



Биол. журн. Армении, 2 (64), 2012

ФАГОЦИТОЗ МОНОЦИТАМИ *ESCHERICHIA COLI* ПОСЛЕ РЕЗЕКЦИИ ПЕЧЕНИ И ГИПЕРБАРИЧЕСКОЙ ОКСИГЕНАЦИИ

П.Н. САВИЛОВ

*Тамбовский государственный технический университет,
Воронежская государственная медицинская академия им. Н.Н. Бурденко
p_savilov@rambler.ru*

В опытах на 82 беспородных белых крысах (самках) изучали влияние резекции печени (РП, 15-20% массы органа) и её сочетания с гипербарической оксигенацией (ГБО, 3 ата, 50 мин, 1 сеанс в сутки, трёхкратно) на способность нейтрофилов артериальной (аорта) и венозной (портальная вена и печёночные вены) крови поглощать *E. coli* (*Escherichia coli*). Установлено, что ГБО устраняет ингибирующее влияние РП на способность печени стимулировать поглощение моноцитами *E.coli*. К 11-м суткам постгипероксического периода данное стимулирующее влияние оперированной печени усиливается. ГБО устраняет вызываемое операцией увеличение интенсивности поглощения *E.coli* в крови моноцитами. Одновременно с этим предотвращает задержку в оперированной печени моноцитов, активно фагоцитирующих *E.coli*.

Гипероксия – печень – резекция – моноциты – кишечная палочка – фагоцитоз

Յետազոտվել է լյարդի ռեզեկցման (ԼՌ, օրգանի զանգվածի 15-20 %-ը) ազդեցությունը, ինչպես նաև դրա զուգակցումը հիպերբարիկ օքսիգենացման հետ (ՀԲՕ, 3 մթթ, 50 ր, օրական 1 սեսան, երեք անգամ) զարկերակային (արտա) և երակային (պորտալ երակ և լյարդային երակներ) արյան նեյտրոֆիլների՝ *E. coli* (*Escherichia coli*) կլանման ունակության վրա: Պարզվել է, որ ՀԲՕ-ն վերացնում է ԼՌ արգելակող ազդեցությունը լյարդի՝ մոնոցիտների կողմից *E.coli*-ի կլանման խթանման ունակության վրա: Վիրահատված լյարդի այդ խթանող ազդեցությունը ավելանում է հետիպերօքսիդացվող ժամանակահատվածի 11-րդ օրը: ՀԲՕ-ն վերացնում է վիրահատության արդյունքում արյան մեջ մոնոցիտների կողմից *E.coli*-ի կլանման ինտենսիվության ավելացումը: Միաժամանակ ՀԲՕ-ն կանխում է վիրահատված լյարդում *E.coli*-ն ակտիվ ֆագոցիտող մոնոցիտների հապաղումը:

Հիպերօքսիա – լյարդ – ռեզեկցում – մոնոցիտներ – աղիքային ցուպիկ – ֆագոցիտոզ

Experiments were conducted on 82 outbred female albino rats exposed to liver resection (LR, 15-25% of the organ mass) and hyperbaric oxygenation (HBO), at 3 ata, for 50 min, three times per days after surgery. The capacities of monocytes of arterial (aorta) and venous (v. porta and v.hepatica) blood to ingest and digest *E.coli* were investigated. It is established that HBO eliminates the inhibitory effect of RP on the liver ability to stimulate hepatic uptake by monocytes *E.coli*. By the 11th day of the posthypen oxygenation period stimulating effect of the operated liver has been increased. HBO eliminates, increasing of the intensity of absorption in the blood monocytes *E.coli* caused by the operation. At the same time HBO prevents the monocytes delay in the operated liver, actively phagocytes *E.coli*.

Hyperoxia – liver resection – monocytes – E.coli – phagocytosis

Предыдущими исследованиями было установлено, что удаление небольшого объёма (15-20% массы органа) печени нарушает стимулирующее влияние данного органа на способность нейтрофилов поглощать *E. coli* [10], являющуюся естественным симбионтом организма млекопитающих. Между тем аналогичная способность интактной печени обнаружена и в отношении моноцитов [8], которые, как известно [5], выйдя в ткани из сосудистого русла, трансформируются в макрофаги. Между тем антикоагуляционная активность моноцитов после резекции печени (РП) в настоящее время остаётся не изученной.

