

О. Б. Прийма

## Зміна вмісту неферментних катіонних білків та ступеня пошкодження лейкоцитів у кролів при крововтраті

*Выполнены цитохимические исследования содержания неферментных катионных белков (НКБ) в лейкоцитах у кроликов при острой кровопотере с определением среднего цитохимического коэффициента (СЦК) и степени повреждения лейкоцитов. При умеренной кровопотере содержание НКБ было повышено на протяжении двух недель. В случае повторной значительной по объему кровопотере данный показатель резко уменьшался. Особенно существенными были эти изменения у погибших животных. При анатомо-гистологическом исследовании обнаружены обширные зоны воспалительных и некротических процессов в брюшине, печени, почках, селезенке, лёгких, сердце. У всех животных наблюдалось увеличение степени повреждения лейкоцитов, но особенно выражено это было у животных, перенесших повторное кровопускание. Характер изменения СЦК и результаты анатомо-гистологических исследований погибших животных делают возможным предположить участие НКБ в развитии воспалительных и прогрессировании некротических процессов во внутренних органах кроликов, перенесших повторную острую кровопотерю. Выраженное повышение степени повреждения лейкоцитов при повторной острой кровопотере свидетельствуют о наличии в периферической крови экспериментальных животных возросшего количества нейтрофилов с голокринным типом секреции.*

### ВСТУП

Неферментні катіонні білки (НКБ) містяться в специфічних і азурофільних гранулах лізосом зернистих, в основному, нейтрофільних лейкоцитів [3,4]. Хімічні властивості НКБ зумовлені надлишковим позитивним зарядом через велику кількість  $\text{NH}_2^+$ -груп в їх молекулах [3,7]. Їм властивий широкий спектр фізіологічних і патофізіологічних дій. НКБ є важливим фактором неспецифічної резистентності організму через значний їх антибактеріальний потенціал [5], саме вони у разі запальних інфекційних процесів першими пошкоджують структури клітин патогенних мікроорганізмів, підготовлюючи їх до подальшого розщеплення [3]. Неферментні катіонні білки мають виражену антикоагулянтну та антикомплементарну дію [4].

Здатність циркулюючих у крові НКБ у малих концентраціях стимулювати, а в значних пригнічувати процеси обміну в клітині дає змогу віднести їх до регуляторів життєвих функцій клітин організму. Останнє разом зі спроможністю підвищувати проникність клітинних і судинних мембран, а також стимулювати позитивний хемотаксис лейкоцитів дає можливість віднести НКБ до медіаторів запалення [5]. Експериментальні дані свідчать про здатність НКБ проявляти пошкоджуючу дію стосовно соматичних клітин організму при розвитку в ньому інфекційно-запального процесу [3]. Отже, є можливість перетворення НКБ з фактора антибактеріального захисту в фактор патогенезу запальних і деструктивних процесів в організмі [6].

Виділення НКБ у загальний кровоток здійснюється, в основному, нейтрофілами, які

мають усі три головні типи секреції: мерокринний, апокринний, голокринний [6]. Поряд з НКБ виділяється лізоцим, лактоферин, мієлопероксидаза, нейтральні протеази [3,4,7]. Всі вищевказані сполуки, за винятком, НКБ, є ферментами. Їм властива специфічна та вузько направлена хімічна дія в організмі. Крім цього, протеази здатні розщеплювати лише мертві тканини, не впливаючи на живі, життєздатні структури. Ось чому з продуктів секреції нейтрофілів саме НКБ властива універсальна цитопатична дія.

Секреція НКБ з лейкоцитів у кровоток регулюється та стимулюється катехоламінами крові [6]. Помірна катехоламінемія, виконуючи адаптаційно-трофічну функцію, призводить до активації мієлопоезу [2]. При вираженій гіперкатехоламінемії спостерігається підвищення в крові кількості активованих лейкоцитів з гіперсекрецією деяких біологічно активних речовин за голокринним типом [6,8]. Особливо це проявляється за умов розвитку запального процесу в організмі [8].

Таким чином, НКБ – важливий фактор антибактеріального захисту організму. При вираженій гіперкатехоламінемії активовані лейкоцити виділяють у кровоток значну кількість НКБ, які здатні проявляти цитопатичну дію.

Метою нашої роботи було вивчення змін вмісту НКБ у лейкоцитах і ступеня їх пошкодження при крововтраті.

