# ЗНАЧИМОСТЬ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КУПФЕРА В РЕГУЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ ХОЛЕСТЕРИНА В ПЕЧЕНИ И ЛИПОПРОТЕИНАХ КРОВИ, УРОВНЯ ЙОДСОДЕРЖАЩИХ ГОРМОНОВ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ В КРОВИ И ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

**Чепелева Е.Н., Висмонт Ф.И.**

**Белорусский государственный медицинский университет**

**Кафедра патологической физиологии**

## ВВЕДЕНИЕ

Перитонит, будучи частым и наиболее опасным осложнением острых хирургических, гинекологических заболеваний, повреждений органов брюшной полости и оперативных вмешательств на них, является широко распространенной патологией и представляется серьезной как медицинской, так и социальной проблемой [1]. Летальность в терминальных стадиях данного заболевания может достигать 50–70 % [1].

В связи с этим поиск путей коррекции основных жизненных функций и обмена веществ при септических состояниях и перитоните, в частности, является одной из актуальных задач современной медицины.

Проведенные за последние десятилетия исследования позволили по-новому взглянуть на проблему перитонита и оценить роль печени в этом процессе [2].

Известно, что печеночная недостаточность сопровождается значительными нарушениями обменных процессов, особое значение среди которых имеют изменения метаболизма липидов, в частности, обмена липопротеинов (ЛП) сыворотки крови. Предполагается, что холестерин (ХС) ЛП, являясь важнейшим фактором поддержания физико-химических свойств и функций клеточных мембран, основным субстратом для стероидогенеза, обеспечивает формирование компенсаторного ответа организма на инфекцию.

Известно, что при септических состояниях и перитоните имеет место выраженная эндотоксинемия. К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении клеток Купфера (КК) в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии, в процессах детоксикации и элиминации эндотоксинов в печени [3, 4]. Показано, что патогенные эффекты эндотоксинов на метаболизм и функции различных клеток и гепатоцитов, в частности при перитоните, связаны с усиленной продукцией КК целого ряда цитокинов, а также монооксида азота (NO), под воздействием которых происходят изменения в системе нейроэндокринной регуляции органов и систем [5].

Рядом исследователей выявлено, что печень участвует в метаболизме гормонов и физиологически активных веществ, участвующих в регуляции обмена ХС ЛП сыворотки крови и, в частности, гормонов щитовидной железы, обеспечивая поддержание их оптимальной концентрации в крови [3, 6].

Однако, несмотря на то, что исследования по выяснению значимости функционального состояния печени в патогенезе септических состояний многочисленны, значимость активности клеток КК в процессах изменения липидного профиля, метаболизма ХС ЛП крови, уровня йодсодержащих гормонов в плазме крови и температуры тела при перитоните остается во многом не изученной.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Выяснить значимость активности КК в регуляции содержания общего ХС в печени и ЛП крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови и температуры тела у крыс с экспериментальным перитонитом.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опыты выполнены на 108 взрослых белых крысах обоих полов массой 180–250 г. Животные до постановки эксперимента адаптировались к условиям вивария. Животные получали полноценный пищевой рацион в соответствии с правилами содержания лабораторных животных. Питьевой режим соответствовал принципу ad libitum.

В связи с имеющимися в литературе данными о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания уровня ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, опыты проводились в строго определенное время (8–12 ч утра). Все наблюдения проводили в термонейтральных условиях (20–22 °С).

Для создания экспериментального перитонита использована модель лигирования и последующего однократного пунктирования слепой кишки – cecal ligation and puncture (CLP) [7]. Для этого крысам под гексеналовым наркозом (100 мг/кг, внутрибрюшинно) производили двухсантиметровый разрез передней брюшной стенки, через который извлекали слепую кишку. Затем ниже илеоцекального клапана на кишку накладывали лигатуру и однократно пунктировали ее иглой с внешним диаметром 1,3 мм (18 gauge). Пассаж пищевых масс при этом не нарушался. По данным литературы, через 18-24 ч после CLP-операции у животных развивается тяжелый полимикробный сепсис, который сопровождается выраженной полиорганной недостаточностью. В качестве контроля использовали ложнооперированных (ЛО) крыс, которым под наркозом проводили разрез передней брюшной стенки без извлечения и пунктирования слепой кишки. Всем животным ушивали брюшную стенку и через 30 мин после оперативного вмешательства подкожно вводили 2,5 мл изотонического раствора хлорида натрия.

