

ВЛИЯНИЕ ПАТОЛОГИИ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ МАТЕРИ НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОТОМСТВА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

Г.В. Брюхин, Н.В. Невзорова

Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск

В ходе исследования были изучены функциональные особенности нейтрофилов периферической крови, в том числе способность к адгезии, расплыванию, фагоцитозу, а также лизосомальная активность и интенсивность кислородзависимых метаболических процессов. В качестве объекта исследования использовалось потомство самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени. Было выявлено угнетение функциональной активности нейтрофилов и снижение их содержания в крови.

Ключевые слова: нейтрофилы, кровь, мать, плод, фагоцитоз.

Введение. Большинство фундаментальных процессов, лежащих в основе индивидуального развития, в настоящее время изучены недостаточно. В частности, под пристальным вниманием российских и зарубежных ученых находятся вопросы становления одной из важнейших систем человеческого организма – системы крови. Известно, что для нормального функционирования организма необходимо определенное соотношение клеток крови различных типов, выполняющих специфические функции и находящихся на определенных стадиях развития [2].

В частности, для обеспечения адаптационных возможностей организма важно нормальное содержание в крови нейтрофильных гранулоцитов и необходима способность этих клеток выполнять важнейшие функции, из которых основной является защитная. В основе защитной функции нейтрофила лежит его способность к фагоцитозу. Для обеспечения акта фагоцитоза необходимо наличие в клетке специфических ферментов, отвечающих за лизис чужеродного агента, способности к адгезии и расплыванию, а также высокого уровня метаболической активности [7].

В настоящее время многочисленные экспериментальные и клинические исследования указывают на нарушение у потомства матерей с хронической патологией гепатобилиарной системы становления систем жизнеобеспечения, в том числе репродуктивной, иммунной, макрофагальной [1, 2].

Применяемые в работе цитохимические методы исследования позволяют выявить связь между морфологией и биохимией клетки в норме и патологии.

В связи с этим целью настоящего исследования явился анализ роли патологии печени матери в условиях эксперимента на морфофункциональное становление гранулоцитов крови.

Методика исследования. В качестве объекта исследования в эксперименте были использованы белые лабораторные крысы (самки) линии Вистар, всего 120 животных, в том числе взрослые самки (24 животных) и их разнополое потомство – 96 животных из 24 пометов в различные сроки постнатального периода (15, 30, 45, 60-е сут). Сроки исследования согласуются с общепризнанным подразделением возрастных периодов у данной группы животных.

Исходя из цели настоящего исследования все экспериментальные животные были разделены на 2 группы. Первую группу составили животные от интактных матерей – контрольная группа – 48 животных из 10 пометов. Во вторую группу вошло потомство от самок с хроническим экспериментальным поражением печени с помощью фильтра *E.coli* – экспериментальная группа – 48 животных из 14 пометов.

Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Поражение печени моделировалось путем введения половозрелому животному (самке) в три участка печени – по одной инъекции с обеих сторон у основания мечевидного отростка и справа у края реберной дуги по срединно-ключичной линии – 0,2 мл фильтрата шестидневной культуры *E.coli* (штамм АТСС 25922) в разведении 1:4. Разрешающую инъекцию производили через 24 ч путем введения в хвостовую вену фильтрата шестидневной культуры *E.coli* из расчета 0,3 мл/кг массы тела. По данным литературы, экспериментальный гепатит, вызываемый введением фильтрата шестидневной культуры *E.coli*, по своим морфологическим, иммунологическим и биохимическим характеристикам рассматривается как

адекватная модель вирусного гепатита А у человека [9].

Исходя из поставленных задач нами были использованы морфологические, гистологические, гистохимические, статистические методы исследования.

Выделение нейтрофилов проводили общепринятыми методами на фиколл-верографиновом градиенте плотностью 1,095. Исследования проводили в мазках и в монослое клеток [5].

Количество нейтрофилов в периферической крови исследовалось с помощью камеры Горяева. Кроме того, для оценки рецепторного аппарата нейтрофилов использовали нединамический «адгезивный тест» и тест «распластывание», основанных на их способности прикрепляться к чистой стеклянной поверхности [5].

Кислородзависимые метаболические процессы в нейтрофилах оценивали по интегральному НСТ-тесту в модификации А.Н. Маянского с соавторами в двух вариантах – спонтанном и индуцированном [6]. Оценку результатов проводили путем подсчета НСТ-положительных клеток (%).

