

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХИМИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ПЕРИТОНЕАЛЬНЫХ И АЛЬВЕОЛЯРНЫХ МАКРОФАГОВ ПОТОМСТВА САМОК КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

Г.В. Брюхин, Е.Ю. Шаверина

Челябинская государственная медицинская академия

Изучено влияние экспериментального хронического поражения печени (обусловленного введением гепатотропного яда D(+) – галактозамина гидрохлорида) на цитохимическую активность перитонеальных и альвеолярных макрофагов потомства на разных этапах постнатального развития. Установлено, что патология гепатобилиарной системы матери обуславливает снижение функциональной активности макрофагальных клеток потомства, что отражается в подавлении лизосомальной и пероксидазной активности, а также снижении содержания кислой фосфатазы.

Ключевые слова: поражение печени, макрофаги, лизосомы, пероксидаза, кислая фосфатаза.

Введение. С позиции оценки системы резистентности человека огромное значение имеют клетки системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ). Данные клетки, участвуя в процессе формирования и регуляции иммунного ответа, являются одним из элементов, от функциональной активности которого зависит интенсивность иммунной реакции и поддержание гомеостаза в организме [8]. В сложном комплексе биохимических, физиологических и морфологических изменений, в которых реализуется ответная реакция макрофагов, особая роль принадлежит лизосомальному аппарату и его важнейшим составляющим – кислой фосфатазе и пероксидазе. Данные лизосомальные ферменты играют одну из главных ролей в патофизиологии системного воспаления [7].

В связи с вышеизложенным **целью настоящего исследования** явилась оценка активности лизосомального аппарата альвеолярных и перитонеальных макрофагов потомства матерей с хронической патологией печени на разных стадиях постнатального онтогенеза.

Методика исследования. Работа проведена на белых лабораторных крысах Вистар (18 взрослых самок) и их потомстве (72 животных из 18 пометов) в различные сроки постнатального развития (на 15-е и 45-е сутки).

Исследование проводилось с учетом суточных и сезонных колебаний. При этом животные содержались в одинаковых условиях вивария и получали стандартный пищевой рацион. Контрольных и опытных животных на протяжении всего эксперимента содержали в пластиковых клетках при естественном освещении и неограниченном доступе к воде и пище.

Работа с экспериментальными животными проводилась строго в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.77.

Исходя из поставленной цели экспериментальные животные были разделены на 2 группы. В 1-ю группу были выделены животные от интактных родителей (контрольная группа). Во 2-ю группу вошло потомство от матерей с экспериментальным хроническим D-галактозаминовым поражением печени (опытная группа). Данную модель патологии печени создавали путем однократного внутривентрального введения взрослым половозрелым самкам D(+) – галактозамина гидрохлорида («Sigma – G500», США) – на 0,9%-ном растворе натрия хлорида в дозе 250 мг/кг массы тела животного. Через 10 дней после введения галактозамина к самкам производилась подсадка здоровых самцов.

Поражение гепатобилиарной системы экспериментальных животных верифицировали с помощью морфологических (дискомплексация печеночных балок, расширение синусоидных капилляров, гидропическая и мелкокапельная вакуолярная дистрофия гепатоцитов, очаговые некробиотические изменения гепатоцитов в различных отделах дольки, диффузная инфильтрация портальной и внутривенной стромы нейтрофилами, лимфоцитами, макрофагами), биохимических (повышение активности ферментов АлАт, АсАт и ЛДГ, увеличение свободного билирубина, общего холестерина и триглицеридов) и иммунологических (повышение титра противопеченочных антител 1:640 и 1:1280) критериев.

Проблемы здравоохранения

В качестве объекта исследования были выбраны перитонеальные и альвеолярные макрофаги, которые получали с использованием общепринятых методик [4].