Известно, что одним из регуляторов нарушения антимикробной защиты оперированного организма является гипербарическая оксигенация [1,9]. При этом установлена её способность восстанавливать нарушаемую РП способность печени “обогащать” кровь нейтрофилами, активно фагоцитирующими *E. coli* [10]. Что касается влияния ГБО на способность оперированной печени изменять антикоагуляционную активность моноцитов, то данный вопрос остаётся открытым.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния РП и её сочетания с ГБО на способность моноцитов поглощать *E. coli* в притекающей и оттекающей от печени крови.

Материал и методика. Опыты проведены на 82 беспородных белых крысах (самках) массой 170-220 г. Резекцию печени проводили под эфирным наркозом, удаляя электроножом 15-20% массы органа. Операционное поле очищали от шерсти и обрабатывали раствором хлорамина. Хирургический инструментарий подвергали стерилизации по общепринятой методике. После резекции печени и контроля гемостаза ушивали брюшную стенку кетгуттом. На кожу накладывали П-образные шёлковые швы. Антибиотики и антисептики парентерально не вводились. Частота нагноений составила 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, 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”); 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 и 10 серии – животные, исследованные на 3-и, 7-е и 14-е сутки послеоперационного (1-е, 4-е и 11-е сут постгипероксического) периода соответственно. Животных выводили из опыта декапитацией на фоне этилового наркоза (40 мг/кг массы). Объектами исследования служили моноциты артериальной (АК) и венозной крови: кровь воротной вены (КВВ) и кровь печёночных вен (КПВ).

Артериальную кровь получали пункцией аорты, венозную – соответственно пункциями портальной вены и печёночных вен. Получение крови из печёночных вен осуществляли по разработанной ранее методике [6]. Кровь забирали в следующей последовательности: печёночные вены →портальная вена→аорта. Фагоцитарную активность и моноцитов определяли по их способности поглощать убитые нагреванием микробы [13]. Для этого 0,1 мл гепаринизированной крови инкубировали с 0,05мл монозвеси *E. coli* (штамм К-12), убитой нагреванием, в концентрации 500 млн микробных тел/мл и 0,005 мл физиологического раствора в течение 30 мин при 37°C, встряхивая через каждые 5 мин. По завершению инкубации пробирки на 2 мин помещали в ледяную воду, далее центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин. Плазму удаляли микродозатором, а из верхнего слоя готовили мазки, которые окрашивали по Романовскому. Подсчёт фагоцитированных микроорганизмов осуществляли под микроскопом “БИОЛАМ” ув.100, ок. 12. Определяли следующие показатели: фагоцитарное число моноцитов (ФЧм) – процент клеток, поглотивших тест-микроб за единицу времени. ФЧ рассчитывали на 50 моноцитов. Одновременно рассчитывали фагоцитарный индекс моноцитов (ФИм) – среднее число тест- микробов, поглощённых одной клеткой. Это показатель характеризует интенсивность поглощения микроба клеткой. Результаты обработаны статистически с учётом непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни. Результаты считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Исследованиями установлено, что у крыс в норме ФИм к *E. coli* в КПВ достоверно превышал аналогичный показатель в АК и КВВ соответственно на 39% и 33% (табл. 1). Это указывает на способность интактной печени “обогащать” кровь моноцитами, активно фагоцитирующими кишечную палочку. В свою очередь ФИм к *E. coli* в КВВ составил $4,31 \pm 0,43$, достоверно превысив на 34% аналогичный показатель в АК ($3,19 \pm 0,15$). В КПВ величина ФИм составила $3,64 \pm 0,25$, достоверно не отличаясь от аналогичного показателя моноцитов, находящихся в артериальной крови и крови печёночных вен. Из этого следует, что при прохождении крови по сосудистому руслу органов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) увеличивается интенсивность поглощения моноцитами *E. coli*. В свою очередь часть моноцитов крови воротной вены, интенсивно поглощающих *E. coli*, задерживается в интактной печени. Примечательно, но в отношении нейтрофилов данного явления обнаружено не было [10].

