Министерство здравоохранения Республики Беларусь

Белорусский государственный медицинский университет

Кафедра патологической физиологии

ОБ УЧАСТИИ КЛЕТОК КУПФЕРА В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ, ФОРМИРОВАНИЯ ДИСЛИПИДЕМИИ И ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

Чепелева Елена Николаевна, старший преподаватель

Висмонт Франтишек Иванович, заведующий кафедрой, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент НАН Беларуси, заслуженный деятель науки Республики Беларусь

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время, несмотря на значительные успехи в лечении острых хирургических заболеваний органов брюшной полости, частота осложнений, в том числе развития перитонита, остается по-прежнему высокой и составляет 20-30 % (при тяжелых формах 50-80 %) [1]. Патогенез распространенного перитонита является сложным динамичным процессом, главенствующая роль в развитии которого отводится эндотоксинемии, обусловленной как накоплением в организме токсичных продуктов нарушенного обмена веществ, так и поступающими из брюшной полости токсинами [2].

Известно, что в процессах детоксикации в условиях эндотоксинемии задействованы две большие популяции клеток печени: гепатоциты и звездчатые макрофаги (клетки Купфера (КК)), которые, с одной стороны, элиминируют из кровотока эндотоксины, а с другой – активируются последними и продуцируют во внутреннюю среду организма, в том числе в кровь, огромное количество физиологически активных веществ (интерлейкины, фактор некроза опухолей, колониестимулирующие факторы и др.) – важнейших «медиаторов» острофазного ответа и воспаления [3].

Показано, что бактериальная эндотоксинемия при перитоните, сопровождающаяся гиперпродукцией провоспалительных медиаторов и цитокинов, в значительной мере обусловлена активацией КК и приводит к изменению функционального состояния гепатоцитов и метаболизма основных энергетических и пластических субстратов, который характеризуется значительным преобладанием распада веществ над их утилизацией (синдром гиперметаболизма) [4]. Проблеме нарушений обмена холестерина (ХС) липопротеинов (ЛП) крови при различных септических состояниях, действии бактериальных эндотоксинов посвящено большое количество работ отечественных и зарубежных авторов [2, 5–8]. Показано, что большинство патологических состояний, сопровождающихся бактериальной эндотоксинемией или бактериемией, вызывают заметную перестройку всех видов обмена, в том числе и липидного [7, 9–12]. Однако особенности гуморальной регуляции уровня ХС ЛП плазмы крови при бактериальной эндотоксинемии в условиях перитонита остаются не выясненными. Как известно, КК печени принадлежит важная роль в обезвреживании бактериальных эндотоксинов. Несмотря на то, что КК составляют не более 10 % всех клеток печени, они играют важную роль в борьбе с инфекционными осложнениями, составляя до 90% макрофагов в организме человека [13]. КК, выполняя фагоцитирующую функцию, метаболизируют различные вещества липидной природы, расщепляют белковые комплексы и мелкие частицы, а также удаляют из кровотока апоптотические клетки.

Среди многочисленных сдвигов в обменных процессах при септических состояниях, сопровождающихся эндотоксинемией, особую роль играют изменения метаболизма липидов тканей и крови [14]. Известно, что ХС и другие липиды являются не только основным структурно-функциональным компонентом биологических мембран и субстратом для стероидогенеза, но и служат источником свободных радикалов, а также участвуют в регуляции сосудистого тонуса, реакциях гемостаза, процессах внутриклеточной передачи сигнала, развитии воспаления, что во многом определяет течение и исход многих патологических состояний, сопровождающихся бактериальной эндотоксинемией [15].

Одной из важнейших функций ЛП крови при инфекционных и септических состояниях является их участие в процессах детоксикации организма. Показано, что различные классы липопротеинов крови (как липопротеины высокой плотности (ЛПВП), так и липопротеины низкой плотности (ЛПНП)) связывают бактериальные эндотоксины, поступающие в кровоток при различных инфекциях, и тем самым снижают их патогенное действие в организме [16, 17]. Кроме того, ХС ЛП как важнейший субстрат для стероидогенеза в надпочечниках, играет важную роль в формировании адекватной ответной реакции организма на инфекцию и действие других повреждающих факторов [18].

