

ИММУНОФАРМАКОЛОГИЯ

ВЛИЯНИЕ ЛИЗОЦИМА НА ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПОЛИМОРФНО-ЯДЕРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ В УСЛОВИЯХ ОСТРОЙ КРОВОПОТЕРИ

В. Н. Рыбников¹, И. Л. Бровкина¹, **Б. С. Утешев²**

Обнаружено снижение в результате острой кровопотери фагоцитарного числа и фагоцитарного индекса, показателей НСТ-теста, активности НАДФН-оксидазы и повышение активности Ca^{2+} -АТФазы полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови. Лизоцим эффективно корректирует перечисленные параметры функционально-метаболической активности этих клеток. В реализации корректирующего влияния лизоцима участвуют клетки селезенки, прилипающие к стеклу.

Ключевые слова: функционально-метаболическая активность, полиморфно-ядерные лейкоциты, лизоцим, цитокины прилипающих к стеклу клеток селезенки

ВВЕДЕНИЕ

Острая кровопотеря является одной из наиболее частых форм стресса в условиях чрезвычайных ситуаций, хирургической и акушерско-гинекологической практике. Экспериментальными исследованиями убедительно показано, что умеренная острая кровопотеря приводит к существенному снижению показателей, характеризующих неспецифическую резистентность и иммунологическую реактивность организма.

Мощная система неспецифической резистентности и иммунологической реактивности организма образуется моноцитами и полиморфно-ядерными лейкоцитами (ПЯЛ). Моноцитарное звено системы является источником большого количества цитокинов, регулирующих различные механизмы неспецифической защиты и иммунологической реактивности.

Одним из важнейших гуморальных факторов неспецифической реактивности является лизоцим, выделяющийся в больших количествах стимулированными клетками мононуклеарных фагоцитов [5]. Лизоцим вызывает выраженный бактерицидный эффект, индуцирует перестройку поверхностных структур гепатоцитов и иммуноцитов, стимулирует развитие иммунного ответа на различные антигены [1, 11]. Показано, что лизоцим уменьшает степень подавления или нормализует неспецифическую резистентность, угнетенные действием на организм многих физических, химических и биологических агентов [14].

Учитывая все вышеизложенное, можно сделать предположение о том, что одной из причин возникновения или обострения инфекционных процессов после кровопотери является снижение содержания лизоцима, а также угнетение функционально-метаболической активности (ФМА) полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови, и что введение этого фермента способно корректировать возникающие нарушения этого звена иммунитета и приводить к повышению устойчивости организма в отношении возбудителей инфекционных заболеваний после острой кровопотери.

Целью работы было изучение влияния лизоцима на функционально-метаболическую активность полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови в условиях острой кровопотери.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на крысах Вистар массой 180 – 200 г. Под легким эфирным наркозом у крыс из бедренной артерии одномоментно удаляли 3 % крови от массы тела.

Для получения суспензии лейкоцитов гепаринизированную венозную кровь (25 ЕД на 1 мл крови) смешивали с 3 % желатином (0,1 мл на 1 мл крови) и выдерживали 15 – 20 мин при 37 °С. После оседания эритроцитов слой плазмы, обогащенной лейкоцитами, переносили в силиконированные пробирки. Клетки осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин, дважды отмывали бесцветным раствором Хенкса и помещали в среду 199. Количество клеток подсчитывали под световым микроскопом в камере Горяева [7].

ФМА лейкоцитов оценивали по величинам фагоцитарного числа (ФЧ) и фагоцитарного индекса (ФИ), показателей спонтанного и индуцированного зимоза-

¹ Кафедра акушерства и гинекологии (зав. — проф. М. Г. Газзян) и кафедра спортивной медицины и медицинской реабилитации (зав. — проф. И. Л. Бровкина) Курского государственного медицинского университета, МЗ РФ, Курск, 305041, ул. К. Маркса, 3.

² Кафедра фармакологии (зав. — проф. **Б. С. Утешев**) Российский государственный медицинский университет, Москва, 117437, ул. Островитянова, 1.