## МЕТОДИКА

У кролів обох статей віком 1-3 роки, масою 1500-3100 г моделювали гостру крововтрату кровопусканням зі стегових судин під місцевим знеболенням з використанням 0,25%-го розчину новокаїну. Проведено дві серії дослідів: у першій (20 кролів) - кровопускання одноразове, що склало 10% від об'єму циркулюючої крові (ОЦК); у другій (10 кролів) - дворазове кровопускання: спочатку 10% ОЦК, а на 3-тю добу повторна крововтрата - 15% ОЦК.

Контрольні дослідження виконували паруванням судин стегна з їх перев'язкою без кровопускання. Об'єм крововтрати визначали мірним циліндром та зважуванням використаних марлевих тампонів. Для дослідження брали кров з крайової вени вуха кроля в терміни: до початку дослідження, через 1,2,7,10,14 дів після кровопускання.

НКБ у лейкоцитах аналізували цитохімічним методом [3] з визначенням напівкількісного показника - середнього цитохімічного коефіцієнта (СЦК) за формулою Ас-тальді і Верга.

Паралельно проводили визначення ступеня пошкодження лейкоцитів [3]. Підраховували число лейкоцитів, зафарбованих міцним зеленим та азуром А, у яких виявлено порушення цілісності плазматичної мембрани, серед 100 таких, котрі були досліджені щодо вмісту НКБ.

Проведено статистичну обробку результатів з використанням критерію t Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З першої доби постгеморагічного періоду вміст НКБ у лейкоцитах кролів першої серії дослідів був в 1,2-1,5 раза вищим від вихідних значень. Протягом двох тижнів СЦК набував значень вищих від вихідних, але не досягав їх (табл. 1). При мікроскопії препаратів крові, взятих під час експерименту і зафарбованих міцним зеленим і азуром А, виявлено велику кількість нейтрофілів, цитоплазма яких містила від десяти до тридцяти та більше гранул і була забарвлена в інтенсивно зелений колір міцним зеленим, протягом двох тижнів досліду. Ядра нейтрофілоцитів були забарвлені азуром А в світлофіолетовий колір. Ступінь пошкодження лейкоцитів був в 2 - 4 рази вищим від вихідних значень протягом усього досліду, досягаючи максимуму на 2-гу добу постгеморагічного періоду (табл. 2). При мікроскопії препаратів крові, які досліджувалися щодо вмісту НКБ виявлено підвищення кількості деструктивних, пустотілих нейтрофілів зі зруйнованими

**Таблиця 1. Вміст неферментних катіонних білків у лейкоцитах у кролів при крововтраті, СЦК ( $M \pm m$ )**

Схема досліджу	До початку експерименту	Строк експерименту				
		1-ша доба	2-га доба	7-ма доба	10-та доба	14-та доба
Контроль (n=10)	1,685±0,047 -----	1,848±0,034 P<0,01	1,427±0,046 P<0,002	1,623±0,036 P<0,5	-----	-----
10%-та крововтрата (n=20)	1,675±0,069 -----	1,853±0,062 P<0,02	2,073±0,115 P<0,002	1,889±0,05 P<0,01	1,921±0,037 P<0,002	1,947±0,029 P<0,01
25%-та крововтрата (n=10)	1,642±0,052 -----	2,031±0,050 P<0,001	1,904±0,030 P<0,002	0,386±0,044 P<0,001	0,379±0,040 P<0,001	-----

плазматичними мембранами і явищами каріолізу протягом двох тижнів експерименту.

У другій серії до повторного кровопускання СЦК і ступінь пошкодження лейкоцитів змінювалися аналогічно першій серії дослідів. Але після повторної крововтрати СЦК різко знижувався, був в 4 рази нижчим від вихідних значень, що свідчить про зменшення вмісту НКБ у лейкоцитах, через вихід НКБ у загальний кровотік (табл. 1). При мікроскопії препаратів крові взятих після повторного кровопускання та зафарбованих міцним зеленим і азуром А виявлено, що цитоплазма нейтрофілів здебільшого забарвлена в блідо-зелений колір і містить кілька слабо забарвлених гранул або взагалі не містить таких. Ядра нейтрофілоцитів зафарбувалися в блідо-фіолетовий колір. Ступінь пошкодження лейкоцитів після повторної крововтрати був в 3 – 5 раз вищим від вихідних значень (див. табл. 2). При мікроскопії препаратів крові, взятих після повторного кровопускання, виявлено значне підвищення кількості

деструктивних, пустотілих нейтрофілів зі зруйнованими плазматичними мембранами і явищами каріолізу. В другій серії дослідів загинуло 8 тварин. Смерть настала на 10 - 14-ту добу досліджу. При аутопсії виявлено потовщення, матовість і дряблість очеревини. Печінка - малокровна, на розрізі просякнута інтерстиціальною рідиною, зі стертими контурами структур. Аналогічні зміни виявлено в нирках, легенях, селезінці, серці. Вміст НКБ у лейкоцитах цих тварин перед смертю був в 5 раз нижчим за вихідні значення. Водночас ступінь пошкодження лейкоцитів у цих же кролів був в 5,5 раза вищим за вихідні результати.

