



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи  
•Experimental and Theoretical articles•

Биол. журн. Армении, 1 (61), 2009

## ВЛИЯНИЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ И ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ НА ФАГОЦИТОЗ НЕЙТРОФИЛАМИ *E. COLI*

П. Н. САВИЛОВ

Воронежская государственная медицинская академия им. Н. Н. Бурденко  
E-mail: p\_savilov@rambler.ru

В опытах на 82 беспородных белых крысах (самках) исследовали влияние резекции печени (РП, 15-20% массы органа) и ее сочетания с гипербарической оксигенацией (ГБО, 3 ата, 50 мин, 1 сеанс в сутки, трехкратно) на способность нейтрофилов артериальной и венозной (портальная вена, печеночные вены) крови поглощать *E.coli* (*Escherichia coli*). Установлено, что в условиях ГБО ограничивается ингибирующее влияние печени на фагоцитоз-стимулирующую способность нейтрофилов для *E.coli*. В постгипероксическом периоде данная функция оперированной печени нормализуется. ГБО предупреждает развивающуюся при РП задержку в оперированном органе нейтрофилов, активно фагоцитирующих *E.coli*.

*Гипероксия – печень – резекция – нейтрофилы – кишечная палочка  
– фагоцитоз*

Ոչ ցեղական 82 սպիտակ առնետների վրա կատարված փորձերում (եզեր) հետազոտել ենք յարդի մասնատման (ԼՄ, օրգանի զանգվածի 15-20%) և դրա հետ համատեղ հիպերբարիկ օքսիգենացման (ՀԲՕ, 3 ата, 50 րոպե, 1 սեսան/օր երեք անգամ) ազդեցությունը զարկերակային և երակային արյան (դռներակային երակ, յարդի երակներ) նեյտրոֆիլների *E. coli*-ն կլանելու ունակության վրա: Հաստատված է, որ ՀԲՕ-ի պայմաններում նվազում է յարդի արգելակող ազդեցությունը *E. coli*-ն ֆագոցիտոզի ենթարկելու նեյտրոֆիլների ունակության վրա: Ետհիպերոքսիկ շրջանում վիրահատված յարդի տվյալ գործառույթը կանոնավորվում է: ՀԲՕ-ն կանխում է զարգացող *E. coli*-ն ակտիվորեն ֆագոցիտոզ կատարող նեյտրոֆիլների կանգը վիրահատված օրգանում, որը սովորաբար զարգանում է ԼՄ-ի ժամանակ:

*Հիպերօքսիա – յարդ – մասնատում – նեյտրոֆիլներ – աղիքային ցուպիկ  
– ֆագոցիտոզ*

Experiments were conducted on 82 outbred female albino rats exposed to liver resection (LR, 25-29% of the organ mass) and hyperbaric oxygenation (HBO, at 3 ata, for 50 min once, three times per day within the first three days after surgery). The capacities of neutrophils of arterial (aorta) and venous (portal vein, hepatic veins) blood to ingest and digest *E. coli* were investigated. Under HBO, the inhibitory

impact of LR on the phagocytosis-stimulating ability of the liver to *E. coli* was limited for neutrophils. In the posthyperoxic period, the phagocytosis-stimulating function of the operated liver was found to be normalized. HBO prevented the post-LR delay of the neutrophils which actively englobe *E. coli* in the operated organ.

*Hyperoxia – liver – resection – neutrophils – E. coli – phagocytosis*

Исследованиями последних лет установлено, что печень млекопитающих способна стимулировать поглотительную способность фагоцитов (нейтрофилы, моноциты) в отношении Грам(+) и Грам(-) микроорганизмов [7], одновременно регулируя бактерицидную активность гуморальных факторов крови [6]. Установлено, что удаление уже небольшого объема печени (15-20% массы органа) нарушает антистафилококковую активность нейтрофилов и моноцитов [8]. Состояние поглотительной способности нейтрофилов и моноцитов в отношении естественного симбионта организма млекопитающих *E. coli* после резекции печени (РП) в настоящее время не известно.

