

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ ПРО- И ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО ДЕСТРУКТИВНОГО ПАНКРЕАТИТА

Изучено взаимодействие микробных агентов (*S. aureus*, *E. coli*) с паренхиматозными и стромальными элементами поджелудочной железы при экспериментальном остром деструктивном панкреатите и при лечебной коррекции. Показано позитивное влияние окситоцина при его применении. Полученные результаты могут служить основой для дальнейших научных разработок по включению окситоцина в комплекс лечебных мероприятий при остром деструктивном панкреатите.

Нейроэндокринной системе организма отводится важнейшая роль в поддержании гомеостаза, обеспечении процессов адаптации и компенсации нарушенных функций (1, 2), участии в стимуляции репаративных гистогенезов (3). Нонапептиды гипоталамического происхождения, являясь филогенетически более древними, обеспечивают тканям различного генеза реализацию их компенсаторных и приспособительных свойств при разнообразных воздействиях на макроорганизм, в том числе патогенных микробов. Не исключается и участие этих гуморальных факторов в регуляции жизнедеятельности прокариот (4). Использование окситоцина как гипоталамического нонапептида для лечения острого деструктивного панкреатита в экспериментальных условиях и исследование его влияния на изменение биологических свойств прокариот представляет собой несомненный интерес.

Целью работы явилось изучение взаимодействия микробных агентов (*S. aureus*, *E. coli*) с паренхиматозными и стромальными элементами поджелудочной железы при экспериментальном остром деструктивном панкреатите (ЭОДП) в моделируемых условиях и при лечебной коррекции.

Материал и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на 90 белых беспородных лабораторных крысах-самцах массой 280-300 г. ЭОДП вызывался в условиях операционной путем механического раздавливания тканей поджелудочной железы и введением 0,5-1,0 мл стерильной желчи. Для инфицирования одновременно с желчью в панкреатические протоки вводились различные инфекционные агенты (*S. aureus*, *E. coli*) в дозе 3×10^6 микробных клеток. Были выполнены следующие серии экспериментов: I серия - 30 животных с инфицированным ЭОДП, II серия - на 60 крысах с инфицированным ЭОДП проводили лечение окситоцином или цефаболом. Окситоцин вводился инъекционно, ежед-

невно в дозе 1МЕ один раз в сутки, цефабол – ежедневно, два раза в сутки в суточной дозе 100 мг/кг (30 мг в сутки) в область панкреонекроза до выведения животных из опыта.

Изучение полученного материала (кусочки поджелудочной железы) у экспериментальных животных осуществляли через 24 часа, 3 и 7 суток от начала эксперимента. Для забора материала животных забивали под глубоким ингаляционным эфирным наркозом путем декапитации. Для световой микроскопии материал фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, спирт-формоле, Ценкер-формоле, смеси Буэна. Обезвоживание и уплотнение материала производили в этаноле возрастающей крепости и заливали в смесь парафина с воском (1:1). Гистосрезы толщиной 5-6 мкм окрашивали гематоксилином Майера и эозином, по Ван-Гизону, толуидиновым синим и альциановым синим, метиленовым зеленым и пиронином Ж по Браше, ставили ШИК – реакцию. Гистохимические реакции сопровождали соответствующими контролями (5).

Для электронномикроскопического исследования материал последовательно фиксировали в 2,5% растворе охлажденного (+ 4° С) глутарового альдегида и четырехокси осмия по Millonig. Обезвоживание проводили в ацетоне с нарастающей концентрацией и последующей заливкой кусочков в смолу ЭПОН-812. Ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме ЛКВ-5. Срезы подвергли двойному контрастированию: в 2% водном растворе уранила ацетата при +37° С в течение 2 часов и цитрате свинца. Изучение объектов и фотографирование их осуществляли с помощью электронного микроскопа ЭВМ 100 АК при увеличениях $\times 7000$ – $\times 48000$.

При приготовлении гистоавтографов использовали жидкую эмульсию типа «М» (производства НИИХИМфото) по методике, предложенной Л.Н. Жинкиным (6). Эмульсию экспонировали 4 недели с последующим проявлением в амидоловом проявителе. Гистоавтографы окрашивали гематоксилином-эозином.

Подсчет треков ³H-тимидина (зерен восстановленного серебра) осуществляли в условных полях зрения микроскопа (окулярная вставка 5×5 мм, об. 90, ок. 10). При этом в каждом гистологическом срезе того или иного органа анализировали не менее 100 полей зрения в 10 препаратах каждого животного конкретной серии экспериментов.