Известно, что выраженность эндотоксинемии определяется состоянием детоксикационной функции печени и системы гипофиз-щитовидная железа. Так, рядом исследователей показано, что печень играет важную роль в метаболизме гормонов щитовидной железы, обеспечивает регуляцию их обмена и поддержание оптимального уровня в крови. Установлено, что от функционального состояния печени зависит интенсивность процессов дейодировния йодсодержащих гормонов щитовидной железы, имеющих важное значение в процессах детоксикации и терморегуляции [19].

Показано, что тиреоидные гормоны обладают многочисленными биологическими эффектами, оказывая стимулирующее действие на протекание большинства биохимических процессов. Показано, что от уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы зависит состояние энергетического и пластического обмена, а также процессов теплообмена в норме и при патологии [20–22].

Исходя из вышеизложенного есть основания полагать, что повреждающее действие различного рода токсинов, равно как и их элиминация печенью во многом определяется состоянием тиреоидного статуса организма, однако механизмы участия тиреоидных гормонов в регуляции детоксикационной функции печени и теплообмена остаются во многом неизученными.

Таким образом, участие КК в механизмах поддержания гомеостаза, регуляции процессов жизнедеятельности и формирования защитно-приспособительных реакций при бактериальной эндотоксинемии очевидно и вполне закономерно. Однако выяснение значимости КК в регуляции процессов детоксикации при перитоните не было предметом специального исследования. Также до сих пор остается неясным значение КК в формировании тиреоидного статуса, влиянии на активность аргиназы печени, обмен ХС ЛП сыворотки крови и температуру тела крыс при септических состояниях в условиях экспериментального перитонита.

Целью данной работы было выяснение значимости активности КК в процессах детоксикации, формировании тиреоидного статуса и дислипидемии у крыс с экспериментальным перитонитом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование выполнено на 192 взрослых белых крысах-самцах массой 180-220 г. Эксперименты проводились в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными и требованиями директив Европарламента и Совета Европейского союза (2010/63/EU), регулирующих использование животных в научных целях [23].

До постановки эксперимента животных адаптировали к условиям вивария. Они получали полноценный пищевой рацион в соответствии с правилами содержания лабораторных животных [24]. Питьевой режим соответствовал принципу adlibitum. В связи с имеющимися в литературе данными о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания содержания ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, опыты проводили в строго определенное время (8-12 ч утра), соблюдая термонейтральные условия (20-22 °C).

Для создания экспериментального перитонита использована модель лигирования и последующего однократного пунктирования слепой кишки – CLP (cecal ligation and puncture) [25, 26]. Для этого крысам под гексеналовым наркозом (100 мг/кг, внутрибрюшинно (в/б)) 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. Схематическое изображение CLP-операции у крыс представлено на рисунке 1.

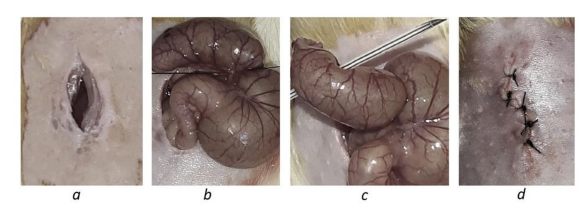

Рис. 1. Схематическое изображение CLP-операции у крыс: *a* – выполнен продольный разрез передней брюшной стенки; *b* – осуществлено извлечение слепой кишки и ниже илеоцекального клапана наложена лигатура; *c* – выполнено однократное пунктирование слепой кишки иглой; *d* – возвращена слепая кишка в брюшную полость и осуществлено ушивание брюшной стенки

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 сразу после декапитации. Суммарную фракцию липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и ЛПНП из сыворотки крови выделяли путем осаждения по методу M. Burstein и J. Samaille [27]. 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 [28]. Содержание ХС в сухих липидных экстрактах сыворотки крови оценивали с помощью реакции Либермана-Бурхарда, а содержание ХС суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП – по формуле ХС ЛПОНП + ЛПНП = общий ХС сыворотки крови – ХС ЛПВП.

Коэффициент атерогенности (Ка) рассчитывали по следующей формуле: Ка = (ХС ЛПОНП + ЛПНП) / ХС ЛПВП.

