завершался. Лизосомальный аппарат нейтрофилов в контрольной серии восстанавливался через 5 сут после кровопотери.

При окраске световым зеленым отмечалась аналогичная закономерность в динамике дегрануляции, обусловленной потерей катионных белков.

Изменение количества лейкоцитов (тыс/мм ³)						после
Серия опытов	Показатели ($M \pm m$)	До кровопотери	После			кровотери
			3 ч	1		сутки
I (первая группа)	Количество лейкоцитов	8,4 ± 1,17	14,9 ± 1,36*	19,6 ± 1,85*		19
	Абсолютное количество нейтрофилов	3,3 ± 0,46	10,5 ± 1,94*	14,5 ± 1,94*		13
II	Количество лейкоцитов	10,5 ± 0,57		14,4 ± 0,77*		13
	Абсолютное количество нейтрофилов	5,5 ± 0,61		10,1 ± 0,81*		11
Примечание. * — отмечены данные, достоверно отличающиеся от таковых до						кровотери

Примечание. * — отмечены данные, достоверно отличающиеся от таковых до кровопотери

У животных контрольной серии через 1 сут после операции увеличивалось количество клеток созревающего пула гранулоцитарного ростка (табл. 3). Преобладание процесса созревания сохранялось и в последующие сутки. Равновесие между процессами пролиферации и созревания устанавливалось через 3 сут, но на более высоком уровне, обеспеченном уже через 2 сут после кровопотери. В последующие сутки наблюдалось преобладание процесса пролиферации. Через 5 сут показатели миелопоэза восстанавливались до исходного уровня.

У животных опытной серии в ранние сроки изменения активности миелопоэза не были выражены. Через 3 сут после кровопотери отмечалось его угнетение.

Таким образом, проведенные исследования позволяют проследить зависимость восстановления артериального давления после острой кровопотери от степени дегрануляции нейтрофильных лейкоцитов. Так, максимальная степень дегрануляции и восстановление давления наблюдаются в один и тот же срок исследования, а стабилизация лизосомальных мембран нейтрофилов приводит к задержке его восстановления и в более поздние сроки, что свидетельствует об участии лизосомальных нейтрофильных клеток в гуморальной регуляции артериального давления.

Известно, что ферменты лизосом первоначально обуславливают снижение общего сопротивления, но в дальнейшем сопротивление сосудов повышается [6]. Нейтрофильные лейкоциты также проявляют последовательно кининообразующую, а затем кининазную активность. Относительно отдаленные сроки, в которые наблюдаются максимальная степень дегрануляции и восстановление артериального давления после кровопотери, позволяют полагать, что на этом этапе исследований проявляется кининазная активность нейтрофилов, обусловленная наличием в гранулоцитах кролика и человека неидентичных плазменному ферменту кининаз [13], причем данные номенклатуры лизосомальных энзимов, рекомендованной Международным биохимическим союзом, которая включает карбоксипептидазы, дипептидазы [12], дают основание допускать, что кининазы нейтрофилов принадлежат к системе лизосомальных ферментов.

Стабилизация мембран лизосомальных ферментов в кровяное русло, а следовательно, и их участие в гуморальной регуляции артериального давления, что исключает реализацию их кининазной (на данном этапе) активности, приводящей в конечном итоге к повышению периферического сопротивления сосудов. Это, с нашей точки зрения, и приводит к задержке восстановления артериального давления, наблюдаемой при стабилизации.

Таблица 1

после острой 15 % кровопотери					
кровопотери через					
сутки					
2	3	4	5	6	
19,2±1,87*	16,5±1,85*	12,7±1,91	8,2±1,51	6,5±1,24	
13,8±1,92*	11,2±1,83*	7,3±1,63*	3,9±1,13	2,9±0,82	
19,4±0,86*	10,5±0,63				
12,9±0,92*	4,9±0,52				
кровопотери.					

