

АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ІМ. О. О. БОГОМОЛЬЦЯ

На правах рукопису

ЧЕХОВ Анатолій Анатолійович

**РОЛЬ ГИПОТАЛАМО-ГИПОФИЗАРНО-
АДРЕНКОРТИКАЛЬНОЇ СИСТЕМИ У РЕАКЦІЇ
ЛІЗОСОМАЛЬНОГО АПАРАТУ НЕЙТРОФІЛЬНИХ
ЛЕЙКОЦИТІВ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ПРИ ДІЇ
СТРЕСОРА НЕІНФЕКЦІЙНОЇ ПРИРОДИ**

03.00.13 — фізіологія людини та тварин

А в т о р е ф е р а т
дисертації на здобуття наукового ступеню
кандидата біологічних наук

Київ — 1993

Робота виконана у Луганському державному педагогічному інституті ім. Т. Г. Шевченка.

Науковий керівник — доктор медичних наук,
професор **Н. В. Луїна**

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук,
професор **А. Ф. Косенко**,
доктор біологічних наук
І. М. Алексєва

Ведуча організація — НДІ ендокринології та обміну речовин МОЗ України.

Захист відбудеться « 22 » вересня 1993 року

о _____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д-016.15.01 при Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця АН України (252024, Київ-24, вул. Богомольця, 4).

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту.

Автореферат розіслано « 19 » серпня 1993 року.

**Вчений секретар
спеціалізованої ради
доктор біологічних наук**

З. О. СОРОКІНА-МАРІНА

ЛНБ України ім. В. Стефаника



00754009 (P)

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність проблеми. Дослідження системи крові при стресі виявило низку таких неспецифічних реакцій, як нейтрофілоз, лімфо- та еозінопенія, міграція лімфоцитів у кістковий мозок, підсилення проліферації гранулоцитарного паростка, збільшення кількості клон утворюючої одиниці селезінки, активація калікреїн-кінінової та ренін-ангіотензивної, зсідуючої та фібринолітичної систем крові [Горизонтов и др., 1983; Нагоев, 1986; Дыгай, Шахов, 1989; Маянский, Маянский, 1989; Гольдберг и др., 1990; Selye, 1971; Chikkappa e. a., 1977; Hethington, Quie, 1985; Møsher, 1990; Tengborn, 1990].

У фізіологічній літературі значення нейтрофільного лейкоцитозу і активації гранулоцитопоезу переважно розглядається з точки зору участі нейтрофілів у процесах формування резистентності до пошкоджуючої дії інфекційно-запальюючих факторів [Пигаревский, 1978; Алмазов и др., 1979; Струков, 1980; Маянский и др., 1987; Бала и др., 1991; Movat, 1985; Borregard, 1988].

З цієї точки зору нейтрофіли уявляються як ефектори гострого запалення [Маянский, 1991]. У реалізації їх флогогенного потенціалу значну роль грають лізосомальні ферменти, які розглядаються, як «медіатори запалення» [Липшиц и др., 1982; Fallon, Collin, 1986]. Лізосомальні ферменти нейтрофілоцитів ще у крові визначають такі початкові прояви запальних реакцій, як прямі та зворотні зв'язки нейтрофільних лейкоцитів з системою калікреїн-кінінів [Ойвин, Королева, 1971; Movat, 1985], взаємодію з системою комплемента [Езепчук, 1985; Кульдберг, 1985], кооперацію з тучними клітинами і тромбоцитами [Маянский, 1991]; через секретуємий ними активатор плазміногена, включення у процеси фібринолізу [Herion e. a., 1979] і, перертвлюючи чинник XII зсідання крові в активний чинник Хагемана, індукування процесів зсідання крові, фібринолізу, кініногенезу [Чернух, Гомазков, 1976; Маянский и др., 1987].

Що ж стосується біологічної ролі нейтрофільного лейкоцитозу в екстремальних умовах, не пов'язаних з інфекцією та запаленням, то вона в значній мірі залишалася невідомою. Результати досліджень нашої лабораторії [Лунина, Козюк, 1978] показали, що розвиток нейтрофілозу при крововтраті супроводжується дегрануляцією нейтрофілів крові. Це дозволило висунути гіпотезу про вірогідну участь потрапляючого у кров вмісту лізосом у гуморальній регуляції функцій організму.

У ході подальшої розробки цієї ідеї було доведено, що при розвитку нейтрофільного лейкоцитозу, викликаного дією різних факторів неінфекційної природи, виникає активація лізосомального апарату циркулюючих нейтрофілів, яка виражається у вивільненні вмісту лізосом з клітини. Вивільнені у кров лізосомальні ферменти та катіонні білки активують чинник Хагемана і залежні від нього процеси зсідання, фібринолізу, кініногенезу, комплемент і таким чином приймають участь в адаптивно-відновних реакціях організму та регуляції активності біологічно активних речовин [Лунина, Коваль, 1982; Шинкарев, 1983; Лунина, Полтавський, 1984; Лунина, Агафонова, 1986; Скрипка, 1986; 1990; Лунина, Абакумова, 1991].

Внаслідок того, що активація лізосомального апарату не залежить від природи стресора (крововтрата [Лунина, Козюк, 1978; Скрипка, 1990], знижений барометричний тиск [Лунина, Полтавський, 1984], іммобілізація [Лунина, Абакумова, 1990; 1991], вагітність та пологи [Коваль и др., 1983]) та носить дозозалежний характер [Лунина, Агафонова, 1986; Когут, 1988], було зроблено висновок про неспецифічність даної реакції.