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

Сроки послеоперационного (постгипероксического) периода		Кровеносные сосуды		
		aorta	v. porta	v. hepatica
Норма (n=10)		$28,7 \pm 2,24$	$30,3 \pm 2,39$	$40,0 \pm 2,63$
3(1) сутки	ЛО (n=9)	$21,9 \pm 1,21^*$	$30,9 \pm 1,41^{\blacktriangle}$	$37,8 \pm 3,96^{\blacktriangle}$
	РП (n=9)	$29,8 \pm 3,44^{\blacklozenge}$	$26,1 \pm 3,06$	$27,8 \pm 2,7^*$
	РП+ГБО (n=10)	$26,7 \pm 1,67^{\bullet}$	$31,4 \pm 2,95$	$40,0 \pm 3,8^{\blacktriangle\bullet}$
7(4) сутки	ЛО (n=10)	$30,1 \pm 2,51$	$34,6 \pm 2,16$	$50,8 \pm 2,1^{\blacktriangle\blacktriangledown}$
	РП (n=9)	$33,0 \pm 1,45$	$33,2 \pm 1,96$	$30,2 \pm 1,9^{\blacklozenge*}$
	РП+ГБО (n=8)	$34,4 \pm 1,97$	$31,6 \pm 2,22$	$48,3 \pm 4,9^{\blacktriangle\blacktriangledown\bullet}$
14(11) сутки	ЛО (n=10)	$24,9 \pm 1,81$	$28,3 \pm 1,22$	$37,5 \pm 2,8^{\blacktriangle\blacktriangledown}$
	РП (n=8)	$30,0 \pm 2,2$	$33,4 \pm 2,7$	$31,1 \pm 2,87^*$
	РП+ГБО (n=8)	$32,8 \pm 1,85^{\blacklozenge}$	$34,5 \pm 3,58$	$51,3 \pm 1,4^{\blacktriangle\blacktriangledown\bullet}$

Примечание. ЛО – “ложнооперированные” животные; РП- резекция 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 \blacktriangledown ($p < 0,05$) – с аналогичным показателем артериальной и портальной крови данной серии соответственно; \blacklozenge и \bullet ($p < 0,05$) – с аналогичным показателем послеоперационного периода “ложнооперированных” животных и животных с РП соответственно.

На 3-и сутки после лапаротомии отмечено снижение на 24 % ФЧм к *E. coli* в АК, в результате чего тона становилась ниже аналогичного показателя в КВВ и КПВ соответственно на 29% и 42% (табл.). Это сопровождалось увеличением относительно нормы ФИм к *E. coli* в КПВ на 46% (рис.1). На 7-е сутки полностью восстанавливалось характерное для нормы (табл. 1) преобладание ФЧм к *E. coli* в КПВ над аналогичным показателем в АК и КВВ, сохранявшееся к 14-м суткам после лапаротомии. Что касается ФИм, то у “ложнооперированных” крыс к 14-м суткам после лапаротомии отмечено его избирательное увеличение (на 42%) в АК по сравнению с нормой (рис.1 А), тогда как в других сосудах он оставался в её пределах (рис. 1 Б и 1 В). При этом ФИм в АК на 14-е сутки после лапаротомии достоверно превышал на 41% аналогичный показатель в КВВ.

Следовательно, вызывая кратковременное снижение содержания в АК моноцитов, активно поглощающих *E. coli*, лапаротомия одновременно стимулирует поступление из печени в кровяной ток моноцитов, интенсивно поглощающих этот микроб. Одновременно с этим создаются условия для отсроченной (на 14-е сутки) задержки в тканях ЖКТ моноцитов, интенсивно поглощающих *E. coli*.