Известно, что гипербарический кислород способен устранять вызываемые РП нарушения стимулирующего влияния печени на поглотительную способность нейтрофилов в отношении золотистого стафилококка [8]. Влияние гипербарической оксигенации (ГБО) на способность оперированной печени изменять поглотительную способность нейтрофилов к *E. coli* не изучено.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния РП и ее сочетания с ГБО на способность нейтрофилов поглощать *E. coli* как в притекающей, так и в оттекающей от печени крови.

**Материал и методика.** Опыты проведены на 82 беспородных белых крысах (самках) массой 170-220 г. Резекцию печени проводили на фоне эфирного наркоза, удаляя электроножом часть левой доли печени (15-20% массы органа). Операционное поле очищали от шерсти, обрабатывали раствором хлорамина. Хирургический инструментарий подвергали стерилизации по общепринятой методике. После удаления части печени и контроля гемостаза ушивали мышечный слой брюшной стенки кетгуттом. На кожу накладывали П-образные шелковые швы, которые предотвращают кожные края раны от подвертывания и тем самым ускоряют процесс заживления. Антибиотики и антисептики парэнтерально не вводили. Частота послеоперационных нагноений – 2,5%. Животные с послеоперационными нагноениями из опыта исключались. ГБО проводили медицинским кислородом в первые трое суток после операции, в режиме 3 ата, 50 мин, по 1 сеансу в сутки. Первый сеанс начинали через 4-8, второй и третий – соответственно через 24 и 48 ч после операции. Все животные были разделены на 10 серий опытов: 1 серия – интактные животные (норма); 2, 3, 4 серии – животные, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сут после лапаротомии («ложнооперированные» животные). 5, 6, 7 серии – животные, исследованные соответственно на 3-и, 7-е и 14-е сут после РП. Эти серии служили контролем для выявления «чистого» эффекта ГБО. 8, 9, 11 серии – оксигенированные животные с РП, исследованные на 3-и, 7-е и 14-е сут послеоперационного (1-е, 4-е и 11-е сут постгипероксического) периода соответственно. Животных выводили из эксперимента декапитацией на фоне этаминалового наркоза (40 мг этаминала натрия/кг).

Объектами исследования служили нейтрофилы артериальной крови (АК) и венозной крови: кровь воротной вены (КВВ) и кровь печеночных вен (КПВ).

Артериальную кровь получали пункцией аорты, венозную – соответственно пункцией портальной вены и печеночных вен. Получение крови из печеночных вен осуществляли по разработанной ранее методике [6]. Последовательность забора крови составляла: печеночные вены → портальная вена → аорта. Фагоцитарную активность нейтрофилов и моноцитов определяли по их способности поглощать убитые нагреванием микробы [9]. Для этого 0,1 мл гепаринизированной крови инкубировали с 0,05 мл монозвеси *E. coli* (штамм К-12), убитой нагреванием, в концентрации 500 млн микробных тел/мл и 0,05 мл физиологического раствора в течение 30 мин при 37<sup>0</sup>, встряхивая через каждые 5 мин. По завершении инкубации пробирки помещались на 2 мин в ледяную воду, далее центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин. Плазму удаляли микродозатором, а из верхнего слоя осадка готовили мазки и окрашивались по Романовскому. Подсчет фагоцитированных микроорганизмов проводили под микроскопом «БИОЛАМ» ув.100, ок12. Определяли следующие показатели: фагоцитарное число нейтрофилов (ФЧн) - % клеток, поглотивших тест-микроб за единицу времени. ФЧн рассчитывали на 100 нейтрофилов. Одновременно рассчитывали фагоцитарный индекс нейтрофилов (ФИн) - среднее количество тест-микробов, поглощенных одной клеткой. Этот показатель характеризует интенсивность поглощения микроба фагоцитами. Результаты обработаны статистически с учетом непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Результаты считались достоверными при  $p < 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** Как видно из таблицы 1, у интактных крыс ФЧн к *E. coli* в КПВ достоверно превышало аналогичный показатель в АК и КВВ соответственно на 52% и 61%. ФИн у интактных животных достоверно не различался и составил в АК, КВВ и КРВ  $5,27 \pm 0,25$ ;  $5,64 \pm 1,6$  и  $5,27 \pm 0,3$  соответственно.