С целью выяснения значимости активности КК в исследуемых процессах при CLP-перитоните использовали селективный ингибитор КК $GdCl_3$. Водный раствор $GdCl_3$ в дозе 10 мг/кг (дозе, подавляющей эндотоксин обезвреживающую функцию КК [29, 30]) вводили крысам в/б 1 раз в неделю в течение 8 недель. В указанной дозе данный ингибитор широко используется в экспериментальной практике с целью выяснения значимости КК в процессах жизнедеятельности [31, 32]. Контрольным группам крыс 1 раз в неделю в течение 8 недель в/б вводили 1,0 мл физиологического раствора (физ. р-р).

Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NO_x) [33]. Содержание общего и свободного трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4) в плазме крови определяли радиоиммунологическим методом с использованием наборов реактивов РИА-T_3-СТ, РИА-T_3-свободный-СТ, РИА-T_4-СТ и РИА-T_4-свободный производства УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси». Тяжесть поражения печени оценивали по изменению соотношения активности АлАТ и АсАТ (АлАТ/АсАТ) в сыворотке крови. Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови определяли колориметрическим динитрофенилгидрозиновым методом [34]. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически по методике, предложенной J.W. Geyeri, B. Dabich [35].

О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), концентрации в плазме крови фракции «средних молекул» (СМ) и степени токсичности крови (СТК). Определение содержания СМ производили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В. М. Моиным с соавт. [36], СТК-способом, предложенным О. А. Радьковой с соавт. [37]. О ПНС у крыс (гексенал 100,0 мг/кг, в/б) судили по времени нахождения животных в боковом положении.

В исследовании использовались следующие экспериментальные группы:

- Интактные ($n = 18$) – интактные крысы;
- ЛО ($n = 18$) – ложнооперированные крысы, которым под наркозом проводили разрез передней брюшной стенки без извлечения и пунктирования слепой кишки;
- CLP-перитонит ($n = 27$) – крысы, которым выполняли CLP-операцию;
- Контроль + физ. р-р ($n = 18$) – крысы, которым в/б вводили 1,0 мл физраствора1 раз в неделю в течение 8 недель;
- Контроль + $GdCl_3$ ($n = 18$) – крысы, которым в/б вводили $GdCl_3$ в дозе 10 мг/кг 1 раз в неделю в течение 8 недель;
- ЛО + физ. р-р ($n = 18$) – крысы, которым в/б вводили 1,0 мл физраствора1 раз в неделю в течение 8 недель и после этого выполняли ложную операцию;
- ЛО + $GdCl_3$ ($n = 18$) – крысы, которым в/б вводили $GdCl_3$ в дозе 10 мг/кг 1 раз в неделю в течение 8 недель и после этого выполняли ложную операцию;
- CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 29$) – крысы, которым в/б вводили 1,0 мл физраствора1 раз в неделю в течение 8 недель и после этого выполняли CLP-операцию;
- CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 28$) – крысы, которым в/б вводили $GdCl_3$ в дозе 10 мг/кг 1 раз в неделю в течение 8 недель и после этого выполняли CLP-операцию.

В группах CLP-перитонит, CLP-перитонит + ФР и CLP-перитонит + $GdCl_3$ через 24 ч после CLP-операции отмечалась следующая выживаемость животных: 66,7 %, 62,1 % и 64,3 % соответственно.

У всех животных с помощью электротермометра ТПЭМ-1 (НПО «Медфизприбор», Российская Федерация) измеряли ректальную температуру.