У контрольних дослідях СЦК підвищувався в першу добу після крововтрати, але на 2-гу добу вміст НКБ у лейкоцитах зменшувався, нормалізуючись на 7-му добу досліджу (див. табл. 1). У контролі в мазках крові першої доби постгеморагічного періоду підвищувалася помірно кількість нейтрофілів, цитоплазма яких була інтенсивно забарвлена в зелений колір і містила велику кількість гра-

**Таблиця 2. Ступінь пошкодження лейкоцитів у кролів при крововтраті ( $M \pm m$ )**

Схема досліджу	До початку експерименту	Строк експерименту				
		1-ша доба	2-га доба	7-ма доба	10-та доба	14-та доба
Контроль (n=10)	5,20±1,24 -----	6,00±0,60 P<0,5	5,40±0,96 P<0,5	6,00±1,60 P<0,5	-----	-----
10%-та крововтрата (n=20)	4,55±1,35 -----	10,60±1,84 P<0,01	19,85±3,05 P<0,001	11,40±2,24 P<0,01	8,70±1,40 P<0,02	5,80±1,42 P<0,5
25%-та крововтрата (n=10)	4,60±1,00 -----	12,70±1,36 P<0,001	17,00±1,20 P<0,001	23,70±2,16 P<0,001	24,40±2,12 P<0,001	-----

нул. Але в препаратах крові другої доби постгеморагічного періоду збільшилося число нейтрофілів з блідо-зеленим забарвленням цитоплазми. В кінці першого тижня досліджень у препаратах крові спостерігалася картина подібна до початку експерименту. Ядра нейтрофілоцитів забарвлювались у блідо-фіолетовий колір. Ступінь пошкодження лейкоцитів у контролі змінювався, але результати були не достовірними (див. табл. 2). При мікроскопії в контрольних дослідженнях препаратів крові, які вивчалися щодо вмісту НКБ, кількість деструктивних нейтрофілів була як до початку експерименту. Всі інші наведені результати є статистично достовірними.

Характер змін вмісту НКБ у лейкоцитах кролів, що перенесли кровопускання, може бути виявом фізіологічних адаптаційних реакцій, які розвиваються у відповідь на подразники різної сили [1, 8].

Так, одноразову гостру крововтрату (10% ОЦК) у кролів першої серії проведених досліджень можна вважати подразником середньої сили дії. В результаті розвивається помірна гіперкатехоламінемія, яка виконує при цьому адаптаційно-трофічну функцію, котра полягає у стимуляції мієлопоезу [2]. У цьому разі вміст неферментних катіонних білків у лейкоцитах збільшується, а ступінь пошкодження лейкоцитів в перші доби постгеморагічного періоду також збільшується, але помірно і нормалізується до 14-ї доби. Такі зміни з боку лейкоцитів можуть бути виявом реакції активації, яка є неспецифічною основою фізіологічних процесів, скерованих на підвищення загальної опірності організму та є необхідною для профілактики запальних процесів у експериментальних тварин, що перенесли кровопускання.

Повторна значна за об'ємом крововтрати, як надзвичайний подразник, є неспецифічною основою виникнення патологічних процесів [1]. Виявом цього є зменшення вмісту НКБ у лейкоцитах і значне підвищення ступеня пошкодження лейкоцитів в крові кролів, що перенесли дворазову крововтрату в кіль-

кості 25% ОЦК у другій серії досліджень. Гостра крововтрата, як неінфекційний стрес, супроводиться гіперкатехоламінемією [2]. Остання стимулює підвищену секрецію НКБ з нейтрофілів [6]. Наявність в периферичній крові великої кількості нейтрофілів зі зруйнованими плазматичними мембранами і явищами каріолізу може бути проявом збільшення кількості зернистих лейкоцитів з голокринним типом секреції, при якій з останніх “лавиноподібно” виділяється велика кількість НКБ та інших чинників, що містяться в лізосомальних гранулах поліморфноядерних лейкоцитів.

