

УДК: 6187-06 : 616.36-008.811.5]-074-097-092.9

# ПОКАЗАТЕЛИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКОЙ КЛЕТОЧНОЙ И ГУМОРАЛЬНОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ, КОМПОНЕНТОВ ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО РАВНОВЕСИЯ У ПОТОМСТВА КРЫС, РОДИВШЕГОСЯ В УСЛОВИЯХ ХОЛЕСТАЗА, ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО ВЫЗВАННОГО В ПЕРИОД ФЕТОГЕНЕЗА

Я.Р. Маджук, В.В. Зинчук, Л.С. Кизюкевич, Е.Ч. Михальчук,  
Г.М. Сухоцкая

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

*Эксперимент проведен на 38 крысятах 15- и 45-суточного возраста, 22 из которых родились от самок с экспериментально вызванным на 17-е сутки беременности обтурационным холестазом. Исследовали фагоцитарную активность нейтрофилов, активность комплемента и показатели прооксидантно-антиоксидантного равновесия. Установлено, что обтурационный холестаз матери, развившийся в период активного фетогенеза, вызывает у родившегося потомства стабильное угнетение фагоцитарной активности нейтрофилов крови, снижение показателей системы комплемента, активирует в тканях желудка, почек перекисное окисление липидов и снижает при этом уровень содержания  $\alpha$ -токоферола и активность каталазы. Выраженность этих изменений неоднозначна у разных органов и в разные возрастные периоды.*

**Ключевые слова:** беременность, холестаз, нейтрофилы, комплемент, желудок, почки, прооксидантно-антиоксидантное равновесие.

*Experiments were performed in 38 rat pups at the age of 15-45 days, 22 of these rats were born from female rats with obturative cholestasis experimentally induced on the 17<sup>th</sup> day of pregnancy. The neutrophilic phagocytic activity, complement activity and indices of prooxidant-antioxidant balance were studied. The results showed that the maternal experimental cholestasis developed during the active fetogenesis caused in the litter the steady depression of neutrophilic phagocytic activity in blood, decrease in complement system parameters, more active lipid peroxidation in gastric and renal tissue and the lower  $\alpha$ -tocopherol content and catalase activity. The degree of such changes varied depending on organ and age.*

**Key words:** pregnancy, cholestasis, neutrophils, complement, stomach, kidneys, prooxidant-antioxidant balance.

## Аналитический обзор

Установлено, что в условиях холестаза, развивающегося при заболеваниях печени, имеет место увеличение в крови содержания холестерина, билирубина, щелочной фосфатазы и особенно желчных кислот [12, 16]. Последние, встраиваясь в липидный комплекс клеточных мембран, могут вызвать структурные и функциональные изменения практически во всех органах [1]. В тканях последних в этих условиях происходит увеличение продуктов перекисного окисления липидов [6, 15, 19], развиваются структурные изменения [1, 7, 3].

Холестаз у беременных серьезных расстройств не вызывает, но оказывает весьма отрицательные воздействия на плод [2, 17]. Из цикла экспериментальных работ [8, 9, 10] известно, что холестаз, вызванный у беременных животных (крыс) в период обособления у эмбрионов зачатков органов или в период интенсивного их развития, приводит к рождению потомства с меньшей массой и сниженной жизнеспособностью, задерживает его физическое развитие и становление структурных и биохимических свойств органов половой системы, сопровождаясь деструктивными и функциональными изменениями. Патогенетический механизм этих нарушений не изучен.

Исходя из вышеизложенного, нами была принята попытка изучить у 15- и 45-суточного потомства крыс, родившегося от животных с холестазом, экспериментально вызванным в период ак-

тивного фетогенеза (17-е сутки беременности), фагоцитарную активность нейтрофилов крови, как одного из показателей неспецифической клеточной резистентности, выполняющей роль первой линии защиты, носящей многостадийный характер и зависящей от содержания желчных кислот [4], активность комплемента, как показателя неспецифической гуморальной резистентности и показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса в тканях некоторых органов, в значительной степени определяющих состояние их структурно-функциональных свойств.

## Материал и методы

Эксперимент проведен на 38 крысятах 15- и 45-суточного возраста, 22 из которых родились от самок с экспериментально вызванным на 17-е сутки беременности обтурационным холестазом [8]. Оставшиеся крысята (16), родившиеся от самок без наложения лигатуры на общий желчный проток, служили контролем. Опытные и контрольные животные находились под тщательным наблюдением и в одинаковых условиях вивария. По достижению 15- и 45-суточного возраста крысят тщательно осматривали, взвешивали и умерщвляли парами эфира, забирали желудок, почки для биохимических, а кровь для иммунологических исследований.

Во взятой крови определяли фагоцитарную активность нейтрофилов и активность комплемента.