ном НСТ-теста (Р. М. Хаитов, 1995). Для определения активности НАДФН-оксидазы взвесь лейкоцитов гомогенизировали в лабораторном пестиковом гомогенизаторе Поттера-Эльвегейма с зазором 10 мкм. Гомогенизатор помещали на лед и растирали клетки в течение двух минут. В некоторых опытах перед гомогенизацией клетки инкубировали в течение 10 мин с примирующими агентами (лизоцимом или фракциями супернатанта спленоцитов). Активность НАДФН-оксидазы определяли спектрофотометрически [6]. Использовали квадратные кюветы с толщиной слоя 10 мм. Объем пробы составлял 3 мл. В состав пробы входили Na-K-фосфатный буфер, гомогенат клеток (1 млн/мл), субстрат — НАДФН (0,5 нмоль/мл). Контрольная проба не содержала субстрата. Определение проводили при комнатной температуре. Активность фермента оценивали по скорости НАДФН-оксигеназной реакции, рассчитываемой по убыли поглощения НАДФН (за счет его окисления) при 340 нм.

Скорость реакции рассчитывали по формуле:

$$V = \frac{\Delta D \cdot 60 \cdot 1000}{E \cdot t \cdot \alpha}$$

где V — скорость реакции, пкмоль/мин · 10³ клеток; ΔD — измеренная убыль оптической плотности за период измерения; t — период измерения, с; E — коэффициент миллимолярной экстинкции, равный 6,22 мМ⁻¹; α — количество клеток в пробе; 60 — коэффициент пересчета секунд в минуты; 1000 — коэффициент пересчета на тысячу клеток.

Активность Са²⁺-АТФ-азы определяли в среде инкубации, содержащей 50 мМ трис-НСl, 1 мМ СаCl₂, 1,5 мМ АТФ, 50 мкМ МоCl₂, 5 мМ ЭДТА, рН 7,5. Суспензию лейкоцитов (10⁶ кл./мл) инкубировали 60 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением холодной трихлоруксусной кислоты — ТХУ, конечная концентрация 5 % (Ю. Д. Слабнов и др., 1998). Неорганический фосфат (Рн) определяли по Chen [12], белок (Рт) — в ТХУ-осадках по Lowry [3].

Концентрацию P_n рассчитывали по уравнению регрессии: $y(P_n) = -9,33 \cdot 10^{-3} + 0,2x$, а содержание Рт в тканях — по уравнению: $y(P_n) = 3,43 \cdot 10^{-3} + 0,51x$, где x — экстинкция.

Клетки селезенки фракционировали по способности прилипать к стеклу при различной температуре

[9]. Прилипающие и не прилипающие клетки инкубировали в среде 199 (10⁷ клеток на 1 мл среды), содержащей 5 % телячьей эмбриональной сыворотки и антибиотики (пенициллин и стрептомицин) в течение 4–6 ч в ламинарном боксе при периодическом обновлении газовой среды (95 % кислорода и 5 % двуокиси углерода) и готовили пул супернатантов прилипающих и не прилипающих к стеклу клеток селезенки (СПКС и СНКС), содержащих равные объемы супернатантов 5–6 животных. Белки СПКС и СНКС после диализа и концентрирования фракционировали на сефадексе G-150 [8]. Получали три фракции белков: фракция I содержала белки с молекулярной массой (ММ) более 150 кД, фракция II — белки с ММ 50–60 кД и фракция III — белки с ММ менее 15 кД. Концентрацию белков во фракциях устанавливали по Бредфорд, используя краситель Кумаси [16]. Активность фракций оценивали путем внесения их в среду инкубации ПЯЛ.

Результаты подвергали статистической обработке путем вычисления средних величин и средних квадратических отклонений. Существенность различий средних оценивали по критериям Вилкоксона – Манна — Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кровопотеря снижала концентрацию лизоцима в крови и показатели, характеризующие фагоцитарную (ФЧ и ФИ) метаболическую (спонтанный и индуцированный зимозаном НСТ-тест) активность нейтрофилов периферической крови. Введение лизоцима в дозе 1 мг/кг уменьшало выраженность супрессии показателей неспецифической резистентности, а инъекции фермента в дозе 5 мг/кг нормализовали содержание лизоцима и ФМА лейкоцитов (табл. 1).