Лизосомальную активность нейтрофилов изучали по методу И.С. Фрейншлин и др. (1976), основанному на инкубации монослоя нейтрофилов в среде с флюоресцирующим красителем – акридиновый оранжевый. При оценке результатов данного теста учитывали количество акридин-позитивных клеток и средний гистохимический показатель, отражающий лизосомальную активность [3, 10].

Изучение фагоцитарной способности нейтрофилов периферической крови проводили на модели поглощения частиц латекса диаметром 1,2 мкм. При оценке результатов определяли фагоцитарный показатель, отражающий процент макрофагов, содержащих микросферы латекса, и фагоцитарный индекс, отражающий количество частиц латекса из расчета на 1 клетку [6].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием лицензионного пакета прикладных программ «SPSS 17.0». При сравнительном анализе данных использовали непараметрический критерий Манна – Уитни [8].

Результаты исследований и обсуждение.

Прежде всего нами было установлено достоверное снижение количества нейтрофилов в 1 мл периферической крови у подопытных животных по сравнению с контролем на 30-й и 45-й день постнатального развития (табл. 1). Это можно объяснить снижением интенсивности процессов гемопоэза, в частности, нейтрофилоцитопоэза в костном мозге. Наиболее выраженные изменения содержания нейтрофилов у экспериментальных животных имели место в период становления половой зрелости (30-е и 45-е сут) – возрастной период, сопровождающийся усилением метаболической активности, подверженности организма стрессам, адаптации к быстро меняющимся условиям внутренней среды.

Таблица 1
Количество нейтрофилов в 1 мл крови экспериментальных животных

Срок исследования, сут	Количество клеток в 1 мл крови, $\times 10^6$	
	Контроль	Опыт
15-е	2,65 ± 0,22	2,11 ± 0,29
30-е	3,21 ± 0,21	2,45 ± 0,14*
45-е	3,12 ± 0,22	2,28 ± 0,12*
60-е	2,87 ± 0,37	2,21 ± 0,16

Здесь и в рис. 1–5 * – различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

Изучая адгезивные свойства нейтрофилов, мы руководствовались положением о том, что изменение адгезивных свойств клетки тесно взаимосвязано с уровнем возбуждения фагоцита, являясь важным признаком активации [7, 10].

Большинство физиологических и патологических реакций, в которых участвует нейтрофил, совершается в тканях. В связи с этим адгезия, то есть свойство клеток прикрепляться к определенным субстратам и задерживаться на них, приобретает важное функциональное значение. Адгезивность является активной реакцией клетки на адекватное раздражение. Изменение адгезивных свойств клетки часто сопутствует другим признакам активации нейтрофила: поглощению объектов фагоцитоза, хемотаксису, дегрануляции [7].

Адгезивные свойства нейтрофилов периферической крови изучались нами в двух временных параметрах: на 30-й и 60-й мин культивирования.

Полученные результаты отражены на рис. 1 и 2. Как видно из рисунков, у подопытных крысят всех возрастных групп число адгезированных фагоцитов через 30 и 60 мин культивирования снижено по сравнению с контролем. Аналогичные результаты получены и при постановке теста распластывания фагоцитов.

Логично предположить, что такие изменения связаны с нарушением способности клеток к образованию адгезивных межклеточных контактов и дефектом рецепторов-адгезинов и свидетельствуют о депрессии функционального состояния нейтрофилов потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени.

При оценке содержания распластанных нейтрофилов периферической крови экспериментальных животных было выявлено снижение доли распластанных клеток у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени. Так, на 15-е сут постнатального онтогенеза доля распластанных нейтрофилов подопытных животных составила (26,31 ± 0,25) %, на 30-е сут – (32,34 ± 0,27) %, на 45-е сут – (34,54 ± 0,51) % и на 60-е сутки – (34,65 ± 0,46) %, что существенно ниже содержания распластанных нейтрофилов интактных животных – (34,32 ± 0,37) %, (37,61 ± 0,24) %, (37,61 ± 0,24) %, (37,61 ± 0,24) %.

