

# ОЦЕНКА ФАГОЦИТАРНЫХ И БАКТЕРИЦИДНЫХ СВОЙСТВ МОНОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПОТОМСТВА ЖИВОТНЫХ С ПАТОЛОГИЕЙ ГЕПАТОБИЛИАРНОЙ СИСТЕМЫ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Г.В. Брюхин, Е.Ю. Шаврина

Челябинская государственная медицинская академия, г. Челябинск

Проведено исследование влияния экспериментального поражения печени матери различного генеза на функциональную активность моноцитов крови потомства на разных этапах постнатального развития. Установлено угнетение исследуемых показателей у крысят опытных групп, что выражается в снижении фагоцитарной активности и подавлении бактерицидных свойств изучаемых клеток. Результаты исследования позволяют сделать вывод о том, что потомство от самок крыс с экспериментальной патологией гепатобилиарной системы имеет нарушенный «старт» защитных реакций, что негативно влияет на формирование неспецифической резистентности организма плода.

*Ключевые слова:* патология печени, потомство, моноциты, фагоцитоз, киллинг.

**Введение.** Фагоциты формируют первую линию защиты, так как в их задачу входит быстрое реагирование на повреждающий фактор и его уничтожение [8]. Именно макрофагам принадлежит одна из ключевых ролей в создании защиты организма от бактериальной инвазии. Реализация этой функции осуществляется как за счет прямого механизма воздействия, так и с помощью непрямого механизма, а именно процессинга и представления антигенных детерминант Т-клеткам [16].

Фагоциты являются одними из главных клеток врожденного иммунитета. В основе защитной функции клеток системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ) лежит прямой механизм воздействия, а именно, фагоцитарный процесс, заключающийся в их способности распознавать, поглощать, убивать и переваривать микробные клетки. Внутриклеточная бактерицидность (киллинг) фагоцитов, то есть способность быстро и эффективно умерщвлять захваченные микроорганизмы, – неременный этап, предшествующий их деградации. Нет киллинга, нет и деградации микроорганизмов [2].

В то же время в последние годы в силу распространенности заболеваний гепатобилиарной системы, в том числе у женщин фертильного возраста, хронические гепатиты являются одной из основных проблем нашего времени, так как гепатиты представляют одну из важнейших проблем здравоохранения как в нашей стране в целом, так и в нашем регионе [7]. Рядом исследований показано, что дети от матерей с хроническим поражением гепатобилиарной системы предрасположены к различным заболеваниям [6, 14].

В связи с этим, целью настоящего исследования явился анализ особенностей фагоцитарной и бактерицидной активности моноцитов периферической крови, во многом определяющих неспе-

цифическую резистентность у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различной этиологии на разных этапах постнатального развития.

**Материалы и методы исследования.** В эксперименте были использованы белые половозрелые лабораторные крысы (самки) «Вистар» и их потомство на 15, 45 и 60-й дни постнатального онтогенеза. Выбранные сроки исследования согласуются с общепризнанным подразделением возрастных периодов для данной группы животных: подсосный период (с 6 по 21 день), период становления половой зрелости (с 22 по 50 день), период половой зрелости (с 60-го дня) [3].

Экспериментальные животные были разбиты на 3 группы. В первую группу выделено потомство от интактных матерей – контрольная группа (К – 25 животных). Вторую группу составили крысята от самок с хроническим аутоиммунным поражением печени с помощью фильтра Е.coli – опытная группа № 1 (О1 – 18 животных), третью – животные от матерей с экспериментальным токсическим D-галактозаминовым поражением печени – опытная группа № 2 (О2 – 20 животных).

Методика получения экспериментального гепатита с помощью Е.coli заключалась в двукратном введении супернатанта 6-дневной культуры Е.coli (штамм АТСС 25922) под эфирным наркозом лабораторным животным (половозрелым самкам крыс). Сенсибилизирующую инъекцию в объеме 0,2 мл фильтра шестидневной культуры Е.coli (в разведении физиологическим раствором 1:4) производили в три участка печени. Через сутки экспериментальным животным в хвостовую вену производилась разрешающая инъекция данного фильтра в объеме 0,3 мл на 1 кг массы тела.