Полученные данные свидетельствуют о существенном корригирующем влиянии лизоцима на факторы неспецифической резистентности организма при острой кровопотере.

Важнейшей функцией ПЯЛ является генерация активных метаболитов кислорода. Ключевую роль в реализации этого процесса играет НАДФН-оксидаза, катализирующая восстановление кислорода до супероксидного радикала, обладающего высокой токсичностью по отношению к микробным антигенам и служащего индуктором образования гидроксильного

Таблица 1. Влияние лизоцима на ФМА лейкоцитов при острой кровопотере

Условия опыта	ФЧ	ФИ	НСТсп	НСТинд
1. Контроль (без кровопотери и введения лизоцима)	40,6 ± 4,3	1,4 ± 0,1	12,5 ± 1,3	36,7 ± 2,3
2. Кровопотеря	29,7 ± 2,9* ¹	0,5 ± 0,06* ¹	6,4 ± 0,8* ¹	22,8 ± 1,9* ¹
3. Кровопотеря, введение лизоцима в дозе 1 мг/кг	34,8 ± 3,1* ^{1, 2}	0,9 ± 0,1* ^{1, 2}	9,7 ± 0,9* ^{1, 2}	29,0 ± 2,1* ^{1, 2}
4. Кровопотеря, введение лизоцима в дозе 5 мг/кг	42,2 ± 4,1* ^{2, 3}	1,3 ± 0,1* ^{2, 3}	11,8 ± 1,6* ^{2, 3}	34,9 ± 2,4* ^{2, 3}

радикала, синглетного кислорода и перекиси водорода. Физиологическими активаторами НАДФН-оксидазы являются фагоцитированные бактерии, опсонизированные частицы, иммунные комплексы, компоненты комплемента, цитокины, а ингибиторами — любые стресс-индуцирующие агенты [2].

Кровопотеря вызывала снижение скорости реакции окисления НАДФН в ПЯЛ крови. Введение лизоцима после кровопотери увеличивало скорость НАДФН-оксидазной реакции в ПЯЛ (табл. 2).

Учитывая данные об участии цитокинов прилипающих к стеклу клеток селезенки в реализации модулирующего влияния лизоцима на ФМА лейкоцитов, значительный интерес представлял вопрос: обусловлено ли повышение скорости НАДФН-оксидазной реакции, при введении лизоцима, непосредственным влиянием лизоцима на фермент, или этот эффект вызывают выделяющиеся под влиянием лизоцима цитокины прилипающих к стеклу клеток? Для решения этого вопроса ПЯЛ, полученные после кровопотери, экстракорпорально инкубировали с лизоцимом или фракциями супернатантов прилипающих и не прилипающих клеток селезенки.

Установлено, что обработка лизоцимом не влияла на скорость реакции, катализируемой НАДФН-оксидазой. В отличие от этого, низкомолекулярная фракция супернатантов прилипающих к стеклу при 32–37 °С спленоцитов, полученных после кровопотери и получавших инъекции лизоцима или тяжелых эритроцитов крыс, которым вводили лизоцим, увеличивала скорость НАДФН-оксидазной реакции ПЯЛ крыс, подвергнутых кровопотери — КПК (табл. 3). На основании полученных данных можно прийти к заключению, что активатором НАДФН-оксидазы ПЯЛ КПК является не сам лизоцим, а выделяющиеся под его влиянием цитокины спленоцитов, прилипающих к стеклу при 32–37 °С.

