

3. Березовский В. А. Электрохимические и биологические особенности хроноамперометрического определения кислорода // Полярографическое определение кислорода в биологических объектах.— Киев: Наук. думка, 1968.— С. 98—121.
4. Гриневич Ю. А., Алферов А. И. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных // Лаб. дело.— 1981.— № 8.— С. 493—496.
5. Карузина И. И., Арганов А. И. Выделение микросомной фракции печени и характеристика ее окислительных систем // Современные методы в биохимии / Под ред. акад. АМНР В. Н. Ореховича.— М.: Медицина, 1977.— С. 49—62.
6. Ковалев И. Е., Полевая О. Ю. Биохимические основы иммунитета к низкомолекулярным химическим соединениям.— М.: Наука, 1985.— 303 с.
7. Лопухин Ю. М., Молоденков М. Н., Владимиров Ю. В. Регистрация хемилюминесценции составных частей сыворотки крови в присутствии двухвалентного железа // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1985.— № 2.— С. 61—63.
8. Лукьянова Л. Ф., Балмуханов Б. С., Уголев А. Т. Кислородозависимые процессы в клетке и ее функциональное состояние.— М.: Наука, 1982.— 301 с.
9. Чернушенко Е. Ф., Когосова Л. С. Иммунологические исследования в клинике.— Киев: Здоров'я, 1978.— 159 с.
10. Jellinch P. H., Irwin I. Interaction of oestrogen quinones with ethylene diamine // Biochim. et biophys. acta.— 1965.— 78.— P. 778—780.
11. Nardiello S., Russo M., Pizzella T., Galanti B. Different levels of lymphocyte adenosine deaminase in active and inactive forms of chronic liver disease // J. Clin. and Lab. Immunol.— 1983.— 11, N 4.— P. 177—180.
12. Paronetto F., Popper H. Enhanced antibody formation in experimental acute and chronic liver injury produced by carbon tetrachloride or allyl alcohol // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.— 1964.— 116.— P. 1060—1069.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН Украины, Киев

Материал поступил
в редакцию 24.12.92

УДК 615.273.53.035.112.93.076.9

Б. А. Умарова, Ф. Б. Шапиро, С. М. Струкова

Участие катехоламинов, выделяемых при стрессе, в стимуляции секреции гепарина тучными клетками крысы

За допомогою морфометричного аналізу досліджено секреторний статус тучних клітин (ТК) брижі та підшкірної клітковини щурів. Після 30-хвилинної іммобілізації секреторна активність клітин підвищувалася, індекс насичення їх гепарином зменшувався у 3,7 рази, а індекс гранулолізу підвищувався у 3 рази. У тварин, які попередньо одержували β -адреноблокатор обзидан (1,25 мг/кг), стимулюючого ефекту іммобілізації не було. α -Адреноблокатор фентоламін (6 мг/кг) частково блокував ефект іммобілізаційного стресу. Відповідно β -агоніст ізопреналін (1,5 мкг/кг) активував секрецію гепарину у відсутності іммобілізації, в той час як α -агоніст фенілефрин (2,5 мкг/кг) не впливав на секреторний статус ТК. Обзидан (1,25 мг/кг) блокував і стимулюючу дію внутрішньовенно введеного α -тромбіну (50 NIH/кг) на секрецію гепарину ТК підшкірної клітковини. Показано, що катехоламіни приймають участь в активації секреції гепарину ТК, індукованої стресорною дією і введенням тромбіну. Цей ефект катехоламінів опосередкований β -адренорецепторами судинної стінки.

Введение

Известно, что совокупность неспецифических реакций, индуцированных в организме стрессорным воздействием, включает изменения, возникающие в системе гемостаза. Так, в частности, при развитии стрессорной реакции повышается антикоагулянтный потенциал крови и резко воз-

© Б. А. УМАРОВА, Ф. Б. ШАПИРО, С. М. СТРУКОВА, 1993

растает высвобождение гепарина из тучных клеток (ТК). При этом установлено, что усиление в состоянии стресса секреции гепарина ТК практически не зависит от исходной концентрации гепарина в крови [5].