Електронно-мікроскопічні дослідження довели, що механізм виділення лізосомальних ферментів із нейтрофілоцитів носить екзоцитозний характер [Коваль и др., 1983].

Дослідами *in vitro* було показано переважний, безпосередньо активуючий вплив на чинник Хагемана лізосомальних ферментів нейтрофільних лейкоцитів, у порівнянні з лізосомальними ферментами інших клітин [Лунина, Коваль, 1983].

Досліджені вікові особливості реакції лізосомального апарату нейтрофілів при дії неінфекційного агенту [Лунина, Абакумова, 1991].

В останній час стрес розглядається як неспецифічний компонент фізіологічних та патофізіологічних реакцій, характеризуючий стан напруження самого по собі, міра активації систем підтримки гомеостазу [Барабой, 1989; Сох, 1978]. Ведучу роль у розвитку резистентності організму при дії екстремальних чинників грають симпато-адреномедулярна, гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальна, а також холін-, гістамін- та серотонінергічні системи, система опіюїдних пептидів [Горизонтов и др., 1983; Панин, 1983; Середенко, 1984; Меерсон, 1986; 1988; Гольдберг и др., 1990; Amir e. a., 1980; Imuga e. a., 1984].

Згідно з існуючими уявленнями, гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальна система (ГГАКС) відіграє вагомую роль у підтримці гомеостазу системи крові при стресі [Горизонтов,

Протасова, 1968; Дешевой, 1980; Горизонтов и др., 1981; 1983; Гольдберг и др., 1990; Hetherington, Quie, 1985]. Глюкокортикоїди за умов дії екстремальних чинників визначають підсилення продукції гранулоцитів та розвиток нейтрофілії [Горизонтов и др., 1983]. Ці ж гормони викликають виникнення характерних для стресу змін лізосомального апарату різних клітин [Покровский, Тутельян, 1976; Панин, 1983; Сергеев, 1984; Панин, Маянская, 1987; Сергеев и др., 1987].

Що ж стосується можливої участі ГГАКС у механізмах регуляції активності лізосомального апарату нейтрофілів при загальному адаптаційному синдромі, то це питання не вивчалось і в літературі не обговорювалося.

В зв'язку з цим метою даної роботи стало вивчення ролі гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи у формуванні реакцій лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові при дії іммобілізаційного стресу.

У процесі формування адаптаційного синдрому у відповідь на дію 12-годинної іммобілізації на тлі пригнічення реактивності ГГАКС у кролів необхідно було вирішити такі завдання:

— вивчити кількісні зміни нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові і гранулоцитів у кістковому мозку;

— дослідити деякі морфофункціональні властивості лізосомального апарату циркулюючих нейтрофілоцитів (по вмісту лізосом та лізосомальних катіонних білків у нейтрофілах, активності лізосомальної кислій фосфатази у сироватці крові, адгезивним властивостям лейкоцитів);

— вивчити функціональний стан систем крові, залежних від чинника Хагемана — зсідуючої, фібринолітичної, калікреїн-кінінової;

— визначити роль ГГАКС у формуванні реакції лізосомального апарату нейтрофілоцитів у різні періоди онтогенезу.

Наукова новизна роботи. Вперше на рівні цілісного організму досліджена роль ГГАКС у зміні морфофункціональних властивостей лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові при формуванні стрес-синдрому.

Встановлено, що за умов пригнічення реактивності ГГАКС функціональна активність систем, залежних від чинника Хагемана — зсідуючої, фібринолітичної, калікреїн-кінінової, зберігає кореляцію із зміною кількості дегранульованих та декатіонізованих нейтрофілів й підвищенням концентрації лізосомальних ферментів нейтрофілів у крові.

Доведено, що ГГАС здійснює виражений вплив на активність зсїдаючої, фїбринолітичної та калїкреїн-кінїнової систем кровї за умов стресу неїнфекційної природи, при цьому її ефект реалїзується через активацію лїзосомального апарату нейтрофїльних лейкоцитів, підвищення концентрації лїзосомальних ферментів у плазмі кровї, активацію чинника Хагемана.

Одержано данї, що дозволяють розглядати їснуючі вікові особливостї реакції лїзосомального апарату нейтрофїлів на дію стресора як реакції, визначасмі активністю ГГАС.

Науково-практична цїнність роботи. Наслїдки дослїджень мають певне теоретичне значення, оскїльки дають можливе пояснення ролї ГГАС у механїзмах формування нейтрофїльного лейкоцитозу та реакції лїзосомального апарату нейтрофїлоцитів при дії стресорів неїнфекційної природи, що може бути основою для подальшої розробки питання про значення і місце ГГАС у реалїзації біологічної активності нейтрофїльних лейкоцитів у кровї й проблеми неспецифїчних гуморальних механїзмів адаптації. Одержанї данї можуть бути поясненням при деяких порушеннях стану систем кровї внаслїдок рїзних видів гіпо- та гіперкортицизму, фармакологічному застосуваннї глюкокортикоїдів, адренокортикальних їнгїбиторів чи їнших речовин, впливаючих на функцію ГГАС у кліниці.

Практична цїнність роботи полягає у тому, що встановленї регуляторнї механїзми ГГАС можуть бути використанї для розробки методів фармакологічної корекції видїлення вмісту лїзосом їз нейтрофїлів у кров і таким чином моделювання активності гуморальних гомеостатичних систем кровї.