В регуляции ФМА лейкоцитов и его основного звена — активности НАДФН-оксидазы, важная роль при-

Таблица 3. Кинетические константы НАДФН-оксидазы ПЯЛ, обработанных лизоцимом и фракциями супернатанта прилипающих к стеклу при 32–37 °С спленоцитов

Условия опыта	Скорость НАДФН-оксидазной реакции	
	0,2 нмоль/мл НАДФН	0,5 нмоль/мл НАДФН
1. Контроль (без примиряющего агента)	0,15 ± 0,03	1,29 ± 0,16
2. Введение лизоцима	0,14 ± 0,03	1,34 ± 0,17
3. Введение низкомолекулярной фракции СПС крыс, получавших инъекции лизоцима	0,39 ± 0,04 ^{*1, 2}	1,56 ± 0,28 ^{*1, 2}
4. Введение высокомолекулярной фракции СПС крыс, получавших инъекции лизоцима	0,17 ± 0,04 ^{*3}	1,32 ± 0,18 ^{*3}

Таблица 2. Кинетические константы НАДФН-оксидазы ПЯЛ после кровопотери и введения лизоцима

Условия опыта	Скорость НАДФН-оксидазной реакции	
	0,2 нмоль/мл НАДФН	0,5 нмоль/мл НАДФН
1. Контроль (без кровопотери и введения лизоцима)	0,14 ± 0,03	1,31 ± 0,25
2. Кровопотеря	0,05 ± 0,01 ^{*1}	0,63 ± 0,11 ^{*1}
3. Кровопотеря и введение лизоцима	0,11 ± 0,02 ^{*2}	1,04 ± 0,17 ^{*1, 2}

надлежит ионам Ca²⁺, которые активируют некоторые цитокины, осуществляющие фосфорилирование внутриклеточных компонентов НАДФН-оксидазы [17].

Учитывая это, интересно было изучить влияние кровопотери, лизоцима и выделяемых под его влиянием цитокинов на активность Ca²⁺-АТФазы, переносящей ионы Ca²⁺ из клеток во внешнюю среду. Оказалось, что кровопотеря стимулировала активность Ca²⁺-АТФазы, что сопровождается снижением концентрации ионов Ca²⁺ в цитозоле ПЯЛ и служит одной из причин снижения активности НАДФН-оксидазы. Введение КПК лизоцима или низкомолекулярной фракции супернатанта прилипающих при температуре 32–37 °С клеток селезенки крыс, получавших лизоцим, снижает активность Ca²⁺-АТФазы (табл. 4).

По-видимому, это обуславливает нормализацию ионов Ca²⁺, способствует повышению активности НАДФН-оксидазы. Указанный эффект обусловлен низкомолекулярной фракцией супернатанта клеток селезенки, прилипающих к стеклу при 32–37 °С. Это дает основания считать, что активность НАДФН-оксидазы и Ca²⁺-АТФазы реципрокно регулируется одними и теми же или близкими по структуре и функциональной активности цитокинами спленоцитов.

Есть все основания полагать, что аналогичный эффект может быть вызван введением протеолитических ферментов, которые, как и лизоцим, индуцируют появление у тяжелых эритроцитов свойства индуцировать выделение моноцитами/макрофагами хелперных пеп-

Таблица 4. Влияние лизоцима и фракций СПС крыс, получавших инъекции лизоцима, на активность Ca²⁺-АТФазы ПЯЛ после кровопотери

Условия опыта	Активность Ca ²⁺ -АТФазы ПЯЛ, мкМРн/мг белка · мин
1. Контроль	5,38 ± 0,52
2. Кровопотеря	7,63 ± 0,64 ^{*1}
3. Кровопотеря, введение лизоцима	5,88 ± 0,54 ^{*2}
4. Кровопотеря, введение низкомолекулярной фракции СПС крыс, получавших лизоцим	5,91 ± 0,57 ^{*2}
5. Кровопотеря, введение высокомолекулярной фракции СПС крыс, получавших лизоцим	7,71 ± 0,65 ^{*1, 3, 4}

тидов [14]. Не исключено, что влияние указанных соединений на ФМА мононуклеаров может быть усилено препаратами, корригирующими кальциевый обмен.

Дальнейшее изучение особенностей взаимосвязанного функционирования НАДФН-оксидазы и Ca^{2+} -АТФазы позволит разработать принципиально новые подходы к решению проблемы коррекции ФМА лейкоцитов при различных формах стресса и патологии.

ВЫВОДЫ

1. Кровопотеря снижает содержание лизоцима в крови, угнетает функционально-метаболическую активность полиморфно-ядерных лейкоцитов периферической крови.