Достоверность различий между группами показателей оценивали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок. Все данные представлялись в виде среднего арифметического и ошибки среднего арифметического ($X \pm S_x$). Результаты считали статистически значимыми при значениях $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты показали, что через 24 ч после CLP-операции у крыс развиваются некротические изменения в слепой кишке, отмечаются перитонит с выпотом в брюшную полость и парез кишечника, имеются 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 ректальная температура снижалась на 1,0 °C ($p < 0,01$): с 37,8 ± 0,15 °C у ЛО крыс (n = 10) до 36,8 ± 0,25 °C у крыс с CLP-перитонитом (n = 10). В/б введение $GdCl_3$ (10 мкг/кг) 1 раз в неделю в течение 8 недель в группах Контроль + $GdCl_3$ (n = 10) и ЛО + $GdCl_3$ ($n = 10$)) приводило к статистически не значимому повышению температуры тела на 0,4 °C и 0,5 °C соответственно по отношению к величине ректальной температуры у животных в контролях, которым в/б вводили физ. раствор (группы Контроль + физ. р-р ($n = 10$) и ЛО + физ. р-р ($n = 10$) соответственно). По имеющимся литературным данным ингибитор КК $GdCl_3$ может вызывать изменения в теплообмене, детоксикации и метаболизме тиреоидных гормонов [38]. Депрессия КК $GdCl_3$ ослабляла развитие характерных изменений температуры тела у крыс с CLP-перитонитом. Температура тела у крыс, которым предварительно до CLP-операции в/б вводили $GdCl_3$ (10 мкг/кг) 1 раз в неделю в течение 8 недель, через 24 ч после CLP-операции была на 1,0 °C выше ($p < 0,05$; $n = 10$), чем у животных с экспериментальным перитонитом, получившими 1,0 мл физраствора ($n = 10$) (рисунок 2).

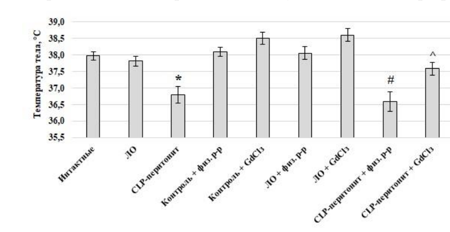

Рис. 2. Температура тела у крыс с экспериментальным перитонитом в условиях депрессии КК $GdCl_3$ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, # – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^ – $p < 0,05$ по отношению к группами CLP-перитонит + физ. р-р и ЛО + $GdCl_3$

Выявлено, что содержание общего ХС в печени крыс через 24 часа после CLP-операции повышалось на 37,2 % ($p < 0,01$): у ЛО животных ($n = 10$) оно составляло 0,235 ± 0,016 мг/100 мг ткани, а у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$) – 0,321 ± 0,018 мг/100 мг ткани. Кроме этого, имело место повышение содержания общего ХС в сыворотке крови на 23,7 % ($p < 0,05$) – с 2,66 ± 0,14 мМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до 3,29 ± 0,17 мМоль/л у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$), а также отмечались выраженные изменения в содержании ХС различных классов ЛП в сыворотке крови крыс: содержание ХС ЛПВП снижалось на 42,4 % ($p < 0,01$) – с 1,32 ± 0,18 мМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до 0,76 ± 0,08 мМоль/л у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$), содержание ХС ЛПОНП + ЛПНП повышалось на 88,8 % ($p < 0,001$) – с 1,34 ± 0,07 мМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до 2,53 ± 0,13 мМоль/л у крыс с CLP-перитонитом ($n = 10$). Установлено, что в условиях CLP-перитонита имело место возрастание Ка на 185,8 % ($p < 0,001$): с 1,27 ± 0,23 ед. у ЛО крыс ($n = 10$) до 3,63 ± 0,40 ед. у животных с CLP-перитонитом ($n = 10$).

Установлено, что развитие CLP-перитонита у крыс в условиях депрессии КК с помощью $GdCl_3$ сопровождается менее выраженными изменениями содержания общего ХС в печени и сыворотке крови, а также ХС различных классов ЛП в сыворотке крови и Ка. Так, содержание общего ХС в печени крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$) в сравнении с группой CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) понижалось на 17,5 % ($p < 0,05$): с 0,325 ± 0,020 мг/100 мг ткани до 0,268 ± 0,016 мг/100 мг ткани. В данных условиях имело место снижение содержания общего ХС в сыворотке крови на 19,6 % ($p < 0,05$): от 3,44 ± 0,13 мМоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до 2,64 ± 0,13 мМоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$). У крыс с CLP-перитонитом в условиях депрессии КК $GdCl_3$ были обнаружены и выраженные изменения содержания ХС в различных классах ЛП крови, в частности понижение содержания ХС ЛПОНП + ЛПНП в сыворотке крови на 50,8 % ($p < 0,001$): от 2,54 ± 0,14 мМоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до 1,25 ± 0,10 мМоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$), а также повышение содержания ХС ЛПВП в сыворотке крови на 54,4 % ($p < 0,05$): с 0,90 ± 0,14 мМоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до 1,39 ± 0,16 мМоль/л у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$). Также в этих условиях имело место снижение Ка на 67,4 % ($p < 0,01$): с 3,53 ± 0,64 ед. у крыс в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до 1,15 ± 0,27 ед. у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$). Данные о содержании общего ХС в печени и сыворотке крови, а также ХС различных классов ЛП в сыворотке крови и Ка у крыс с экспериментальным перитонитом (CLP-модель) в условиях действия в организме животных депрессии КК $GdCl_3$ представлены на рисунке 3.