Поскольку развитие адаптивного синдрома при стрессе в значительной мере определяется активацией симпатoadреналовой системы и системы гипоталамус — гипофиз — кора надпочечников, естественно, возникает вопрос, влияет ли на реакцию высвобождения гепарина из ТК изменившийся при стрессе гормональный статус организма, в частности, возросший в крови титр катехоламинов. Интерес к возможному участию катехоламинов в высвобождении гепарина из ТК обусловлен еще и тем, что в последнее время установлен факт непосредственного взаимодействия (мембранный контакт) ТК с нервными волокнами. Считают, что ассоциация ТК — нервное волокно играет важную роль в регуляции не только локального, но и общего гомеостаза, причем передача сигнала осуществляется не только с ТК на нервное волокно, но и обратно [6, 8]. Особый интерес в связи с активацией ТК при стрессе и наличием их мембранного контакта с нервными волокнами представляют данные о том, что ТК крысы имеют β_2 -адренорецепторы [7].

Цель нашей работы — выяснить на модели иммобилизационного стресса, участвуют ли циркулирующие в крови катехоламины в стимуляции секреции гепарина ТК.

Методика

Эксперименты проводили на беспородных самцах крыс массой 180—200 г. Препараты блокаторов и агонистов адренорецепторов (1 мл) вводили в *V. jugularis*. Контролем служили животные, получавшие равный объем физиологического раствора, и интактные животные. Эксперименты начинали через 15 мин после введения обзидана (фирма «VEB», Германия), фентоламина (отечественное производство), изопrenalина (фирма «Serva», Германия), фенилэфрина (фирма «Sigma», США). α -Тромбин получали по методу, описанному в работе Струковой и соавт. [3]. В качестве стрессорного воздействия использовали 30-минутную иммобилизацию (фиксация животного на столике).

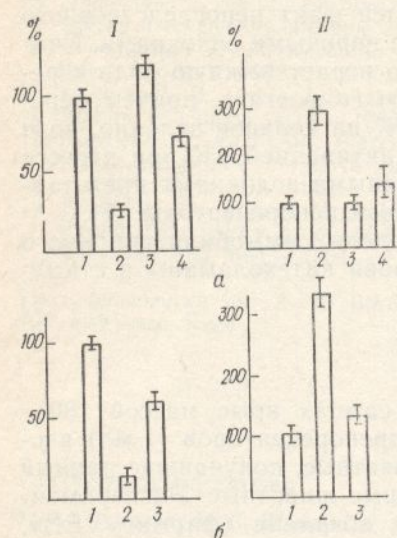
Морфометрический анализ состояния популяций ТК проводили в пленочных препаратах ТК брыжейки и подкожной клетчатки, фиксированных в забуференном растворе формалина и окрашенных 0,5 %-ным раствором телуридинового синего при pH 4,0 [1]. Для характеристики состояния ТК производили подсчет клеток с разной интенсивностью окраски, коррелирующей с содержанием в них гепарина. Различали очень темные, темные, светлые и очень светлые ТК. Использовали следующие характеристики секреторного статуса ТК: индекс насыщения ТК гепарином — отношение суммы очень темных и темных клеток к сумме светлых и очень светлых; индекс гранулолизиса — отношение числа очень светлых (опустошенных) клеток к общей сумме клеток; индекс дегрануляции — отношение числа дегранулированных клеток к общему числу клеток. Поскольку выявленные нами изменения секреторного статуса ТК в обеих исследованных популяциях носили сходный характер, на рис. 1 и в таблице приведены суммарные значения. Результаты обрабатывали статистически.

Результаты

В соответствии с поставленной задачей был исследован секреторный статус ТК подкожной клетчатки и брыжейки у животных, подвергнутых 30-минутному иммобилизационному воздействию через 15 мин после введения им неселективных блокаторов α - и β -адренорецепторов: фентоламин гидрохлорида (6 мг/кг) и обзидана (1,25 мг/кг).

