

ВЛИЯНИЕ ПАТОЛОГИИ ПЕЧЕНИ МАТЕРИ РАЗЛИЧНОЙ ЭТИОЛОГИИ НА МИЕЛОПЕРОКСИДАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК НЕЙТРОФИЛОЦИТАРНОГО РОСТКА КРАСНОГО КОСТНОГО МОЗГА ПОТОМСТВА

Брюхин Г.В., Невзорова Н.В.

ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Минздравсоцразвития России», Челябинск, Россия (454000, Челябинск, ул. Воровского, 64, e-mail: Natasha_happy@list.ru)

Проведён анализ влияния патологии печени матери различной этиологии на становление миелопероксидазной активности клеток нейтрофилоцитарного ростка красного костного мозга потомства. Экспериментальное исследование проводилось с использованием лабораторных животных – крыс «Вистар» (самки и разнополое потомство на 60 день постнатального онтогенеза). У самок крыс моделировалось поражение печени, по своим морфологическим, биохимическим и физиологическим характеристикам аналогичное гепатитам А и В. Исследовалась миелопероксидазная активность нейтрофильных предшественников в красном костном мозге и фагоцитарная и киллинговая активность нейтрофилов периферической крови. Было выявлено снижение миелопероксидазной активности костномозгового пула нейтрофилов, и также качественное и количественное угнетение фагоцитарной и внутриклеточной киллинговой активности зрелых нейтрофилов. На основании полученных результатов сделано заключение о негативном влиянии поражения печени матери на функциональное становление нейтрофилов потомства.

Ключевые слова: мать, плод, печень, нейтрофилы, костный мозг, кровь.

INFLUENCE OF MOTHER'S LIVER'S PATHOLOGY OF A VARIOUS AETIOLOGY ON MYELOPEROXIDASE ACTIVITY OF NEUTROPHIL'S POOL OF BONE MARROW AT POSTERITY

Bryukhin G.V., Nevzorova N.V.

Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, Russia (454000, Chelyabinsk, Vorovskogo st., 64, e-mail: Natasha_happy@list.ru)

In the study we analyzed influence of liver's pathology of mother of a various aetiology on genesis of myeloperoxidase activity of neutrophils in red bone marrow at posterity. In experiment we used laboratory animals - rats «Vistar», females and they posterity 60 days old. We modelled at females liver defeat, under the morphological, biochemical and physiological characteristics similar to hepatitises And and B. We examined myeloperoxidase activity of neutrophilic predecessors in red bone marrow and phagocytosis and killing by neutrophils from peripheral blood. In result we had decrease of myeloperoxidase activity of neutrophils from marrowy pool and also qualitative and quantitative oppression phagocytosing and endocellular killing activity of mature neutrophilic granulocytes. On the basis of results of our study we can make a conclusion about negative influence defeat of mother's liver on functional formation of neutrophils at posterity.

Key words: mother, fetus, liver, neutrophils, bone marrow, blood.

Введение

В настоящее время одной из глобальных задач, стоящих перед учёными всего мира, является обеспечение воспроизводства здорового потомства. Плохая экология, стрессы, заболевания родителей являются факторами, вызывающими нарушения нормального протекания беременности. Особым фактором, негативно влияющим на внутриутробное развитие плода, являются хронические заболевания матери. Одной из самых распространённых экстрагенитальных патологий у женщин репродуктивного возраста являются хронические заболевания гепатобилиарной системы, в частности гепатиты.

Согласно данным литературы, хронический гепатит матери отрицательно влияет на становление и функционирование ряда жизненно важных систем организма, в частности иммунной, макрофагальной, пищеварительной, репродуктивной и пр. [1].

Не подлежит сомнению, что для обеспечения жизнедеятельности организма необходимо нормальное функционирование одной из важнейших систем – системы крови. В свою очередь, адекватное выполнение кровью своих функций напрямую зависит от соотношения и функционирования форменных элементов крови [8].

