

## ДОСЛІДЖЕННЯ ФАГОЦИТАРНОЇ ТА МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВНОСТІ МОНОЦИТІВ КРОВІ У ЩУРІВ З МОДЕЛЬОВАНИМ ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНИМ СИНДРОМОМ

ДОСЛІДЖЕННЯ ФАГОЦИТАРНОЇ ТА МЕТАБОЛІЧНОЇ АКТИВНОСТІ МОНОЦИТІВ КРОВІ У ЩУРІВ З МОДЕЛЬОВАНИМ ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНИМ СИНДРОМОМ – В експерименті на щурах з модельованим гепатопульмональним синдромом проведено дослідження фагоцитарної та метаболічної активності моноцитів крові. Результати проведеного дослідження вказують на виражені порушення функціональної активності досліджуваних клітин: пригнічення фагоцитарної активності, зменшення поглинальної здатності, підвищення киснезалежних механізмів клітингу та виснаження метаболічних резервів.

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАГОЦИТАРНОЙ И МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ КРОВИ У КРЫС С МОДЕЛИРУЕМЫМ ГЕПАТОПУЛЬМОНАЛЬНЫМ СИНДРОМОМ – В эксперименте на крысах с моделируемым гепатопульмональным синдромом проведено исследование фагоцитарной и метаболіческой активности моноцитов крови. Результаты проведенного исследования указывают на выраженные нарушения функциональной активности исследуемых клеток: угнетение фагоцитарной активности, уменьшение поглощающей способности, повышение кислородзависимых механизмов киллинга и истощение метаболіческих резервов.

THE INVESTIGATION OF PHAGOCYtic AND METABOLIC ACTIVITY OF BLOOD MONOCYTES IN RATS WITH MODULATED HEPATOPULMONARY SYNDROME – In experiments on rats with modulated hepatopulmonary syndrome the phagocytic and metabolic activity of blood monocytes were studied. Results of the investigation indicate a pronounced violations of their functional activity: inhibition of phagocytic activity, reducing of the absorptive capacity, increasing oxygen dependent mechanisms of keeling and depletion of metabolic reserves.

**Ключові слова:** фагоцитарна активність, моноцити, гепатопульмональний синдром.

**Ключевые слова:** фагоцитарная активность, моноциты, гепатопульмональный синдром.

**Key words:** phagocytic activity, monocytes, hepatopulmonary syndrome.

**ВСТУП** Мононуклеарні фагоцити складають найважливішу групу клітин, що довго живуть, і здатні до фагоцитозу. Тканинні макрофаги та їх попередники – моноцити, промоноцити і монобласти утворюють систему мононуклеарних фагоцитів [13]. Мононуклеарні фагоцити беруть участь у різноманітних біологічних процесах в організмі людини і тварин у зв'язку з їх присутністю в різних органах і тканинах. Вони значним чином визначають характер і розвиток запалення, включення імуногенезу, регенеративні та інші процеси в організмі [9]. Фагоцити – це універсальні ефектори гомеостазу, котрі реагують на численні сигнали, що виникають внаслідок дестабілізації внутрішнього середовища [4].

При включенні мононуклеарних фагоцитів у той чи інший біологічний процес, змінюється їх функціональна активність за рахунок активації, що супроводжується певними структурно-функціональними змінами [8, 9]. Зважаючи на важливу роль у патогенезі хронічних захворювань гепатобіліарної системи порушень функціональної активності мононуклеарних фагоцитів,

можна вважати доцільним їх дослідження за умови гепатопульмонального синдрому [3, 12].

Метою нашого дослідження було дослідити фагоцитарну та метаболічну активність моноцитів крові щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** Досліди проводили на 56 безпородних щурах-самцях масою 180–220 г. У процесі моделювання патології 8 тварин загинуло.

Першу експериментальну модель гепатопульмонального синдрому ми створювали шляхом накладання подвійної лігатури на загальну жовчовивідну протоку і подальше її пересічення скальпелем [11]. У першій контрольній групі тварин загальну жовчовивідну протоку було відділено від тканин, але не пересікали. Післяопераційну рану пошарово наглухо зашивали. На 31 добу після операції тварин виводили з експерименту під тіопенталовим наркозом.