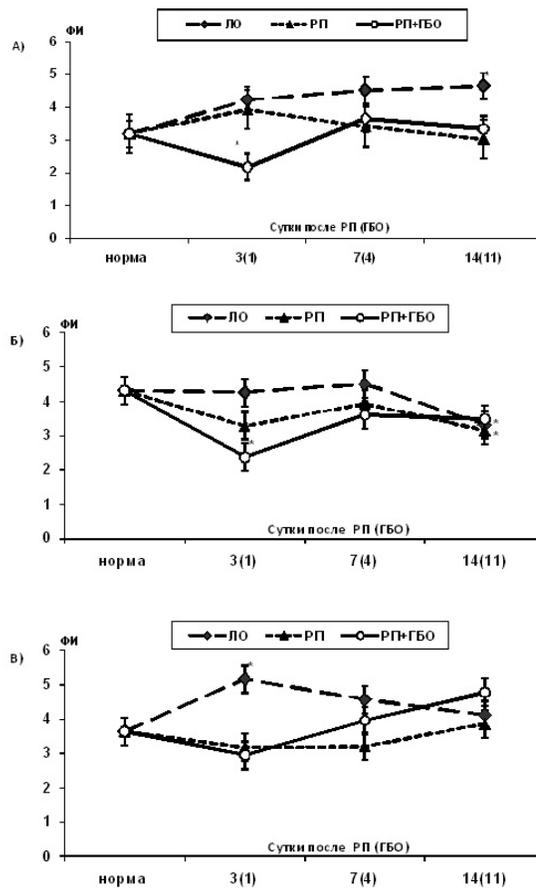


Рис.1. Динамика фагоцитарного индекса нейтрофилов в артериальной крови (А), крови воротной вены (Б) и крови печёночных вен (В) после резекции печени и гипербарической оксигенации.

По оси абсцисс- сутки послеоперационного (постгипероксического) периода.

По оси ординат – абсолютная величина ФИ. ЛО- “ложнооперированные” животные, РП- резекция печени, ГБО- гипербарическая оксигенация,* ($p<0,05$) по сравнению с нормой.

Дополнение лапаротомии РП не вызывало достоверных изменений по сравнению с нормой ФЧм к *E. coli* в артериальной крови и крови портальной вены на протяжении всего периода наблюдений (табл.1). По сравнению с “ложнооперированными” животными обнаружено его увеличение только в АК на 3-и и 14-е сут после операции соответственно на 36% и 20% (табл.1). При этом на 3-и сутки после РП исчезало характерное для аналогичного периода у “ложнооперированных” крыс преобладание ФЧм к *E. coli* в КВВ над аналогичным показателем в АК (табл.1). Вместе с тем РП вызывала снижение относительно нормы ФЧм к *E. coli* в КПВ на 3-и, 7-е и 14-е сут послеоперационного периода соответственно на 30%, 25% и 22% (табл.1). В результате оно достоверно не отличалось от аналогичного показателя моноцитов в АК и КВВ. Как видно из рис. 1 Б и 1 В, на 3-и сут после РП происходит снижение в КВВ и КВВ интенсивности поглощения моноцитами КПВ

E. coli, тогда как в АК данное явление носило отсроченный характер и наблюдалось на 14-е сут исследования (рис.1 А). Из этого следует, что РП у здоровых крыс вызывает нарушение способности печени “обогащать” кровь моноцитами, активно фагоцитирующими *E. coli*, которая не восстанавливается к 14-м сут послеоперационного периода. Одновременно с этим РП устраняет запускаемые лапаротомией механизмы, направленные на увеличение содержания в крови моноцитов, с высокой интенсивностью поглощения кишечной палочки.