В качестве антикоагулянта применяли гепарин (20 Ед/мл). Взвесь лейкоцитов готовили в растворе Хенкса в концентрации  $2-10 \times 10^6$ /мл. Отмытую суспензию золотистого стафилококка разводили раствором Хенкса до  $10-100 \times 10^6$ /мл. К 0,5 мл суспензии лейкоцитов добавляли равный объём микробов, инкубировали при  $37^\circ\text{C}$  один час, делали мазки, которые фиксировали и окрашивали по Романовскому. При микроскопии под иммерсией определяли фагоцитарный индекс Гамбургера – процент фагоцитов, имеющих поглощенные частицы от общего числа нейтрофилов, фагоцитарное число Райта – среднее число фагоцитированных частиц на один фагоцит [11]. Функциональную активность комплемента и его способность лизировать сенсibilизированные эритроциты барана определяли методом Е.Кэбота и М.Мейера. Активность комплемента выражали количественно в гемолитических единицах СН 50, что соответствует количеству комплемента, вызывающего лизис 50% эритроцитов в тест-системе [5, 14].

В тканях желудка, почек опытных и контрольных животных определяли концентрацию диеновых конъюгатов (ДК) путем измерения конъюгированных диеновых структур, образуемых из гидроперекисей полиненасыщенных жирных кислот, и уровень оснований Шиффа (ОШ) по интенсивности флуоресценции хлороформного экстракта при длине волны возбуждения 344 нм и длине волны эмиссии 440 нм на спектрофлуориметре «F-4010» фирмы Hitachi [18]. Каталазную активность в тканях желудка и почек оценивали по количеству израсходованной перекиси водорода, способной образовывать с солями молибдена стойко окрашенный комплекс определяемого на спектрофотометре «СФ-46» при длине волны 410 нм [13]. Содержание же в этих тканях органов а-токоферола определяли по интенсивности флуоресценции гептанового экстракта при длине волны возбуждения 292 нм и длине волны флуоресценции (эмиссии) 325 нм на этом же спектрофлуориметре «F-4010» [13].

Полученные цифровые данные подвергались статистической обработке на персональном компьютере с применением пакета программ «Statistica 6.0» для «Windows».

### Результаты и их обсуждение

Исследования показали, что абсолютная масса опытных крысят на 15-е ( $13,08 \pm 0,86$  г при  $17,13 \pm 1,58$  г в контроле,  $p < 0,05$ ) и 45-е сутки ( $61,63 \pm 4,93$  г при  $67,39 \pm 4,23$  г в контроле) после рождения снижена. Крысята вялые, менее подвижные, шерсть матовая, плохо прибавляли в весе и отставали в физическом развитии. Даже на вскрытии при беглом осмотре их желудка и почки отличались заметно меньшими размерами и массой.

Данные проведенных иммунологических исследований крови представлены в таблице 1. Анализ последних свидетельствует о том, что в организме крысят, родившихся в условиях обтурационно-го холестаза матери, экспериментально вызванного в период фетогенеза, имеет место снижение фагоцитарной активности нейтрофилов и системы комплемента. Причем на ранних этапах постна-

тального онтогенеза (15-е сутки), ссылаясь на достоверное снижение активности комплемента, неспецифическая гуморальная резистентность крысят оказалась более чувствительной к состоянию холестаза матери. На более поздних сроках постнатального развития (45-е сутки) достоверное снижение фагоцитарной активности нейтрофилов свидетельствует о том, что к этому сроку подавляется и неспецифическая клеточная резистентность, а показатели неспецифической гуморальной резистентности практически достигают контрольных значений. Однако однонаправленность этих изменений в разные сроки постнатального развития является доказательством того, что неспецифическая резистентность организма крысят является чувствительной и зависимой от факторов, образующихся при обтурационном холестазе матери, экспериментально вызванном в период фетогенеза.

Таблица 1. Показатели неспецифической клеточной и гуморальной резистентности организма крысят опытной и контрольной групп

Группы	Возраст (сутки)	Фагоцитарное число	Фагоцитарный индекс	Активность комплемента	
				log	СН50(ед)
Контроль	15	$73,00 \pm 1,59$	$9,72 \pm 0,44$	$2,90 \pm 0,13$	$34,94 \pm 1,19$
Опыт		$69,75 \pm 1,59$	$8,78 \pm 0,41$	$1,54 \pm 0,005$	$25,14 \pm 0,11^*$
Контроль	45	$76,40 \pm 1,56$	$8,85 \pm 0,22$	$3,60 \pm 0,23$	$60,12 \pm 3,90$
Опыт		$66,70 \pm 1,65^*$	$8,33 \pm 0,24$	$3,55 \pm 0,24$	$59,29 \pm 4,20$

Примечание. \* - различия показателей достоверны ( $p < 0,001$ ).

