

Г.В. Брюхин, А.В. Шопова

Оценка фагоцитарной и киллинговой активности моноцитов периферической крови у потомства самок крыс с экспериментальной лекарственно-индуцированной патологией печени

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет», 454092, Челябинск, ул. Воровского, 64

В данной работе была изучена функциональная активность моноцитов периферической крови у потомства самок крыс с парацетамоловым поражением печени. При этом были исследованы фагоцитарные свойства данных клеток и их бактерицидная активность. В результате проведенного исследования установлено, что лекарственно-индуцированное поражение печени матери обуславливает угнетение функциональной активности моноцитов периферической крови у потомства.

Ключевые слова: поражение печени, потомство, моноциты периферической крови, фагоцитоз, киллинговая активность

G.V. Brukhin, A.V. Shopova

Evaluation of the phagocytic activity and the killing of peripheral blood monocytes in the offspring of female rats with an experimental drug induced liver pathology

South-Ural State Medical University, 64, Vorovsky str., Chelyabinsk, 454092, Russia

In this study, the functional activity of monocytes of peripheral blood in the offspring of female rats with paracetamol liver disease was investigated. Phagocytic property of these cells and their bactericidal activity was investigated. It is established, that the drug induced liver disease leads to reducing of functional activity of peripheral blood monocytes.

Key words: liver defeat, offspring, monocytes of peripheral blood, phagocytosis, killing activity

Экспериментальными и клиническими исследованиями доказана роль хронической патологии печени матери в становлении у потомства важнейших систем жизнеобеспечения, в частности кроветворной и иммунной систем [1-4].

В этом плане представляют интерес лекарственные поражения печени [5, 6], являющейся биологическим фильтром на пути поступления экзогенных веществ в системный кровоток.

Цель исследования — анализ влияния экспериментальной лекарственно-индуцированной патологии гепатобилиарной системы матери на функциональную активность моноцитов периферической крови потомства.

Методика

У взрослых половозрелых крыс-самок Вистар моделировали лекарственное поражение печени введением парацетамола УБФ (ОАО «Уралбиофарм», Россия) в течение 2 сут. в дозе 2,5 г на 1 кг массы тела.

Препарат вводили интрагастрально [7]. Печень экспериментальных животных исследовали стандартными гистологическими методами использовали окраску препаратов гематоксилином и эозином и пикрофуксин по Ван-Гизону. Поражение печени верифицировали с помощью морфологических (центролобулярные некрозы печеночных долек, периваскулярная гиперплазия и гипертрофия купферовских клеток, расширение синусоидных капилляров, лимфогистиоцитарная инфильтрация портальных трактов, увеличение количества двуядерных и полиплоидных гепатоцитов), биохимических (повышение активности ферментов АлАТ, АсАТ, ЛДГ, повышение свободного билирубина) и иммунологических (повышение титра противопеченочных антител 1:280, 1:560) крите-

Для корреспонденции: Шопова Анастасия Валерьевна, аспирант каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: viktoriya_malinina@mail.ru

риев. При этом печеночные пробы оказались существенно измененными при лекарственном поражении печени. Так, если уровень аланиновой трансминазы (АлАТ) у интактных самок составлял 33,9 МЕ/л, то у самок с лекарственным гепатитом — 193,8 МЕ/л; уровень аспарагиновой трансминазы (АсАТ) — 74,3 МЕ/л и 116,2 МЕ/л соответственно; и, наконец, общий билирубин составлял 1,7 мкм/л в контроле и 6 мкм/л в опыте.

Исследования проводили с учетом суточных и сезонных колебаний. Животных содержали в стандартных условиях вивария с одинаковым пищевым рационом. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием лабораторных животных», утвержденными приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77. Экспериментальные животные были разделены на 2 группы: первую группу составили интактные — «контроль» (К), вторую — крысы с лекарственным поражением печени — «опытная группа» (О). Непосредственным объектом исследования явилось потомство экспериментальных животных на 1-е, 30-е и 60-е сут. постнатального развития: всего 60 крысят мужского пола из 31 помета. Фагоцитарную активность моноцитов оценивали с помощью метода, основанного на свойстве поглощать ими чужеродные агенты. В качестве объекта фагоцитоза использовалась живая суточная культура *S. aureus* и инертные полистероловые сферы латекса диаметром частиц 1,2 мкм. Моноциты периферической крови получали по общепринятой методике [8]. Определяли общее количество клеточных элементов, фагоцитарный показатель — (процентное содержание фагоцитирующих клеток ФП), фагоцитарный индекс (количество частиц латекса или стафилококка в 100 моноцитах в пересчете на 1 клетку ФИ) и бактерицидная активность клеточных элементов — процентное отношение убитых микроорганизмов по отношению ко всем захваченным.