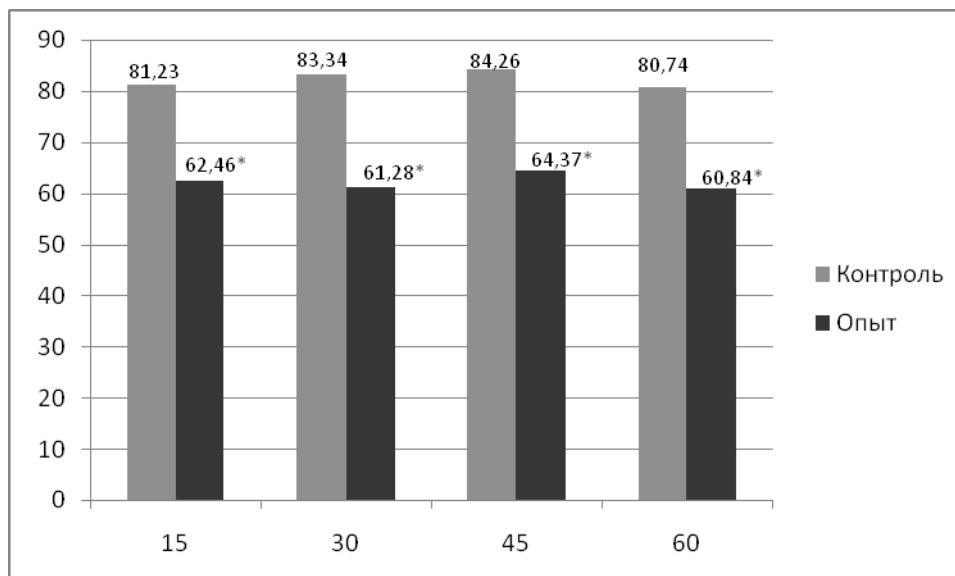


Рис. 1. Доля адгезировавшихся нейтрофилов экспериментальных животных через 30 мин инкубации, %

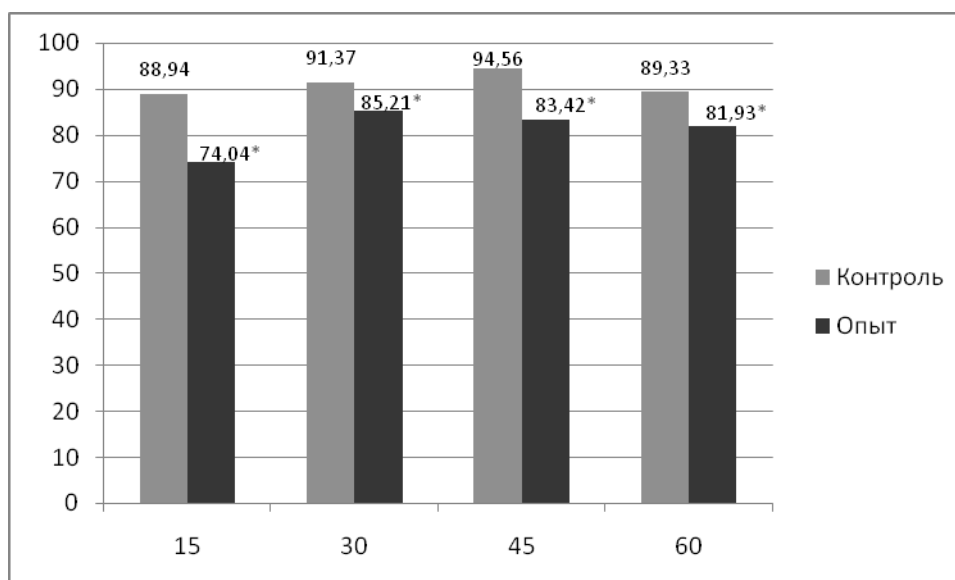


Рис. 2. Доля адгезировавшихся нейтрофилов экспериментальных животных через 60 мин инкубации, %

($39,72 \pm 0,19$) % и ($36,14 \pm 0,46$) % соответственно. Различия на 15, 30 и 45-е сут постнатального развития статистически достоверны.

Логично предположить, что угнетение адгезивной способности нейтрофилов, а также их способности к распластыванию у подопытных крысят обусловлено дефектом рецепторов-адгезинов, что может быть связано, в свою очередь, с патологиями цитоскелета [10].