Биохимические показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса в тканях органов опытных и контрольных 15- и 45-суточных крысят представлены в таблице 2. Анализ этих данных свидетельствует о повышении в тканях желудка опытных крысят показателей перекисного окисления липидов (ПОЛ) во все возрастные периоды постнатального развития. При этом концентрация диеновых конъюгатов (ДК) в гомогенате желудка у 15-суточных опытных крысят возрастает на 74,7%, а у 45-суточных – на 49,68%. Уровень оснований Шиффа (ОШ) увеличивается соответственно срокам менее значительно – на 8,18 и 14,15%. Показатели антиоксидантной защиты, наоборот, снижены. Причем, последние более отчетливы на 15-е сутки, нежели на 45-е.

Так, содержание а-токоферола и активность каталазы в гомогенате тканей желудка у 15-суточных опытных крысят снижены на 4,56 и 26,55%, у 45-суточных животных содержание а-токоферола возвращается, практически, к уровню контрольных значений, а уменьшение активности каталазы становится менее значительным и составляет 11,03%.

В гомогенатах тканей почек изменения показателей прооксидантно-антиоксидантного баланса имеет несколько иной характер. Так, концентрация диеновых конъюгатов у 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза, увеличена на 161,08%, а у 45-суточных, наоборот, ниже уровня контроля на 11,37%, что составляет нижний уровень нормы. Уровень оснований Шиффа в гомогенате почек у 15- и 45-суточных опытных крысят увеличен, соответственно, на 21,71 и 32,62%.

Содержание же а-токоферола в гомогенате почек 15- и 45-суточных опытных крысят существенно не отличается от такового у контрольных групп.

**Таблица 2.** Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты тканей органов 15- и 45-суточных крысят, родившихся в условиях нормы и холестаза матери

Органы	Возраст	Группы	ДК (н/моль/мл)	ОШ (ед/мл)	$\alpha$ -токо- ферол (мкмоль/л)	Каталаза (ммоль H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> / сек Hb)
желудок	15	Контроль	2,53±0,26	58,78±1,82	286,67±0,94	2,26 ±0,15
		Опыт	4,42±0,29*	63,59±1,23	273,62±1,89**	1,66±0,07**
	45	Контроль	3,16±0,32	204,14±3,35	240,54±1,14	9,07±1,03
		Опыт	4,73±0,66**	233,64±4,81	241,08±1,31	8,07±0,93
почки	15	Контроль	2,03±0,49	41,86±1,05	286,60±0,72	3,55 ±0,23
		Опыт	5,30±0,29*	50,95±1,45	288,55±1,13	3,61±0,08
	45	Контроль	3,08±0,33	166,16±3,71	231,54±1,14	14,16±0,68
		Опыт	2,73±0,24	220,37±1,92	236,19±1,76*	11,82±0,85*

Примечание. \* - различия показателей достоверны, p<0,05; \*\* - p<0,001.

Существенно не изменена у 15-суточных крысят и активность каталазы, тогда как у 45-суточных животных активность этого фермента уменьшена на 16,53%.

Таким образом, из анализа вышеизложенных показателей становится очевидным, что холестатическое состояние матери, развившееся в период фетогенеза, вызывает у родившегося потомства снижение фагоцитарных свойств нейтрофилов и активности комплемента, как показателей неспецифической клеточной и гуморальной резистентности, нарушение в тканях прооксидантно-антиоксидантного равновесия, притом далеко не однозначное в разных органах и в разные возрастные периоды. Так, у 15-суточных крысят в почечной ткани имеющая место активация перекисного окисления липидов снижается на 45-е сутки после рождения. Наблюдаемые при этом изменения в содержании  $\alpha$ -токоферола и активности каталазы отражает адаптивный вклад последних в поддержание прооксидантно-антиоксидантного баланса в тканях этого органа.

В тканях желудка характер изменений показателей этого баланса несколько иной. Наблюдаемое как на 15-е, так и 45-е сутки стабильное увеличение параметров свободнорадикального окисления липидов сопровождается снижением, особенно на 15-е сутки, показателей ферментативной и не ферментативной антиоксидантной защиты, что отражает активное участие данных компонентов в механизме поддержания прооксидантно-антиоксидантного баланса.

Неоднозначность по выраженности изменений оцениваемых параметров прооксидантно-антиоксидантного баланса в тканях развивающегося желудка и почек потомства, родившегося в условиях холестаза, отражает определённые различия в развитии в них деструктивных изменений при становлении в постнатальный период структурно-функциональных свойств.