Таблица 1. Динамика фагоцитарного числа нейтрофилов по отношению к *E. coli* в крови после резекции печени и гипербарической оксигенации (  $M \pm m$  )

Сроки послеоперационного, (постгипероксического) периода, сутки		Кровь		
		артериальная	воротной вены	печеночных вен
Норма, n=10		$33,3 \pm 2,1$	$31,3 \pm 2,54$	$50,0 \pm 2,6^{\blacktriangle}$
3 (1)	ЛО, n=9	$25,8 \pm 2,7$	$33,3 \pm 3,2$	$38,4 \pm 3,1^{\blacktriangle*}$
	РП, n=9	$38,4 \pm 3,96^{\blacklozenge}$	$30,6 \pm 1,92$	$26,8 \pm 2,9^{\blacktriangle* \blacklozenge}$
	РП+ГБО, n=10	$24,0 \pm 2,8^{**}$	$30,5 \pm 2,23$	$35,8 \pm 2,8^{\blacktriangle**}$
7 (4)	ЛО, n=10	$31,9 \pm 2,9$	$35,3 \pm 2,64$	$54,8 \pm 4,2^{\blacktriangle}$
	РП, n=9	$49,4 \pm 4,7^{\blacklozenge}$	$49,2 \pm 3,0^{\blacklozenge}$	$37,3 \pm 3,3^{\blacktriangle \blacklozenge}$
	РП+ГБО, n=8	$46,9 \pm 4,8^{\blacklozenge*}$	$38,5 \pm 3,9^{\bullet}$	$58,5 \pm 4,5^{\blacktriangle \blacklozenge \bullet}$
14 (11)	ЛО, n=10	$34,3 \pm 4,4$	$36,1 \pm 3,8$	$49,5 \pm 5,3^{\blacktriangle}$
	РП, n=8	$37,5 \pm 3,8$	$37,6 \pm 3,1$	$35,1 \pm 2,8^{\blacklozenge}$
	РП+ГБО, n=8	$37,1 \pm 1,95$	$34,0 \pm 1,3$	$53,9 \pm 3,3^{\blacktriangle \blacklozenge \bullet}$

Примечание. ЛО- «ложнооперированные» животные, РП – животные с резекцией печени, РП+ГБО – животные с резекцией печени и гипербарической оксигенацией, n – число животных по сериям опытов; \*( $p < 0,05$ ) - достоверность различий по сравнению с нормой;  $\blacktriangle$  ( $p < 0,05$ ) – с аналогичным показателем артериальной и портальной крови данной серии соответственно;  $\blacklozenge$  и  $\bullet$  ( $p < 0,05$ ) – по сравнению с аналогичным показателем послеоперационного периода «ложнооперированных» животных и животных с РП соответственно.

Следовательно, интактная печень, увеличивая в крови количество нейтрофилов, активно фагоцитирующих *E. coli*, не влияет на интенсивность поглощения ими данного микроба.