Селективную депрессию КК вызывали у животных за 12 ч до CLP-операции или ложной операции внутрибрюшинным введением ингибитора КК, который вводили на водном растворе гадолиния хлорида ($GdCl_3$) в дозе 10 мг/кг.

Декапитацию животных проводили через 24 ч после лигирования и пунктирования слепой кишки или ложной операции. Взятие для исследования крови, ткани печени у контрольных и опытных животных проводилось за максимально короткое время после декапитации. Суммарную фракцию ЛПОНП и ЛПНП выделяли из сыворотки крови осаждением по методу M. Burstein, J. Samaille (1955). Для определения содержания общего ХС, ХС ЛПВП в сыворотке крови и ХС в тканевых гомогенатах проводили экстракцию липидов по методу М. А. Креховой, М. К. Чехрановой (1971). Содержание ХС в сухих липидных экстрактах сыворотки крови определяли с использованием реакции Либермана-Бурхарда. Расчет содержания ХС суммарной фракции ЛПОНП+ЛПНП проводили по формуле:

ХС ЛПОНП + ЛПНП = общий ХС сыворотки крови – ХС ЛПВП

Коэффициент атерогенности рассчитывали по формуле:

Коэффициент атерогенности = (ХС ЛПОНП + ЛПНП) / ХС ЛПВП

Продукцию NO определяли по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов ($NO_3^-/NO_2^-$).

Содержание общего трийодтиронина ($T_3$) и тироксина ($T_4$) в плазме крови определяли радиоиммунологическим методом с использованием наборов реактивов РИА-$T_3$-СТ и РИА-$T_4$-СТ производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси».

Тяжесть поражения печени оценивали по изменению соотношения активности АлАТ/АсАТ в сыворотке крови – важнейших показателей тяжести поражения печени. Определение активности аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в плазме крови производили колориметрическим динитрофенилгидрозиновым методом.

У всех животных проводилось измерение ректальной температуры с использованием электротермометра ТПЭМ-1 (НПО «Медфизприбор», Российская Федерация). Эксперименты на крысах проводились в соответствии с этическими нормами обращения с животными. Полученные цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с помощью критерия Стьюдента. Все данные представлялись в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического ($X \pm S_x$). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты показали, что через 24 ч после CLP-операции у всех крыс развиваются некротические изменения слепой кишки, перитонит с выпотом в брюшную полость, парез кишечника, выраженные признаки генерализованной воспалительной реакции: адинамия, вялость, в большинстве случаев – геморрагический конъюнктивит и диарея.

Установлено, что в условиях экспериментального перитонита через 24 ч после CLP-операции, но не у ЛО крыс, ректальная температура снижается на 1,1 °С: с 37,9 ± 0,09 °С до 36,8 ± 0,21 °С ($p < 0,05$; n = 12). Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови животных с перитонитом через 24 ч после CLP-операции возрастала. Развитие перитонита у крыс (n = 10), по сравнению с ЛО животными (n = 10), сопровождалось повышением активности АлАТ в сыворотке крови на 71,2 % ($p < 0,01$): активность составляла 0,59 ± 0,05 мккат/л у ЛО и 1,01 ± 0,09 мккат/л у опытных крыс после CLP-операции. Активность АсАТ в плазме крови крыс в этих условиях возрастал по сравнению с ЛО животными на 15,5 % ($p < 0,05$) и составляла 0,84 ± 0,04 мккат/л у ЛО крыс (n = 10) и 0,97 ± 0,05 мккат/л у опытных крыс (n = 10). Соотношение активностей АлАТ/АсАТ составляло у ЛО 0,70 ± 0,04 и 1,04 ± 0,08 у крыс с перитонитом (рисунок 1).