Таблица 2

Изменение лизосомально-катионной формулы нейтрофилов после острой 15 % кровопотери ($M \pm m$)

Серия опытов	Лейкоциты, (%) с числом лизосом	Окраска	До кровопотери	После кровопотери через					
				3 ч			сутки		
				1	2	3	4	5	6
I (первая группа)	большее 30	1	100	60,8±4,26*	33,8±6,25*	16,9±4,85*	41,6±7,19*	72,2±5,71*	91,8±3,82
	меньше 30	2	100	57,8±4,83*	32,8±5,79*	12,9±3,93*	40,8±3,93*	74,5±5,22*	91,2±4,26
	меньше 10	2	0	16,5±1,60*	14,1±2,55*	8,6±2,08*	16,1±2,78*	16,4±2,81*	5,8±2,82
	меньше 10	2	0	17,3±1,96*	14,1±2,84*	7,1±1,03*	16,6±2,25*	15,5±2,41*	5,9±2,88
II	большее 30	1	0	22,7±4,99*	52,1±6,82*	74,5±4,07*	42,3±7,41*	11,5±4,32*	2,4±1,25
	большее 30	2	0	24,9±4,71*	53,1±5,84*	80,0±4,28*	42,6±7,44*	14,6±4,21*	3,0±1,61
	меньше 30	1	100	93,1±1,60*	93,0±1,61*	81,2±2,32*	93,9±2,61*		
	меньше 30	2	100	1,9±0,75*	1,9±0,75*	79,9±2,50*	93,3±2,91*		
	меньше 10	2	0	2,3±0,79*	2,3±0,79*	6,8±1,62*	3,3±1,44*		
	меньше 10	2	0	3,0±1,35	3,0±1,35	6,4±1,76*	3,4±1,53		
				4,7±1,75*	4,7±1,75*	12,0±1,55*	2,8±1,63		
						13,7±2,42*	3,3±1,61		

Примечание. I — окраска лизосом нейтрофилов красителем Мая—Грюнвальда, 2 — окраска катионных белков световым зеленым.

Таблица 3

Изменение показателей миелопоэза (тыс/мм³) после острой 15 % кровопотери

Серия опытов	Показатели миелопоэза ³ (M ± m)	До кровопотери	После кровопотери через						
			3 ч			сутки			
			1	2	3	4	5	6	
I (первая группа)	Миелокарионциты	56,2 ± 10,66	55,8 ± 9,65	86,7 ± 15,59	94,3 ± 16,48*	110,9 ± 16,34*	62,4 ± 13,71	58,5 ± 11,89	49,7 ± 8,65
	Клетки пролиферирующего пула	14,0 ± 2,76	11,7 ± 2,65	17,9 ± 3,52	22,4 ± 2,06*	26,0 ± 5,17*	22,8 ± 2,09*	13,2 ± 1,72	11,7 ± 1,79
	Клетки созревающего пула	11,5 ± 2,56	10,1 ± 3,92	30,5 ± 6,34*	32,5 ± 5,76*	27,8 ± 3,97*	14,4 ± 3,04	9,9 ± 1,94	8,4 ± 1,33
II	Миелокарионциты	78,7 ± 9,29		56,6 ± 3,56	73,8 ± 4,56	49,2 ± 3,14*			
	Клетки пролиферирующего пула	21,8 ± 4,31		11,1 ± 2,20	20,3 ± 1,22	10,1 ± 0,96*			
	Клетки созревающего пула	19,4 ± 2,61		16,5 ± 1,35	17,2 ± 1,54	12,7 ± 1,06*			

Таблица 4

Изменение артериального давления (мм рт. ст.) после острой 15 % кровопотери

Серия опытов	Показатели ($M \pm m$)	После кровопотери				
		непосредственно	через			
			3 ч	сутки		
				1	2	3
I (вторая группа)	117 $\pm$ 5,0	-43 $\pm$ 5,3*	-42 $\pm$ 2,5*	-33 $\pm$ 2,5*	0, $\pm$ 1,6	—
II	114 $\pm$ 4,8	-60 $\pm$ 4,4*				-20 $\pm$ 8,4*