Как можно видеть из результатов, представленных на рисунке, 1, α , у контрольных животных, получивших вместо блокаторов физиологический раствор, наблюдалось значительное возрастание секреции гепари-

на, и в результате индекс насыщения ТК гепарином после иммобилизации у них снизился по сравнению с таковым у интактных животных в 3,7 раза, а показатель, характеризующий основной механизм секреции гепарина — индекс гранулолизиса, — в 3 раза повысился. Индекс дегрануляции при этом возрос на 21 % ($P < 0,01$). В группе животных, подвергнутых иммобилизации на фоне введения обзидана, стимулирующий эффект стрессорного воздействия отсутствовал, и указанные показатели практически не отличались от таковых у интактных животных. У животных, получивших до иммобилизации фентоламин, наблюдалась иная картина: секреторная активность ТК под влиянием стрессорного воздействия у них возросла, но значительно меньше чем у контрольных, и, соответственно, значение индекса насыщения ТК гепарином занимало промежуточное положение — было достоверно ниже ($P < 0,001$), чем у интактных, и достоверно выше ($P < 0,001$), чем у контрольных живот-



Индексы насыщения гепарином (I) и гранулолизиса (II) тучных клеток подкожной клетчатки и брыжейки крыс, подвергнутых 30-минутному иммобилизационному стрессу (а) и получавших тромбин (б) через 15 мин после введения физиологического раствора (2), обзидана (3) или фентоламина (4). За 100 % приняты значения показателей интактных животных (1).

ных. Аналогично изменился у них и индекс гранулолизиса, при том, что индекс дегрануляции вообще не повысился.

Для проверки, не оказывают ли сами адреноблокаторы влияния на секрецию гепарина, была проведена специальная серия опытов, в которой контрольные животные получали физиологический раствор, а опытные — обзидан или фентоламин (таблица). Животных забивали через 15 мин после введения препаратов. У контрольных животных наблюдались изменения изучаемых показателей, свидетельствующие о некотором усилении секреции гепарина, которое было вызвано, очевидно, стрессорным воздействием экспериментальных манипуляций (индекс насыщения ТК гепарином снизился на 20 %, индекс гранулолизиса повысился на 50 %). В дальнейшем изложении результатов

Влияние адреноблокаторов и их агонистов на показатели секреции гепарина в пленочных препаратах тучных клеток брыжейки и подкожной клетчатки у крыс, находившихся в разных условиях эксперимента ($M \pm m$)

Группа животных	Индекс насыщения гепарином	Индекс гранулолизиса	Индекс дегрануляции
Интактные животные (18)	2,06 ± 0,13	0,02 ± 0,003	0,48 ± 0,02
Животные, подвергавшиеся 30-минутной иммобилизации, которым вводили:			
физиологический раствор (контроль; 18)	1,64 ± 0,13	0,03 ± 0,005	0,43 ± 0,02
обзидан (1,25 мг/кг; 18)	2,20 ± 0,12	0,02 ± 0,003	0,44 ± 0,03
фентоламин (6 мг/кг; 18)	1,70 ± 0,09	0,03 ± 0,005	0,47 ± 0,03
изопrenalин (1,5 мкг/кг; 28)	0,58 ± 0,04	0,07 ± 0,007	0,48 ± 0,03
фенилэфрин (2,5 мкг/кг; 29)	1,36 ± 0,05	0,03 ± 0,003	0,48 ± 0,02

Примечание. В скобках — доза и число препаратов.

экспериментов стрессорное воздействие, связанное с методикой проведения опытов, в отличие от иммобилизационного воздействия будет называться «слабое» стрессорное воздействие.