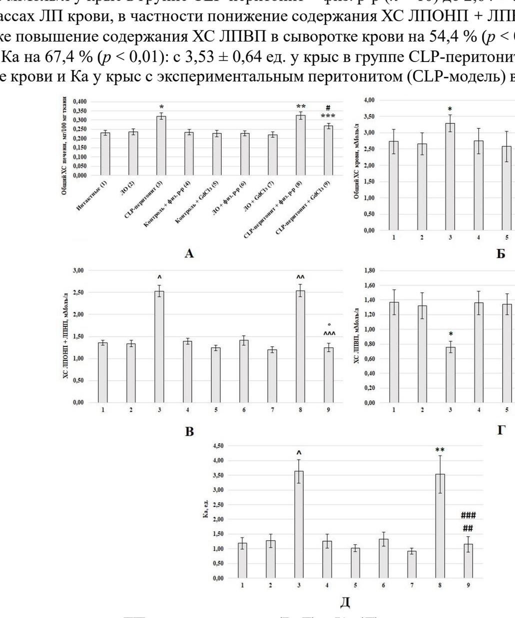

Рис. 3. Содержание общего ХС в печени (А) и сыворотке крови (Б), а также ХС в различных классах ЛП сыворотки крови (В, Г) и Ка (Д) у крыс с экспериментальным перитонитом в условиях депрессии КК $GdCl_3$ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, *** – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, # – $p < 0,05$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, ## – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, ### – $p < 0,01$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, ^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО, ^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, ° – $p < 0,001$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, °° – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р

Развитие перитонита у крыс ($n = 10$) сопровождалось повышением активности АлАТ в сыворотке крови по сравнению с данным показателем у ЛО животных ($n = 10$) на 183,9 % ($p < 0,001$): активность составляла 0,62 ± 0,04 мккат/л у ЛО крыс и 1,76 ± 0,11 мккат/л у опытных животных после CLP-операции. Активность АсАТ в плазме крови крыс в этих условиях по сравнению с ЛО животными повышалась на 33,8 % ($p < 0,05$) и составляла 0,65 ± 0,05 мккат/л у ЛО крыс ($n = 10$) и 0,87 ± 0,08 мккат/л у опытных животных ($n = 10$). Соотношение активности АсАТ/АлАТ у животных после CLP-операции понизилось на 53,6 % ($p < 0,01$) и составило 1,10 ± 0,12 у ЛО крыс ($n = 10$) и 0,51 ± 0,06 у животных с CLP-перитонитом ($n = 10$).

Активность АсАТ и АлАТ в сыворотке крови крыс при развитии перитонита в условиях депрессии КК (CLP-перитонит + $GdCl_3$, $n = 10$) по сравнению с животными с перитонитом, получившими физ. р-р (CLP-перитонит + физ. р-р, $n = 10$) статистически не значимо повышалась на 15,6 % ($p > 0,05$) и 10,5 % ($p > 0,05$) соответственно. Соотношение активности АсАТ/АлАТ в данных условиях также статистически не значимо повышалось на 10,9 % ($p > 0,05$). Таким образом, в/б введение $GdCl_3$ (10 мкг/кг) 1 раз в неделю в течение 8 недель как в условиях CLP-перитонита, так и у животных без него значимо не сказывалось на активностях АсАТ и АлАТ в сыворотке крови и соотношении активности АсАТ/АлАТ (рисунок 4).