В условиях гипероксии (3-и сут после РП) ФЧм к *E. coli* в КПВ на 43% превышал аналогичный показатель животных с РП без ГБО, достигая нормальной величины (табл.1). При этом относительно АК животных данной серии его превышение составило 50% (табл.1). Вместе с тем отмечена способность гипербарического кислорода предотвращать вызываемую лапаротомией стимуляцию поглощения *E. coli* моноцитами крови (рис.1). При этом, если в КВВ гипербарический кислород усиливал ингибирующее влияние РП на данный процесс (рис.1 Б), в КПВ он сохранял его (рис.1 В), тогда как в АК предотвращение увеличения ФИМ в условиях гипероксии было связано только с ингибирующим эффектом ГБО (рис.1 А). Из этого следует, что в условиях ГБО оставшаяся после резекции часть печени восстанавливает свою способность обогащать кровь моноцитами, активно фагоцитирующими *E. coli*. Это в свою очередь устраняет необходимость компенсаторного увеличения интенсивности поглощения *E. coli* моноцитами, находящимися в крови. Прекращение гипероксического воздействия на организм не приводило к реставрации нарушений фагоцитарной активности моноцитов, вызванных РП. Наоборот, на 11-е сутки постгипероксического периода отмечено усиление способности оперированной печени обогащать кровь моноцитами, активно фагоцитирующими *E. coli*. В результате ФЧм к *E. coli* в КПВ превышало норму в указанный период наблюдений на 28%, тогда как относительно АК и КВВ своей серии оно было повышено соответственно на 56% и 49% (табл.1). Что касается ингибирующего влияния ГБО на интенсивность поглощения *E. coli* моноцитами крови, то оно сохранялось на 11-е сутки постгипероксического периода только в АК (рис.1 А).

Известно, что процесс фагоцитоза начинается после взаимодействия опсонированного или неопсонированного микроба с одним из рецепторов, расположенных на мембране фагоцита [11,13]. Поэтому обнаруженное нами увеличение способности интактной печени увеличивать содержание в крови моноцитов, активно фагоцитирующих *E. coli*, можно связать с увеличением содержания рецепторов на их мембране во время прохождения по печёночным синусоидам. При этом наиболее вероятным механизмом этого явления следует рассматривать инкорпорацию на мембране “неактивных” моноцитов соответствующих белков-рецепторов путём её обогащения ими “*de novo*”. Тем более, что установлена способность макрофагов инкорпорировать после стимуляции на своей поверхности белок C_{1q} , который может выступать в качестве Fc-рецептора [14], играющего ведущую роль в аттракции микроба на мембране фагоцита [11]. Следует ожидать, что в качестве стимулятора антиколибактериальной активности моноцитов при их прохождении через печень будут выступать клетки Купфера, являющиеся, как известно [4], мигрировавшими из крови в околасинусоидальное пространство моноцитами, трансформировавшимися в нём в тканевые макрофаги. Нами обнаружена способность органов ЖКТ стимулировать интенсивность поглощения моноцитами кишечной палочки. Одним из механизмов этого следует рассматривать выделение находящимися в стенке органов ЖКТ клеток иммунной системы веществ, вызывающих избирательную экспрессию на поверхности мембран моноцитов рецепторов, способных взаимодействовать с *E. coli*. В частности, установлена прямая зависимость интенсивности поглощения моноцитами патологических иммунных комплексов от

экспрессии на поверхности их мембран С3-рецептора [14]. Повышая интенсивность поглощения кишечной палочки моноцитами органы ЖКТ, вероятно, регулируют не только степень физиологической порտальной колибактериемии, но и презентацию антигена *E. coli* этими клетками.

Анализ полученных результатов показывает, что нарушение способности оперированной печени увеличивать количество в крови активных моноцитов сопровождается кратковременной (на 3-и сут после операции) ретенционной задержкой в оставшейся после резекции части органа моноцитов, активно фагоцитирующих *E. coli*. Если учесть, что аналогичные изменения выявлены и в отношении нейтрофилов [10], то можно говорить о формировании в печёночных синусоидах оставшейся после резекции части печени своеобразного нейтрофильно-моноцитарного антибактериального фильтра. Он будет компенсировать обнаруженное после РП снижение поглотительной способности клеток Купфера [3]. Обнаруженное в эксперименте снижение ФИм к *E. coli* в КВВ после РП при отсутствии изменений ФЧм позволяет говорить о преимущественно повышенном выходе из сосудистого русла в ткани кишечника моноцитов с высокой интенсивностью поглощения кишечной палочки. Вероятно, таким образом ограничивается снижение антимикробного потенциала данного отдела пищеварительного тракта, вызываемое повышением проницаемости его гистогематического после РП [12]. Применение ГБО после РП показало, что в условиях гипероксии не только восстанавливается нарушаемая операцией способность печени “обогащать” кровь моноцитами, активно фагоцитирующими *E. coli*, но и закладываются механизмы, вызывающие её отсроченную активацию на 11-е сут постгипероксического периода. Можно полагать, что это связано со способностью гипербарического кислорода восстанавливать стимулирующее влияние клеток Купфера на антиколибактериальную активность моноцитов крови. Вместе с тем устранение в условиях ГБО стимулирующего влияния операции на интенсивность поглощения *E. coli* моноцитами в крови позволяет говорить об устранении повышенной в гипероксических условиях экспрессии рецепторов на поверхности мембраны моноцитов.