Полученные цифровые данные обрабатывали на компьютере с использованием программы Statistica 17.0 (Statsoft, Inc.). Учитывая небольшую выборку животных, значимость полученных результатов оценивали при помощи непараметрического метода — критерия Манна—Уитни.

Результаты и обсуждение

Установлено, что с возрастом происходит постепенное увеличение числа моноцитов периферической крови у крысят, как в опытной, так и в контрольной группе. С максимумом на 60-е сут. исследования — срок соответствующий периоду половой зрелости (таблица). Обращает на себя внимание, что на всех сроках исследования у подопытных крысят число моноцитов в 1 мл³ существенно снижено по сравнению с контролем.

В следующей серии исследований проанализировали функциональную активность моноцитов периферической крови (рис. 1, 2). Установлено, что на всех сроках исследования поглотительная способность моноцитов периферической крови у подопытных крысят снижена по сравнению с группой контроля (рис. 1), о чем свидетельствуют более низкие величины фагоцитарного показателя. С этими результатами тесно согласуются данные, полученные при анализе фагоцитарного индекса. Так, установлено, что у интактных крысят фагоцитарный индекс моноцитов периферической крови в период новорожденности составил $10,94 \pm 1,12$ и на 30-е сут. постнатального онтогенеза $10,95 \pm 0,34$. При этом наибольшей величины фагоцитарный индекс моноцитов у интактных крысят отмечен на 60-е сут. ($11,44 \pm 1,2$). Аналогичная закономерность выявлена и у подопытных животных. При этом фагоцитарный индекс моноцитов периферической крови у них составил $4,26 \pm 0,77$, $5,78 \pm 1,21$ и $6,41 \pm 0,79$ соответственно на 1-е, 30-е и 60-е сут. постнатального онтогенеза. Обращает на себя внимание тот факт, что на всех сроках исследования данный показатель у подопытных животных оказался сниженным по сравнению с контролем.

Оценка фагоцитарной активности моноцитов периферической крови экспериментальных животных с использованием суточной культуры *S. aureus* позволила выявить аналогичную закономерность (рис. 2). Как видно из рис. 2, у подопытных крысят фагоцитарный показатель, отражающий число активных фагоцитов среди моноцитов периферической крови, существенно снижен по сравнению с группой контроля. При этом оказался сниженным и фагоцитарный индекс. Так, если у интактных животных исследуемый показатель составил $3,16 \pm 0,31$, $4,17 \pm 0,33$ и $4,84 \pm 0,21$ на 1-е, 30-е и 60-е сут., то у подопытных крысят фагоцитарный индекс составил соответственно $2,08 \pm 0,43$, $3,29 \pm 0,16$ и $3,57 \pm 0,19$.

Таблица

Количественный состав моноцитов периферической крови у потомства самок крыс с парацетамоловым поражением печени в различные периоды постнатального онтогенеза ($\times 10^5$ в 1 мл)

Группа	Сутки		
	1-е	30-е	60-е
К	$2,74 \pm 0,21$	$3,91 \pm 0,26$	$6,97 \pm 0,18$
О	$1,15 \pm 0,13^*$	$2,86 \pm 0,08^*$	$3,96 \pm 0,95^*$

Примечание. * — результат статистически значим по сравнению с контролем ($p < 0,05$)

Еще одной важной характеристикой фагоцитоза бактериальных агентов является способность к их уничтожению — киллингу. Киллинговая активность является показателем завершенности фагоцитоза, определяет резервные возможности клетки и осуществляется различными механизмами [9, 10].