### Литература

1. Ганиткевич Я.В. Роль желчи и желчных кислот в физиологии и патологии организма // Киев: Наукова думка – 1980. – 178с.
2. Закревский А.А. Беременность и роды при хронических заболеваниях печени и желчных путей // Антенатальная охрана плода и профилактика перинатальной патологии: Тез. докл. – Киев. – 1979. - С. 98-99.
3. Кизюкевич Л.С. Туревский А.А. Шелесная Е.А. Показатели метаболизма почек при экспериментальном холестазае и последующей хирургической декомпрессии желчных путей // Морфология – 2000. Т. 117. - №3. – С. 56-57.
4. Лапкин К.В., Пауткин Ю.Ф. Механическая желтуха. М: Ун-т Дружбы народов. – 1990. – 108с.
5. Леонова Е.С., Ляликова Р.В., Косенкова Т.В. Метод определения кинетики активации системы комплемента // Лаб. дело. – 1989. - №12. – С. 21-23.
6. Мандрик К.А., Емельянчик С.В., Кизюкевич Л.С., Мацюк Я.Р. Биохимическая характеристика некоторых внутренних органов при экспериментальном супрадуоденальном холестазае // Вестн. ГТУ им. Я.Купалы. – Гродно, 2001. - №2 (6). – С.115-119.
7. Мацюк Я.Р., Туревский А.А., Кизюкевич Л.С., Марголь С.К. Морфофункциональные изменения фолликулов щитовидной железы в ранние сроки холестаза // Вестн АН Беларуси. сер. Бял. Навук. – 1995. - №2. – С.96-100.
8. Мацюк Я.Р., Кизюкевич Л.С., Михальчук Е.Ч., Можейко Л.А. и др. Морфологические свойства органов пищеварительной и мочеполовой систем 45-суточных крысят, родившихся от самок с экспериментальным холестазаем // Ж. Грод. гос. мед. ун-та – 2005. - №2. - С.31-35.
9. Мацюк Я.Р., Гудиневич С.Я. Морфофункциональные свойства яичников, яйцеводов, матки 15-суточных крысят, родившихся в условиях холестаза // Ж. Грод. гос. мед. ун-та. 2005. - №4. – С.46-44.
10. Мацюк Я.Р. Неблагоприятные воздействия холестаза беременных на становление структурных и цитохимических свойств семенников родившегося потомства и протектиновая роль урсофалька // Актуальное вопр. морфологии. Сб. тр. Междунауч. науч. практ. конф., посв. 85-летию БГМУ. – 2006. – С.103-104.
11. Фримель Г. Иммунологические методы. – М: Медицина, – 1987. – 472с.
12. Шехтман М.М. Экстрагенитальная патология и беременность. – М: Медицина. – 1987. – 296с.
13. Aruoma O.I. Cuppett S.L. Antioxidant Methodology: in vivo and in vitro Concepts. - №4. – 1997. – 340p.
14. Kizschfink M., Mollenes T. Modern complement analysis // Clin. And Diagh. Lab. Immunol. – 2003. - №6. – P. 982-989.
15. Kountourous S. Schener P., Billing B. Effect of prolonged bile duct obstruction in the rat on hepatic transport of bilirubin // Clin. Sci. – 1985. – v.68. - №3. – P. 341-347.
16. Nokila K., Riikonen S., Lindfors M. Mieninen T. Serum squalene and noncholesterol sterols before and after delivery in normal and cholestatic pregnancy // I. Lipid Res. – 1996. - v.37. - №12. – P.2687-2695.
17. Plaza F.I., Diaz R.I., Pardo O., Perez C. Colestasis intrahepatica alel ambarazo. Una enfermedad benigna. // Rev. Esp. Enferm. Digest. – 1996, v.88. - №11, - P. 809-811.
18. Rice-Evans C.A., Diplock A.T., Simons M.C. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: techniques in free radical research. London, 1991. - P.291.
19. Sing Li, Yanbang Chi, Xuesun T. Zhogguo puwai sicu ju linchuang zazhi // Clin. S. Bases and Clin.Seery. – 1998. v. 5. - № 3. - P. 148-149.

### Resume

THE INDICES OF NON-SPECIFIC CELLULAR AND HUMORAL RESISTANCE AND THE COMPONENTS OF PROOXIDANT-ANTIOXYDANT BALANCE IN RATS BORN FROM MOTHERS WITH CHOLESTASIS EXPERIMENTALLY INDUCED DURING THE FETOGENESIS.

Ya.R. Matsiuk, V.V.Zinchuk, L.S. Kiziukevich, E.Ch.Mikhailchuk, G.M. Sukhotskaya  
Grodno State Medical University

We investigated the neutrophil phagocytic and complement activity and indices of prooxidant-antioxidant balance in 38 rat pups (15- and 45-day-old). Maternal cholestasis experimentally induced on the 17<sup>th</sup> day of pregnancy (during the active fetogenesis) led to the prolonged inhibition of neutrophil phagocytic activity, lower levels of complement system substances, more active lipid peroxidation in gastric and renal tissues combined with their lower  $\alpha$ -tocopherol content and catalase activity. The degree of such changes depended on organ and age.

Поступила 08.02.07