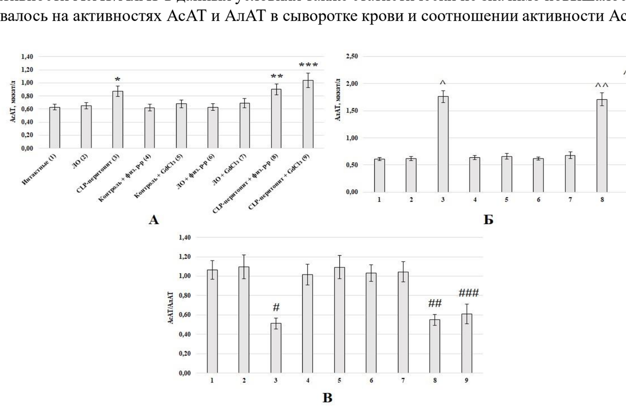

Рис. 4. Активности АсАТ (А) и АлАТ (Б) в сыворотке крови и соотношении активности АсАТ/АлАТ (В) у крыс с экспериментальным перитонитом в условиях депрессии КК $GdCl_3$ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, *** – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, ^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО, ^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, # – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, ## – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ### – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$

Обнаружено, что при перитоните в организме крыс через 24 ч после CLP-операции имело место снижение в плазме крови содержания T_4 на 31,4 % ($p < 0,01$): с 49,32 ± 3,08 нМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до 33,85 ± 2,26 нМоль/л у опытных животных ($n = 10$). Кроме этого, отмечалось снижение в плазме крови уровня T_3 на 30,5 % ($p < 0,05$): с 1,67 ± 0,14 нМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до 1,16 ± 0,14 нМоль/л у опытных животных ($n = 10$). При этом в данных условиях уровни cT_4 и cT_3 снижались на 33,2 % ($p < 0,001$) и на 34,0 % ($p < 0,05$) соответственно. Содержание cT_4 снижалось с 13,95 ± 0,57 пМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до 9,32 ± 0,34 пМоль/л у опытных животных ($n = 10$), а cT_3 снижалось с 3,76 ± 0,34 пМоль/л у ЛО крыс ($n = 10$) до 2,48 ± 0,26 пМоль/л у опытных животных ($n = 10$).

Установлено, что действие в организме крыс ингибитора КК $GdCl_3$, который 1 раз в неделю в течение 8 недель в/б вводился в дозе 10 мг/кг, сопровождается через 24 ч после последнего введения препарата изменением уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы и их свободных фракций в плазме крови. Через 24 ч после введения препарата в группе Контроль + $GdCl_3$ ($n = 10$) повышался уровень T_3 в плазме крови у крыс на 30,6 % ($p < 0,05$) до 2,22 ± 0,17 нМоль/л, а уровень T_4 в крови был на 29,4 % ($p < 0,01$) ниже, чем в группе Контроль + физ. р-р ($n = 10$) и составил 37,52 ± 2,67 нМоль/л. При этом содержание cT_3 в плазме крови в данных условиях повышалось на 43,5 % ($p < 0,05$): с 3,86 ± 0,39 пМоль/л в группе Контроль + физ. р-р ($n = 10$) до 5,54 ± 0,47 пМоль/л в группе Контроль + $GdCl_3$ ($n = 10$), а cT_4 в плазме крови понижалось на 28,4 % ($p < 0,001$): с 14,28 ± 0,68 пМоль/л в группе Контроль + физ. р-р ($n = 10$) до 10,22 ± 0,49 пМоль/л в группе Контроль + $GdCl_3$ ($n = 10$).

Депрессия КК $GdCl_3$ ослабляла развитие характерных после CLP-операции изменений уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы, в частности препятствовала и практически устраняло снижение уровня T_3 в плазме крови у крыс с CLP-перитонитом. Показано, что у крыс в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$) в сравнении с группой CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) уровень T_3 в плазме крови повышался на 45,5 % ($p < 0,05$): с 1,12 ± 0,10 нМоль/л до 1,63 ± 0,15 нМоль/л, а уровень T_4 понижался на 29,4 % ($p < 0,01$): с 32,14 ± 2,09 нМоль/л до 23,18 ± 1,78 нМоль/л. В этих условиях cT_3 в плазме крови повышался на 61,0 % ($p < 0,05$): с 2,41 ± 0,24 пМоль/л в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до 3,88 ± 0,41 пМоль/л в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$), а cT_4 в плазме крови понижалось на 13,3 % ($p < 0,05$): с 9,16 ± 0,42 пМоль/л в группе CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) до 7,94 ± 0,32 пМоль/л в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$).

