

УДК 616.36 – 097 – 618.3

ХАРАКТЕРИСТИКА ШИК-ПОЗИТИВНОГО МАТЕРИАЛА В КЛЕТКАХ НЕЙТРОФИЛОЦИТАРНОГО ПУЛА КОСТНОГО МОЗГА У ПОТОМСТВА САМОК КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПОРАЖЕНИЕМ ПЕЧЕНИ

Невзорова Н.В., Брюхин Г.В.

ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Минздрава России», Челябинск, e-mail: Natasha_happy@list.ru

Проведён анализ влияния патологии печени матери различной этиологии на становление способности к накоплению питательного субстрата клетками нейтрофилоцитарного ростка красного костного мозга потомства. Объектом экспериментального исследования были выбраны самки крыс «Вистар», у которых по общепринятым методикам моделировалось поражение печени, по своим морфологическим, биохимическим и физиологическим характеристикам аналогичное гепатитам А и В, а также их потомство первого поколения. В ходе работы исследовалось содержание накапливающих гликоген нейтрофильных предшественников разной степени зрелости у интактных и подопытных животных. Было выявлено снижение доли содержащих гликоген клеток нейтрофилоцитарного ряда у потомства матерей с поражением печени по сравнению с контрольными животными. По итогам исследования сделано заключение о неблагоприятном влиянии хронической патологии печени матери на становление способности к запасанию питательного субстрата нейтрофилами потомства.

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

THE CHARACTERISTIC OF PAS-POSITIVE MATERIAL IN NEUTROPHIL'S POOL OF BONE MARROW AT POSTERITY OF RAT'S FEMALES WITH LIVER'S EXPERIMENTAL DEFEAT

Nevezorova N.V., Bryukhin G.V.

Chelyabinsk State Medical Academy, Chelyabinsk, e-mail: Natasha_happy@list.ru

In the study we analyzed influence of mother's liver's pathology of a various aetiology on formation of ability to accumulation of a nutritious substratum by neutrophils on a different stage of myelopoiesis in red bone marrow at posterity. Object of an experimental research had been chosen females of rats «Vistar» at which by the standard methodology was modeled liver's defeat, on morphological, biochemical and physiological characteristics similar to hepatitis A and B, and also their posterity of the first generation. During the work we doing pas-reaction, which can helped us inexamined the maintenace of accumulating glycogen neutrophilic predecessors at intact and experimental animals. We revealed decrease of amount glycogen containing cells at posterity of mothers with defeat of liver in comparison with control animals. On the basic of results of our study we can make a conclusion about adverse influence of a chronic pathology of mother's liver on formation of ability to accumulation of a nutritious substratum of neutrophils at posterity.

Keywords: mother, fetus, liver, neutrophils, bone marrow

На фоне продолжающегося демографического кризиса в России одной из актуальных проблем на сегодняшний день остается воспроизводство здорового потомства. В настоящее время отмечается увеличение числа женщин фертильного возраста с различными экстрагенитальными заболеваниями, среди которых особое место занимают болезни гепатобилиарной системы, в том числе хронические гепатиты, распространенность которых в мире год от года возрастает. Многочисленные экспериментальные и клинические исследования указывают на нарушение становления систем жизнеобеспечения у потомства матерей с хронической патологией гепатобилиарной системы, в том числе репродуктивной, иммунной, макрофагальной, пищеварительной и др. [1, 2].

Вместе с тем, является постулатом тот факт, что для функционирования всех без исключения систем органов необходимо их достаточное и полноценное кровоснабжение. Выполнение же кровью важнейших функций, а именно интегративной, транс-

портной, трофической, дыхательной, защитной, иммунной, в известной мере зависит от нормального протекания гемопоэза в красном костном мозге. Нарушение протекания нейтрофилоцитопоэза ведет к снижению и потере неспецифической резистентности организма [1].

В то же время, способность любой клетки адекватно ситуации выполнять свои функции напрямую зависит от достаточного получения этой клеткой питательных веществ и энергии. Наличие запаса питательных веществ определяет способность клетки при действии каких-либо раздражителей увеличивать свою активность, адекватно отвечая на стимуляцию [9]. Отмеченное выше предопределило выбор темы и цель исследования.

Целью настоящего исследования явился анализ роли хронического поражения печени матери в нарушении становления способности к накоплению питательного субстрата нейтрофилами красного костного мозга потомства.

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования в эксперименте были использованы белые лабораторные крысы (самки) «Вистар», всего 168 животных, в том числе взрослые самки (36 животных) и их разнополое потомство – 142 животных из 36 пометов в различные сроки постнатального периода (15-е, 30-е, 45-е, 60-е сутки). Сроки исследования согласуются с общепризнанным подразделением возрастных периодов у данной группы животных [5].