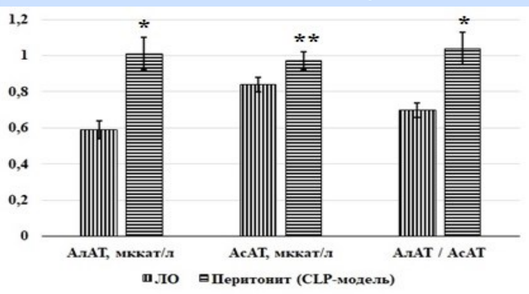


***Рис. 1. Изменения активности АлАТ, АсАТ и их соотношения в сыворотке крови у крыс в условиях экспериментального перитонита (CLP-модель)***
***Примечание: * – p < 0,01; ** – p < 0,05***

Выявлено, что содержание общего ХС в печени крыс после CLP-операции повышалось на 14,1 % ($p < 0,05$): у ЛО составляло 0,298 ± 0,007 мг/100 мг ткани (n = 10), а у крыс с перитонитом 0,340 ± 0,014 мг/100 мг ткани (n = 10). Также имело место повышение уровня общего ХС в сыворотке крови на 23,3 % ($p < 0,05$) с 2,66 ± 0,14 (n = 10) до 3,28 ± 0,11 мМоль/л (n = 10) и выраженные изменения содержания ХС различных классов ЛП сыворотки крови крыс: снижалось содержание ХС ЛПВП на 37,1 % ($p < 0,01$) по сравнению с ЛО животными: с 1,32 ± 0,09 мМоль/л (n = 10) до 0,83 ± 0,07 мМоль/л (n = 10), повышался уровень ХС ЛПОНП + ЛПНП на 82,8 % ($p < 0,001$): с 1,34 ± 0,07 мМоль/л (n = 10) до 2,45 ± 0,08 мМоль/л (n = 10). Установлено, что в условиях перитонита имеет место возрастание коэффициента атерогенности (Ка) на 189,2 % ($p < 0,001$): с 1,02 ± 0,07 ед. у ЛО крыс (n = 10) до 2,95 ± 0,08 ед. у опытных животных (n = 10). Таким образом, повышение коэффициента атерогенности обусловлено как понижением содержания ХС ЛПВП, так и, главным образом, увеличением содержания ХС суммарных фракций ЛПОНП + ЛПНП в крови, что свидетельствует о развитии вторичной атерогенной дислипопротеинемии.

Обнаружено, что в организме у крыс при перитоните через 24 ч после CLP-операции имеет место снижение в плазме крови уровня $T_4$ на 69,7 % ($p < 0,05$) и содержания $T_3$ на 24,1 % ($p < 0,05$): с 48,40 ± 9,5 нМоль/л у ЛО (n = 8) до 14,67 ± 1,6 нМоль/л у опытных животных (n = 8) и с 1,62 ± 0,12 нМоль/л (n = 8) до 1,23 ± 0,07 нМоль/л (n = 8) соответственно.

Выявлено, что в этих условиях у крыс изменяется содержание в плазме крови $NO_3^-/NO_2^-$ – конечных продуктов деградации NO. Развитие перитонита у крыс приводило к повышению концентрации $NO_3^-/NO_2^-$ в плазме крови животных на 81,8 % ($p < 0,05$): с 5,27 ± 0,46 мкмоль/л у ЛО (n = 8) до 9,58 ± 1,27 мкМоль/л у крыс с перитонитом (n = 8).

Учитывая, что КК играют важную роль в инактивации эндотоксина бактериального происхождения и в образовании целого ряда цитокинов, а также NO, участвующих в регуляции процессов жизнедеятельности, в частности обмена тиреоидных гормонов и ЛП крови, можно было предположить, что в выявленных изменениях тиреоидного статуса организма, ЛП обмена и температуры тела в условиях перитонита, сопровождающегося печеночной дисфункцией, могут иметь значение и КК.