Для определения лизосомальной активности на стекло, содержащее монослой клеток, вносили 0,1 мл акридинового оранжевого (концентрация 2 мкг/мл), вызывающего избирательно красное окрашивание лизосом. После часовой инкубации при 37 °С клетки 2 раза отмывали раствором Хенкса. Затем стекло вынимали и смотрели влажный препарат в люминесцентном микроскопе. С целью выявления пероксидазы мазки фиксировали в течение 1 мин в формалиновом спирте, затем на мазки на 4 мин наносили инкубационную смесь следующего состава: 40 мг бензидина, 10 мл 40%-ного спирта и 0,02 мл 3%-ного раствора перекиси водорода. В местах локализации пероксидазы в клетках выявлялись гранулы желтовато-коричневого или темно-коричневого цвета. Активность кислой фосфатазы изучали с помощью реакции азосочетания. Приготовленные мазки фиксировали 30 с в холодном 60%-ном водном ацетоне, а затем помещали на 1 ч при 37 °С в инкубационную среду, содержащую 10 мг нафтол-AS-фосфата (растворенного в 1 мл диметилформамида), 50 мл 0,1 М ацетатного буфера и 50 мг прочного синего ВВ или RR. В результате в цитоплазме клеток появлялась краска синего или фиолетового цвета. При оценке лизосомальной и пероксидазной активности исследуемых фагоцитов макрофаги относили к одной из двух групп: 1) клетки, содержащие лизосомы (пероксидазу), т. е. акридиноранж-позитивные или пероксидазо-позитивные; 2) клетки, в которых лизосомы (пероксидаза) отсутствовали. Для количественного выражения результатов цитохимического исследования фермента кислой фосфатазы использовали средний цитохимический коэффициент (СЦК). Результаты обрабатывали статистически с использованием пакета прикладных компьютерных программ SPSS-10.0. Полученные данные представляли в виде средней арифметической и ее стандартной ошибки ($M \pm m$).

Результаты исследования. Общеизвестно, что неспецифическая резистентность организма человека во многом зависит от характера фагоцитар-

ных свойств мононуклеарных фагоцитов, тогда как эффективность фагоцитоза определяется прежде всего наличием в цитоплазме субклеточных структур – лизосом, содержащих целый комплекс гидролитических ферментов. Кроме того, согласно современным представлениям [6], лизосомам принадлежит центральное место в клеточном метаболизме.

В результате проведенного нами исследования было установлено, что в ходе постнатального онтогенеза у экспериментальных животных обеих групп происходят изменения численного состава клеток СМФ с различной степенью лизосомальной активности. Так, у крысят контрольной группы на 45-й день развития выявлено увеличение числа активных (т. е. содержащих лизосомы) перитонеальных и альвеолярных макрофагов соответственно в 1,10 и в 1,05 раза (по сравнению с 15-м днем). В подопытной группе на 45-й день количество макрофагов перитонеального экссудата возросло в 1,15, а легочных макрофагов – в 1,05 раза по сравнению с 15-м днем постнатального развития. В результате изучения влияния заболевания материнского организма на лизосомальную активность фагоцитов ее потомства было выявлено, что у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени на 15-й день произошло снижение числа активных перитонеальных макрофагов в 1,45 раза, а альвеолярных фагоцитов – в 1,41 раза по сравнению с контролем. На 45-й же день онтогенеза количество активных клеток перитонеального экссудата подопытных крысят снизилось в 1,38 раза, а легочных макрофагов – в 1,41 раза в отличие от контрольных величин соответствующего возраста (табл. 1).

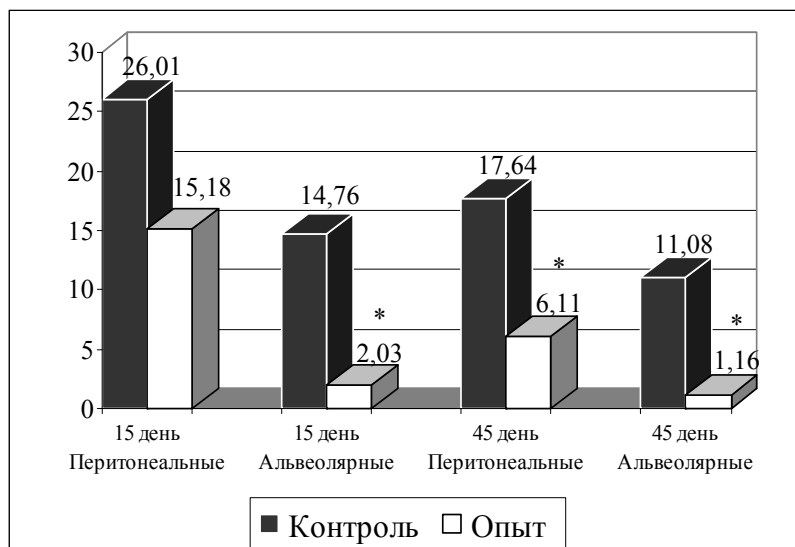
В настоящее время известно более 40 веществ, продуцируемых макрофагами, тогда как основными ферментами клеток СМФ, реализующими переваривание образующихся фагосом, являются пероксидаза и кислая фосфатаза. Пероксидаза является ферментом, который наряду с кислородными радикалами и перекисью водорода составляет эффекторное звено кислородзависимого аппарата бактерицидности фагоцитов [3]. Рядом авторов установлено, что различия в степени активности и локализации пероксидазы макрофагов коррелируют