Апробація роботи. Наслїдки роботи доповїдалися на щорїчних наукових конференціях Луганського держпедїнституту у 1991—1993 рр. та 3-ї регіональній науково-практичній конференції молодих вчених та спеціалїстів «Екологія промїшленого регіона Донбасса» / м. Луганськ, 1993 р./.

Публікації. По матеріалам дослїдження надруковано 5 робїт, з них 3 журналнї статтї та 2 роботи в тезах.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається їз вступу, огляду лїтератури, опису матеріалів та методів дослїдження, трьох роздїлів власних дослїджень, роздїла обговорення одержаних результатів та закїнчення, висновків та списку лїтератури. Загальний об'єм — 149 сторїнок машинописного тексту, їлюстровано 15 таблицями та 10 малюнками. Список лїтератури включає 307 джерел, в тому числі 149 їноземних.

Основні положення роботи, запропоновані до захисту:

1. Активуючий вплив гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи в фазу адаптації стрес-синдрому здійснюється не тільки на мієлопоез та розвиток нейтрофільного лейкоцитозу, але й на зменшення кількості лізосом у циркулюючих нейтрофілоцитах.

2. Гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальна система бере участь у вивільненні вмісту лізосом нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові за умов стресу.

3. Активність Хагеман-залежних систем крові при стресі визначається станом лізосомального апарату нейтрофілів.

4. Гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальна система бере участь у формуванні вікових особливостей адаптаційної відповіді нейтрофілоцитів.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти проведені на 103 кролях — 62 статевозрілих кроля, обох статей, масою 2,5—3 кг та 41 кролі 30-добового віку, масою 0,3—0,6 кг. Предпубертатний період розвитку досліджено в зв'язку з тим, що у попередніх працях нашої лабораторії [Лунина, Абакумова, 1990; 1991] встановлена його більша реактивність у порівнянні з дорослими, а дані літератури [Ставицкая, 1980; Држевецкая, 1987] дозволяють припустити, що це пов'язано з характерною для цього етапу підвищеною активністю ГГКС.

Досліди проводились на тваринах, які були поділені на 4 групи. Першу, контрольну групу, становили 30 статевозрілих кролів. Друга, досліджувана група, складалася з 32 статевозрілих кролів. Третю, контрольну групу, становили 20 кролів предпубертатного віку. Четверта, дослідна група, складалася з 21 кроля предпубертатного віку. Тварин контрольних груп піддавали іммобілізації на спині протягом 12 годин. У піддослідних групах іммобілізацію здійснювали на фоні пригнічення ГГКС.

Пригнічення реактивності ГГКС викликали по принципу «негативного зворотнього зв'язку» введенням супрафізіологічних доз гідрокортизону [Филаретов, Балашов, 1984; Филаретов, 1987].

Тривалість усіх спостережень визначалась часом відновлення повного набору лізосом у нейтрофілах кролів досліджуваних груп, що становило 10 діб.

Вивчали такі показники: кількість лейкоцитів в одиниці

об'єму крові, відносний та абсолютний вміст нейтрофільних лейкоцитів в одиниці об'єму крові; у кістковому мозку — кількість мієлокаріоцитів в одиниці об'єму кістково-мозкової тканини, абсолютну кількість гранулоцитів, у складі яких диференціювали клітини дозріваючого та проліферуючого пулів [Меньшиков, 1987, агрегацію лейкоцитів Сукач, 1988].

Для характеристики змін лізосомального апарату нейтрофілів вивчали: у нейтрофілах — вміст лізосом та гранул лізосомальних катіонних білків; у сироватці крові — активність маркерного лізосомального ферменту кислій фосфатази.

Лізосоми фарбували барвником Мая-Грюнвальда [Меньшиков, 1987], лізосомальні катіонні білки — барвником «світловий зелений» [Лунина, Коваль, 1982]. Лізосоми та гранули катіонних білків визначали за допомогою світлового мікроскопа, а також вивчали їх методом електронної мікроскопії [Коваль и др., 1983].

Активність лізосомальної кислій фосфатази вивчали за методом Боданського [Меньшиков, 1987].

Про участь лізосомальних ферментів нейтрофільних лейкоцитів у гуморальній регуляції функцій судини за їх впливом на системи крові, які залежать від чинника Хагемана — зсідуючу, фібринолітичну, калікреїн-кінінову.

Стан зсідуючої системи крові оцінювали по зміні тромбінового, протромбінового, силіконового, кефалін-каолінового часу плазми, кількості фібриногену [Балуда, 1980].

Активність фібринолітичної системи крові визначали за тривалістю фібринолізу, що залежить від чинника Хагемана [Скипетров, Булочникова, 1987].

Про зміни функціонального стану калікреїн-кінінової системи крові судили за скороченням протромбінового часу зсідання плазми після холодого впливу в тесті «холодова активація калікреїнового мосту» [Балуда, 1980].

Результати експериментів опрацьовано статистично за методом прямих різниць [Монцевичюте-Эрингене, 1964].

ОБГОВОРЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Введення супрафізіологічних концентрацій гідрокортизону з метою фармакологічної блокади глюкокортикоїдної функції ГГКС на 9 добу після останньої ін'єкції гормона приводило до підвищення абсолютного вмісту циркулюючих нейтрофілів у групі піддослідних статевозрілих кролів та збільшенню

загальної кількості лейкоцитів і нейтрофілів в одномісячних тварин, решта ж досліджуваних показників не змінювалась. Вірогідно, пояснити одержані дані можна тим, що саме введення гідрокортизону викликало у крові зміни, подібні до картини стрес-синдрому [Горизонтов и др., 1983; Hetherington, Quie, 1985; Schambach e. a., 1988]. Спостерігаємо підвищення вмісту циркулюючих нейтрофілів у тварин обох вікових груп і як наслідок — збільшення загальної кількості лейкоцитів у кролів предпубертатного віку можна пояснити залишковими наслідками активації мієлопоєзу внаслідок введення кортизолу. У використаному нами методі пригнічення функції ГГАС перший трьохтижневий інтервал часу характеризувався як період, в якому базальний рівень глюкокортикоїдів /ГЛК/ не відрізнявся від норми, зникала реакція ГГАС на стресор /імобілізацію/ та розвивалась ареактивність надниркових залоз до екзогенного АКТГ. Відповідно до цього відсутність вірогідних змін дегрануляції нейтрофілів, активації кислої фосфатази у сироватці крові, показників тесту спонтанної агрегації лейкоцитів і активності систем, залежних від чинника Хагемана, вірогідно, обумовлені тим, що до цього часу, в умовах нормальної концентрації ГЛК, глюкокортикоїдозалежні ефекти, які довгочасно розвиваються, проявлялись, а наслідки короткочасної дії ГЛК вже були слабо виражені або ж відсутні. Що ж стосовно підвищеної кількості нейтрофілів у крові та відсутності змін показників гранулоцитопоезу, то не виключена певна роль у цьому мобілізації їх маргинального пулу, у складі якого може знаходитися 50—60% лейкоцитів [Маянский, Маянский, 1989]. За даними лабораторії П. Д. Горизонтова (1974—1983), активація маргинального пулу лейкоцитів відноситься до ранніх перерозподільних реакцій системи крові на дію стресогенних чинників та розвивається при участі симпатичної нервової системи. В нашому випадку активація маргинального пулу, можливо, була обумовлена психоемоційною напругою тварин, ще не адаптованих до операційних втручань в ході експерименту.

Цікаво відмітити, що у кролів предпубертатного віку підвищення вмісту циркулюючих нейтрофілоцитів після введення гідрокортизону було набагато більшим, ніж у статевозрілих (292% і 141% відповідно), що і стало причиною підвищення загальної кількості лейкоцитів у цій групі тварин. Спостерігаєма кількісна різниця цих показників свідчить про більшу реактивність кролів предпубертатного віку у порівнянні з статевозрілими.

Дані контрольних тварин, отримані при вивченні кінетики нейтрофільних гранулоцитів, морфофункціональних властивостей лізосомального апарату циркулюючих нейтрофілів та стану систем, залежних від чинника Хагемана, свідчать, що при розвитку стрес-реакції, викликаній 12-годинною іммобілізацією, у системі крові розвивався типовий комплекс змін, відмічений у попередніх працях нашої лабораторії при дії на цілісний організм таких стресорів неінфекційної природи як крововтрата, вагітність і пологи, фізичне навантаження, знижений барометричний тиск, іммобілізація [Лунина, Козюк, 1978; Лунина, Коваль, 1983; Шинкарев, 1983; Полтавський, 1985; Лунина, Вовк, 1992]. У периферичній крові контрольних кролів розвивався абсолютний нейтрофільний лейкоцитоз, обумовлений спочатку мобілізацією кістково-мозкових нейтрофілоцитів, а в подальшому — активацією гранулоцитопоезу. При розвитку нейтрофілозу виникало зменшення кількості лізосом у нейтрофілах внаслідок дегрануляції та декатаїонізації, яке супроводжувалось підвищенням активності лізосомальної кислоти фосфатази у сироватці крові і активацією систем, залежних від чинника Хагемана.

Постіммобілізаційний розвиток абсолютного нейтрофільного лейкоцитозу у статевозрілих кролів спостерігався протягом 10 діб дослідження з максимальною проявою на 3-ю добу, коли кількість нейтрофілів у крові становила 163% від їх рівня до іммобілізації. У початковий період після дії стресора (перші 3 доби) нейтрофілоз був обумовлений підсиленням надходження зрілих кістково-мозкових гранулоцитарних клітин у кров і деяким зниженням кількості проліферуючих клітин, що можна пояснити прискоренням процесів дозрівання. В подальшому рівень нейтрофілозу підтримувався внаслідок активації як проліферуючого, так і дозріваючого пулів, про що свідчить зростання клітинних елементів цих пулів до 177 та 153% відповідно (на 8—9 добу експерименту).

У кролів предпубертатного віку кінетика нейтрофільних гранулоцитів у відповідь на дію іммобілізації змінювалась аналогічно, відрізняючись у строках, інтенсивності та часу прояви екстремальних значень. В початковий період (2 перші доби) він розвивався внаслідок зменшення у кістковому мозку дозріваючих гранулоцитів, а в подальшому (3—9 доба) — активації проліферації та дозрівання гранулоцитарного паростка. Більш інтенсивний та менш тривалий розвиток нейтрофілозу, сильніше виражена активація мієлопоезу також свідчать про неадекватно високу реактивність тварин

предпубертатного періоду розвитку у порівнянні з дорослими, що може розглядатися як ще несформована реакція мієлоїдної тканини на дію екстремальних чинників середовища. Одержані дані відповідають раніш виявленим особливостям цих показників [Лунина, Абакумова, 1990; 1991] та доповнюють характеристику предпубертатного періоду онтогенеза [Држевецкая, 1983; 1987; Шаляпина и др., 1986].

