

Н. В. ПУЧКОВ

ДЕЙСТВУЮТ ЛИ МЕДИАТОРЫ НЕРВНОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ НА ФАГОЦИТОЗ ПОДОБНО ОПСОНИНАМ?

(Представлено академиком А. Д. Сперанским 16 VII 1948)

В нескольких работах мною и Г. Г. Голодец (¹, ²) было показано, что медиаторы, выделяемые окончаниями нервов вегетативной нервной системы, способны влиять на фагоцитарную активность лейкоцитов крови, причем, наподобие двойной антагонистической регуляции в других органах, симпатин способен стимулировать фагоцитарную деятельность лейкоцитов, а вещество вагуса — угнетать ее.

Ввиду установленной в настоящее время идентичности вещества вагуса с ацетилхолином и близости или тождественности симпатина с адреналином, Г. Г. Голодец (²), а затем С. М. Титовой (⁵) были проделаны опыты с влиянием этих веществ на фагоцитоз *in vitro*. Оказалось, что синтетический ацетилхолин, так же как вещество вагуса, угнетает, а адреналин в разведениях $1:3 \cdot 10^8$ — $1:3 \cdot 10^9$, как симпатин, возбуждает фагоцитоз. При введении небольших доз адреналина в целый организм мною (⁴) также было получено повышение силы фагоцитоза и, наоборот, при введении пилокарпина — ослабление ее.

В связи с этими фактами нас заинтересовал вопрос о характере действия медиаторов на феномен фагоцитоза.

Как известно, Райтом были обнаружены антитела, благоприятствующие фагоцитозу, названные им опсонинами. Благодаря работам Гектоэна и Рюдигера (³) было выяснено, что действие опсонинов сводится к адсорбции их на поверхности микробов, вследствие чего изменяются поверхностные свойства фагоцитируемых частиц и облегчается захватывание последних лейкоцитами.

Хотя в случае действия медиаторов, исходя из физико-химических свойств адреналина и ацетилхолина, подобное предположение являлось маловероятным, однако мы решили подвергнуть этот вопрос специальному исследованию, воспользовавшись методическими приемами, примененными Гектоэном и Рюдигером для решения вопроса о способе действия опсонинов.

Методика. Лейкоциты для опыта получались из спинного лимфатического мешка лягушки. Начиная с 3-го дня до опыта в спинной лимфатический мешок лягушки ежедневно вводилось по $0,5 \text{ см}^3$ 10% раствора пептона в физиологическом растворе. В день опыта в лимфатическое пространство вводилось 2 см^3 0,65% раствора NaCl, и содержимое мешка извлекалось шприцем.

Лейкоциты затем однократно отмывались в центрифуге при 800 оборотах в минуту, и из них готовилась равномерная взвесь в 2 см^3 раствора Рингера.

В две заранее заготовленные пробирочки отмерялось по $0,2 \text{ см}^3$ из этой (основной) взвеси лейкоцитов и в одну из пробирочек добавля-

лось 0,2 см³ раствора ацетилхолина в разведении 1 : 1 · 10⁶, а в другую 0,2 см³ раствора адреналина в разведении 1 : 1 · 10⁸. Пробирочки оставались стоять в течение часа, а затем производилось двукратное отмывание лейкоцитов от адреналина и ацетилхолина в центрифуге, причем в каждую пробирочку к лейкоцитам добавлялся прежний (0,2 см³) объем раствора Рингера.

Так как каждое отмывание в центрифуге, возможно, изменяет функциональную способность лейкоцитов, то, чтобы выравнять условия, одновременно и оставшиеся в основной пробирке лейкоциты дополнительно 2 раза отмывались в центрифуге.

В качестве материала для фагоцитоза служили 1—2-недельные культуры *Bact. coli communs*. Перед опытом микробы смывались физиологическим раствором с агара и троекратно отмывались в центрифуге при 5000 оборотах в минуту, чтобы удалить остатки продуктов обмена, попавшие из культуры. Из микробов готовилась основная взвесь, содержащая около 150 000 бактерий в 1 мм³. Из этой взвеси по 0,2 см³ переносилось в две пробирочки, в которые добавлялись адреналин или ацетилхолин в тех же концентрациях, что и в пробирочки с лейкоцитами. Дальнейшие процедуры (выдерживание в адреналине и ацетилхолине, отмывание) производились в этих пробирочках точно в таком же порядке, как и в случае лейкоцитов.