D-галактозаминовую модель патологии печени

создавали путем однократного внутривенного введения под эфирным наркозом взрослым половозрелым самкам крыс гепатотропного яда D(+) – галактозамина гидрохлорида («Sigma – G500», США) на 0,9 %-ном растворе натрия хлорида в дозе 250 мг/кг массы тела животного.

О формировании экспериментального поражения печени судили на основании морфологических и биохимических изменений.

Объектом исследования явились моноциты периферической крови, которые выделяли из периферической крови по общепринятой методике [3]. Исследования проводили в монослое клеток.

Для достижения поставленной цели нами использовались морфологические, иммунологические и статистические методы исследования.

Для оценки функционального статуса моноцитов крови мы использовали определение фагоцитарной функции и исследование бактерицидных эффектов.

В качестве объекта фагоцитоза использовали инертные полистероловые сферы латекса (с диаметром частиц 1,2 мкм), который в концентрации  $10^8$  частиц/1 мл (0,2 мл взвеси) добавляли на предметные стекла к монослою клеток. Дальнейшее культивирование проводили в термостате при 37 °С в течение 1 часа. Затем препарат промывали забуференным физиологическим раствором и фиксировали метанолом. После чего фагоциты окрашивали азур-2-эозином по Романовскому – Гимзе.

При определении фагоцитоза микроорганизмов клетками СМФ в качестве тестовой культуры использовали живую суточную культуру клинического штамма *St. aureus* (штамм АТСС 25923). Поглощательную и бактерицидную функцию моноцитов периферической крови изучали с помощью общепринятого метода, основанного на прижизненном флюорохромировании акридиновым оранжевым. С этой целью 0,1 мл микробных клеток (суточной культуры, разведенной физиологическим раствором до концентрации 7 % и содержащей  $2 \cdot 10^8$  микроорганизмов/1 мл) добавляли к монослою моноцитов и инкубировали во влажной камере при 37 °С в течение 1 часа. Затем монослой прилипших клеток СМФ ополаскивали физиологическим раствором и заливали на 1 минуту 0,0015 %-ным раствором акридинового оранжевого. Далее препарат промывали физ. раствором, покрывали покровным стеклом и просматривали с помощью люминесцентного микроскопа под нефлюоресцирующей масляной иммерсией. При этом ядра фагоцитов, а также живые микроорганизмы внутри моноцитов окрашивались в зеленый цвет, ядра погибших фагоцитов и убитые микроорганизмы красились в красный цвет.

Для оценки фагоцитарной и бактерицидной способности моноцитов периферической крови подсчитывали фагоцитарный показатель (ФП), фагоцитарный индекс (ФИ) и киллинг.

Полученные результаты были обработаны 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 исследований и их обсуждение.** Общеизвестно, что фагоцитоз является одним из главных механизмов естественной резистентности и ранним этапом специфического иммунного ответа [1, 15]. Актуальность исследований процесса фагоцитоза и факторов, стимулирующих его завершенность, связана еще с широким распространением в последнее время микроорганизмов, устойчивых к бактерицидным факторам фагоцитирующих клеток [11].

Моноциты периферической крови являются центром системы фагоцитоза, что свидетельствует о том, что одним из их самых ярких функциональных признаков является способность к поглощению и уничтожению чужеродного материала, конечным вариантом чего является разрушение патогена или дефектных структур и их элиминация. Основные механизмы разрушения при гуморальном и клеточном вариантах иммунного ответа связаны с фагоцитозом [2].

В результате проведенного нами исследования было установлено, что в ходе постнатального онтогенеза у животных всех экспериментальных групп происходят изменения фагоцитарного показателя. Так, при исследовании фагоцитарной активности моноцитов периферической крови с применением полистерольных частиц латекса было выявлено незначительное увеличение числа активно фагоцитирующих клеток у крысят как контрольной, так и обеих подопытных групп на 45-й день развития, по сравнению с 15-дневными крысятами соответственно в 1,06; 1,22 и 1,17 раза. На 60-е же сутки ФП моноцитов увеличивается как в контроле, так и в первом опыте соответственно в 1,04; 1,07 раза, тогда как во втором опыте данный показатель к 60-му дню незначительно, но все же сокращается (по сравнению с 45-м днем онтогенеза) (табл. 1).