Известно, что прилипание к эндотелию, определяющее размер маргинального пула нейтрофилов периферической крови, напрямую зависит от адгезивных свойств нейтрофилов. Размер же маргинального пула, в свою очередь, отражает подготовку к необходимой миграции клеток в экстрава-

зальное пространство и формирование тканевого пула. Таким образом, угнетение способности к адгезии негативно сказывается не только на фагоцитарной активности нейтрофилов, но и на возможности их «пионерного» участия в реакциях воспаления [7].

Кислородзависимые бактерицидные механизмы нейтрофилов мы оценивали с помощью интегрального теста восстановления нитросинего тетразолия как одного из характерных и надежных показателей функциональной активности фагоцитирующих клеток [6, 7].

При этом кислородзависимые метаболические процессы в нейтрофилах периферической крови экспериментальных животных мы оценивали

в двух вариантах: спонтанном и стимулированном. Анализ полученных данных позволяет сделать заключение, что у потомства самок с экспериментальным поражением печени на всех сроках исследования имеет место снижение интенсивности спонтанного НСТ-теста в нейтрофилах периферической крови (рис. 3).

Обращает на себя внимание тот факт, что у 15-дневных крысят интактной и опытной групп содержание НСТ-положительных клеток среди нейтрофилов периферической крови приблизительно одинаково. В то же время у 60-дневных опытных крысят этот показатель существенно снижен по сравнению с интактными животными.

Аналогичные изменения выявлены и при постановке индуцированного латексом НСТ-теста (рис. 4).

Из рис. 3 видно, что окислительная метаболическая активность у нейтрофилов подопытных животных снижена по сравнению с клетками интактных крысят, причем наибольшие различия

наблюдаются на 60-й день онтогенеза, в то время как на 15-й день доля высокоактивных клеток практически одинакова в опыте и контроле.

Показатели индуцированного латексом НСТ-теста различаются более существенно – различия статистически достоверны на всех сроках исследования. Такие данные позволяют предположить снижение у нейтрофилов подопытных животных способности адаптировать свой кислородзависимый окислительный метаболизм к изменившимся условиям и адекватно реагировать на внешний раздражитель.

Эти изменения находятся в полном соответствии с таковыми коэффициентами стимуляции НСТ-теста (табл. 2). Известно, что коэффициент стимуляции характеризует способность клетки оперативно и адекватно реагировать на внешнее воздействие усилением окислительного метаболизма [7].

Как видно из табл. 2, на всех сроках исследования у подопытных крысят коэффициент сти-