Другу експериментальну модель ГПС було створено шляхом 8-тижневого внутрішньошлункового введення олійного розчину  $CCl_4$  (400 г на 1 л) в дозі 0,5 мл на 100 г маси тіла тварини у перший день експерименту, 0,3 мл на 100 г на третій день експерименту і далі кожного третього дня до закінчення експерименту 0,3 мл на 100 г. Додатково в раціон щурів було введено суміш кукурудзяної муки, смальцю і холестеролу та розчин алкоголю. Друга контрольна група тварин перебувала на стандартному раціоні віварію і отримувала внутрішньошлунково оливкову олію в еквівалентній кількості [14].

Утримання тварин та експерименти проводили відповідно до положень Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей [10].

Популяцію моноцитів крові отримували за допомогою центрифугування на подвійному градієнті щільності 1,077 і 1,093 фіколу-верографіну. Після 40 хв центрифугування при температурі 4 °С і швидкості 1500 об./хв утворювалися дві інтерфази. Верхня інтерфаза (на межі плазма-верифікол щільністю 1,077) складалася із мононуклеарних клітин – 80 % лімфоцитів, 15–18 % моноцитів і незначного (2–3 %) додатка гранулоцитів. Розподіл лімфоцитів і моноцитів здійснювали методом ізокінетичного центрифугування протягом 5 хв при 400 об./хв у градієнті фіколу-верографіну щільністю 1,060 [6].

В якості тест-системи для вивчення фагоцитарної активності моноцитів використовували стандартні частинки латексу для фагоцитозу (10 % полістирольна суспензія) (“Диазм”, Росія) [1] і визначали: фагоцитарну активність (ФА) за кількістю фагоцитуючих клітин зі 100 підрахованих (%); фагоцитарний індекс (ФІ) за кількістю фагоцитованих частинок латексу, які захоплені однією клітиною, даний показник характеризує поглинальну здатність фагоцитів; фагоцитарне число (ФЧ) (кількість фагоцитованих частинок латексу на 100 підрахованих клітин).

Вираховували фагоцитарне число (ФЧ) і фагоцитарний індекс (ФІ) за формулами:  $ФІ = \text{кількість фагоцитованих частинок латексу} / \text{ФА}$ ;  $ФЧ = \text{кількість фагоцитованих частинок латексу} / 100$ .

Киснезалежну бактерицидну активність моноцитів вивчали за допомогою тесту з нітросинім тетразолієм (НСТ-тест), що базується на здатності відновлення поглиненого фагоцитом розчинного барвника нітросинього тетразолію в нерозчинний диформазаан, який розподіляється в цитоплазмі або на поверхні фагоцитів у вигляді гранул, зафарбованих у темно-синій колір, під впливом супероксиданіону, що утворюється в НАДФ - Н-оксидазній реакції [1, 2].

Розрізняють два варіанти НСТ-тесту: спонтанний та активований. При постановці спонтанного НСТ-тесту моноцити культивувалися в присутності нітросинього тетразолію без попередньої активації клітин, при проведенні індукованого НСТ-тесту до середовища культивування додавали латексну суспензію в якості активатора фагоцитарної реакції.

НСТ-тест оцінювали шляхом підрахунку 100 моноцитів на наявність у цитоплазмі гранул і зерен диформазаану. Виводили відсоток диформазаанпозитивних клітин (гранули барвника займають не менше 1/4 частини цитоплазми) у спонтанному тесті та в активованому.

Для характеристики резервних можливостей оксигензалежного метаболізму визначали показник резерву (ПР) і коефіцієнт метаболічної активації (К).  $ПР = АВ / СВ$ ;  $К = АВ - СВ / АВ$ , де:

АВ – % диформазаанпозитивних клітин в активованому тесті;

СВ – % диформазаанпозитивних клітин у спонтанному тесті.

Статистичну обробку отриманих результатів проводили з визначенням t-критерію Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ** У щурів першої експериментальної групи (на 31 добу після перев'язки загальної жовчовивідної протоки) зафіксовано зниження фагоцитарної активності моноцитів у 2,5 раза ( $p < 0,001$ ) відносно першої контрольної групи щурів (табл. 1). У щурів другої експериментальної групи (після 8-тижневого введення тетраклорметану) ми встановили також зниження фагоцитарної активності моноцитів у 2,2 раза ( $p < 0,001$ ) відносно другої контрольної групи щурів. При порівнянні

ФА моноцитів крові тварин обох експериментальних груп достовірних змін ми не виявили ( $p > 0,05$ ).