Исходя из цели настоящего исследования, все экспериментальные животные были разделены на 3 группы. Первую группу составили животные от интактных матерей – контрольная группа – 46 животных из 11 пометов. Во вторую группу вошло потомство от самок с хроническим экспериментальным поражением печени с помощью D(+)-галактозамина – первая экспериментальная группа – 48 животных из 13 пометов. В третью группу вошло потомство самок с хроническим экспериментальным поражением печени с помощью фильтрата *E. coli* – вторая экспериментальная группа – 48 животных из 12 пометов.

Исследования проводились с учетом суточных и сезонных колебаний. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» [5].

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% 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 рядом исследователей как адекватная модель вирусного гепатита В у человека [3].

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 [8].

Хронические поражения печени верифицировали у лабораторных животных с помощью морфологических, биохимических и иммунологических методов [4, 9].

Морфологические и гистохимические методы исследования. Красный костный мозг получали из отпрепарированной от мышц бедренной кости забитого животного с отсеченными эпифизами путем нагнетания 0,9% раствора натрия хлорида с использованием шприца на 2 мл. Из полученного из бедренной кости костного мозга изготавливали мазки [4].

В мазках изучалась способность клеток к накоплению универсального питательного субстрата животной клетки – гликогена. С этой целью проводилась ШИК-реакция по Мак-Манусу, представляющая собой выявление гликогена методом Шифф-йодная кислота. Реакция основана на способности йодной кислоты окислять спиртовые группы, что при условии взаимодействия с реактивом Шиффа (фуксинсернистая кислота) приводит к образованию кислотоустойкого красителя красно-фиолетового цвета.

ШИК-положительные вещества окрашиваются в красный цвет различных оттенков. Нейтральные мукополисахариды, содержащие гексозу, – пурпурно-красные, гликоген – темно-красный [4, 9].

Кроме того, количество накопленного клетками гликогена визуально оценивали полуколичественным методом с вычислением среднего гистохимического показателя (СГП) Астальди и Верга (1957) по формуле

$$\text{СГП} = (0 \cdot a + 1 \cdot b + 2 \cdot v + 3 \cdot r) / 100,$$

где 0 – отсутствие гранул в клетке; 1 – гранулами занято < 25% площади цитоплазмы; 2 – гранулами занято 25–50% площади цитоплазмы; 3 – гранулами занято > 50% площади цитоплазмы.

Статистические методы исследования. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием лицензионного пакета прикладных программ «SPSS 17.0». При сравнительном анализе данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни [7].

Результаты исследования и их обсуждение

Способность к накоплению гранул гликогена оценивалась на 15, 30, 45 и 60 день постнатального онтогенеза у нейтрофилов на различных стадиях развития. Из клеток митотического пула были рассмотрены миелобласты, миелоциты и метамиелоциты. Результаты исследования миелобластов контрольных и подопытных животных представлены в табл. 1. Отражена доля содержащих гранулы гликогена клеток от общего количества миелобластов.

Из табл. 1 видно, что количество накапливающих гликоген миелобластов на раннем сроке постнатального развития (на 15 день) в контроле и обеих опытных группах различается незначительно. С увеличением возраста животных увеличиваются и различия – на 30, 45 и 60 день количество содержащих гранулярный гликоген миелобластов в обеих опытных группах существенно ниже по сравнению с контролем.

Результаты оценки содержания гликогена в промиелоцитах представлены в табл. 2. Из табл. 2 следует, что для промиелоцитов сохраняется та же тенденция, что и для миелобластов: незначительные на раннем сроке постнатального онтогенеза различия с возрастом начинают усиливаться. Доля гликогенсодержащих промиелоцитов на 30, 45 и 60 день развития существенно ниже в обеих опытных группах по сравнению с контролем.

Таблица 1

Содержание гликогенсодержащих миелобластов
в костном мозге экспериментальных животных (%)

Группа \ Возраст, сутки	Контрольная	Опытная группа 1	Опытная группа 2
15	10,64 ± 0,38	11,37 ± 0,86	9,94 ± 0,64
30	16,65 ± 0,49	11,89 ± 0,56*	14,33 ± 0,56*
45	21,32 ± 0,54	17,45 ± 0,73*	18,46 ± 0,31*
60	14,47 ± 0,65	12,29 ± 0,34	11,59 ± 0,67*

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

Таблица 2

Содержание гликогенсодержащих промиелоцитов
в костном мозге экспериментальных животных (%)