Одним из важнейших форменных элементов крови является нейтрофильный гранулоцит. Это «пионерная» клетка, первой приходящая в очаг воспаления и активно участвующая в реакциях обезвреживания и уничтожения чужеродного агента. Нейтрофилы способны к активному движению, хемотаксису, фагоцитозу и дегрануляции. После фагоцитирования чужеродных частиц нейтрофилы обычно погибают, высвобождая большое количество биологически активных веществ, повреждающих болезнетворные агенты, а также усиливающих воспаление и хемотаксис иммунных клеток в очаг воспаления. Нейтрофилы содержат большое количество миелопероксидазы – фермента, способного окислять анион хлора до гипохлорита – сильного антибактериального агента, обладающего неспецифическим бактерицидным действием. После активации нейтрофила происходит дегрануляция, и миелопероксидаза секретируется либо внутрь фагосомы, либо во внеклеточное пространство. Этот процесс является одним из важнейших механизмов реактивности нейтрофила, обеспечивающих выполнение им защитных функций [4; 5].

В связи со сказанным выше **целью** настоящей работы явилось изучение влияния хронической патологии печени матери на миелопероксидазную активность нейтрофилов потомства. Поскольку биосинтез пероксидазы осуществляется во время дифференциации нейтрофильных предшественников в костном мозге и заканчивается ко времени выхода зрелых гранулоцитов в кровеносное русло, нами было изучено содержание этого фермента на всех морфологически идентифицируемых стадиях развития нейтрофила [5].

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования в эксперименте были использованы белые лабораторные крысы (самки) «Вистар», всего 48 животных, в том числе взрослые самки (12 животных) и их разнополое потомство – 36 животных из 15 пометов. Исследовались крысята, достигшие 60-дневного возраста. Согласно общепризнанному подразделению возрастных периодов у данной группы животных, на 60-й день постнатального развития крысята достигают половой зрелости, возможности их организма реализуются в полную силу, обменные процессы стабилизируются [3].

Исходя из цели настоящего исследования все экспериментальные животные были разделены на 3 группы. Первую группу составили животные от интактных матерей – контрольная группа – 12 животных из 4 помётов. Во вторую группу вошло потомство от самок с хроническим экспериментальным поражением печени с помощью D(+)-галактозамина – первая экспериментальная группа – 12 животных из 6 помётов. В третью группу вошло потомство самок с хроническим экспериментальным поражением печени с помощью фильтрата *E. coli* – вторая экспериментальная группа – 12 животных из 5 помётов.

Исследования проводились с учетом суточных и сезонных колебаний. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [3].

Модель хронического поражения печени путем введения D(+)-галактозамина

Поражение печени моделировалось путем внутрибрюшинного введения гепатотропного яда D(+)-галактозамина гидрохлорида (Sigma-G0500, США) на 0,9%-ном растворе натрия хлорида в дозе 250 мг/кг массы тела животного. Экспериментальный гепатит, вызываемый введением D(+)-галактозамина, по своим морфологическим, иммунологическим и биохимическим характеристикам рассматривается как адекватная модель вирусного гепатита В у человека [2].

Модель хронического поражения печени путем введения фильтрата *E. coli*

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 ATCC 25922) в разведении 1:4. Разрешающую инъекцию производили через 24 часа путём введения в хвостовую вену фильтрата шестидневной культуры *E. coli* из расчёта 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 [7].

Морфологические и гистохимические методы исследования

Красный костный мозг получали из отпрепарированной от мышц бедренной кости забитого животного с отсеченными эпифизами путем нагнетания 0,9%-ного раствора натрия хлорида с использованием шприца на 2 мл. Из полученного из бедренной кости костного мозга изготавливали мазки.

В мазках изучалась миелопероксидазная активность нейтрофильных предшественников. Для этого нами проводилась цитохимическая реакция на выявление пероксидазы по методу Лелле. Фиксированные формалиновым спиртом и промытые в

дистиллированной воде мазки на 4 минуты помещали в инкубационную смесь, состоящую из 10 мл 40%-ного этанола, 40 мг бензидина и капли 3%-ной перекиси водорода. В основе метода реакция окисления перекисью водорода в присутствии пероксидазы бензидина в буро-коричневый оксибензидин. Ядра клеток докрашивали метиленовым зелёным. Миелопероксидаза выявляется в цитоплазме клеток в виде коричневых гранул. При отсутствии реакции гранул в цитоплазме не наблюдается [4; 8].

Выделение нейтрофилов проводили общепринятыми методами на фиколл-верографиневом градиенте плотностью 1,095. Исследования проводили в монослое клеток, который получали по общепринятой методике, основываясь на способности фагоцитов адгезироваться к чистой стеклянной поверхности [8].