В результате исследования влияния экспериментального хронического поражения печени матери различной этиологии на фагоцитарную активность моноцитов периферической крови потомства было выявлено, что у крысят от самок первой опытной группы на 15, 45 и 60-й день постнатального развития количество активно фагоцитирующих макрофагов, по сравнению с контролем достоверно снижено в 1,79; 1,55 и 1,50 раза соответственно. Еще более существенное угнетение ФП по сравнению с контрольными величинами соответствующего возраста замечено у крысят второй подопытной группы: в 2,09; 1,89 и 1,97 раза.

Анализ фагоцитарного индекса моноцитов крови показал возрастание данного показателя у 45-дневных крысят контрольной (в 1,20 раза) и первой опытной группы (в 1,42 раза) по сравнению с аналогичными показателями 15-дневных животных соответствующих групп. В то же время во второй опытной группе ФИ на 45-й день разви-

Таблица 1

Фагоцитоз микросфер полистерольного латекса моноцитами периферической крови у потомства самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени различной этиологии (M ± m)

Группа Возраст	ФП моноцитов крови			ФИ моноцитов крови		
	15 сутки	45 сутки	60 сутки	15 сутки	45 сутки	60 сутки
Контроль	89,73 ± 6,07	94,85 ± 9,03	98,17 ± 3,97	23,04 ± 1,61	27,68 ± 1,15	35,11 ± 1,85
Опыт 1	50,15 ± 7,12*	61,28 ± 4,15*	65,66 ± 7,14*	5,13 ± 0,82*	7,29 ± 0,49*	10,05 ± 1,17*
Опыт 2	42,94 ± 8,51*	50,14 ± 6,26*	49,93 ± 2,08*	2,95 ± 0,13	2,76 ± 0,17*	3,98 ± 0,06*

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

Таблица 2

Фагоцитоз суточной культуры *St. aureus* моноцитами периферической крови у потомства самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени различной этиологии (M ± m)

Группа Возраст	ФП моноцитов крови			ФИ моноцитов крови		
	15 сутки	45 сутки	60 сутки	15 сутки	45 сутки	60 сутки
Контроль	85,96 ± 4,96	89,16 ± 9,19	92,08 ± 10,97	3,90 ± 0,67	5,15 ± 0,94	6,07 ± 1,02
Опыт 1	66,33 ± 5,15*	62,09 ± 8,76*	73,12 ± 6,92*	2,06 ± 0,42	2,97 ± 0,37*	3,19 ± 0,44*
Опыт 2	69,84 ± 7,91*	76,15 ± 11,04*	81,87 ± 5,06*	3,02 ± 0,18*	3,94 ± 0,25*	4,08 ± 0,86*

тия снизился по сравнению с 15-м днем в 1,07 раза. К 60-му дню онтогенеза в сравнении с 45-м отмечена тенденция к увеличению ФИ моноцитов у крысят всех исследуемых групп: в 1,27; 1,38 и 1,44 раза соответственно.

Также в ходе исследования было установлено значительное снижение ФИ моноцитов у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени как на 15-й день, так на 45-й и 60-й день постнатального развития по сравнению с контролем. Так на 15-е сутки ФИ моноцитов крови первой и второй опытной групп ниже контрольных величин соответственно в 4,49 и 7,81 раза. На 45-й день исследуемый показатель в подопытных группах снижен в 3,80 и 10,03 раза. На 60-е же сутки ФИ моноцитов первой и второй опытной групп сократился по сравнению с контролем соответствующего возраста в 3,49 и 8,82 раза.

Исследование фагоцитарной активности (ФП) моноцитов периферической крови (с использованием суточной культуры *St. aureus*) выявило увеличение числа активно фагоцитирующих клеток у крысят как контрольной, так и второй опытной группы на 45-й день развития по сравнению с 15-м соответственно в 1,04 и 1,09 раза. В первой же подопытной группе ФП к 45-м суткам снизился в 1,07 раза. На 60-й день онтогенеза количество активно фагоцитирующих моноцитов увеличивается как в контроле, так и в опыте по сравнению с 45-дневным сроком в 1,03; 1,18 и 1,08 раза соответственно (табл. 2).