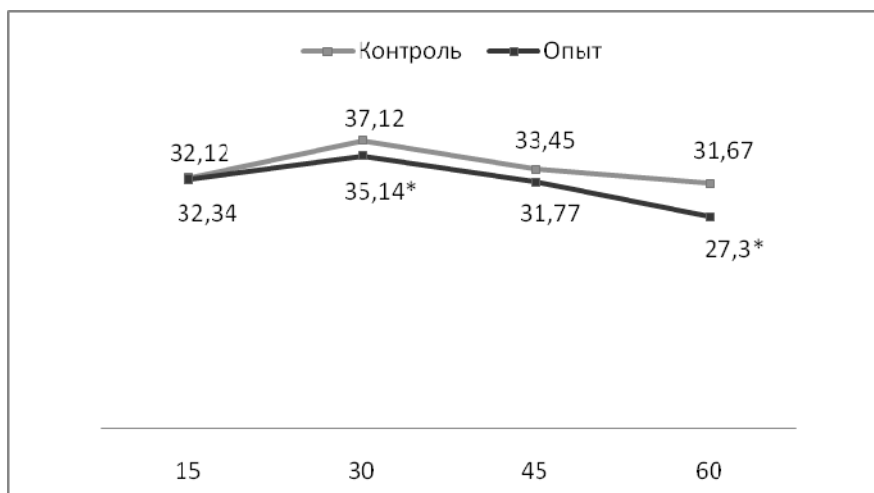


Рис. 3. Содержание НСТ-положительных нейтрофилов при спонтанном НСТ-тесте, %

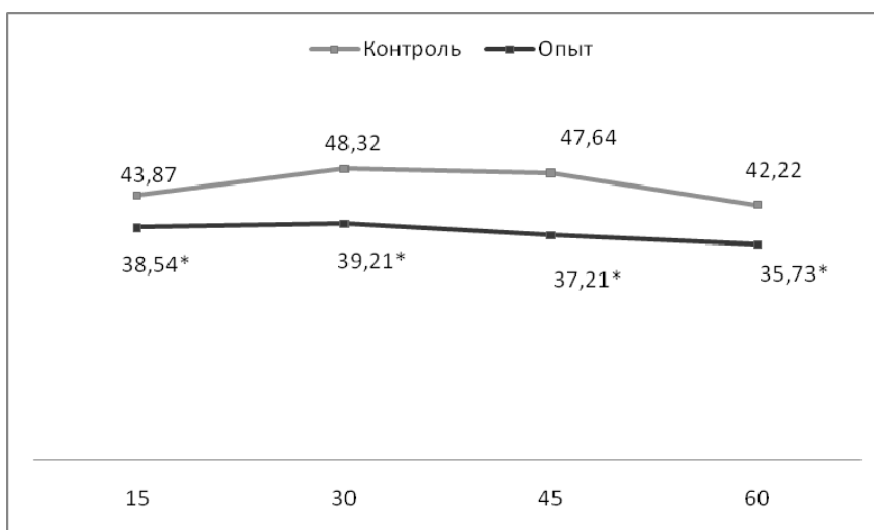


Рис. 4. Содержание НСТ-положительных клеток при постановке НСТ-стимулированного теста, %

Проблемы здравоохранения

муляции НСТ-теста оказался существенно сниженным по сравнению с таковым у интактных животных.

Для оценки лизосомальной активности нейтрофилов периферической крови экспериментальных животных нами использовался метод флуоресцентного зондирования отдельных клеток [10].

Таблица 2
Коэффициент стимуляции НСТ-теста в нейтрофилах периферической крови экспериментальных животных, %

Срок исследования, сут	Коэффициент стимуляции НСТ-теста	
	Контроль	Опыт
15-е	135,65	119,98
30-е	130,17	111,58
45-е	142,42	117,12
60-е	133,31	130,87

Полученные результаты отражены на рис. 5. Как видно из рисунка, число акридинпозитивных клеток у подопытных крысят на всех сроках исследования снижено по сравнению с таковыми у интактных животных. Учитывая, что лизосомальные ферменты участвуют в переваривании поглощенных веществ, в том числе микроорганизмов, выявленное нами уменьшение числа нейтрофилов с лизосомальной активностью у потомства самок крыс с хроническим поражением печени может указывать на депрессию у них этой функции [4].

Известно, что лизосомальные ферменты нейтрофила нацелены на деструктивные реакции: они участвуют во внутриклеточном пищеварении (фагоцитоз) или, будучи секретированными во внешнюю среду, способствуют умерщвлению живых объектов и разрушению макромолекул.

Образование и высвобождение преформированных биологически активных веществ составляет важнейший этап реализации эффекторного потенциала зрелого нейтрофила [7]. Соответственно, снижение лизосомальной активности нейтрофилов подопытных крысят свидетельствует о существенном уменьшении защитного потенциала этих клеток.

При исследовании фагоцитарной активности нейтрофилов было выявлено снижение всех показателей способности клеток к фагоцитозу.

Так, фагоцитарный показатель нейтрофилов подопытных животных – $37,93 \pm 0,44$ – на 15-й день постнатального развития, $43,77 \pm 0,24$ – на 30-й день, $42,64 \pm 0,36$ – на 45-й день и $40,86 \pm 33$ – на 60-й день – существенно снижен по сравнению с контролем – $45,74 \pm 33$, $47,21 \pm 0,26$, $49,53 \pm 0,16$ и $52,31 \pm 0,43$ соответственно (различия статистически достоверны).

Выявлено снижение количества активно фагоцитирующих клеток по сравнению с контролем, о чем свидетельствует изменение фагоцитарного индекса.

Фагоцитарный индекс нейтрофилов также ниже среди нейтрофилов подопытных животных: на 15-й день онтогенеза – в 2,32 раза, на 30-й день – в 2,56 раза, на 45-й день – в 3,24 раза и на 60-й день в 2,76 раза по сравнению с контролем. Таким образом, нейтрофилы потомства самок с поражением печени способны поглотить значительно меньшее количество чужеродных агентов, чем нейтрофилы здоровых животных.