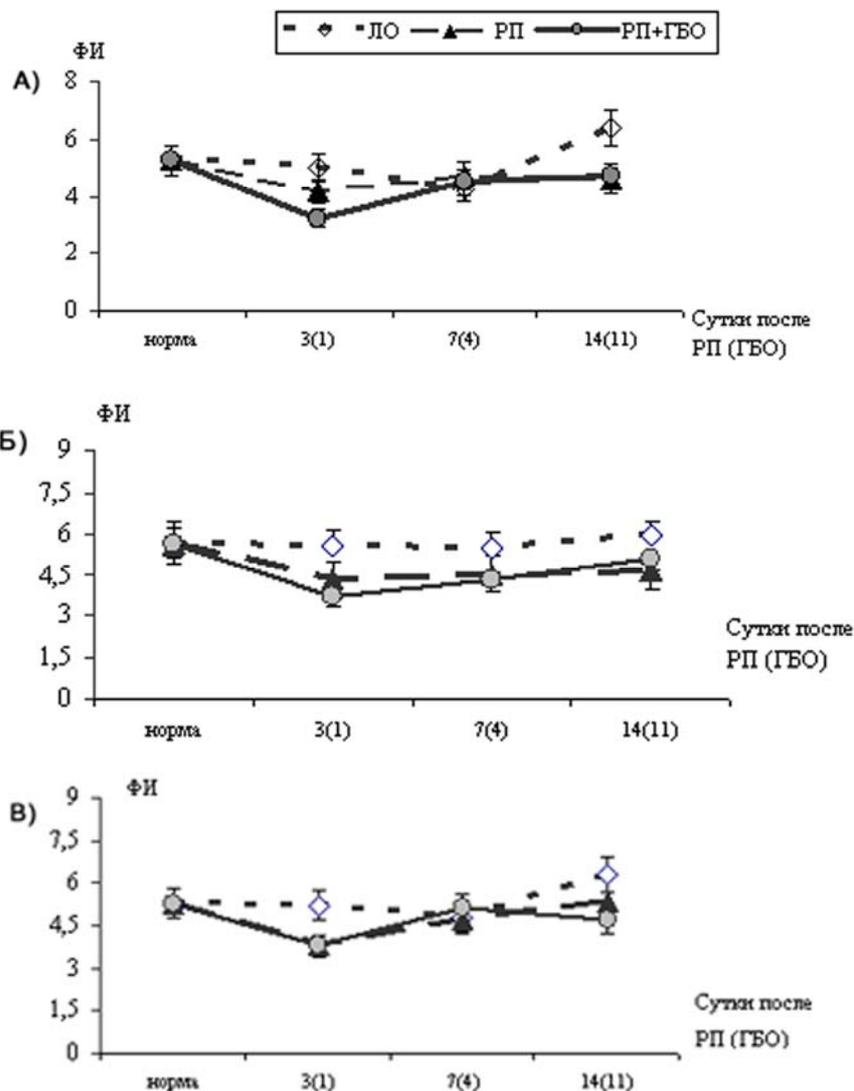
Нарушение целостности брюшной полости посредством лапаротомии вызывало кратковременное (на 3-и сут после операции) снижение на 24% по сравнению с нормой ФЧн к *E. coli* только в КПВ. Фин к *E. coli* в этот период достоверно не менялся, но избирательно увеличивался на 14-е сут после лапаротомии в АК и КПВ (табл. 1). Следовательно, лапаротомия, вызывая кратковременное ограничение стимулирующего влияния печени на фагоцитарную активность нейтрофилов к *E. coli*, создает условия для отсроченного увеличения интенсивности поглощения ими данного микроба в артериальной крови и крови печеночных вен.

Дополнение лапаротомии РП вызывало значимое по сравнению с нормой снижение ФЧн в КПВ на 3-и, 7-е и 14-е сут послеоперационного периода соответственно на 46%, 25% и 30% (табл. 1). При этом на 3-и и особенно на 7-е сут послеоперационного периода ФЧн в оттекающей от печени крови становилось достоверно ниже по сравнению с аналогичным показателем в притекающей к ней крови (табл. 1). Одновременно достоверно увеличивалось по сравнению с «ложнооперированными» животными ФЧн в АК на 3-и и 7-е сут послеоперационного периода соответственно на 49% и 91%. В последнем случае это сопровождалось сохранением повышенного показателя в КВВ (табл. 1) Из этого следует, что механическое повреждение печени не только нарушает способность этого органа «обогащать» кровь нейтрофилами, активно фагоцитирующими *E. coli*, но и приводит к частичной ретенции в нем клеток. Это сопровождается активацией внепеченочных механизмов, направленных на увеличение содержания в артериальной и портальной крови нейтрофилов, активно фагоцитирующих *E. coli*, но истощающихся к 14-м сут послеоперационного периода.