E. V. Skripka

EFFECT OF HEMORRHAGE ON CHANGES IN LYSOSOMIC NEUTROPHIL ENZYMES AND ON ARTERIAL PRESSURE LEVEL

Summary

In healthy rabbits loss of 15 % of the total circulating blood volume is associated with absolute neutrophilic leucocytosis and degranulation. The arterial pressure level decreases, but two days later it restores its preoperative value (prehemorrhagic level). After the same period the process of degranulation of neutrophils reaches its maximum (74.5 %). In rabbits with lysosomal membrane stabilized by intravenous injection of 10 % sodium salicylate solution after the hemorrhage absolute neutrophilic leucocytosis time was not long, degranulation was insignificant (12 %) and was observed only for two days after loss of blood. Arterial blood pressure restoration has not been completed even three days after hemorrhage.

Список литературы

1. Белоусов О. И., Федотова М. И. К вопросу о ранней реакции лимфоидной ткани и костного мозга на кровопускание. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1971, № 6, с. 69—74.
2. Горизонтов П. Д. Закономерности неспецифической реакции кроветворных органов на действие чрезвычайных раздражителей (стрессоров). — Арх. патологии, 1973, 35, № 8, с. 3—11.
3. Горизонтов П. Д., Белоусова О. И., Зимин Ю. И. Роль надпочечников в начальном периоде стресс-реакции. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1970, № 2, с. 38—44.
4. Дзизинский А. А., Гомазков О. А. Биохимическая регуляция кининовой системы. — В кн.: Кинины в физиологии и патологии сердечно-сосудистой системы. Новосибирск: Наука, 1976, с. 31—50.
5. Клебанов Б. М. Влияние нестероидных противовоспалительных веществ на мембраны лизосом. — Фармакология и токсикология, 1975, 38, № 10, с. 29—32.
6. Кочетыгов Н. И., Ремизова М. И., Куликов А. М. Гемодинамика и лизосомальные гидролазы при ожоговом шоке. — Патол. физиология и эксперим. терапия, 1980, № 1, с. 31—35.
7. Лунина Н. В., Козюк П. М. Влияние острой кровопотери на лизосомальный аппарат нейтрофильных лейкоцитов. — Там же, 1978, № 2, с. 76—78.
8. Меерсон Ф. З., Павлова В. И., Камилов Ф. Х., Якушев В. С. Применение гамма-оксибутирата натрия для профилактики повреждений, вызванных эмоционально-болевым стрессом. — Там же, 1979, № 3, с. 26—31.
9. Нучога В. Д., Дунаев В. Г. Лекарственная регуляция лизосомального аппарата клетки. — Фармакология и токсикология, 1978, 41, № 6, с. 730—750.
10. Ойвин И. А., Гапонюк П. Я. Роль кининов плазмы в патогенезе воспаления и анафилаксии. — В кн.: Химические факторы регуляции активности и биосинтеза ферментов. М.: Медицина, 1969, с. 248—274.
11. Пигаревский В. Е. Зернистые лейкоциты и их свойства. — М.: Медицина, 1978. — 128 с.
12. Покровский А. А., Крыстев Л. П. Печень, лизосомы и питание. — София: Изд-во Болгар. акад. наук, 1977. — 208 с.
13. Greenbaum L. M., Kim K. S. The kinin forming and kininase activity of rabbit polymorphonuclear leucocytes. — Brit. J. Pharmacol., 1967, 29, N 2, p. 238—247.

Ворошиловградский педагогический институт

Поступила в редакцию
07.12.81

Миеокариониты
Клетки пролиферирующего пула
Клетки созревающего пула

78,7 $\pm$ 9,29
21,8 $\pm$ 4,31
19,4 $\pm$ 2,61

56,6 $\pm$ 3,56
11,1 $\pm$ 2,20
16,5 $\pm$ 1,35

73,8 $\pm$ 4,56
20,3 $\pm$ 1,22
17,2 $\pm$ 1,54

49,2 $\pm$ 3,14*
10,1 $\pm$ 0,96*
12,7 $\pm$ 1,06*