Таблица 1

Характеристика лизосомальной активности макрофагов различных компарментов у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени ($M \pm m$)

Группа	Число акридиноранж-позитивных клеток			
	Перитонеальные макрофаги		Альвеолярные макрофаги	
	15-й день	45-й день	15-й день	45-й день
Контроль	75,30 ± 7,39 (n = 12)	83,2 ± 5,08 (n = 12)	82,5 ± 6,02 (n = 12)	86,6 ± 5,56 (n = 12)
Опыт	52,10 ± 3,03* (n = 10)	60,10 ± 4,20* (n = 10)	58,5 ± 11,16 (n = 10)	61,6 ± 4,43* (n = 10)

Примечание. Здесь, на рисунке и в табл. 2 * – результаты статистически достоверны по сравнению с контролем ($p < 0,05$).



Содержание пероксидазо-позитивных макрофагов у потомства экспериментальных животных

с их функциональным состоянием и завершенностью процесса фагоцитоза [5].

Исследование характера изменений распределения пероксидазы в цитоплазме перитонеальных макрофагов в ходе постнатального развития показало, что у крысят как контрольной, так и подопытной группы на 45-й день происходит снижение числа пероксидазо-позитивных макрофагов – соответственно в 1,47 и 2,48 раза по сравнению с 15-м днем. В результате исследования влияния экспериментального хронического поражения печени на содержание пероксидазы в перитонеальных фагоцитах было выявлено, что у потомства опытной группы на 15-й день постнатального онтогенеза происходит достоверное снижение числа пероксидазо-позитивных клеток в 1,71 раза по сравнению с контрольной группой. Аналогичная тенденция в изменении содержания исследуемого фермента в перитонеальных макрофагах наблюдается и на 45-й день развития. При этом в подопытной группе отмечено значительное достоверное снижение количества содержащих пероксидазу макрофагов в 2,89 раза в отличие от контрольных величин. Анализ возрастных изменений распределения пероксидазы в альвеолярных макрофагах выявил следующую закономерность: у контрольных крысят на 45-й день онтогенеза число пероксидазо-позитивных клеток снизилось незначительно – в 1,33 раза по сравнению с предыдущим этапом. Количество же легочных фагоцитов подопытной группы животных, содержащих гликоген, на 45-й день постнатального развития сократилось в 1,75 раза (по сравнению с 15-м днем). Изучение влияния патологии гепатобилиарной системы матери на характер распределения пероксидазы в альвеолярных макрофагах потомства показало, что как на 15-й, так и на 45-й день онтогенеза число пероксидазо-позитивных клеток у потомства опытных животных достоверно снизилось в 7,27 раза и

9,55 раза соответственно по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы животных (см. рисунок).

Кислая фосфатаза является маркерным лизосомальным гидролитическим ферментом, играющим важную роль в обеспечении защитных реакций организма.

В ходе исследования было установлено, что у крысят контрольной группы к 45-му дню в перитонеальных макрофагах выявлено увеличение СЦК в 1,09 раза, тогда как в опытной группе на 45-й день произошло снижение СЦК в 1,19 раза (по сравнению с предыдущим этапом). Анализ возрастных изменений содержания кислой фосфатазы в альвеолярных макрофагах выявил, что у контрольных крысят на 45-й день онтогенеза СЦК возрос в 1,22 раза по сравнению с 15-м днем. У опытных же животных СЦК на 45-й день увеличился незначительно – в 1,10 раза. У потомства матерей с экспериментальным поражением печени на всех сроках исследования произошло снижение СЦК перитонеальных макрофагов по сравнению с контролем. Так 15-й и 45-й день СЦК при выявлении кислой фосфатазы в перитонеальных фагоцитах у подопытных животных оказался достоверно ниже соответственно в 1,52 раза и 1,97 раза, чем в контроле. Аналогичная тенденция наблюдалась и при исследовании влияния патологии гепатобилиарной системы матери на содержание кислой фосфатазы в альвеолярных макрофагах потомства. Анализ данных показал, что как на 15-й, так и на 45-й день онтогенеза СЦК легочных фагоцитов у потомства опытных животных снизился в 1,58 и 1,75 раза соответственно по сравнению с аналогичными контрольными показателями (табл. 2).