Подтверждение было получено в опытах на крысах при выяснении особенностей изменения температуры тела, содержания ХС ЛП, уровня $NO_3^-/NO_2^-$ и тиреоидных гормонов в плазме крови в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК $GdCl_3$.

Обнаружено, что действие в организме у крыс $GdCl_3$ в дозе 10 мкг/кг – дозе, подавляющей эндотоксинобезвреживающую функцию КК, – сопровождается изменениями температуры тела и уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови животных. Внутрибрюшинное введение раствора $GdCl_3$ приводило через 12 ч после введения препарата к повышению температуры тела на 1,1 °С ($p < 0,05$; n = 12) по сравнению с контрольными животными (внутрибрюшинное введение физ. раствора 1,0 мл). Через 12 ч после введения препарата возрастал уровень $T_3$ в плазме крови у крыс на 171,4 % ($p < 0,05$; n = 8), а концентрация $T_4$ в крови была на 38,9 % ($p < 0,05$; n = 8) ниже по сравнению с животными в группе контроля. Концентрация в плазме крови $NO_3^-/NO_2^-$ в этих условиях снижалась на 37,5 % ($p < 0,05$; n = 8) и составляла 3,5 ± 0,37 мкМоль/л.

Депрессия КК $GdCl_3$ ослабляла развитие характерных изменений уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы, содержания общего ХС в печени и ЛП плазмы крови и температуры тела у крыс с перитонитом (см. табл. 1). Опыты показали, что предварительное (за 12 ч до CLP-операции) введение крысам $GdCl_3$ в дозе 10 мг/кг не приводило к значительному снижению содержания общего $T_4$ в крови животных по сравнению с животными контрольной группы. Содержание $T_4$ в плазме крови животных опытной группы (n = 8) увеличилось на 302,6 % ($p < 0,01$) по сравнению с уровнем $T_4$ в крови контрольной группы животных (n = 8), подвергнутых CLP-операции и получивших внутрибрюшинно 1,0 мл физ. раствора. Применение $GdCl_3$ препятствовало и практически устраняло снижение содержания $T_3$ у животных с перитонитом, а также приводило к менее значительному повышению уровню $NO_3^-/NO_2^-$ в крови. Концентрация $T_3$ в плазме крови крыс через 24 ч после CLP-операции (n = 8), предварительно получивших $GdCl_3$, составила 1,58 ± 0,09 нМоль/л, а у крыс с перитонитом (n = 8), предварительно получивших физ. раствор, 1,24 ± 0,06 мМоль/л. Уровень $NO_3^-/NO_2^-$ в плазме крови крыс с перитонитом, получивших $GdCl_3$, по сравнению с животными с перитонитом, но получивших физ. раствор, был ниже на 31,8 % ($p < 0,05$) и составил 6,51 ± 1,04 мкМоль/л (n = 8).

Выявлено, что у крыс с перитонитом в условии депрессии КК (n = 10) отмечаются менее выраженные изменения содержания общего ХС в крови и печени, ХС ЛП крови животных, а также менее значимое повышение уровня АлАТ и АсАТ в плазме крови. Так, уровень общего ХС в крови и в печени в этих условиях по сравнению с животными контрольной группы (n = 10), подвергшихся CLP-операции и получивших внутрибрюшинно 1,0 мл физ. раствора, был ниже на 22,1 % ($p < 0,05$) и 17,1 % ($p<0,05$). Имело место снижение по сравнению с животными контрольной группы содержания ХС ЛПОНП + ЛПНП в сыворотке крови на 39,1% ($p < 0,01$; n = 10) и повышение содержания ХС ЛПВП в сыворотке крови на 25,6 % ($p < 0,01$; n = 10).

Температура тела у крыс с перитонитом, которым до CLP-операции предварительно внутрибрюшинно вводили $GdCl_3$ (10 мкг/кг) снижалась на 0,6 °С ($p < 0,05$; n = 12).