Исследование влияния хронического поражения гепатобилиарной системы на фагоцитарную активность моноцитов выявило, что у потомства самок крыс с экспериментальной патологией печени с помощью супернатанта *E.coli* и D-галактозаминным поражением печени на 15-й день постнатального развития количество активно фагоцитирующих макрофагов по сравнению с контролем достоверно снижается в 1,30 и 1,23 раза соответ-

венно. На 45-е сутки в опытных группах количество активных макрофагов снизилось в 1,44 и 1,17 раза по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы. На 60-й же день ФП моноцитов крови обеих подопытных групп достоверно снизился по сравнению с контролем в 1,26 и 1,12 раза соответственно.

Анализ фагоцитарного индекса моноцитов периферической крови с применением суточной бактериальной культуры *St. aureus* показал увеличение данного показателя у 45-дневных крысят как контрольной (в 1,32 раза), так первой опытной (в 1,44 раза) и второй опытной групп (в 1,30 раза) по сравнению с аналогичными показателями 15-дневных животных. У 60-дневных крысят контрольной группы происходит увеличение ФИ в 1,18 раза, у первых опытных крысят – в 1,07 раза, а у вторых опытных крысят – в 1,04 раза по сравнению с аналогичными показателями 45-дневных животных.

При этом в ходе исследования установлено снижение ФИ моноцитов у потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени различного генеза на всех сроках постнатального развития по сравнению с контролем. Наиболее выраженное снижение, в 1,90 раза, отмечено у крысят первой опытной группы на 60-й день онтогенеза. На 15-е и 45-е сутки у крысят от самок крыс с поражением печени с помощью *E.coli* выявлено снижение ФИ в 1,89 и 1,73 раза по сравнению с контрольными животными соответствующего возраста. На 15-й день развития у крысят второй опытной группы наблюдается достоверное снижение ФИ в 1,29 раза по сравнению с контролем. В то же время на 45-е и 60-е сутки ФИ моноцитов животных от самок с D-галактозаминным поражением гепатобилиарной системы достоверно снижен соответственно в 1,31 и 1,49 раза по сравнению со значениями контрольной группы животных соответствующего возраста.

Важной характеристикой функционирования макрофагов является их киллинговая активность [9, 11, 12]. По разным данным киллинг может осуществляться сериновыми протеазами, возникающими под влиянием лизосомальных гидролаз СЗасубкомпонентом комплемента, катионным белком или индукцией макрофагами в мишенях аберрантного деления, приводящего к их лизису.

Итак, в результате исследования было установлено, что с возрастом происходит увеличение киллинговой активности моноцитов периферической крови у животных практически всех экспериментальных групп. Так, у крысят контрольной группы показатель киллинговой активности моноцитов с возрастом незначительно возрастает соответственно в 1,12 и 1,06 раза (относительно предыдущего этапа развития).

В то же время в обеих подопытных группах на 45-е сутки киллинг *St. aureus* исследуемыми клетками снизился по сравнению с 15-м днем онтогенеза в 1,12 и 1,23 раза соответственно. При этом уже к 60-му дню внутриклеточный киллинг в первой и второй опытной группах незначительно увеличился в 1,05 и 1,16 раза по сравнению с 45-сутками (см. рисунок).