2. Лизоцим в дозе 5 мг/кг нормализует содержание лизоцима в крови и показатели, характеризующие функционально-метаболическую активность полиморфно-ядерных лейкоцитов.

3. Кровопотеря снижает скорость реакции окисления НАДФН в НАДФН-оксидазной реакции. Лизоцим увеличивает скорость этой реакции.

4. Корригирующие эффекты лизоцима опосредуются цитокинами, выделяемыми клетками селезенки, прилипающими к стеклу при 32 – 37 °С.

5. Острая кровопотеря повышает активность Ca^{2+} -АТФазы. Применение лизоцима позволяет снизить активность данного фермента. Данный эффект опосредуется также цитокинами спленоцитов, прилипающих к стеклу при 32 – 37 °С.

ЛИТЕРАТУРА

1. О. В. Бухарин, н. В. Васильев, *Лизоцим и его роль в биологии и медицине*, Томск (1974).

2. Н. К. Зенков, Е. Б. Меньщикова, *Усп. совр. биол.*, **113**, вып. 3, 286 – 296 (1993).
3. Л. А. Зильбер (ред.), *Иммунохимический анализ*, Москва (1968).
4. Г. А. Лазарева, В. Н. Рыбников, И. Л. Бровкина, *Метаболическая иммуномодуляция*, Курск (2000), с. 194 – 199.
5. Д. Н. Маянский, С. Н. Кутина, Э. Г. Щербакова, *Антибиот. и химиотер.*, **33**(2), 128 – 130 (1988).
6. *Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен)*, Н. Д. Ещенко (ред.), Ленинград (1982), с. 188 – 233.
7. Л. В. Никанкина, Л. В. Ковальчук, Л. В. Ганковская и др., *Иммунол.*, № 4, с. 29 – 32 (2001).
8. Л. А. Остерман, *Хроматография белков и нуклеиновых кислот*, Москва (1985).
9. С. В. Родионов, В. И. Патним, И. Г. Матаренко, В. М. Земсков, *Иммунол.*, № 3, 32 – 37 (1985).
10. В. Н. Рыбников, А. А. Конопля, И. Л. Бровкина, *Метаболическая иммуномодуляция*, Курск (2000), с. 199 – 205.
11. Л. Е. Сипливая, *Автореф. дис ... канд. мед. наук*, Москва (1986).
12. В. П. Скулачев, *Соотношение окисления и фосфорилирования в дыхательной цепи*, Москва (1962), с. 156.
13. Ю. Д. Слабнов, Г. В. Черепнев, и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **68**(1), 40 – 43 (1988).
14. *Ферментная иммуномодуляция*, Л. Г. Прокопенко (ред.), Курск (1998).
15. Р. М. Хаитов, Б. В. Пинегин, Х. И. Истамов, *Экологическая иммунология*, Москва (1995).
16. С. С. Шишкин, *Вопр. мед. химии*, № 4, 134 – 141 (1982).
17. Т. Finkel, М. Pobst, and Н. Suzuki, *J. Biol. Chem.*, **262**, 1258 – 1259 (1992).

Поступила 24.09.03

THE EFFECT OF LYSOZYME ON THE FUNCTIONAL METABOLIC ACTIVITY OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES UNDER ACUTE HEMORRHAGE CONDITIONS

V. N. Rybnikov¹ I. L. Brovkina², and B. S. Uteshev³

¹ Department of Obstetrics and Gynecology, Kursk State Medical University, ul. K. Marksa 3, Kursk, 305033 Russia

² Department of Sport Medicine and Rehabilitation, Kursk State Medical University, ul. K. Marksa 3, Kursk, 305033

Russia ³ Department of Pharmacology, State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117487 Russia

Acute hemorrhage leads to a decrease in the phagocyte number and index, the NBT test parameters, and the NADPH oxidase activity and to an increase in the Ca^{2+} ATPase activity in polymorphonuclear leukocytes on the peripheral blood. Lysozyme produces effective correction of the above parameters of the functional-metabolic activity of these cells. The drug effect is mediated by cytokines of splenocytes sticking to the glass.