Заключение. Таким образом, в ходе проведенного эксперимента было установлено, что экспериментальное поражение гепатобилиарной системы у самок крыс обуславливает отклонение по-

Интенсивность цитохимической реакции на кислую фосфатазу в клетках СМФ потомства самок крыс в различные сроки постнатального развития ($M \pm m$)

Группа	СЦК			
	Перитонеальные макрофаги		Альвеолярные макрофаги	
	15-й день	45-й день	15-й день	45-й день
Контроль	1,32 ± 0,13 (n = 12)	1,44 ± 0,15 (n = 12)	1,28 ± 0,31 (n = 12)	1,56 ± 0,13 (n = 12)
Опыт	0,87 ± 0,10* (n = 10)	0,73 ± 0,19* (n = 10)	0,81 ± 0,12 (n = 10)	0,89 ± 0,17* (n = 10)

казателей от нормы функционального состояния макрофагов у потомства. Так, клетки СМФ у подопытных животных подвергаются существенным качественным изменениям: в перитонеальных и альвеолярных макрофагах на разных этапах постнатального онтогенеза происходит снижение лизосомальной активности, угнетение пероксидазной активности, а также сокращение содержания кислой фосфатазы.

Одновременное снижение лизосомальной и пероксидазной активности, а также существенные сдвиги в активности основного маркера лизосом – кислой фосфатазы – наводят на мысль, что моделируемая патология печени, не оказывая непосредственного токсического действия на клеточную мембрану, вызывает все-таки дестабилизацию внутриклеточных мембранных структур и в первую очередь лизосомального аппарата. Общеизвестным является полифункциональность макрофагов, их активное участие в поддержании гомеостаза в организме, способность моментально включаться в развитие различных патологических процессов [2]. Именно поэтому нарушение лизосомальной активности макрофагов может привести к снижению восприимчивости организма к различным бактериальным и вирусным инфекциям и в целом привести к снижению неспецифической реактивности организма [1].

Литература

1. Барышева, С.В. Морфофункциональные особенности перитонеальных макрофагов у животных с экспериментальным гепатитом / С.В. Барышева, Г.В. Брюхин // *Вестн. Челяб. гос. ун-та.*

Серия «Биология». – 2008. – Вып. 1. – № 4. – С. 60–64.

2. Бахшиян, М.З. Изменения структуры и функции макрофагов селезенки в условиях злокачественного роста / М.З. Бахшиян, А.В. Азнаурян // *Морфология. – 2004. – № 5. – С. 45–48.*

3. 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.

4. Иммунологические, цитохимические и биохимические методы исследования фагоцитирующих клеток: метод. рекомендации / под ред. Э.А. Имельбаевой. – Уфа: БГМИ, 1996. – 85 с.

5. Маслов, К.А. Бактерицидный эффект и активность миелопероксидазы макрофагов при персистировании микобактерий туберкулеза и лепры / К.А. Маслов // *Вестник новых медицинских технологий. – 1999. – № 1. – С. 76–79.*

6. Роль лизосомальных ферментов в генезе ведущих клиничко-патологических синдромов: факты и гипотезы / А.В. Ефремов, Л.А. Руюткина, О.В. Цыганкова, З.Г. Бондарева // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2007. – № 1. – С. 18–21.*

7. Цыганкова, О.В. Лизосомальные ферменты. Новый взгляд на фундаментальные материи с позиций кардиолога / О.В. Цыганкова, Л.А. Руюткина, З.Г. Бондарева // *Цитокины и воспаление. – 2009. – № 4. – С. 11–17.*

8. Шпак, С.И. Альвеолярные макрофаги при воздействии ксенобиотиков / С.И. Шпак, Ю.И. Шрамко // *Морфология. – 2000. – № 6. – С. 66–68.*

Поступила в редакцию 15 июня 2012 г.