Заключение. Полученные результаты позволяют сделать заключение о том, что у потомства самок крыс с экспериментальным хроническим поражением гепатобилиарной системы снижение числа нейтрофилов в циркуляции сопровождается их качественными изменениями, что проявляется в угнетении адгезивной и фагоцитарной активности,

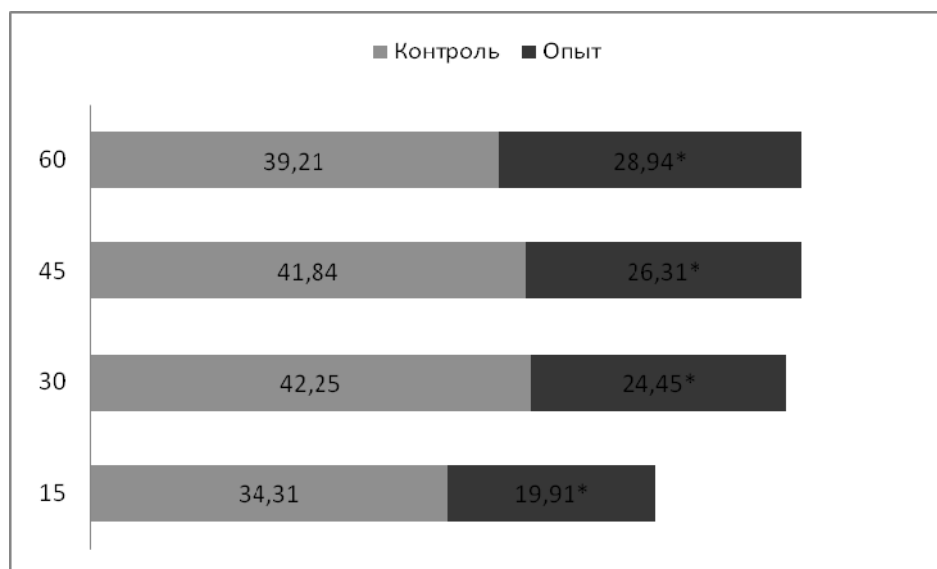


Рис. 5. Содержание акридинпозитивных нейтрофилов в периферической крови экспериментальных животных, %

а также в снижении интенсивности внутриклеточных метаболических процессов. Эти данные могут свидетельствовать о незрелости либо о депрессии эфферентных функций этих клеток под влиянием нарушенного метаболического гомеостаза, обусловленного патологией печени матери.

Литература

1. Брюхин, Г.В. Роль токсического поражения печени матери в нарушении структурно-функционального становления яичников потомства в условиях эксперимента / Г.В. Брюхин, Е.В. Вторушина // *Морфологические ведомости*. – 2006. – № 3–4. – С. 16–18.
2. Брюхин, Г.В. Особенности клеточного иммунитета у потомства самок крыс с хроническим поражением печени / Г.В. Брюхин, А.А. Федосов // *Вест. Челяб. гос. пед. ун-та*. – 2006. – № 6. – С. 157–158.
3. Бутенко, З.А. Цитохимия и электронная микроскопия клеток крови и кроветворных органов / З.А. Бутенко, Д.Ф. Глузман, К.П. Зак. – Киев: Наукова думка, 1974. – 243 с.
4. Долгушин, И.И. Нейтрофильные внеклеточные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И.И. Долгушин, Ю.С. Андреева, А.Ю. Савочкина. – М.: Изд-во РАМН, 2009. – 208 с.
5. Иммунологические, цитохимические и биохимические методы исследования фагоцитирующих клеток: метод. рекомендации / под ред. Э.А. Имельбаевой. – Уфа: БГМИ, 1996. – 85 с.
6. Маянский, А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге / А.Н. Маянский, Д.Н. Маянский. – Новосибирск: Наука, 1983. – 254 с.
7. Маянский, А.Н. Клинические аспекты фагоцитоза / А.Н. Маянский, О.И. Пикуза. – Казань: Магариф, 1993. – 200 с.
8. Реброва, О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
9. Сааков, Б.А. Моделирование воспалительного процесса в печени / Б.А. Сааков, А.И. Поляк // *Моделирование, методы изучения и экспериментальная терапия патологических процессов*, 1967. – С. 119–123.
10. Фрейндлин, И.С. Система мононуклеарных фагоцитов / И.С. Фрейндлин. – М.: Наука, 1984. – 272 с.

Поступила в редакцию 26 марта 2012 г.