Фагоцитарную и внутриклеточную киллинговую активность изучали на основе способности клеток к захвату и перевариванию микроорганизмов по общепринятым методикам, основанным на инкубации в течении часа при 37 °С монослоя фагоцитов со взвесью микроорганизмов [8]. В качестве объекта фагоцитоза использовали живые суточные культуры *St. aureus*, штамм ATCC 25923.

Статистические методы

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием лицензионного пакета прикладных программ «SPSS 17.0». При сравнительном анализе данных использовали непараметрический критерий Манна–Уитни [6].

Результаты исследования и их обсуждение

Нами изучалось содержание нейтрофилов на различных стадиях развития, у которых реакция на миелопероксидазу положительная. Результаты исследования представлены в таблице 1. За 100% мы брали всё количество клеток определённого типа у данной группы животных. Анализируя данные, представленные в таблице, в первую очередь можно отметить практически одинаково невысокое содержание бензидин-положительных клеток среди ранних стадий развития нейтрофила как в контрольной, так и в опытных группах. Согласно данным литературы, миелопероксидаза является важным ферментом зрелой клетки, активно выполняющим эффекторные функции. Синтез пероксидазы начинается и усиливается по мере увеличения степени дифференцировки клеток. Соответственно, у находящихся на ранних стадиях развития клеток митотического пула нейтрофильных предшественников – миелобластов, промиелоцитов и миелоцитов наличие миелопероксидазных гранул в цитоплазме скорее исключение, чем правило [5]. Поэтому на данном этапе различия между опытом и контролем практически не проявляются – клеток с отсутствием реакции одинаково много в контрольной и обеих опытных группах.

Таблица 1 – Содержание проявляющих положительную реакцию на пероксидазу клеток нейтрофилоцитарного ростка красного костного мозга контрольных и подопытных крысят, %

| Группа Тип клеток | Контроль | Опытная группа 1 | Опытная группа 2 |
|------------------------------|--------------|------------------|------------------|
| Миелобласт | 7,33 ± 0,33 | 6,39 ± 0,37 | 6,57 ± 0,26 |
| Промиелоцит | 22,46 ± 0,21 | 23,31 ± 0,28 | 21,99 ± 0,45 |
| Миелоцит | 24,61 ± 0,58 | 22,97 ± 0,74 | 23,68 ± 0,19 |
| Метамиелоцит | 57,79 ± 0,44 | 43,79 ± 0,26* | 46,89 ± 0,47* |
| Палочкоядерный нейтрофил | 78,89 ± 0,34 | 56,68 ± 0,51* | 53,37 ± 0,32* |
| Сегментоядерный нейтрофил | 85,57 ± 0,32 | 63,34 ± 0,54* | 57,89 ± 0,37* |

* Различия статистически достоверны ($p < 0,05$).

Начиная с метамиелоцита наблюдается статистически достоверное снижение доли проявляющих положительную реакцию на пероксидазу у подопытных животных по сравнению с контрольными. Среди палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов содержание таких клеток снижено настолько, что разница между опытом и контролем составляет несколько десятков процентов.

Полученные результаты позволяют сделать вывод, что у потомства самок крыс с хроническим экспериментальным поражением печени матери имеет место угнетение пероксидазной активности, что проявляется в снижении общего количества содержащих пероксидазу нейтрофильных предшественников на всех стадиях развития.

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что поражение печени матери, негативно влияя на становление пероксидазной активности костномозговых нейтрофилов, вызывает угнетение фагоцитарной функции зрелых нейтрофилов-эффекторов. Логично предположить, что отсутствие важнейшего фермента – миелопероксидазы, будет негативно сказываться на выполнении нейтрофилом фагоцитарной и бактерицидной функций [5].

Для экспериментального подтверждения этого предположения нами был проведён анализ фагоцитарной и киллинговой активности нейтрофилов периферической крови экспериментальных животных на примере поглощения ими золотистого стафилококка.

Результаты исследования поглотительной и киллинговой активности нейтрофилов периферической крови представлены на рисунке 1.