Группа \ Возраст, сутки	Контрольная	Опытная группа 1	Опытная группа 2
15	15,52 ± 0,44	15,24 ± 0,63	14,67 ± 0,73
30	19,94 ± 0,26	17,74 ± 0,62*	16,65 ± 0,44*
45	23,35 ± 0,61	20,55 ± 0,27*	19,78 ± 0,66*
60	19,21 ± 0,37	17,35 ± 0,54*	17,01 ± 0,52*

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

Доля содержащих гранулы гликогена миелоцитов у подопытных и интактных крысят представлена в табл. 3. Среди миелоцитов количество гликогенсодержащих клеток на всех сроках развития снижено по сравнению с контролем. С возрастом различия в количестве накапливающих гликоген клеток у подопытных и контрольных крысят увеличиваются. Миелобласты, промиелоциты и миелоциты относятся к митотическому пулу предшественников нейтрофила. Эти клетки активно делятся, практически

не несут другой функциональной нагрузки и не обладают характерной для нейтрофила синтетической и фагоцитарной активностью [6]. В связи с этим, эти клетки не остро нуждаются в накоплении питательных веществ. Однако даже на ранних стадиях нейтрофилоцитопоза наблюдается снижение по сравнению с контролем количества гликогенсодержащих клеток в первой и второй опытных группах, причём по мере созревания клеток от миелобласта к миелоциту различия становятся всё более явными.

Таблица 3

Содержание гликогенсодержащих миелоцитов
в костном мозге экспериментальных животных (%)

Группа \ Возраст, сутки	Контрольная	Опытная группа 1	Опытная группа 2
15	17,53 ± 0,28	15,81 ± 0,33*	15,38 ± 0,27*
30	20,25 ± 0,31	18,11 ± 0,49*	17,73 ± 0,39*
45	22,48 ± 0,44	19,97 ± 0,35*	20,18 ± 0,67
60	20,64 ± 0,35	18,64 ± 0,37*	18,52 ± 0,25*

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

Эти результаты позволяют констатировать, что нарушение процессов синтеза и накопления гликогена в нейтрофильных предшественниках начинается на ранних стадиях нейтрофилоцитопоза [6].

Три следующие стадии развития нейтрофила представляют собой немитотический

пул нейтрофильных предшественников. Начиная с метамиелоцитаб начинается собственно процесс дифференцировки – синтез специфических ферментов, накопление оксифильной и азурофильной зернистости, становление фагоцитарной активности, повышение интенсивности окислительно-вос-

становительных процессов. Клетки способны участвовать в реакциях воспаления и адекватно отвечать на внешний стимул усилением интенсивности метаболизма [6].

В табл. 4 представлены данные по содержанию гликогена в метамиелоцитах крысят контрольной и опытных групп.

Таблица 4

Содержание гликогенсодержащих метамиелоцитов в костном мозге экспериментальных животных (%)

Группа \ Возраст, сутки	Контрольная	Опытная группа 1	Опытная группа 2
15	38,61 ± 0,36	33,81 ± 0,47*	35,05 ± 0,43*
30	41,67 ± 0,24	34,56 ± 0,58*	34,93 ± 0,55*
45	45,30 ± 0,51	33,68 ± 0,23*	35,51 ± 0,38*
60	43,59 ± 0,45	35,21 ± 0,36*	37,64 ± 0,17*

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

Согласно таблице, доля содержащих гранулы гликогена метамиелоцитов в обеих опытных группах существенно ниже по сравнению с контролем на всех представленных сроках постнатального развития. Доля содержащих гликоген клеток среди палочкоядерных нейтрофилов контрольных и по-

допытных животных представлена в табл. 5. Доля содержащих включения гликогена нейтрофилов в обеих опытных группах существенно снижена по сравнению с контролем. Можно отметить, что разница между контролем и опытом по мере повышения степени дифференцировки клеток усиливается.

Таблица 5

Содержание гликогенсодержащих палочкоядерных нейтрофилов в костном мозге экспериментальных животных (%)

Группа \ Возраст, сутки	Контрольная	Опытная группа 1	Опытная группа 2
15	64,33 ± 0,21	55,78 ± 0,38*	56,74 ± 0,35*
30	70,13 ± 0,53	54,86 ± 0,34*	57,89 ± 0,18*
45	71,54 ± 0,37	60,72 ± 0,56*	61,34 ± 0,57*
60	68,46 ± 0,52	55,26 ± 0,54*	60,61 ± 0,64*

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

Наконец, результаты оценки доли гликогенсодержащих зрелых сегментоядерных нейтрофилов представлены в табл. 6. Содержание зрелых нейтрофилов с включе-

ниями гликогена в обеих опытных группах достоверно снижено на всех сроках постнатального онтогенеза по сравнению с контролем.