У животных, получивших обзидан (см. таблицу), показатели были на уровне, характерном для интактных животных, что свидетельствует об отсутствии влияния самого обзидана на секрецию гепарина и совершенно естественном отсутствии на его фоне усиления секреторной активности ТК, вызванной слабым стрессорным воздействием. Фентоламин, не совсем снявший, как мы видим, эффект иммобилизационного воздействия, не снял эффекта и слабого стрессорного воздействия. Судя по значениям индекса насыщения ТК гепарином и индекса гранулолизиса, секреция гепарина у животных после введения фентоламина происходила с той же интенсивностью, что и у контрольных животных, получивших физиологический раствор. Это дает основание считать, что сам фентоламин на секрецию гепарина влияния не оказывает.

В полном соответствии со сведениями о мере торможения секреции гепарина при иммобилизационном воздействии после блокады α - и β -адренорецепторов находятся результаты опытов, в которых животным вводили агонисты адренорецепторов (см. таблицу). Агонист β -адренорецепторов изопреналин (1,5 мкг/кг) оказал значительное стимулирующее действие на секрецию гепарина: индекс насыщения ТК гепарином через 15 мин после введения агониста снизился, а индекс гранулолизиса возрос в такой же мере, как и после 30-минутного иммобилизационного воздействия. Агонист α -адренорецепторов фенилэфрин (2,5 мкг/кг) не повлиял на высвобождение гепарина, и секреторный статус ТК у этих животных не отличался от такового у контрольных, которым был введен физиологический раствор.

На основании этих результатов можно сделать следующее заключение: поскольку β -адреноблокатор при системном введении тормозит стимулированную стрессорным воздействием секрецию гепарина, а β -агонист ее усиливает и в отсутствие стрессорного воздействия, следует считать, что сигнал катехоламинов через β -адренорецепторы стенки сосуда передается ТК, хотя о механизме этой передачи ничего определенного сказать пока нельзя.

В свете полученных результатов возникает вопрос, принимают ли участие катехоламины в активации секреции гепарина ТК, вызванной специфическим индуктором — тромбином. Ранее нами было показано, что α -тромбин стимулирует выброс гепарина из ТК при воздействии на них *in vitro* и при системном введении его в организм, несмотря на то, что во втором случае непосредственный контакт тромбина с ТК маловероятен [2, 4]. Поскольку при внутривенном введении тромбина, вызывающем значительный сдвиг гемостаза, направленный на компенсаторное повышение антикоагулянтного потенциала крови, в организме создается «стрессорная ситуация», вопрос о том, участвуют ли катехоламины в реализации стимулирующего действия тромбина на секрецию гепарина, вполне закономерен.

Для выяснения этого вопроса была проведена серия экспериментов с внутривенным введением животным α -тромбина (50 НИИ/кг) через 15 мин после введения физиологического раствора или обзидана, поскольку установлено, что влияние катехоламинов на секрецию гепарина опосредовано β -адренорецепторами. Состояние тучноклеточной популяции подкожной клетчатки исследовали через 5 мин после введения тромбина, когда явно выражен вызванный им антикоагулянтный эффект. Установлено (рисунок, б), что к этому времени секреция гепарина значительно возросла, и индекс насыщения ТК гепарином снизился в 7,7 раза по сравнению с таковым у интактных животных, а индекс гранулолизиса повысился в 3,2 раза; индекс дегрануляции не изменился.

Следует иметь в виду, что в условиях нашего эксперимента наблюдаемый эффект вызван введением тромбина и стимулирующим действием на секрецию гепарина слабого стрессорного воздействия. Расчет по-

казал, что тромбин обеспечил примерно 70 % наблюдаемого снижения индекса насыщения ТК гепарином. Когда тромбин был введен после обзидана, снимающего эффект слабого стрессорного воздействия, можно было ожидать, что его стимулирующее действие на секрецию гепарина проявится полностью. Однако оказалось, что обзидан в значительной мере (на 40 %) блокировал действие и самого тромбина. Этот факт, очевидно, следует рассматривать как снятие обзиданом стрессорного компонента в действии тромбина, связанного с нарушением под его влиянием гомеостаза.