Для получения дополнительной информации, касающейся оценки поверхностных компартментов микробов, использована атомно-силовая микроскопия (АСМ) в контактном режиме (7). Данные АСМ обрабатывались статистически при компьютерной записи трехмерных изображений объектов.

Результаты исследования и их обсуждение

На всех этапах экспериментов на ультраструктурном уровне обнаружено присутствие использованных для опытов бактериальных агентов. Помимо лизированных бактерий встречались и реактивно измененные объекты, близкие по своему электронномикроскопическому виду жизнеспособным микроорганизмам. Так, *S. aureus* имели шаровидную форму. Их диаметр на ультратонких срезах был равен 0,6-0,8 мкм. Они часто образовывали линейные скопления («цепочки»). Фибриллярный материал микрокапсул у данных микробов сохранялся во все сроки наблюдений и был сильно разрыхлен через 7 суток опыта.

При использовании препарата окситоцина фибриллярный компонент клеточной стенки стафилококков отсутствовал полностью, что свидетельствовало (уже на стадии 3 суток эксперимента) о существенной дезорганизации клеточной поверхности данных бактерий. При использовании цефабола и без лечебной коррекции ЭОДП клеточная стенка идентифицированных в поджелудочной железе микроорганизмов была уплотнена и значительно утолщена.

Применение окситоцина вызывало существенную гомогенизацию клеточной стенки бактерий, исчезновение рибосом и мембранных структур цитоплазмы. При этом происходила дезорганизация нуклеоида, нарушение ориентации микрофибрилл и их фрагментация.

В тех сериях опытов, где не применялся окситоцин, микроорганизмы сохраняли свои основные фенотипические признаки. В этих же условиях внутриклеточно расположенные бактерии отграничивались мембранами, изолирующими их от остальных участков цитоплазмы. При использовании окситоцина подобного отграничения не наблюдалось, что приводи-

ло к лизированию микроорганизмов, особенно отчетливо прослеженному через 7 суток опытов (табл. 1).

Полученные в эксперименте данные согласуются с результатами исследования прямого влияния окситоцина на *S. aureus* в условиях их культивирования *in vitro* (4). Ультраструктурный анализ в этих условиях показал нарушения клеточной стенки стафилококков и их нуклеоида под влиянием окситоцина в виде локальной дезорганизации клеточной поверхности кокков, дисконкомплексации их надплазменных комплексов, фрагментации гликокаликса клеточной оболочки, разрыхлении и везикуляции нуклеоидных компонентов.

Идентификация *E. coli* по данным ультраструктурного анализа была более затруднена. В тех случаях, когда они электронномикроскопически визуализировались, они имели гладкую микрокапсулу, цитоплазматические мембраны кольцевидной ориентации, слабо различимые гранулярные компоненты цитоплазмы. В центральной ее части отмечалось просветление гиалоплазмы с малым содержанием рибосом.

Исследуя взаимоотношение микробных клеток с тканями поджелудочной железы на различных стадиях развития ЭОДП, были прослежены основные этапы инвазии микроорганизмов в гистоструктуру органа. В этом отношении наиболее доказательными были те факты, которые касались интервенции стафилококков. Отмечались явления адгезии бактерий к плазмолемме панкреатоцитов, фибробластов, макрофагов, эндотелиальных клеток. Через 3 суток большинство стафилококков занимали межклеточные пространства, лизируясь лейкоцитами и макрофагами. Через 7 суток микроорганизмы регистрировались не только в межклеточных пространствах и детрите, но и в ка-

Таблица 1. Число *St. aureus* в очагах панкреонекроза (электронномикроскопический анализ на серийных ультратонких срезах, ув х 8500)

ЭОП*	Стадии эксперимента		
	3 суток	7 суток	14 суток
Контроль	3,1±0,1	6,8±0,9	7,1±1,1
При лечении ГУК	2,8±0,2	4,1±0,1	5,6±2,0
При лечении КУР	2,6±0,1	5,1±0,2	5,5±0,1
При лечении ОТ	1,7±0,1	0,6±0,1	0,4±0,1

ЭОП – экспериментальный острый панкреатит
 ГУК – гиалуриновая кислота
 КУР – куриозин
 ОТ – окситоцин

веолоподобных структурах панкреатоцитов, а также внутриклеточно.