При підрахунку фагоцитарного індексу – показника, що характеризує поглинальну здатність моноцитів, ми виявили його зменшення в 1,9 раза у щурів обох експериментальних груп ( $p < 0,001$ ).

Фагоцитарне число – кількість фагоцитованих частинок латексу на 100 підрахованих моноцитів також зменшувалося. У щурів першої експериментальної групи зафіксовано зменшення ФЧ у 4,8 раза ( $p < 0,001$ ) відносно першої контрольної групи щурів. У щурів другої експериментальної групи ми встановили зменшення ФЧ у 4,1 раза ( $p < 0,001$ ) відносно другої контрольної групи щурів. Порівнюючи ФЧ моноцитів крові тварин обох експериментальних груп, достовірних змін ми не виявили ( $p > 0,05$ ).

Оскільки при цирозі знижується детоксикаційна функція печінки, то зменшення фагоцитарної активності моноцитів крові може бути пов'язане з негативним впливом продуктів тканинного розпаду, ендотоксинів, циркулюючих імунних комплексів, що зумовлюють функціональне перевантаження клітин [7].

Кількість диформазаанпозитивних клітин у спонтанному НСТ-тесті в щурів першої експериментальної групи збільшилася на 75,8 % ( $p < 0,001$ ) відносно першої контрольної групи щурів (табл. 2). Кількість диформазаанпозитивних клітин у щурів другої експериментальної групи збільшилася на 95,6 % ( $p < 0,001$ ) відносно до контрольної групи щурів. Порівнюючи результати обох експериментальних груп, варто зауважити, що кількість диформазаанпозитивних клітин у щурів другої експериментальної групи була більшою на 12,9 % ( $p < 0,05$ ).

Досліджуючи аналогічний показник при постановці активованого НСТ-тесту, ми отримали протилежно направлені результати. У щурів першої експериментальної групи зафіксовано зменшення кількості диформазаанпозитивних клітин на 32,1 % відносно першої контрольної групи щурів ( $p < 0,001$ ). У щурів другої експериментальної групи даний показник також зменшився, але більш виражено – на 46,4 % відносно другої контрольної групи щурів ( $p < 0,001$ ).

Порівнюючи результати обох експериментальних груп, варто зауважити, що кількість диформазаанпозитивних клітин у щурів другої експериментальної групи була меншою на 15,9 % ( $p < 0,05$ ).

**Таблиця 1. Показники фагоцитарної активності моноцитів крові у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом ( $M \pm m$ )**

Дослідна група	Перша контрольна група (n=12)	Перша експериментальна група (n=12)	Друга контрольна група (n=12)	Друга експериментальна група (n=12)
Фагоцитарна активність (%)	77,50±2,30	31,20±1,46 $p_1 < 0,001$	75,16±2,77	34,53±1,97 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
Фагоцитарний індекс	5,88±0,19	3,03±0,23 $p_1 < 0,001$	5,98±0,21	3,15±0,19 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$
Фагоцитарне число	4,55±0,11	0,95±0,06 $p_1 < 0,001$	4,48±0,11	1,08±0,07 $p_1 < 0,001$ $p_2 > 0,05$

Примітки: 1.  $p_1$  – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами;

2.  $p_2$  – різниця достовірна порівняно з ураженими тваринами.

Таблиця 2. Показники НСТ-тесту моноцитів крові у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом (M±m)

Дослідна група	Перша контрольна група (n=12)	Перша експериментальна група (n=12)	Друга контрольна група (n=12)	Друга експериментальна група (n=12)
Кількість диформазапозитивних клітин в активованому тесті (%)	28,05 ± 1,37	19,05 ± 1,0 p <sub>1</sub> <0,001	29,92 ± 1,79	16,03 ± 0,74 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05
Кількість диформазапозитивних клітин у спонтанному тесті (%)	17,23 ± 0,71	30,30 ± 1,29 p <sub>1</sub> <0,001	17,48 ± 0,55	34,20 ± 1,18 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,05
Показник резерву	1,62 ± 0,04	0,63 ± 0,008 p <sub>1</sub> <0,001	1,71 ± 0,10	0,47 ± 0,019 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,001
Коефіцієнт метаболічної активації	27,43 ± 1,38	17,46 ± 1,02 p <sub>1</sub> <0,001	29,33 ± 1,82	13,88 ± 0,81 p <sub>1</sub> <0,001 p <sub>2</sub> <0,02