Активность АлАТ и АсАТ – важнейших показателей тяжести поражения печени – в плазме крови крыс опытной группы (n = 10) (развитие перитонита в условиях депрессии КК) по сравнению с животными с перитонитом, получивших физ. раствор (n = 10), понижалась на 25,77 % ($p < 0,01$) и 8,5 % ($p < 0,05$) соответственно.

Известно, что у людей и крыс более 2/3 циркулирующего 3,5,3'-трийодтиронина – высокоэффективного тиреоидного гормона – продуцируется в периферических органах из тироксина путем 5'-дейодирования последнего. Показано, что конверсия $T_4$ в $T_3$, в основном происходящая в печени, – одно из ведущих звеньев клеточного метаболизма тиреоидных гормонов – во многом определяет тиреоидный статус организма.

Показано, что тиреоидные гормоны ингибируют окисление ХС ЛПНП, тем самым проявляют антиатерогенный эффект.

Можно было предположить, что выявленные изменения уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы при перитоните в условиях поражения печени $GdCl_3$, обусловлены изменениями функционального состояния печени, ее детоксикационной и эндотоксинобезвреживающей функций, и, возможно, являются важным звеном оптимизации тиреоидного статуса организма при этом состоянии.

С целью подтверждения выдвинутого предположения, представляло интерес выяснить значимость гипертиреоидного состояния, вызываемого $T_3$ в выявленных изменениях содержания ХС в печени и ЛП крови и характера формирования терморегуляторных реакций организма у крыс при перитоните, вызываемом CLP-операцией.

С этой целью изучали сдвиги содержания общего ХС в крови и печени и ХС ЛП крови, а также изменения ректальной температуры у крыс с повышенным уровнем йодсодержащих гормонов в организме животных при перитоните. Для этого крысам через 3 ч после оперативного вмешательства (ЛО или CLP-операции) однократно интрагастрально вводили на 1%-ом крахмальном растворе синтетический препарат трийодтиронина гидрохлорид (Liothyronin, «Berlin Chemi», Германия) в дозе 30 мкг/кг.

Установлено, что интрагастральное введение $T_3$ крысам через 3 ч после CLP-операции предотвращает развитие у них гипотермии. Так, если через 24 ч после CLP-операции ректальная температура снижалась с 37,9 ± 0,09 °С (n = 12) до 36,8 ± 0,21 °С ($p < 0,05$; n = 12), то в условиях действия $T_3$ ректальная температура крыс с перитонитом составляла 37,8 ± 0,29 °С ($p < 0,05$; n = 12). Действие $T_3$ у крыс с перитонитом ослабляло вызываемое CLP-операцией снижение содержания ХС ЛПВП в крови, а также характерное для перитонита повышение уровня ХС в печени, ХС ЛПОНП + ЛПНП в крови и коэффициента атерогенности.

Так, если у крыс с экспериментальным перитонитом, получивших интрагастрально 1,0 мл 1 %-ного крахмального раствора, содержание ХС ЛПВП крови понижалось на 37,7 % ($p < 0,01$): с 1,30 ± 0,11 мМоль/л у ЛО крыс (n = 10), получивших 1 %-ный крахмальный раствор, до 0,81 ± 0,07 мМоль/л у крыс с перитонитом (n = 10), получивших 1 %-ный крахмальный раствор, то у крыс дополнительно получивших $T_3$ (n = 8) данный показатель снижался лишь на 19,2 % ($p < 0,01$) до 1,05 ± 0,04 мМоль/л по сравнению с ЛО крысам (n = 10), получившими 1 %-ный крахмальный раствор.