Ультраструктурная идентификация внутриклеточно расположенных бактерий имеет определенную сложность. Особенно это касается специфических морфологических признаков микробов различных штаммов. Для их четкого фенотипического определения, безусловно, необходимы дополнительные методики, которыми мы не располагали. Полученные данные далее мы приводим без дифференциальной оценки внутриклеточного расположения *S. aureus* и *E. coli*.

Установлено присутствие реактивно измененных бактерий (экзогенно вводимых на этапах моделирования ЭОДП) в вакуолярной системе панкреатоцитов, макрофагов и клетках фибробластического дифферона. К этой системе мы отнесли эндоплазматический ретикулум с его гранулярной и агранулярной частями, а также пластинчатый комплекс Гольджи. Эти различные части вакуолярной системы сообщаются между собой постоянными или, что более вероятно, временными и динамичными каналами. Кроме того, мембраны этой системы не только без перерывов связаны с наружным листком кариолеммы, но в некоторых локусах вступают в контакт с плазматической мембраной через инвагинации последней или через пиноцитозные вакуоли.

Внутриклеточная локализация микроорганизмов в наибольшей степени была прослежена в расширенных везикулах эндоплазматического ретикулума, контактирующего с мешочками, цистернами и пузырьками комплекса Гольджи. Однозначно судить о жизнеспособности бактерий трудно. Тем не менее мы отмечаем сохранность у них основных ультраструктурных признаков по показателям, характеризующим клеточные оболочки, нуклеоид и цитоплазму.

Описанные выше данные касаются тех случаев, когда не было использовано корректиру-

ющего лечебного воздействия на ЭОДП или когда применялся цефабол.

В условиях использования окситоцина нам не удалось идентифицировать сохранных бактерий в системе эндосомы – комплекс Гольджи панкреатоцитов. В подавляющем большинстве обнаруженные бактерии были лизированы, в основном макрофагическими клетками. Уже в первые сутки эксперимента введение окситоцина существенно стимулировало деятельность макрофагов, увеличивая их количество в 2,5-3 раза. Часть из них включала радиоактивную метку ³H-тимидина, что свидетельствовало об активизации их готовности к клеточной репродукции. Подобных изменений макрофагических клеток не было отмечено при использовании антибиотика.

При анализе характера распределения стафилококков и *E. coli* (меченых ³H-тимидином), было обнаружено, что применение с целью лечебной коррекции ЭОДП препарата окситоцина достоверно уменьшало численность бактерий в очагах панкреонекроза. При этом обсемененность патогенами в данных условиях была в 1,5-2 раза ниже, по сравнению с теми сериями экспериментов, когда использовался антибиотик цефабол.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что окситоцин как один из адаптогенных гипоталамических нейроромонов может рассматриваться с точки зрения его влияния на внутриклеточную персистенцию в организме хозяина, а также как возможный антибиотический фактор с механизмом прямого влияния или опосредованного воздействия на бактериальные агенты путем активации макрофагальной системы. Полученные результаты могут служить основой для дальнейших научных разработок по включению окситоцина в комплекс лечебных мероприятий при остром деструктивном панкреатите.

Список использованной литературы:

1. Поленов А.Л., Константинова М.С., Гарлов П.Е. Гипоталамо-гипофизарный нейроэндокринный комплекс // Нейроэндокринология. СПб, 1994. – Ч. 2. – С. 139-186.
2. Акмаев И.Г. Взаимодействие основных регулирующих систем (нервной, эндокринной и иммунной) и клиническая манифестация их нарушений // Клиническая медицина. – 1997. – №11. – С. 8-13.
3. Стадников А.А. Гипоталамические факторы регуляции процессов роста, пролиферации и цитодифференцировки эпителия аденогипофиза. Екатеринбург: УрО РАН, 1999. – 140 с.
4. Стадников А.А. Роль гипоталамических нейропептидов во взаимодействии про- и эукариот. (Структурно-функциональные аспекты). Екатеринбург: УрО РАН, 2001. – 245 с.
5. Пирс Э. Гистохимия теоретическая и прикладная. – М.: ИЛ, 1962. – 610 с.
6. Жинкин Л.Н. Применение радиоактивных изотопов в гистологии // Радиоактивные индикаторы в гистологии. Л.: ИЭМ АМН СССР, 1959. – С. 5-33.
7. Яминский И.В. Взгляд в микромир: от атомов до молекул живых клеток // Сканирующая зондовая микроскопия биополимеров. М., 1997. – Вып. 1 – С. 9-12.