Примітки: 1. p<sub>1</sub> – різниця достовірна порівняно з контрольними тваринами;  
2. p<sub>2</sub> – різниця достовірна порівняно з ураженими тваринами.

Показник резерву в щурів першої експериментальної групи зменшувався в 2,6 раза відносно першої контрольної групи щурів (p<0,001). У щурів другої експериментальної групи даний показник також зменшувався, але більш виражено – в 3,6 раза відносно другої контрольної групи щурів (p<0,001) (рис. 1).

Порівнюючи результати обох експериментальних груп ми зафіксували на 25,4 % інтенсивніше зменшення показника резерву в щурів другої експериментальної групи (p<0,001).

Аналогічну тенденцію до зменшення ми виявили при підрахунку коефіцієнта метаболічної активації. У щурів першої експериментальної групи зафіксовано зменшення даного показника на 36,4 % відносно першої контрольної групи щурів (p<0,001), а у щурів другої експериментальної групи – на 52,7 % відносно другої контрольної групи щурів (p<0,001).

При порівнянні результатів обох експериментальних груп ми зафіксували на 20,5 % інтенсивніше зменшення показника резерву в щурів другої експериментальної групи (p<0,02).

З функціональної точки зору фагоцити можуть перебувати у двох станах – спокої та активованому. В нормі в активованому стані знаходиться невелика кількість фагоцитів. Поява подразника різко змінює цей показник, відображаючи підключення фагоцитів до реакцій, спрямованих на корекцію внутрішнього середовища організму. Метаболічна перебудова стимульованих фагоцитів відбувається миттєво (“респіра-

торний вибух”), її основу складають киснезалежні реакції, у процесі яких утворюються активні форми кисню: супероксидний аніон, синглетний кисень, гідроксильний радикал, гіпохлорид. Утворення активних форм кисню пов'язане з ферментом нікотинаміддинуклеотидфосфатом відновленим (НАДФН):O<sub>2</sub>-оксидоредуктазою або НАДФН-оксидазою, локалізованою у плазматичній мембрані, в мембранах фагосом, у внутрішньоклітинних мембранах. Окиснювальний метаболізм фагоцитів не тільки забезпечує їх енергетичні потреби, але й паралельно реалізує захисну функцію шляхом генерації та звільнення сполук активованого кисню під час вільнорадикального окиснення [5].

Спонтанний НСТ-тест дозволяє оцінити ступінь активації киснезалежних механізмів кілінгу неактивованих фагоцитів. Він відображає активність інтралейкоцитарної бактерицидної системи, як однієї з важливих ланок неспецифічної резистентності організму.

Значення активованого НСТ-тесту характеризує активність фагоцитуючих клітин у присутності антигенного подразника і розглядається, як біологічний критерій їх готовності до завершеного фагоцитозу.

Виразене зростання показників спонтанного НСТ-тесту вказує на підвищення киснезалежної бактерицидної активності моноцитів крові у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом, що свідчить про появу в периферійній крові великої кількості субстанцій, які здатні підвищувати функціональну активність цих клітин. Зокрема, ними можуть бути і цитокіни.

Зниження показників активованого НСТ-тесту, показника резерву та коефіцієнта метаболічної активації моноцитів крові у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом вказує на виснаження метаболічних резервів цих клітин та порушення процесу фагоцитозу.

**ВИСНОВКИ** 1. У щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом спостерігаються виражені порушення фагоцитарної та метаболічної активності моноцитів крові, що проявилися пригніченням фагоцитарної активності, зменшенням поглинальної здатності, підвищенням киснезалежних механізмів кілінгу та виснаженням метаболічних резервів.