Таким образом, в результате у нас получились четыре пробирочки, содержавшие лейкоциты или микробы, выдержанные по 1 часу в адреналине или в ацетилхолине.

Кроме того, в другие три пробирочки вводилось по 0,2 см³ микробов из основной взвеси и затем в одну из них добавлялось 0,2 см³ раствора Рингера (контроль), во вторую 0,2 см³ раствора адреналина в разведении 1 : 1 · 10⁸ и в третью 0,2 см³ раствора ацетилхолина в разведении 1 : 1 · 10⁶.

Всего таким образом мы имели в опыте 7 различно подготовленных пробирочек.

После этого к 5 пробирочкам, где имелись взвеси микробов, добавлялось по 0,2 см³ лейкоцитов из основной взвеси, а в оставшиеся две пробирочки, где была взвесь лейкоцитов, по 0,2 см³ микробов. Пробирочки 30 мин. выдерживались в термостате (время фагоцитоза) при 20°C, затем в каждую пробирочку для прекращения фагоцитоза добавлялось по 1 капле 1% раствора осмиевой кислоты. Пробирочки далее вынимались из термостава, подвергались центрифугированию, и из получившегося на дне осадка делался мазок. Мазки фиксировались метиловым спиртом и окрашивались по Гимза. После этого подсчитывалось число микробов, захваченных 400 лейкоцитами.

Число микробов, захваченных лейкоцитами в контрольной пробирке, принималось за 100%, а отклонения в силе фагоцитоза в других пробирках выражались в процентах со знаком + при усилении фагоцитоза и со знаком — при угнетении его по сравнению с контрольной.

Результаты проделанных нами опытов приведены в табл. 1 (первые 11 опытов).

В графе 2 табл. 1 указано число захваченных в контрольной пробирке микробов при расчете на 100 лейкоцитов; в графе 3 — изменение силы фагоцитоза в процентах при добавлении к смеси микробов и лейкоцитов адреналина; в графе 4 — сила фагоцитоза в смеси с микробами, выдержанными до опыта в растворе адреналина; в графе 5 — сила фагоцитоза в смеси с лейкоцитами, выдержанными в адреналине; в графе 6 — изменение силы фагоцитоза в присутствии ацетилхолина; в графе 7 — сила фагоцитоза в смеси с микробами, выдержанными в растворе ацетилхолина; в графе 8 — сила фагоцитоза в смеси с лейкоцитами, выдержанными в ацетилхолине.

Таблица 1

№ п.п.	Контроль		Изменение силы фагоцитоза в %					
	число микробов, захваченных лейкоцитами	адреналин 1:1·10 ⁸	микробы, выдержанные в адреналине	лейкоциты, выдержанные в адреналине	ацетилхолин 1:1·10 ⁶	микробы, выдержанные в ацетилхолине	лейкоциты, выдержанные в ацетилхолине	микробы, выдержанные в сыворотке
1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	41,5	+ 40	-13	+ 28	-45	-43	—	—
2	26,0	+ 56	+10	+ 42	-39	+ 8	0	—
3	10,0	+ 19	- 3	- 12	-49	+ 2	- 3	—
4	73,0	+ 68	+ 2	+ 3	- 6	+ 5	- 1	—
5	205,0	+ 64	+ 6	+123	-42	+ 8	-15	—
6	20,5	+ 58	- 7	- 15	-59	- 5	+10	—
7	20,0	+ 27	-13	- 13	-75	-10	-25	—
8	19,5	+ 77	+ 2	- 3	-67	+ 5	- 8	—
9	32,5	+100	+ 8	+106	-55	+15	-19	—
10	23,0	+ 67	- 2	+113	-22	+ 2	+11	—
11	26,0	+ 6	+ 2	- 6	-27	+19	- 2	—
12	1:2,5	—	—	—	—	—	—	+ 531
13	9,5	—	—	—	—	—	—	+ 2000
14	41,0	—	—	—	—	—	—	+ 307
Среднее . . .	Показатель достоверности разности . . .	+52,9	+2,0	+33,3	-44,2	+0,5	-5,2	
		6,1	0,4	1,9	6,9	0,1	1,4	