Відмічені нами особливості кінетики нейтрофільних гранулоцитів співпадають з літературними даними про розвиток у периферичній крові нейтрофільного лейкоцитозу і гіперплазії гранулоцитарного паростка кісткового мозку в умовах іммобілізаційного стресу [Горизонтов и др., 1983; Агафонова, Лунина, 1987; Дыгай, Шахов, 1989; Гольдберг и др., 1990], що з загальноприйнятих позицій є найбільш типовою реакцією гемопоєзу на дію стресорів.

У контрольних групах після іммобілізації у всі строки виявлення нейтрофілозу ми спостерігали зменшення вмісту лізосом у циркулюючих нейтрофілах, обумовлене їх дегрануляцією та декатіонізацією. Взаємозв'язок процесів розвитку нейтрофілії та зниження кількості лізосом у нейтрофілах проявлявся також у збігу строків їх максимального вираження. Така ж реакція лізосомального апарату нейтрофілів відмічалась й іншими авторами при дії різноманітних стресорів [Лунина, Козюк, 1978; Скрипка, 1986; Прияткин и др., 1988; Шинкарев, Полтавский, 1990; Морозов и др., 1991; Лунина, Вовк, 1993].

Згідно з сучасними уявленнями, функціональна активність лізосомального апарату визначається властивостями мембран лізосом [Панин, Маянская, 1987]. Закономірним етапом активації лізосомального апарату є підвищення проникливості мембран. Цитохімічними методами [Полтавский, 1985] було показано підвищення проникливості лізосомальних мембран у нейтрофілах при нейтрофілозі стресогенного походження. Експериментальна лабілізація та стабілізація лізосомальних мембран нейтрофілів в умовах стресу [Скрипка, 1983; Агафонова, Лунина, 1987] обумовлювали абсолютне число дегранульованих та декатіонізованих нейтрофілоцитів у крові. Отож, стрес в аналогічних нашим умовах закономірно викликав підвищення проникливості мембран у нейтрофілоцитах. За даними літератури підвищення проникливості мембран лізосом та зниження їх кількості у нейтрофілах опосередковується підвищенням концентрації іонів Ca^{2+} у цитозолі клітини [Панин, Маянская, 1987; Тепермен, Тепермен, 1989; Середенко и др., 1991; Lindau, Nusseo, 1990], підвищенням вмісту ц-АМФ

[Смоулен, Вайссманн, 1984; Alonso e. a., 1982], активацією перекисного окислення ліпідів [Аратян, 1984; Барабой, 1989].

Зниження вмісту лізосом у циркулюючих нейтрофілах після іммобілізації супроводжувалось підвищенням активності лізосомальної кислої фосфатази у сироватці крові контрольних тварин. Максимальний рівень активності лізосомального ферменту реєстрували у строк, коли абсолютний вміст нейтрофілів у крові був найбільшим (у дорослих кролів — 3-я, в одномісячних — 2-а доба).

Для рішення питання про механізм поступу ферментів лізосом нейтрофілів у кров ми спирались на результати електронно-мікроскопічних досліджень нашої лабораторії, що показали обумовленість зниження кількості лізосом у нейтрофілах при стресі вивільненням лізосомальних гранул із клітини шляхом екзоцитозу [Коваль и др., 1983]. Інші автори такий прояв реактивності нейтрофілів визначають як секреторну дегрануляцію, що призводить до виділення лізосомальних ферментів в оточуюче середовище без ознак цитоліза та зі збереженням життєздатності клітин [Алмазов и др., 1979; Бахов и др., 1986; Маянский, Маянский, 1989; Beesley e. a., 1988].

Побічним доказом екзоцитозного механізму надходження ферментів лізосом у кров при іммобілізації у наших дослідах була відсутність виражених ознак клітинної альтерації та збереження дегранульованих нейтрофілів у крові, а також збільшення (а не зменшення) загального вмісту нейтрофільних лейкоцитів у периферичній крові.

Іммобілізаційний стрес підсилював реакцію спонтанної агломерації лейкоцитів у контрольних кролів обох вікових груп. Максимальне підвищення лейкогічних властивостей відмічалось у строки найбільшого підвищення активності лізосомальної кислої фосфатази у плазмі крові. Індуцироване стресом явище гіперадгезивності лейкоцитів ми пояснюємо вивільненням лізосомальних ферментів, які самі бувають агрегантами [Маянский, 1991; Tsvetkove e. a., 1987] чи ж діють через C5a-фрагмент комплементу, продукти ліпоксігеназного шляху активації арахідонової кислоти, фібриноген [Wautier e. a., 1983; Berliner e. a., 1987; Henderson, 1987; Colman, 1990]. У всякому випадку процес агрегації є одним з проявів активного стану лейкоцитів і має східні властивості з дегрануляцією, наприклад, залежить від Ca^{2+} [Смоулен, Вайссманн, 1984; Ginis, Tauber, 1990].

Іммобілізація викликала активацію основних гомеостатичних систем плазми контрольних кролів — зсідуючої, фібринолітичної, калікреїн-кінінової, про що свідчить скоро-

чення тромбінового, протромбінового, сіліконового, кефалін-каолінового часу зсідання плазми, підвищення у крові концентрації фібриногена, збільшення фібринолітичної активності крові, зменшення протромбінового часу після холодової дії у тесті холодової активації калікреїнового мосту. Активація вивчасмих систем плазми розвивалась пропорційно підвищенню активності кислої фосфатази у крові тварин.