Развитие перитонита у крыс, получивших $T_3$, сопровождалось менее значимым возрастанием содержания ХС ЛПОНП + ЛПНП – на 16,3 % ($p <0,01$). Содержание ХС ЛПНОП + ЛПНП в крови животных с перитонитом, получивших 1 %-ный крахмальный раствор, составляла 2,49 ± 0,08 мМоль/л (n=8), а у крыс с перитонитом, получивших $T_3$, – 1,76 ± 0,14 (n = 8). Повышение коэффициента атерогенности у крыс с перитонитом, получивших 1 %-ный раствор крахмала, составляло 192,4 % ($p < 0,01$): с 1,05 ± 0,05 ед. у ЛО (n = 10) до 3,07 ± 0,16 ед. у крыс с перитонитом (n = 10), в то время как у животных, получивших $T_3$ на 1 %-ном крахмальном растворе, развитие перитонита сопровождалось менее выраженным возрастанием данного показателя – на 60,0 % ($p < 0,01$): с 1,05 ± 0,05 ед. у ЛО крыс, получивших 1 %-ный крахмальный раствор (n = 10), до 1,68 ± 0,11 ед. у крыс с перитонитом, получивших $T_3$ на 1 %-ном крахмальном растворе (n = 8).

У крыс с перитонитом, получивших $T_3$ на 1 %-ном крахмальном растворе (n = 8), по сравнению с животными после CLP-операции и получивших 1 %-ный крахмальный раствор содержание общего ХС в печени крыс было меньше на 12,9 % ($p < 0,05$): 0,340 ± 0,014 у крыс (n = 10) с перитонитом, получивших 1 %-ный крахмальный раствор, и 0,296 ± 0,018 мг/100 г ткани у крыс с перитонитом (n = 8), получивших $T_3$ на 1 %-ном крахмальном растворе.

Таким образом, развитие перитонита у крыс, которым интрагастрально однократно вводили $T_3$ на 1%-ом крахмальном растворе, сопровождалось менее значительным приростом содержания общего ХС в печени и крови, ХС ЛПОНП + ЛПНП, менее значимым снижением ХС ЛПВП в крови и коэффициента атерогенности по сравнению с контрольной группой животных после CLP-операции. Полученные экспериментальные данные дают основание полагать, что повышение уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови при перитоните ослобляет характерные для его развития атерогенные нарушения показателей липопротеинового обмена крови.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях экспериментального перитонита у крыс развивается вторичная атерогенная дислипопротеинемия и снижается уровень йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови. В изменениях содержания холестерина в печени и липопротеинах крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови и температуре тела при перитоните (CLP-модель) участвуют клетки Купфера и NO. Снижение активности клеток Купфера при перитоните, по-видимому, играет компенсаторную роль, повышая уровень $T_3$ в крови и ослабляя развитие характерных изменений содержания общего холестерина в печени, холестерина липопротеинов в крови и препятствует развитию вторичной дислипопротеинемии.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Перитонит, как одна из основных причин летальных исходов / Н. Д. Томнюк [и др.] // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 10. – С. 81–84.
2. Мишнев, О. Д. Патология печени при сепсисе / О. Д. Мишнев, У. Н. Туманова, А. И. Щеголев // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2017. – № 8-2. – С. 267–271.
3. Висмонт, Ф. И. О роли клеток Купфера и гепатоцитов в механизмах реализации влияния трийодтиронина на процессы детоксикации и регуляции температуры тела / Ф. И. Висмонт, С. А. Артюшкевич // Белорусский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13, № 3. – С. 45–47.
4. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени / Д. Н. Маянский // Патологическая физиология и экспериментальная медицина. – 1985. – № 4. – С. 80–86.
5. Ni, J. Nitric oxide synthase isoforms play distinct roles during acute peritonitis / N. Jie [et al.] // Nephrol Dial Transplant. – 2010. – Vol. 25, N 1. – P. 86-96.
6. Функциональное состояние щитовидной железы и липидный профиль крови / С. В. Мустафина [и др.] // Атеросклероз. – 2010. – Т. 6, № 2. – С. 15–19.
7. Моделирование экспериментального сепсиса путем выполнения лигирования и пункции слепой кишки (CLP-процедура) / Е. Ю. Шаповалова [и др.] // Ульяновский медико-биологический журнал. – 2020. – № 3. – С. 150–158.