Как можно видеть из данных отдельных опытов и из средних цифр, присутствие адреналина в концентрации 1:1·10⁸, в соответствии с ранее упомянутыми нашими наблюдениями, заметно усиливало фагоцитоз (в среднем на 52,9%) и, наоборот, наличие ацетилхолина в концентрации 1:1·10⁶ угнетало его (в среднем на 44,2%). В то же время смеси с микробами, выдержанными в адреналине или ацетилхолине до опыта, практически не отличались по силе фагоцитоза от контроля. В отдельных опытах имелись нерегулярные отклонения в силе фагоцитоза в ту и другую сторону, которые нивелировались в средних цифрах и, очевидно, представляли собой случайные отклонения вследствие неравномерного распределения лейкоцитов с захваченными микробами в мазке.

В отличие от этого, во взвесах, содержащих лейкоцитов, выдержанных в адреналине, мы довольно часто, хотя и не всегда, видели заметное усиление фагоцитоза по сравнению с контрольной пробой. Это отразилось и на средней, давшей 33,3% усиления фагоцитоза. Лейкоциты, выдерживавшиеся в ацетилхолине, дали менее отчетливые результаты, хотя здесь также имеется намек на свойственное ацетилхолину угнетение силы фагоцитоза.

Достоверность отклонений была также нами проверена статистически, путем вычисления так называемого показателя достоверности разности. По правилам статистики, вполне достоверным считается отклонение, показатель достоверности которого получается не ниже 3. Как видно из цифр нижней строки табл. 1, вполне достоверным в наших опытах является лишь результат отклонений в присутствии адреналина и ацетилхолина. Показатель достоверности для лейкоцитов, выдержанных до опыта в адреналине и ацетилхолине, ниже 3, и поэтому отклонение не является вполне достоверным. Мы можем говорить лишь о тенденции к усилению фагоцитоза после выдерживания лейкоцитов в

адреналине и к угнетению после выдерживания в ацетилхолине. Показатель достоверности разницы в случае микробов, выдерживавшихся в адреналине или ацетилхолине, очень невысок и показывает на полную недостоверность отклонений.

Для сравнения нами были поставлены еще 3 опыта (табл. 1, оп. 12, 13 и 14), где вместо адреналина или ацетилхолина микробы выдерживались в сыворотке лягушки, т. е. подвергались действию нормальных опсоинов. Сыворотка лягушки получалась после свертывания крови, взятой из сердца. Микробы на 1 час погружались в сыворотку и затем отмывались двукратно в центрифуге. Из этих микробов готовилась взвесь, как указано выше. В качестве контроля одновременно готовилась такая же пробирка, но с микробами, не бывшими в соприкосновении с сывороткой. Остальные процедуры были точно такие же, что и при описанных выше опытах.

Как мы видим из последней графы таблицы, микробы, выдержанные в сыворотке, в значительной мере адсорбировали опсоины и во много раз интенсивнее захватывались лейкоцитами.

Таким образом, в результате проведенных нами опытов мы могли убедиться, что влияние медиаторов на фагоцитоз не имеет ничего общего по характеру с действием опсоинов. Очевидно, медиаторы не абсорбируются на фагоцитируемых частицах, и действие их зависит от влияния на лейкоцитов. Правда, изменение фагоцитарной активности лейкоцитов, выдерживавшихся до опытов в растворах адреналина и ацетилхолина, получилось не вполне регулярным, однако вряд ли это и можно было ожидать, учитывая то, что двукратное отмывание лейкоцитов от адреналина и ацетилхолина занимало 8—10 мин., в течение которых след от воздействия этих веществ в значительной мере должен был исчезнуть. Как известно, в отношении других органов адреналин (так же как и симпатин) дает более продолжительное физиологическое последствие, чем ацетилхолин; этим и можно объяснить, что в наших опытах его действие на лейкоцитарные клетки было выражено яснее.

Поступило
16 VII 1948

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ Г. Г. Голодец и Н. В. Пучков, Бюлл. эксп. биол. и мед., 7, в. 5, 443 (1939). ² Г. Г. Голодец, там же, 11, в. 1, 84 (1941). ³ L. Nektoen and S. F. Ruediger, J. of Inf. Diseases, 2, № 1, 178 (1905). ⁴ Н. В. Пучков Бюлл. эксп. биол. и мед., 20, в. 4—5 (10—11), 12 (1945). ⁵ С. М. Титова, там же № 8, 48 (1946).