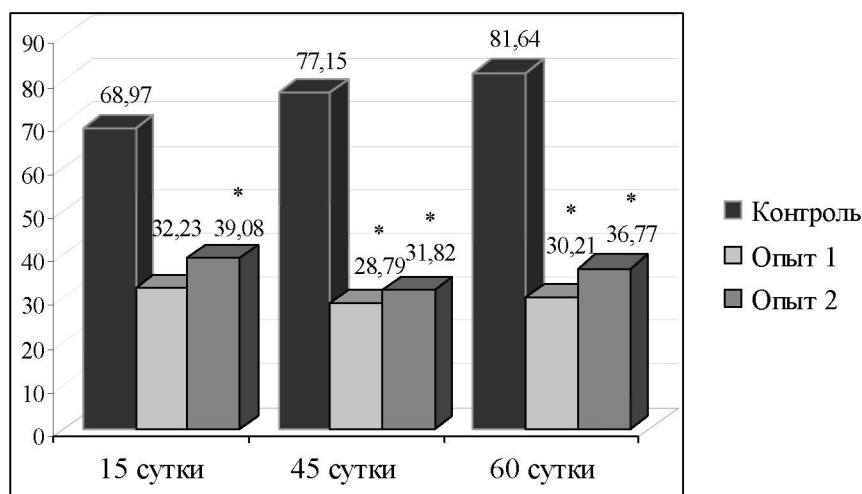
Несмотря на это, в обеих опытных группах у крысят самок с хроническим поражением печени наблюдается снижение киллинговой активности по сравнению с контролем. Так, киллинговая активность моноцитов периферической крови крысят первой опытной группы оказалась ниже контрольных величин в 2,14 раза у 15-дневных животных; в 2,68 раза – у 45-дневных крысят и в 2,70 раза – у 60-дневных. Аналогичная тенденция наблюдается с динамикой киллинговой активности моноцитов крови второй опытной группы. При этом наиболее выраженное достоверное снижение произошло у потомства самок крыс с хроническим D-галактозаминным поражением печени на 45-й день развития в 2,42 раза по сравнению с контро-

лем. У 15- и 60-дневных крысят второй опытной группы киллинг также достоверно снизился по сравнению с контролем, но в меньшей степени – в 1,76 и 2,22 раза соответственно.

**Закключение.** Общеизвестно, что хронический процесс в печени свидетельствует о несостоятельности системы неспецифической защиты. Депрессия лейкоцитарного звена вызывает развитие инфекционно-воспалительного процесса, общую интоксикацию организма, утяжеление и хронизацию патологии печени [10]. Кроме того, функциональные свойства клеток моноцитарного происхождения настолько многообразны, что их неполноценность, как следствие или причина патологического процесса, со временем неизбежно формирует системное поражение организма [13]. Из этого следует, что дефекты функции фагоцитов могут существенно ухудшить эффективность и адекватность любого из вариантов иммунного ответа.

Именно фагоцитоз характеризует одну из основных функций клеток системы мононуклеарных фагоцитов – способность поглощать и переваривать чужеродные соединения [3].

В ходе проведенного нами исследования с возрастом отмечена тенденция к повышению функциональной активности и бактерицидных эффектов моноцитов периферической крови практически всех экспериментальных групп. Несмотря на это, детальное микроскопирование фагоцитирующих моноцитов позволило установить угнетение всех исследуемых показателей у крысят обеих опытных групп, что выражается в снижении фагоцитарной активности (а именно, в снижении фагоцитарного показателя и фагоцитарного индекса как при использовании инертных частиц полистеролового латекса, так и с применением суточной бактериальной культурой *St. aureus*) по сравнению с контрольными величинами соответствующего возраста. Наряду с этим, нами установлено, что экспериментальная патология печени матери



**Бактерицидная активность (внутриклеточный киллинг *St. aureus*) моноцитов периферической крови потомства матерей с экспериментальной патологией гепатобилиарной системы различного генеза (M ± m): \* – результаты статистически достоверны по сравнению с контролем (p < 0,05)**

подавляет бактерицидную способность (киллинговую активность) моноцитов периферической крови потомства.

Кроме того, нами были выявлены различия в величине исследуемых показателей обеих опытных групп. Так, у потомства матерей с экспериментальным хроническим поражением печени, вызванным введением супернатанта шестидневной культуры *E.coli*, фагоцитарная активность в отношении *St. aureus* и киллинговые эффекты значительно ниже по сравнению с аналогичными показателями моноцитов, полученных от потомства матерей с D-галактозаминным поражением печени. В то же время фагоцитарная активность (ФП и ФИ) в отношении инертных частиц полистеролового латекса наоборот выше в моноцитах от крысят первой опытной группы по сравнению со второй.