В отличие от ФЧ нейтрофилов их ФИ при РП снижался в притекающей и оттекающей от печени крови на 3-и сут послеоперационного периода, по сравнению как с нормой, так и с «ложнооперированными» животными. При этом к 14-м сут послеоперационного периода ингибирующее влияние РП на интенсивность поглощения нейтрофилами *E. coli* сохранялось (рис. 1).

Следовательно, механическое повреждение печени устраняет механизмы, запускаемые непосредственно лапаротомией и направленные на отсроченное увеличение в артериальной крови и крови печеночных вен нейтрофилов, максимально поглощающих *E. coli*.

Как видно из табл. 1, в условиях гипероксии (3-и сут после РП) ФЧн к *E. coli* в КПВ на 34% превышало аналогичный показатель животных с РП без ГБО, но при этом оставалось на 28% ниже нормы. Однако появлялось достоверное различие между ФЧн в КПВ и АК. Это указывает, во-первых, на ограничение в условиях применения ГБО снижения способности оперированной печени «обогащать» кровь нейтрофилами, активно фагоцитирующими *E. coli*; во-вторых, ослабление при гипероксии ретенции последних в оперированной печени.



**Рис. 1.** Динамика фагоцитарного индекса нейтрофилов в артериальной крови (А), крови воротной вены (Б) и крови печеночных вен (В) после резекции печени и гипербарической оксигенации.

По оси абсцисс – сутки послеоперационного (постгипероксического) периода.

По оси ординат – абсолютная величина ФИ. ЛО – «ложнооперированные» животные.

В первые сутки постгипероксического периода выявлено избирательное снижение относительно здоровых животных и животных с РП без ГБО, ФЧн в АК, которое прекращалось к 4-м сут постгипероксического периода, но при этом появлялось отсроченное ингибирующее влияние ГБО на ФЧн в КВВ (табл. 1). При этом восстанавливалось достоверное превышение ФЧн в КПВ над аналогичным показателем в АК и КВВ (табл. 1). Это свидетельствует о нормализации в постгипероксическом периоде способности оперированной печени «обогащать» кровь нейтрофилами, активно-фагоцитирующими *E. coli*.

Исследование ФИн к *E. coli* в первые сутки постгипероксического периода выявило сохранение негативного влияния РП на данный показатель в КВВ и КПВ в условиях гипероксии при его усилении в АК (рис. 1).

Прекращение гипероксического воздействия на организм не оказывало существенного влияния на исследуемый показатель фагоцитоза (рис. 1). Следовательно, ингибирующее влияние ГБО на интенсивность поглощения *E. coli* нейтрофилами определяется длительностью гипероксического воздействия и только для клеток, находящихся в артериальной крови.