Применение ГБО устраняет развивающуюся в ответ на РП ретенцию в оставшейся после резекции части органа моноцитов, активно фагоцитирующих *E. coli*. С одной стороны, это связано со способностью ГБО купировать развитие воспаления в повреждённой ткани [2], с другой – регулировать в ней тканевую кровоток [7]. В результате снижается выход активно фагоцитирующих моноцитов из крови в околасинусоидальное пространство. Можно полагать, что это один из механизмов реализации на 11-е сут постгипероксического периода стимулирующего влияния ГБО на поступление из оперированной печени в кровь моноцитов, активно поглощающих *E. coli*.

Таким образом, применение курса ГБО в первые трое суток после РП устраняет ингибирующее влияние операции на способность печени стимулировать антиколибактериальную активность моноцитов. При этом гипербарический кислород регулирует компенсаторно-приспособительные реакции организма, возникающие в ответ на данное нарушение. Прекращение гипероксического воздействия на организм сопровождается усилением лечебного эффекта ГБО к 11-м суткам постгипероксического периода.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Леонов А.Н.* Гипероксия. Адаптация. Саногенез, Воронеж. Изд-во ВГМА, 2006.
2. *Маянский Д.Н., Щербаков В.И., Калинина Т.Г.* Зависимость моноцитарной инфильтрации печени от пролиферации гепатоцитов. Бюллетень эксперим. биологии и медицины, 5, 621-623, 1984.

3. *Маянский Д.Н.* Система фагоцитоза: методологические проблемы. Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2, 84-87, 1986.
4. *Плющ И.В., Цырендоржиев Д.Д., Маянский Д.Н.* Реакция лёгочных фагоцитов после частичной гепатэктомии. Бюлл. эксперим. биол. и медицины, 5, 477-479, 1995.
5. *Савилов П.Н., Кузьмина Н.Н., Дьячкова С.Я.* Бактерицидная активность крови после частичной гепатэктомии интактной и патологически изменённой печени. Вестник ВГУ. Серия Проблемы химии, биологии, Воронеж, 1, 41-43, 2001.
6. *Савилов П.Н.* Кислородный режим оперированной печени после гипероксии. Бюллетень гипербар. биол. и медицины, 9, 1-4, 5-11, 2001.
7. *Савилов П.Н.* Фагоцитозрегулирующая функция печени. Росс. физиол. журнал, 90, 8, Приложение Ч.2: 121, 2004.
8. *Савилов П.Н., Дьячкова С.Я.* Иммунобиологические механизмы гипербарической кислородной терапии. Иммунология Урала, Оренбург, 1, 5, 66-67, 2006.
9. *Савилов П.Н.* Влияние резекции печени и гипербарической оксигенации на фагоцитоз нейтрофилами *E.coli*. Биолог. журн. Армении, 61, 1, 11-17, 2009.
10. *Фрейндлин И.С.* Система мононуклеарных фагоцитов. М.: Медицина, 1984.
11. *Ходжанов С.А.* Динамика приспособительных процессов перестройки кровеносных сосудов и слизистой оболочки подвздошной и толстой кишок после резекции печени: Дисс... канд. мед. наук. ТашМИ, Ташкент, 1988.
12. *Учитель И.Я.* Макрофаги в иммунитете. М.: Медицина, 1978.
13. *Yagawa K., Onone K., Aida K.* Structural studies of Fc receptor. I. Binding properties solubilisation and partial characterization of Fc receptors of macrophages. J.Immunol., 122, 1, 366-373, 1979.

Поступила 09.01.2012