В результате исследования внутриклеточной бактерицидной активности моноцитов периферической крови было установлено, что с возрастом происходит увеличение киллинговой активности в обеих группах исследования. Прежде всего нами установлено, что у интактных животных киллинговая активность моноцитов периферической крови постепенно увеличивается, достигая максимального значения к 60-м сут. постнатального периода. У подопытных животных после рождения также отмечается увеличение киллинговой активности моноцитов периферической крови, достигающей максимального

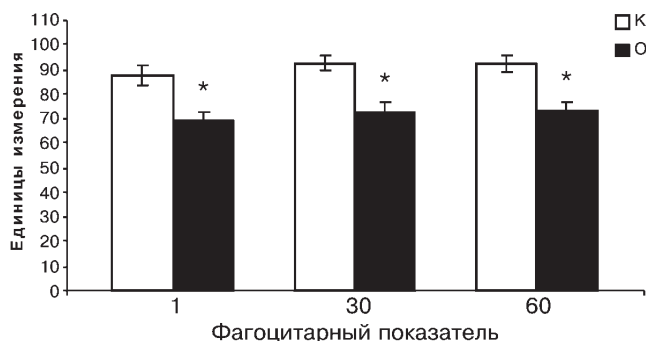


Рис. 1. Фагоцитоз микросфер полистерольного латекса моноцитами периферической крови у потомства самок крыс с парацетамоловым поражением печени в различные периоды постнатального развития: * результат статистически значим по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

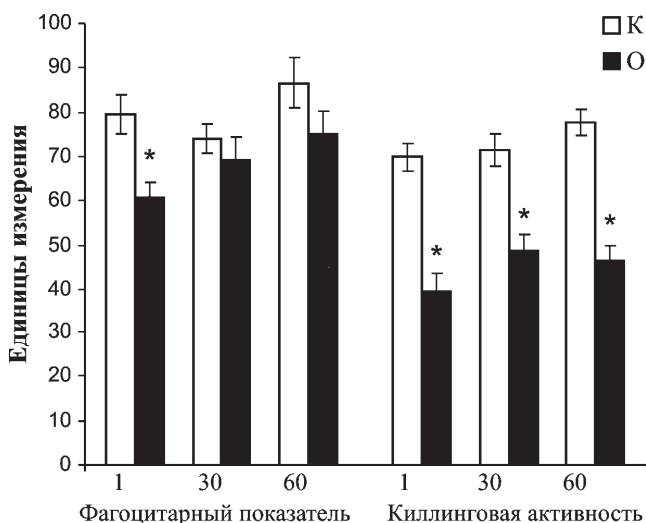


Рис. 2. Фагоцитоз суточной культуры *S. aureus* моноцитами периферической крови у потомства самок крыс с парацетамоловым поражением печени в различные периоды постнатального развития: * результат статистически значим по сравнению с контролем ($p < 0,05$).

значения на 30-е сут. постнатального периода. При этом на всех сроках исследования данный показатель у подопытных животных оказался существенно сниженным по сравнению с группой контроля.

Общеизвестно, что клеточные элементы крови первыми реагируют на изменения метаболических процессов организма, при различных патологических процессах, в том числе при патологии гепатобилиарной системы. При этом ведущая роль в механизмах развития и хронизации заболеваний печени отводится факторам естественной резистентности, среди которых доминирующее значение принадлежит фагоцитам. Функциональные свойства клеток моноцитарного происхождения настолько многообразны, что их неполноценность как следствие или причина патологического процесса со временем неизбежно формирует системное поражение организма [11]. Это позволяет сделать вывод о том, что любые нарушения функционального статуса фагоцитов крови могут снижать эффективность иммунного ответа и нарушать неспецифическую резистентность организма.

Проведенное исследование выявило закономерную тенденцию: с возрастом происходит усиление фагоцитарных свойств и внутриклеточной бактерицидности моноцитов периферической крови у животных обеих исследуемых групп. Эти данные согласуются с изменением показателей количественного состава исследуемой группы клеток. Однако, несмотря на это, у подопытных животных отмечается снижение фагоцитарных и бактерицидных свойств мононуклеаров крови по сравнению с контрольными животными. Данное обстоятельство можно объяснить тем, что при моделировании хронического гепатита у самок крыс происходит системное нарушение процессов жизнеобеспечения, что проявляется, в том числе, угнетением костномозгового кроветворения [12], что проявляется нарушением дифференцировки и созревания клеток-предшественников, в частности, моноцитарного пула, проявляющееся качественными и количественными нарушениями. Угнетение миелоидного роста в костном мозге, как следствие, приводит к нарушению метаболической активности моноцитов периферической крови, снижению их защитных механизмов, таких, как фагоцитоз и внутриклеточный киллинг [13]. Все вышесказанное позволяет предположить сниженный «старт» защитных реакций у потомства самок крыс с экспериментальным лекарственным поражением печени. Таким образом, полученные результаты в целом позволяют считать, что у самок крыс с экспериментальным хроническим поражением печени рождается физиологически незрелое потомство, что является показанием для систематического тщательного наблюдения за развитием детей, рожденных от матерей с патологией печени и выделением их в группы диспансерного наблюдения по иммунологическому профилю.