Таким образом, в стимулирующем действии тромбина на секрецию гепарина при его системном введении оказалось возможным разграничить эффект тромбина, как специфического индуктора секреции гепарина, от его действия в качестве стрессорного фактора.

Обращают на себя внимание два следующих обстоятельства. Во-первых, интенсивность активированной секреции гепарина ТК зависит от силы воздействия — слабое стрессорное воздействие значительно меньше стимулировало высвобождение гепарина, чем 30-минутная иммобилизация. Во-вторых, по всей вероятности, существует предельная мера опустошения ТК гепарином, так как примененные в работе разные способы активации — иммобилизация, введение β -агониста и α -тромбина, обладающего, как мы видели, комбинированным действием, привели к практически одинаковому снижению индекса насыщения ТК гепарином. Во всех случаях в клетках оставалось не менее 15—20 % гепарина.

Материалы работы подтверждают описанный нами ранее факт [5], что основным механизмом высвобождения гепарина из ТК является гранулолизис. Вклад дегрануляции в секрецию гепарина относительно невелик.

В заключение следует отметить, что, учитывая тесную связь ТК с нервной системой, полученные в работе результаты об участии катехоламинов в стимуляции секреции гепарина ТК указывают на роль в этом процессе и симпатической нервной системы, имея, естественно, в виду, что удельный вес эндокринных и нервных влияний на ТК в разных ситуациях может быть различным.

B. A. Umarova, F. B. Shapiro, S. M. Strukova

PARTICIPATION OF CATECHOLAMINES IN STIMULATION OF HEPARIN RELEASE BY MAST CELLS OF RATS IN VIVO

The secretory status of mast cells of mesentery and subcutaneous connective tissue was studied in rats using the morphometry analysis. Immobilization for 30 min has induced a 3.7-fold decrease of the heparin saturation index in these mast cells and a 3-fold increase of the granulolysis index. In rats preliminary given propranolol, α -adrenoceptor antagonist (1.25 mg/kg), a stimulatory effect of immobilization was absent. Phentolamine, α -adrenoceptor antagonist (6 mg/kg), partially inhibited the immobilization effect. Isoprenaline, β -agonist (1.5 mg/kg), activated heparin secretion in rats without immobilization, while phenylephrine, α -agonist (2.5 mg/kg) had no effect on the secretory state of mast cells. Propranolol in the same dose also blocked the stimulatory action of i. v. injected α -thrombin (50 NIH/kg) on heparin secretion from mast cells of subcutaneous connective tissue. The obtained results show that catecholamines participate in activation of heparin release from mast cells induced both by the stress and by thrombin injection. Their action is mediated by β -adrenoceptors of the vessel wall.

M. V. Lomonosov University, Moscow

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Линднер Д. П., Поберий И. А., Розкин М. Я. и др. Морфометрический анализ популяции тучных клеток // Арх. патологии.— 1980.— № 6.— С. 60—64.
2. Струков А. И., Струкова С. М., Хлебникова Т. Г. и др. Анализ тучноклеточной популяции при возбуждении и блокаде противосвертывающей системы // Бюл. эксперим. биологии и медицины.— 1982.— № 6.— С. 116—119.

3. Струкова С. Свойства α -гепарина по медицине.—
4. Умарова Б. на секреторн журн.— 1991
5. Шапиро Ф. nervous sys and function press, 1989.—
6. Bienenstock L. A cyanopindolo Gen. Pharma
7. Botana L. A. interaction //

Москов. ун-т и Российской Фе

УДК 618.19—008.8

И. И. Слуквин, В

Вплив жін на функці

В зависимости ный ответ м дозами (в ч культуральн ноцитов же глобулинов ского молози ло дозозавис его концентр В отлич прессиное в глобулинов лозива не по ющее влияни в культурал Установлено, тами мыши г числа IgG2a- зива, с котор масса этой ф

Вступ

Відомо, що х безпечують п таннім часом тивно вплива реторний ком сорні фактор дозволяють п тів, стимулю

© И. И. СЛУКВИН,