Таблица 6

Содержание гликогенсодержащих сегментоядерных нейтрофилов в костном мозге экспериментальных животных (%)

Группа \ Возраст, сутки	Контрольная	Опытная группа 1	Опытная группа 2
15	71,42 ± 0,43	63,37 ± 0,19*	61,28 ± 0,26*
30	73,46 ± 0,61	65,44 ± 0,51*	64,32 ± 0,37*
45	70,45 ± 0,34	62,45 ± 0,31*	61,86 ± 0,64*
60	71,67 ± 0,39	61,34 ± 0,27*	62,35 ± 0,43*

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

По результатам исследования содержания гликогена в клетках немитотического пула нейтрофильных предшественников можно заметить, что в процессе диффе-

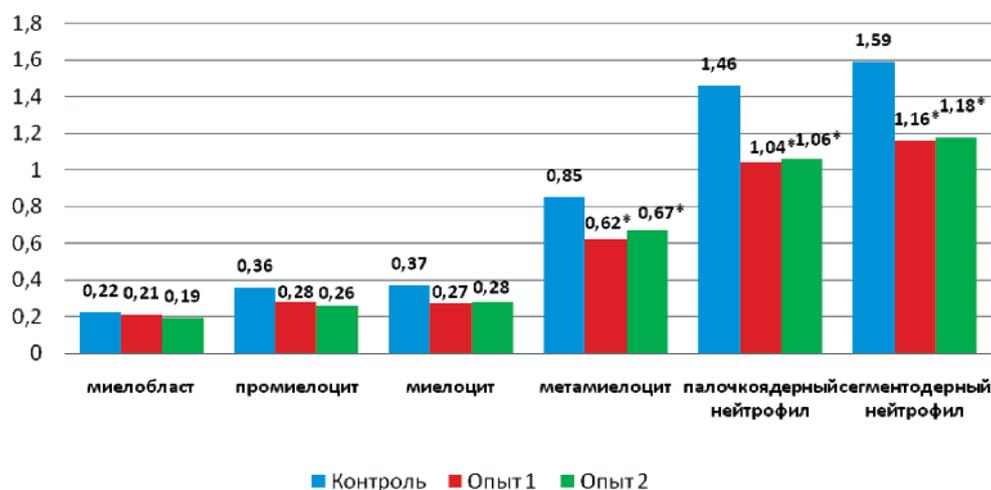
ренцировки костномозговых нейтрофилов обеих подопытных групп, начиная с ранних стадий, имеет место нарушение синтеза и накопления гранул гликогена. Наиболее

выраженное снижение запасов гликогена выявлено на более поздних стадиях нейтрофилоцитопоза.

Эти результаты находятся в полном соответствии с изменением среднего гистохимического показателя, отражающего содержание гликогена в расчёте на одну клетку (рисунок).

Как видно из рисунка, средний гистохимический показатель миелобластов, промиелоцитов и миелоцитов крысят с поражением печени незначительно снижен по сравнению с контролем. В процессе дифференцировки костномозговых нейтрофилов экспериментальных животных содержание гранулярного гликогена в них увеличивает-

ся. При этом у подопытных крысят содержание данного энергетического субстрата существенно снижено по сравнению соответствующим контролем. Вероятно, клетки контрольных животных по мере созревания приобретают способность накапливать гликоген в значительных количествах, что необходимо для выполнения основных функций нейтрофилов, в том числе фагоцитарной и киллинговой. Вместе с тем, снижение содержания гликогена в нейтрофилах потомства матерей с хроническим поражением печени может обусловить угнетение их фагоцитарных свойств и, как следствие, депрессию неспецифической резистентности [9].



Средний гистохимический показатель накопления гликогена нейтрофилами экспериментальных животных

Заключение

Полученные результаты позволяют говорить о том, что экспериментальное хроническое поражение гепатобилиарной системы матери по своим морфологическим, биохимическим и физиологическим характеристикам аналогичное гепатитам А и В, негативно влияет на способность костномозговых нейтрофилов потомства синтезировать и накапливать гликоген, являющийся основным энергетическим субстратом клетки. У подопытных животных происходит уменьшение числа гликогенпозитивных клеток и содержания гранулярного гликогена в каждой клетке. Полученные результаты позволяют предположить, что у самок крыс с хроническим поражением печени рождается потомство с нарушением нейтрофилоцитопоза.