Список литературы

References

1. Николаева Л.Б., Ушакова Г.А. Первая беременность и первые роды: Монография. — М., 2011.
2. Шехтман М.М. Руководство по экстрагенитальной патологии у беременных. — М., 2003.
3. Брюхин Г.В., Евченко Е.В., Михайлова Г.И. Сравнительная характеристика иммунологических показателей у потомства самок крыс с хронической патологией печени в условиях эксперимента // Морфологические ведомости. — 2004. — 1—2. — С. 362.
4. Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л. Роль экспериментального поражения печени матери в развитии физиологической незрелости потомства // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2012. — 154 (11). — С. 544—547.
5. DeLeve L.D., Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease // Gastroenterol. Clin. N. Am. — 1995. — 24. — P. 787—810.
6. Буверов А.О. Лекарственные поражения печени // Российский медицинский журнал. — 2001. — С. 13—14.
7. Венгеровский А.И., Маркова И.В., Саратиков А.С. Методические указания по изучению гепатозащитной активности фармакологических веществ: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М., 2005.
8. Фримель Г. Иммунологические методы. — М., 1987.
9. Парахонский А.П. Ферментативная активность нейтрофильных лейкоцитов при хронических заболеваниях печени // Фундаментальные исследования. — 2005. — 5. — С. 79—80.
10. Тихомирова Е.И. Участие лектина Paenibacillus Polymyxa в процессах киллинга бактерий макрофагов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2008. — 6. — С. 82—86.
11. Тотолян А.А. Клетки иммунной системы. — СПб., 2000.
12. Брюхин Г.В., Невзорова Н.В. Роль хронической экспериментальной патологии печени матери в становлении неспецифической клеточной резистентности потомства // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2013. — 155 (1). — С. 114—118.
13. Брюхин Г.В., Шаврина Е.Ю. Сравнительная характеристика цитохимического состояния перитонеальных и альвеолярных макрофагов потомства самок крыс с экспериментальным поражением печени // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2013. — 155 (5). — С. 551—555.

1. Nikolaeva L.B., Ushakova G.A. First pregnancy and first delivery: Monograph. M., 2011 (in Russian).
2. Shehtman M.M. Guide by extra genital pathology of pregnant. M., 2003 (in Russian).
3. Bryukhin G.V., Evchenko E.V., Michailova G.I. Comparative characteristic of immunological parameters in the offspring of female rats with a chronic liver pathology in experimental conditions. Morphological newsletter. 2004; 1—2: 362 (in Russian).
4. Bryukhin G.V., Sizonenko M.L. The role of experimental liver defeat in the development of physiological immaturity in the offspring. Bulletin of experimental biology and medicine. 2012; 154 (11): 544—7 (in Russian).
5. DeLeve L. D., Kaplowitz N. Mechanisms of drug-induced liver disease. Gastroenterol. Clin. N. Am. 1995; 24: 787—810.
6. Bueverov A. O. Drug liver defeat. Russian medical journal. 2001: 13—4 (in Russian).
7. Vengerovsky A.I., Markova I.V., Saratikov A.S. Guidelines for the study of hepatoprotective activity of pharmacological substances. Guidelines for the experimental study of new pharmacological substances. M., 2005 (in Russian).
8. Frimel G. Immunological methods. M., 1987 (in Russian).
9. Parachonsky A.P. Enzymatic activity of neutrophils with chronic liver defeat. Fundamental research. 2005. — 5: 79—80 (in Russian).
10. Tichomirova E.I. Part of the lectin Paenibacillus Polymyxa in the processes of killing of microorganisms of macrophages. Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology. 2008; 6: 82—6 (in Russian).
11. Totolyan A.A. Cells of immune system. SPb., 2000 (in Russian).
12. Bryukhin G.V., Nevzorova N.V. The role of experimental liver defeat in the formation of nonspecific cell resistance in the offspring. Bulletin of experimental biology and medicine. 2013; 155 (1): 114—8 (in Russian).
13. Bryukhin G.V., Shavrina E. Yu. Comparative characteristic of cytochemical condition of peritoneal and alveolar macrophages in the offspring of rat 's with experimental liver defeat. Bulletin of experimental biology and medicine. 2013; 155 (5): 551—5 (in Russian).

Поступила 13.09.13

Сведения об авторах:

Брюхин Геннадий Васильевич, д.м.н., проф. каф. гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России, e-mail: kanc@chelsma.ru