Одержані результати співпадають з даними літератури про те, що гіперкоагуляція, активація фібринолізу й кініногенезу є основні неспецифічні прояви стресу в крові [Кудряшов и др., 1975; Калишевская, 1982; Бышевский, Кожевникова, 1986; Гланц, 1989; Kluff e. a., 1987; Mosher, 1990; Tokado e. a., 1990; Tengborn e. a., 1990].

Пояснюючи спостерегаємий стан основних протеолітичних систем крові, ми виходили з концепції про єдину «полісистему» гуморальних регуляторів у крові, ключовим ферментом якої є чинник Хагемана [Баркаган, 1988; Баркаган, Кузник, 1990; Fuhrer e. a., 1990], та керувались отриманими в нашій лабораторії результатами про виражений, у порівнянні з клітинами інших тканин, безпосередній вплив ферментів лізосом нейтрофілів на чинник Хагемана в умовах *in vitro* [Лунина, Коваль, 1983], а також наслідками експериментального пригнічення гранулоцитопоезу, які показали залежності рівня активації чинника Хагемана, систем гемокоагуляції й фібринолізу від абсолютної кількості дегранульованих нейтрофільних лейкоцитів та відповідно активності лізосомальних ферментів у крові [Полтавский, 1985; Лунина, Абакумова, 1990]. Отже, активація систем гемокоагуляції, фібринолізу, кініногенезу в умовах іммобілізаційного стресу визначається активністю лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів.

Результати досліджень, одержані при вивченні впливу іммобілізації на кінетику нейтрофілів, стан їх лізосомального апарату та активність Хагеман-залежних систем крові у контрольних тварин стали основою для аналізу тих змін, що обумовлювалися пригніченням реактивності ГГКС у піддослідних тварин.

У тварин з пригніченою реактивністю ГГКС у початковий період розвитку стрес-синдрому (перші 2 доби у статевозрілих і перші 3 доби у тварин предпубертатного віку) абсолютний вміст нейтрофілоцитів у крові не відрізнявся від аналогічних даних контрольних груп. Ранні зміни у гранулоцитарному паростку кісткового мозку у тварин з недостатністю глюкокорти-

коїдної функції ГГАС характеризувалися однаковою інтенсивністю зменшення гранулоцитів та їх субпопуляцій у порівнянні з контрольними тваринами. У дорослих кролів цей період тривав 4 доби після іммобілізації, в одномісячних — 2 доби.

Вищеописані ранні зміни клітин нейтрофільного ряду у кістковому мозку та периферичній крові характеризуються як викид у циркулюючу кров кістково-мозкового резерву гранулоцитів [Горизонтов и др., 1983; Гольдберг и др., 1990] і відповідають першому періоду стрес-реакції по П. Д. Горизонтову або стадії мобілізації по Г. Сельє (1977).

Відсутність різниці у розвитку перерозподільних реакцій між кістковим мозком та периферичною кров'ю у піддослідних і контрольних тварин підтверджує дані літератури (Горизонтов и др., 1968—1983) про те, що викид нейтрофільних лейкоцитів у периферичну кров в стадію мобілізації не залежить від глюкокортикоїдів.

Більш пізній період стрес-реакції у тварин із зниженою реактивністю ГГАС характеризувався зміною реакцій нейтрофілів на дію стресора. Нейтрофілоз, характерний для контрольних тварин, не розвивався. Кількість нейтрофілів або ж була незмінною, або ж зменшувалась у порівнянні з їх вмістом до іммобілізації. Абсолютний вміст нейтрофілоцитів у крові піддослідних тварин протягом цього періоду був значно меншим, аніж у контрольних. У кролів з глюкокортикоїдною недостатністю ГГАС, викликану стресом, кістково-мозкова гіперплазія була ледве помітною. Пригнічення реактивності ГГАС призводило до більш тривалого зменшення всіх показників мієлопоезу в обох вікових групах, до менш виразного та більш короточасного збільшення клітин проліферуючого та дозріваючого пулів у статевозрілих тварин й до відсутності збільшення загальної кількості гранулоцитів та клітин дозріваючого пула і ще менш виразного та більш короточасного збільшення кількості проліферуючих клітин у кролів предпубертатного віку.

На основі вищезазначених результатів експериментів та даних літератури про регулюючу дію глюкокортикоїдів на гемопоєз [Дешевой, 1980; Горизонтов и др., 1983; Ромашко и др., 1985; Гольдберг и др., 1987;1990; Дыгай, Шахов, 1989] логічно було б припустити, що пригнічення реактивності ГГАС змінювало адаптивну відповідь гемопоетичної тканини на дію іммобілізації.

Відсутність ефекту підсилення гранулоцитопоезу могла

бути наслідком порушення механізмів прямої стимуляції ГЛК поліпотентних ствольових клітин через їхні бета-адренорецептори [Афанасьєв, Алмазов, 1985; Макио Огава, 1990; Aglietta, 1989] або/та порушення стимуляції клітин-попередників мієлопоезу через Т-клітини-регулятори, клітинні та гуморальні елементи гемопоезиндуруючого мікрооточення [Ястребов и др., 1988; 1991; Vonnefoix e. a., 1988].

Особливості кінетики нейтрофільних гранулоцитів при дії стресора в одномісячних тварин, у порівнянні з дорослими, в умовах пригнічення ГГАСС заключалися у більшому відносно-му зниженні кількості нейтрофільних лейкоцитів та менш вираженій активації гранулоцитопоезу. Вірогідним поясненням цих вікових особливостей може бути характерний для пубертату напружений рівень функціонування ГГАСС, який виражається у більш широких змінах параметрів системи під впливом стресорів та екзогенних ГЛК [Ставицкая, 1980].