Циркулюючи в кровотоку НКБ, маючи цитопатичний ефект, здатні пошкоджувати соматичні клітини організму. Це сприяє поширенню зон некрозів у внутрішніх органах кролів поряд з такими, викликаними гострою ішемією тканин через крововтрату. Здатність НКБ підвищувати проникність клітинних і судинних мембран поряд зі стимуляцією позитивного хемотаксису лейкоцитів може бути підтвердженням участі НКБ у розвитку запальних процесів у внутрішніх органах кролів, що перенесли повторну значну гостру крововтрату.

Отже, помірна гостра крововтрата у кролів призводить до підвищення середнього вмісту НКБ у циркулюючих нейтрофільних лейкоцитах, що надає останнім високого антибактеріального потенціалу і підвищує цим самим загальну опірність організму. Повторна значна за об'ємом гостра крововтрата у кролів спричинює підвищення в кровотоку кількості нейтрофілів з голокринним типом секреції та “лавиноподібного” виходу НКБ з лейкоцитів у кровоток. Внаслідок цього, циркулюючи в кровотоку, НКБ можуть поширювати зони некрозів і викликати розвиток запальних процесів у внутрішніх органах експериментальних тварин, що перенесли повторну гостру значну крововтрату.

## ВИСНОВКИ

1. У разі помірної експериментальної крововтрати у кролів підвищується загальна опір-

ність організму. Важлива роль у цьому належить підвищеному вмісту неферментних катіонних білків у нейтрофілах, що є виявом активації мієлопоєзу при гострій крововтраті.

2. При повторній значній за об'ємом крововтраті неферментні катіонні білки, що "лавиноподібно" виділяються з нейтрофілів у кровоток, перетворюються з фактора захисту в фактор патогенезу некротичних і запальних процесів у внутрішніх органах дослідних тварин.

3. Повторне кровопускання у кролів призводить до стимуляції голокρινного типу секреції нейтрофілів у периферичному кровотоку, що може бути зумовлено гіперкатехоламінемією.

**О.В. Priyma**

#### **THE CHANGES OF THE CONTAIN OF NON – ENZYMATIC CATIONIC PROTEINS AND THE DEGREE OF DAMAGE IN LEUCOCYTES IN THE RABBITS WITH HAEMORRAGES**

We study the contain of non – enzymatic cationic proteins (NCP) and the "degree of damage" in leucocytes in the rabbits with haemorrhages. In the animals with unimportant haemorrhages the contain of NCP in leucocytes increased. But in the rabbits with the considerable and return haemorrhages the contain of NCP in leucocytes lossed. The degree of damage in leucocytes increased in the all experiments. The re-

ceived results proved the presence of leucocytolysis in the rabbits with considerable and return haemorrhages. In the rabbits with haemorrhages the contain of NCP in leucocytes changed dependence of the weight of the haemorrhages.

*Truskavets Municipal Hospital*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. – Ростов-на-Дону: Изд-во Ростов. ун-та, 1990. – 224 с.
2. Горизонтов П.Д., Белоусова О.И., Федотова М.И. Стресс и система крови. – М.: Медицина, 1983. – 239с.
3. Мазинг Ю.А. Функциональная морфология катионных белков лизосом нейтрофильных гранулоцитов. – Автореф. дисс. докт. биол. наук. – СПб, 1993. – 46с.
4. Нагоев Б.С. Катионный белок лейкоцитов и его значение. – Нальчик: Эльбрус, 1982. – 102с.
5. Пигаревский В.Е. О молекулярном уровне некоторых общепатологических процессов // Архив патологии. – 1990. – т.52. - №1. – С.5-11.
6. Терещенко И.П., Кашулина А.П. Роль системы нейтрофильных гранулоцитов в формировании особенностей развития патологических процессов // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 1993. - № 4. – С.56-60.
7. Kruse-Jarres J.D., Kinzelmann T. Pathobiochemistry and clinical role of granulocytes and their lysosomal neutral proteinases in inflammatory processes // Arztl. Lab. – 1986. – 32. – P.185-196.
8. Lazar G. Stress: from concept to modern immunology. In: Stress of life: from molecules to man / Ed. By. P. Csermely. – Annals of the NYAS. – 1998. – 851. – P. 16-18.

*Трускав. міська лікарня  
М-ва охорони здоров'я*

*Матеріал надійшов  
до редакції 9.06.1999*