Так как процесс фагоцитоза является одним из важнейших защитных механизмов макроорганизма против различных патогенных бактерий и от степени его завершенности зависит исход воспалительного процесса [4], то полученные нами в ходе эксперимента данные могут свидетельствовать о том, что потомство от самок крыс с экспериментальной патологией гепатобилиарной системы (обеих подопытных групп) имеет нарушенный «старт» защитных реакций, что негативно влияет на формирование неспецифической резистентности организма плода. Более того, так как клетки СМФ составляют первую линию защиты организма от попадающих инфекционных агентов, то патология в данном звене иммунитета может негативно сказаться на поддержании гомеостаза всего организма, что в дальнейшем может привести к развитию инфекционно-воспалительного процесса, общей интоксикации организма, утяжелению и хронизации различных болезненных состояний.

В то же время сравнительный анализ полученных результатов позволяет сделать заключение о том, что наиболее выраженные изменения функциональной активности моноцитов периферической крови выявлены у потомства самок крыс с хроническим поражением гепатобилиарной системы, обусловленным введением *E.coli*, что может быть связано с аутоиммунным компонентом, наиболее негативно действующим на иммунную систему плода в целом и на клетки СМФ в частности.

### Литература

1. Барышева, С.В. Морфофункциональные особенности перитонеальных макрофагов у животных с экспериментальным гепатитом / С.В. Барышева, Г.В. Брюхин // *Вестн. Челябин. гос. ун-та. Серия «Биология»*. – 2008. – Вып. 1, № 4. – С. 60–64.
2. 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.

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

4. Кузник, Б.И. Иммуногенез, гемостаз и неспецифическая резистентность организма / Б.И. Кузник, Н.В. Васильев, Н.Н. Цыбиков. – М.: Медицина, 1989. – 280 с.

5. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария и др. – 3-е изд., перераб. и доп. – Киев: Вища школа, 1983. – 383 с.

6. Медведь, В.И. Введение в клинику экстрагенитальной патологии беременных / В.И. Медведь. – 2-е изд., испр. – Киев: Гидромакс, 2007. – 168 с.

7. Некоторые вопросы распространения и профилактики вирусных гепатитов В и С в современных условиях / О.В. Мартова, Р.Р. Ахмерова, Г.К. Курятникова и др. // *Фундаментальные исследования*. – 2004. – №1. – С. 69.

8. Олиферук, Н.С. Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности нейтрофилов, макрофагов и незрелых дендритных клеток / Н.С. Олиферук, А.Н. Ильинская, Б.В. Пинегин // *Иммунология*. – 2005. – № 1. – С. 10–12.

9. Парахонский, А.П. Ферментативная активность нейтрофильных лейкоцитов при хронических заболеваниях печени / А.П. Парахонский // *Фундамент. исследования*. – 2005. – № 5. – С. 79–80.

10. Рудик, Д.В. Влияние низкоинтенсивного лазерного излучения на активность процесса фагоцитоза / Д.В. Рудик, Е.И. Тихомирова, И.О. Бугаева // *Международ. информ. система по резонансным технологиям*. – 2002. – № 27. – <http://ikar.udm.ru/mis-rt.htm>

11. Оценка функционально-метаболического статуса фагоцитирующих клеток под действием низкоинтенсивного лазерного излучения ИК-диапазона (850 нм) / Д.В. Рудик, Е.С. Тучина, Е.И. Тихомирова и др. // *Фундаментальные исследования*. – 2006. – № 5. – С. 100–101.

12. Тихомирова, Е.И. Участие лектина *Raenibacillus Polytuxa* в процессах киллинга бактерий в макрофагах / Е.И. Тихомирова, Л.В. Карпунина, О.В. Абросимова // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. – 2008. – № 6. – С. 82–84.

13. Тоголян, А.А. Клетки иммунной системы / А.А. Тоголян, И.С. Фрейдлин. – СПб.: Наука, 2000. – 231 с.

14. Шехтман, М.М. Руководство по экстрагенитальной патологии у беременных / М.М. Шехтман. – 5-е изд. – М.: Триада-Х, 2011. – 896 с.

15. Ярилин, А.А. Основы иммунологии / А.А. Ярилин. – М.: Медицина, 1999. – 608 с.

16. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens / G. Nau, J. Richmond, A. Schbesinger et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol. 99, № 3. – P. 1503–1508.

Поступила в редакцию 24 августа 2011 г.