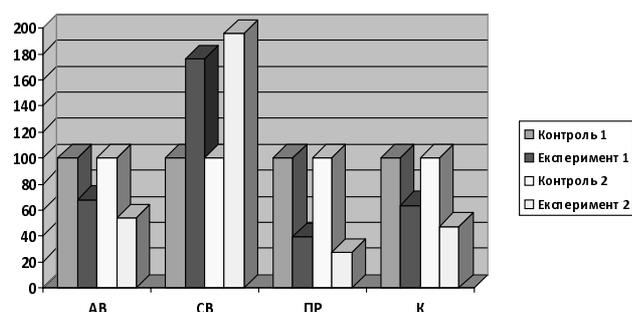


Рис. 1. Зміни показників НСТ-тесту експериментальних тварин у відсотках.

2. Серед досліджуваних показників функціональної активності моноцитів крові найбільш виражених змін зазнали показники спонтанного НСТ-тесту, що відображає зростання киснезалежної бактерицидної дії фагоцитів та доповнює уявлення про патогенез гепатопульмонального синдрому.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Исследование поглотительной и метаболической активности нейтрофилов периферической крови у детей раннего возраста / Г. И. Гордиенко, Т. М. Бородина, Т. А. Дудина, Г. А. Самсыгина // Педиатрия. – 2003. – № 5. – С. 1–11.
2. Громов С. А. Диагностика клинко-нейроиммунологических нарушений у больных эпилепсией с синдромом энцефалопатии, их иммунокоррекция и лечение / С. А. Громов, Л. В. Липатова // Методические рекомендации. – СПб., 2010. – 27 с.
3. Єлізарова Т. О. Показники фагоцитарної активності моноцитів у хворих на неалкогольний стеатогепатит / Т. О. Єлізарова, Л. В. Кузнецова // Український морфологічний альманах. – 2010. – Т.8, № 4. – С. 64–66.
4. Функціональна активність клітин фагоцитарної системи при папіломавірусній інфекції статевих органів жінок / В. П. Лакатош, Л. М. Лазаренко, М. Я. Співак [та ін.] // Український медичний часопис. – 1999. – № 4(12). – С. 119–122.
5. Найда І. В. Фагоцитуючі клітини та їх роль при туберкульозі / І. В. Найда // Режим доступу <http://www.ifp.kiev.ua/doc/staff/fagocidcell.htm>
6. Кисеньзалежні функції фагоцитів у хворих на хронічне обструктивне захворювання легень / Є. М. Нейко, П. Р. Герич, М. М. Островський, Л. М. Томашук // Здобутки клінічної і експериментальної медицини. – 2010. – № 1. – С. 100–104.
7. Парахонский А. П. Изменение функциональных свойств фагоцитов при заболеваниях пищеварительной системы / А. П. Парахонский // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 8. – С. 72–73.
8. Фрейдлин И. С. Система мононуклеарных фагоцитов / И. С. Фрейдлин. – М. : Медицина, 1984. – 272 с.
9. Адгезивные и поглотительные свойства макрофагов в норме, при острой и хронической воспалительной патологии у женщин репродуктивного возраста / И. А. Храмова, И. П. Кольцов, Т. К. Бурлова, К. Р. Гурбанов // Дальневосточный медицинский журнал. – 2010. – № 1. – С. 29–31.
10. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. – Council of Europe. Strasbourg. – 1986. – № 123. – 52 p.
11. Common bile duct ligation in the rat: a model of intrapulmonary vasodilatation and hepatopulmonary syndrome / M. B. Fallon, G. A. Abrams, J. W. McGrath [et al.] // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 272. – P. 779–784.
12. Heymann F. Monocytes and macrophages as cellular targets in liver fibrosis / F. Heymann, C. Trautwein, F. Tacke // Inflamm. Allergy Drug Targets. – 2009. – Vol. 8 (4). – P. 307–318.
13. Hume D. A. The mononuclear phagocyte system / D. A. Hume // Curr Opin Immunol. – 2006. – Vol. 18(1). – P. 49–53.
14. Multiple pathogenic factor-induced complications of cirrhosis in rats: A new model of hepatopulmonary syndrome with intestinal endotoxemia / Hui-Ying Zhang, De-Wu Han, Zhong-Fu Zhao [et al.] // World J. Gastroenterology. – 2007. – Vol. 13 (25). – P. 3500–3507.

Отримано 25.01.13