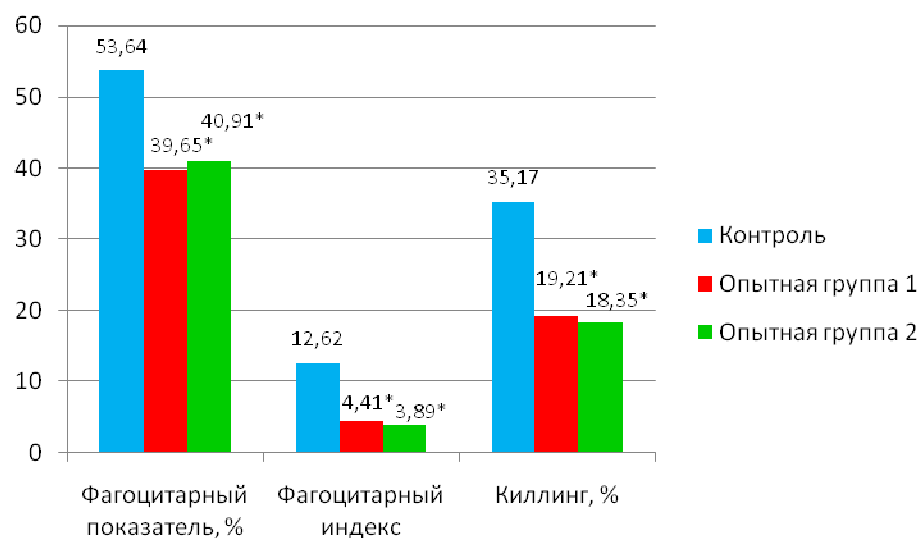


Рис. 1. Фагоцитарный показатель, фагоцитарный индекс и показатель киллинга нейтрофилов периферической крови экспериментальных животных.

Фагоцитарный показатель, характеризующий долю активно фагоцитирующих клеток среди всех нейтрофилов периферической крови, снижен у подопытных животных по сравнению с контролем. Снижен у них и фагоцитарный индекс, характеризующий способность фагоцита к поглощению одновременно значительного числа микроорганизмов. Соответственно, у подопытных животных имеет место как качественное, так и количественное нарушение способности к фагоцитозу.

При анализе киллинговой активности нейтрофилов периферической крови было также выявлено снижение способности к перевариванию микроорганизмов у нейтрофилов периферической крови подопытных животных по сравнению с контролем. Убитыми в нейтрофилах подопытных животных оказалось менее 20% поглощённых микроорганизмов, в то время как в нейтрофилах интактных животных мёртвых стафилококков практически вдвое больше. Логично предположить, что снижение способности к киллингу может быть связано с нарушением становления важнейшего бактерицидного механизма, связанного с накоплением миелопероксидазы, во время развития и дифференцировки нейтрофилов подопытных животных в красном костном мозге [5; 8].

Заключение

По результатам настоящего экспериментального исследования можно сделать вывод о негативном влиянии хронического поражения печени матери, по своим морфологическим, биохимическим и физиологическим характеристикам аналогичного гепатитам А и В, на становление и реализацию миелопероксидазной активности нейтрофилов разных стадий дифференцировки потомства. Нарушение синтеза и накопления пероксидазы в

нейтрофильных предшественниках, ведёт к снижению эффекторных свойств зрелых нейтрофилов, что, в свою очередь, может привести к ослаблению неспецифической резистентности организма.

Список литературы

1. Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л. Становление генеративной функции семенников потомства самок крыс с хроническим поражением печени // Проблемы репродукции. – 2009. – № 1. – С. 16-19.
2. Венгеровский А.И., Саратиков А.С. Механизм действия гепатопротекторов при токсических поражениях печени // Фармакология и токсикология. – 1988. – Т. 51. – № 1. – С. 89-92.
3. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк [и др.]. – 3-е изд., перераб. и доп. – Киев : Вища школа, 1983. – 383 с.
4. Маслов К.А. Бактерицидный эффект и активность миелопероксидазы макрофагов при персистенции микобактерий туберкулеза и лепры // Вестник новых медицинских технологий. – 1999. – № 1. – С. 76-79.
5. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. – Новосибирск : Наука, 1983. – 254 с.
6. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М. : МедиаСфера, 2002. – 312 с.
7. Сааков Б.А., Поляк А.И. Моделирование воспалительного процесса в печени // Моделирование, методы изучения и экспериментальная терапия патологических процессов. – 1967. – С. 119-123.
8. Тотолян А.А., Фрейндлин И.С. Клетки иммунной системы. – СПб. : Наука, 2000. – 231 с.

Рецензенты:

Телешева Ираида Борисовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая учебной частью кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации», г. Челябинск.

Тишевская Наталья Викторовна, доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации», г. Челябинск.