Изменение уровней йодсодержащих гормонов щитовидной железы и их свободных фракций в плазме крови у крыс после CLP-перитонита в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК $GdCl_3$ представлено на рисунке 5.

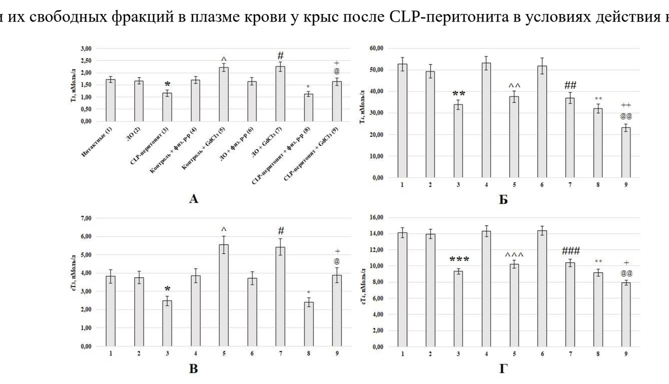

Рис. 5. Уровни йодсодержащих гормонов щитовидной железы (А – T_3, Б – T_4) и их свободных фракций (В – cT_3, Г – cT_4) в плазме крови у крыс после CLP-перитонита в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК $GdCl_3$ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, *** – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО, ^ – $p < 0,05$ по отношению к группе Контроль + физ. р-р, ^^ – $p < 0,01$ по отношению к группе Контроль + физ. р-р, ^^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе Контроль + физ. р-р, # – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ## – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ### – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ° – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, °° – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, @ – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, @@ – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, + – $p < 0,05$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, ++ – $p < 0,01$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р

В группе Интактные животные ($n = 10$) содержаниеNO_x в плазме крови и активность аргиназы печени составляли 12,87 ± 1,32 мкМоль/л и 5,64 ± 0,37 мкМоль мочевины/г сырой ткани·ч соответственно, а в группе ЛО ($n = 10$) 12,58 ± 1,27 мкМоль/л и 5,81 ± 0,41 мкМоль мочевины/г сырой ткани·ч соответственно. Развитие CLP-перитонита у крыс ($n = 10$) приводило, в сравнении с группой ЛО животных ($n = 10$), к повышению уровняNO_x в плазме крови на 72,3 % ($p < 0,01$) и снижению активности аргиназы печени на 36,3 % ($p < 0,01$) и составили 21,67 ± 1,86 мкМоль/л и 3,70 ± 0,21 мкМоль мочевины/г сырой ткани·ч соответственно.

Применение $GdCl_3$ (в/б введение 1 раз в неделю на протяжении 8 недель с последующим выполнением CLP-операции после последнего введения препарата) приводило через 24 ч после CLP-операции к не столь выраженному повышению уровня NO_x в крови. В группе животных CLP-перитонит + $GdCl_3$ ($n = 10$) в сравнении с группой CLP-перитонит + физ. р-р ($n = 10$) уровень NO_x в плазме крови снижался на 29,2 % ($p < 0,05$) и составлял 15,84 ± 1,45 мкМоль/л, а активность аргиназы печени у крыс в данных условиях повышалась на 38,7 % ($p < 0,01$) и составляла 5,05 ± 0,28 мкМоль мочевины/г сырой ткани·ч.

Изменение активности аргиназы печени и уровня NO_x в плазме крови у крыс с CLP-перитонитом в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК $GdCl_3$представлено на рисунке 6.

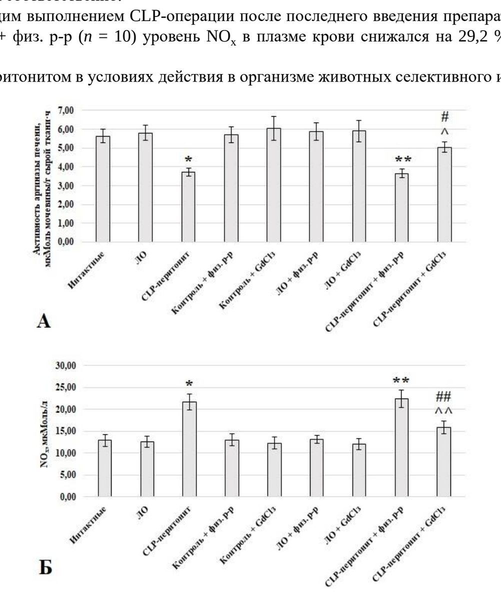

Рис. 6. Активность аргиназы печени (А) и уровень NO_x (Б) в плазме крови у крыс с CLP-перитонитом в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК $GdCl_3$ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^ – $p < 0,01$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, ^^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, # – $p < 0,01$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, ## – $p < 0,05$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р