Общеизвестно, что в крови циркулируют два пула нейтрофилов - «дремлющие» и «активные», различающихся по фагоцитарной активности [1], которая традиционно оценивается по величинам ФЧ и ФИ [9]. Если первый характеризует количество клеток, находящихся в «активном» пуле фагоцитов, то второй отражает количество микробов, поглощенных одним «активным» фагоцитом и зависит от количества рецепторов на мембране последнего. Анализ изменений ФЧн и ФИн к *E. coli* позволяет говорить о том, что увеличение поглотительной способности нейтрофилов к указанному микробу при прохождении крови по печеночным синусоидам достигается не экспрессией рецепторов на поверхности данных клеток, а обогащением нейтрофилов «дремлющего» пула рецепторами *de novo*. Аналогичный процесс обнаружен в культуре неактивных макрофагов, инкорпорирующих на своих мембранах при контакте с «активными» фагоцитами белок C<sub>1q</sub> системы комплемента, выступающий в роли Fc-рецептора [10]. РП нарушает этот процесс, что приводит к снижению ФЧн к *E. coli* в оттекающей от оперированной печени крови (табл. 1). Одновременно при РП нарушается поглотительная функция печеночных макрофагов – клеток Купфера [4], содействуя появлению в центральном кровотоке кишечной палочки, имеющейся в норме только в крови воротной вены [3]. Вероятно, последнее и активирует «внепеченочные» механизмы увеличения содержания в крови оперированных крыс нейтрофилов, активно фагоцитирующих *E. coli*. При этом наблюдающуюся после РП ретенцию части «активных» нейтрофилов в оперированном органе следует рассматривать как компенсаторную реакцию организма в ответ на нарушение антимикробной функции печени. В результате в оперированном органе формируется своеобразный нейтрофильно-моноцитарный антимикробный барьер [8], берущий на себя антимикробную функцию купферовских клеток, которые переключаются после РП на регуляцию репаративных процессов гепатоцитов [2]. К компенсаторной реакции при РП следует отнести и снижение содержания в крови нейтрофилов, максимально поглощающих *E. coli*. Есть все основания говорить об увеличении их выхода из сосудистого русла не только в интерстициальное пространство оперированной печени, но и органов пищеварительного тракта, что приводит к увеличению местного иммунитета последнего.

Применение трехдневного курса ГБО восстанавливает нарушаемую РП способность данного органа «обогащать» кровь активно фагоцитирующими *E. coli* нейтрофилами. При этом лечебный эффект ГБО развивается не сразу, а постепенно, в динамике постгипероксического состояния, под которым понимают совокупность функционально-метаболических

и морфогенетических изменений, формирующихся в организме после прекращения гипероксического воздействия [5].

Это дает основание говорить о последовательном вовлечении в гипероксической саногенез физиологических реакций, детерминирующих фагоцитозстимулирующую функцию печени и нарушаемых при РП. Восстановление ГБО стимулирующего влияния оперированной печени на фагоцитарную активность в отношении *E.coli* устраняет необходимость во «внепеченочных» механизмах перевода нейтрофилов из «дремлющего» пула в активно фагоцитирующие *E.coli* клетки, активируемых РП.

Таким образом, применение в первые трое суток после РП курса ГБО создает условия для устранения вызываемого операцией нарушения способности печени «обогащать» кровь нейтрофилами, активно фагоцитирующими *E.coli*. Лечебный эффект ГБО сохраняется к 14-м сут послеоперационного периода, чего нельзя сказать о животных с РП без ГБО.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Адо А. Д. Патофизиология фагоцитов. М.: Медгиз, 1961.
2. Маянский Д. Н., Щербаков В. И., Шимек И. Бюлл. эксперим. биол. и медицины, 5, 50-54, 1985.
3. Маянский Д. Н., Виссе Э., Деккер К. Новые рубежи в гепатологии. Новосибирск, Изд-во НГУ, 1982.
4. Плющ И. В., Цырендоржиев Д. Д., Маянский Д. Н. Бюлл. эксперим. биол. и медицины, 5, 477-479, 1995.
5. Савилов П. Н. Бюлл. гипербарич. биол. и медицины, 7, 1-4, 121-122, 1999.
6. Савилов П. Н., Кузьмина Н. И., Дьячкова С. Я. Вестник ВГУ. Серия: Проблемы химии, биологии. Воронеж, 1: 41-43, 2001.
7. Савилов П. Н. Росс. физиол. журнал. 90, 8, Приложение. Часть 2: 121, 2004.
8. Савилов П. Н. Общая реаниматология, 4, 5, 40-44, 2008.
9. Учитель И. Я. Макрофаги в иммунитете. М.: Медицина, 1978.
10. Yagawa K., Onone K., Aida K. J. Immunol. 122, 1, 366-373, 1979.

Поступила 09.12.2008