Дослідження стану лізосомального апарату нейтрофілів в умовах пригнічення реактивності ГГАСС при іммобілізаційному стресі дозволило встановити, що спостерігаєма дегрануляція та декатіонізація нейтрофільних лейкоцитів, у порівнянні з контролем, була більш короточасною та менш інтенсивною. Так, зменшення кількості лізосом у статевозрілих кролів зі зниженою реактивністю ГГАСС спостерігалось протягом 9 діб після іммобілізації, тоді як у контрольних — 14, максимум дегрануляції й декатіонізації лізосом відмічався на 1 добу, а у контролі — на 3—4, інтенсивність зниження кількості лізосом була однаковою тільки на 1 добу, а в подальшому — значно менше контрольної.

У кролів предпубертатного віку зниження реактивності ГГАСС також скорочувало процес активації лізосомального апарату нейтрофілів (9 діб у піддослідних та весь період спостереження у контрольних) і значно знижувало рівень секреторної дегрануляції протягом всього дослідження (1—10 доба).

Зміна абсолютної кількості дегранульованих нейтрофілів у тварин із зниженою реактивністю ГГАСС відбувалася відповідно дегрануляції нейтрофілоцитів.

Як і у контрольних тварин, активність лізосомальної кислій фосфатази у плазмі крові в умовах пригнічення реактивності ГГАСС змінювалась відповідно зміні абсолютного вмісту дегранульованих нейтрофілів у циркуляції, що підтверджує поступ цього ферменту у кров саме з лізосом нейтрофілоцитів.

Звертає на себе увагу невідповідність між впливом ГЛК

на розвиток нейтрофілозу та активацію лізосомального апарату нейтрофілоцитів, яка проявилася в тому, що пригнічення реактивності ГГАС призводило до зменшення кількості нейтрофілів у крові і тільки ослаблювало (а не виключало) зменшення вмісту лізосом у нейтрофільних лейкоцитах. Вірогідно, у цих умовах діють і інші механізми, окрім глюкокортикоїдоопосередкованих, які зумовлюють підвищення проникливості лізосомальних мембран і визначають, при відсутності нейтрофілозу, появу у крові деякої кількості дегранульованих та декатіонізованих нейтрофілів й підвищення активності лізосомальних ферментів.

Агрегаційні властивості лейкоцитів периферичної крові після іммобілізації за умов пригнічення реактивності ГГАС змінювалися відповідно з динамікою вмісту кислій фосфатази у крові, тобто у порівнянні з контрольними тваринами вони знижувалися і більш значно у другий період розвитку стрес-синдрому.

Отже, пригнічення реактивності ГГАС призводило до менш вираженої активації лізосомального апарату нейтрофілів і як наслідок цього — до меншого вивільнення лізосомальних ферментів у кров та стимуляції агрегації лейкоцитів. Вищезазначене свідчить на користь існування залежності рівня секреторної дегрануляції циркулюючих нейтрофілоцитів від активності ГГАС в умовах стресу й припускає вірогідну активацію лізосомального апарату нейтрофілів через глюкокортикоїди.

Особливості стану лізосомального апарату нейтрофілів у кролів предпубертатного віку, у порівнянні із статевозрілими, при іммобілізації за умов пригніченої реактивності ГГАС визначалися більшою мірою пригнічення секреторної дегрануляції нейтрофілів і більш низьким рівнем активності у крові маркерного лізосомального ферменту. Що також може бути пояснено підвищеною реактивністю ГГАС у цей період онтогенезу.

В умовах пригнічення реактивності ГГАС іммобілізаційний стрес не викликав вираженої активації Хагеман-залежних систем крові — зсідуючої, фібринолітичної, калікреїн-кінінової, як це було в інтактних тварин. Особливості активації досліджених гемостатичних систем плазми у цій групі, у порівнянні з контрольною, були у менш тривалому часі активації, у зміщенні максимальної вираженості на більш ранній час після дії стресора, у більш низькій інтенсивності змін показників зсідання, фібринолізу й кініногене-

зу. Тобто, і в цих умовах спостерігалось зменшення кількості лізосом у нейтрофілах, супроводжуване підвищенням активності кислої фосфатази у плазмі крові та активацією основних протеолітичних систем. Однак, як і міра дегрануляції нейтрофілів і підвищення активності маркерного лізосомального ферменту, активація Хагеман-залежних систем крові була значно ослаблена. Ці дані дають можливість вважати, що для прояву таких наслідків дії стреса у крові, як гіперкоагуляція, активація фібринолізу й кініногенезу, потрібне повноцінне функціонування ГГАС. При цьому регуляторний вплив ГГАС на активність основних гомеостатичних систем плазми реалізується через лізосомальний апарат нейтрофілів та активацію чинника Хагемана.

Обмірковуючи вірогідні механізми передачі впливу ГГАС на лізосомальний апарат циркулюючих нейтрофілів при дії екстремальних факторів, слід звернути увагу на однонаправленість змін досліджених показників у тварин з пригніченою функцією ГГАС та кролів з вимкненими бета-адренорецепторами [Лунина, Вовк, 1992;1993] у відповідь на іммобілізаційний вплив. Подібність основних прояв активації лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів в умовах стресу свідчить про можливість реалізації адаптійної дії ГГАС на лізосомальний апарат нейтрофілів через активацію бета-адренорецепторів. Таке припущення співпадає з даними літератури в тому, що активація лізосомального апарату при розвитку стрес-синдрому, спричинена як катехоламінами, так і гідрокортизоном, реалізується через один механізм, тобто через бета-адренорецептори та підвищення концентрації ц-АМФ у клітині [Панин и др., 1982;1983; 1987]. У подальшому ці системи можуть включатися у процес лабілізації лізосомальних мембран під впливом активуємих ГЛК протеїнкіназ [Панин и др., 1990; Huang Chi-Kuang, 1989].