Список литературы

1. Брюхин Г.В., Вторушина Е.В. Роль токсического поражения печени матери в нарушении структурно-функционального становления яичников потомства в условиях эксперимента // Морфологические ведомости. – 2006. – №3–4. – С. 16–18.
2. Брюхин Г.В., Сизоненко М.Л. Особенности становления эндокринного компартмента мужских половых желез потомства самок крыс с хроническим поражением печени // Проблемы репродукции. – 2012. – №1. – С. 31–34.
3. Венгеровский А.И., Саратиков А.С. Механизм действия гепатопротекторов при токсических поражениях печени // Фармакология и токсикология. – 1988. – Т.51. – №1. – С. 89–92.
4. Иммунологические, цитохимические и биохимические методы исследования фагоцитирующих клеток. Методические рекомендации / под ред. Э.А. Имельбаевой. – Уфа: БГМИ, 1996. – 85 с.
5. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария, Б.В. Западнюк. – 3-е изд., перераб. и доп. – Киев: Вища школа, 1983. – 383 с.

6. Маянский А.Н., Маянский Д.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. – Новосибирск: Наука, 1983. – 254 с.
7. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. – М.: МедиаСфера, 2002. – 312 с.
8. Сааков Б.А., Поляк А.И. Моделирование воспалительного процесса в печени // Моделирование, методы изучения и экспериментальная терапия патологических процессов. – 1967. – С. 119–123.
9. Тотолян А.А., Фрейндлин И.С. Клетки иммунной системы. – СПб.: Наука, 2000. – 231 с.

References

1. Bryukhin G.V., Vtorushina E.V. *Rol toksicheskogo porazheniya pecheni materi v narushenii strukturno-funktsionalnogo stanovleniya yaichnikov potomstva v usloviyakh eksperimenta* (Role of toxic defeat of mother's liver in infringement of structural and functional formation of ovaries at posterity in the conditions of experiment). *Morfologicheskie vedomosti* [Morphological newsletter]. 2006. no 3–4. pp. 16–18.
2. Bryukhin G.V., Sizonenko M.L. *Osobennosti stanovleniya endokrinnogo kompartnenta muzhskikh polovykh zhelez potomstva samok krysa s khronicheskim porazheniem pecheni* (Features of formation of endocrine compartment of man's sexual glands at posterity of rat's females with chronic defeat of a liver). *Problemy reproduksii* [Russian journal of Human Reproduction]. 2012. no 1. pp. 31–34.
3. Vengerovskiy A.I., Saratikov A.S. *Mekhanizm deystviya gepatoprotectorov pri toksicheskikh porazheniyakh pecheni* (The action mechanism of hepatoprotectors at toxic defeats of a liver) *Farmacologiya i toksikologiya* [Pharmacology and toxicology]. 1988. tome 51. no 1. pp. 89–92.
4. *Immunologicheskie, tsitokhimicheskie i biokhimicheskie metody issledovaniya fagotsitiruyutshikh kletok. Metodicheskie rekomendatsii*. [Immunological, cytochemical and biochemical methods of research of phagocytes. Methodical recommendations]. Under edition E. A. Emelbaevoy. Ufa: BGMI, 1996. p. 85.

5. Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zahariya E.A., Zapadnyuk B.V. *Laboratornye zhivotnye. Razvedenie, sodержание, ispolzovanie v eksperimente*. [Laboratory animals. Cultivation, keeping, used in experiment]. The third edition, processed and added. Kiev: Vitsha shkola, 1983. p. 383.

6. Mayanskiy A.N., Mayanskiy D.N. *Ocherki o neytrofilie i makrofage* [Sketches about neutrophil and macrophage]. Novosibirsk: Science, 1983. p. 254.

7. Rebrova O. YU. *Statisticheskiy analiz meditsinskih dannykh. Primenenie paketa prikladnykh program STATISTICA* [The statistical analysis of medical data. Application of a package of applied programs STATISTICA]. Moscow: MediaSfera, 2002. p. 312.

8. Saakov B.A., Polyak A.I. *Modelirovanie vospalitel'nogo potsesta v pecheni* (Modelling of inflammatory process in liver) *Modelirovanie, metody izucheniya i eksperimental'naya terapiya patologicheskikh protsessov* [Modelling, methods of examination and experimental therapy of pathological processes]. 1967. pp. 119–123.

9. Totolyan A.A., Freyndlin I.S. *Kletki immunnoy sistemy*. [Cells of immune system]. St. Petersburg: Science, 2000. p. 231.

Рецензенты:

Куренков Е.Л., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой анатомии человека ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации», г. Челябинск;

Кривохижина Л.В., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Челябинская государственная медицинская академия Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации», г. Челябинск.

Работа поступила в редакцию 03.08.2012.