12-годинна іммобілізація контрольних тварин викликала поряд з розвитком абсолютного нейтрофільного лейкоцитозу, обумовленого активацією гранулоцитопоезу, активацію лізосомального апарату циркулюючих нейтрофілів, включаючи дегрануляцію та декатіонізацію лізосом, підвищення активності у плазмі крові маркерного лізосомального ферменту нейтрофілів — кислої фосфатази. Одночасно з цим у крові експериментальних тварин відмічалось підсилення агломераційних властивостей лейкоцитів та виразна активація систем гемокоагуляції, фібринолізу, кініногенезу.

Вікові особливості реакцій лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові кролів предпубертатного віку, у порівнянні з статевозрілими, на дію іммобілізації були виражені у більш інтенсивному та менш тривалому розвитку нейтрофілозу, обумовленому більш інтенсивнішою активацією мієлопоезу й вивільненням лізосомальних ферментів з нейтрофілів.

У кролів з пригніченою функцією ГГАС у другу фазу адаптаційного синдрому спостерігалось зменшення кількості нейтрофілів у крові, відсутність активації мієлопоезу, коротка та неінтенсивна дегрануляція нейтрофільних гранулоцитів і відповідне їй незначне підвищення активності кислої фосфатази у плазмі крові, що супроводжувалось зниженням агрегаційних властивостей лейкоцитів і послабленням активації зсідальної, фібринолітичної, калікреїн-кінінової систем плазми.

В умовах пригніченої ГГАС у кролів предпубертатного віку, у порівнянні з статевозрілими, особливості адаптаційної відповіді нейтрофільних лейкоцитів на дію іммобілізації проявлялись у більшому зниженні кількості циркулюючих нейтрофілів та пригніченні гранулоцитопоезу, у меншому зниженні кількості лізосом у нейтрофілах та більш низькому рівні активності кислої фосфатази у плазмі, що свідчить про неадекватність реакції нейтрофілів на стресор, обумовлену ще не сформованою ГГАС.

ВИСНОВКИ

1. У фазу адаптації стрес-синдрому активність гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи визначає розвиток нейтрофільного лейкоцитозу, обумовленого гіперплазією мієлоїдної тканини.

2. Гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальна система бере участь в зменшенні вмісту лізосом та лізосомальних катіонних білків з нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові.

3. Глюкокортикоїдозалежна активація лізосомального апарату циркулюючих нейтрофілів обумовлює вивільнення лізосомальних ферментів з нейтрофілів і підвищення їх активності у плазмі крові, а також підвищення агрегаційних властивостей лейкоцитів.

4. При дії іммобілізаційного стресу ГГАС визначає активність гемокоагуляції, фібринолізу, кініногенезу, при

цьому її вплив реалізується через активацію лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові і чинник Хагемана.

5. Вікові особливості реакцій лізосомального апарату нейтрофілів у кролів предпубертатного періоду розвитку та статевозрілих на дію іммобілізації в значній мірі визначаються реактивністю ГГАКС, характерною для цих етапів постнатального онтогенезу.

6. Активація лізосомального апарату нейтрофілів здійснюється не тільки ГГАКС, але, вірогідно, й іншими механізмами, впливаючими на проникливість лізосомальних мембран.

7. При дії на організм стресора неінфекційної природи ГГАКС регулює активність лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів периферичної крові.

СПИСОК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ПО ТЕМІ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Луніна Н. В., Чехов А. А. Роль гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи у формуванні реакції лізосомального апарату нейтрофільних лейкоцитів в умовах іммобілізаційного стресу // Физиол. журн.—1992.—38, № 6.—С. 55—60.

2. Луніна Н. В., Вовк С. В., Чехов А. А. Вплив гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної та симпатичної систем на функційний стан Хагеман-залежних систем крові за іммобілізаційного стресу // Укр. биохим. журн.—1993.—65, № 1.—С. 48—54.

3. Чехов А. А., Вовк С. В. Роль симпато-гіпоталамо-гіпофізарно-адренкортикальної системи в изменении морфофункциональных свойств лизосомального аппарата нейтрофильных лейкоцитов в условиях иммобилизационного стресса // Цитология и генетика.—1993.—27, №2.—С. 54—58.

4. Добровольская В. Е., Чехов А. А. Влияние лизосомальных ферментов нейтрофилов на иммунологические показатели при иммобилизации // В кн. Экология промышленного региона Донбасса. Материалы 3-й региональной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов.—Луганск, 1993.—С. 42—43.

5. Чехов А. А., Добровольская В. Е. Действие чрезвычайных факторов на систему гемостаза // В кн. Экология промышленного региона Донбасса. Материалы 3-й региональной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов.—Луганск, 1993.—С. 143—144.

Підписано до друку 16.06.93. Формат 60x84/16. Папір друкарський. Друк офсетний. Ум. друк. арк. 1,0. Тираж 100 екз. Замовлення 4695. Обласна друкарня, 348040, Луганськ, вул. Ватутіна, 89а.

465724

AB 27.769

AB 27.769