Опыты показали, что через 24 ч после CLP-операции имеет место угнетение детоксикационной функции печени, что проявлялось повышением СТК на 125,2 % ($p < 0,001$; $n = 10$), уровня СМ в плазме крови на 70,0 % ($p < 0,001$; $n = 10$) и увеличением ПНС на 43,4 % ($p < 0,05$; $n = 8$) по сравнению с ЛО животными.

В ходе исследования установлено, что ингибитор КК $GdCl_3$ в группе Контроль + $GdCl_3$ в сравнении с группой Контроль + физ. р-р приводил к статистически не значимому сокращению ПНС на 17,6 % ($p > 0,05$; $n = 8$) и не сопровождался статистически значимыми изменениями таких показателей печеночной детоксикации как уровень СМ в плазме крови ($p > 0,05$; $n = 10$) и СТК ($p > 0,05$; $n = 10$). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс в группе Контроль + физ. р-р составили 0,737 ± 0,018 г/л, 1,34 ± 0,12 ед. и 29,34 ± 2,78 мин соответственно, а в группе Контроль + $GdCl_3$ – 0,718 ± 0,018 г/л, 1,27 ± 0,12 ед. и 24,18 ± 2,10 мин соответственно.

Развитие CLP-перитонита в условиях угнетения КК (в группе CLP-перитонит + $GdCl_3$) сопровождалось у крыс менее значимым снижением детоксикационной функции печени. Через 24 ч после CLP-операции в данных условиях были установлены следующие значения показателей детоксикационной функции печени: понижение СТК на 32,0 % ($p < 0,01$; $n = 10$), уровня СМ в плазме крови на 28,0 % ($p < 0,001$; $n = 10$) и снижение ПНС на 29,9 % ($p < 0,05$; $n = 8$) в сравнении с группой CLP-перитонит + физ. р-р.

Изменение содержания СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс с CLP-перитонитом в условиях действия в организме животных ингибитора КК $GdCl_3$ представлено на рисунке 7.

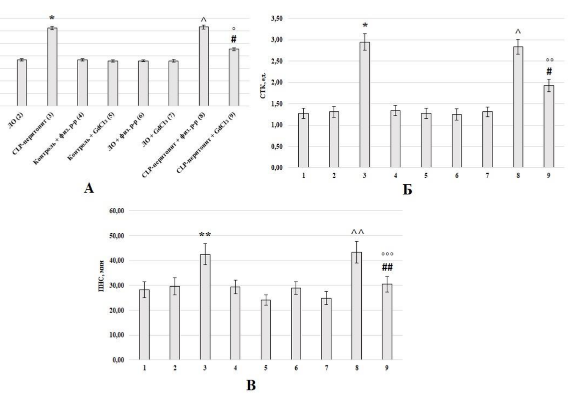

Рис. 7. Содержания СМ в плазме крови (А), СТК (Б) и ПНС (В) у крыс после CLP-перитонита в условиях действия в организме животных ингибитора КК $GdCl_3$ (10 мг/кг). Примечание: * – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО, ** – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО, ^ – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, ^^ – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + физ. р-р, # – $p < 0,001$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, ## – $p < 0,05$ по отношению к группе ЛО + $GdCl_3$, ° – $p < 0,001$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, °° – $p < 0,01$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р, °°° – $p < 0,05$ по отношению к группе CLP-перитонит + физ. р-р

Таким образом, результаты выполненного исследования дают основание заключить, что развитие CLP-перитонита в условиях действия в организме животных ингибитора КК $GdCl_3$ сопровождается более выраженными изменениями содержания общего ХС в печени и ЛП в сыворотки крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови, угнетением детоксикационной функции печени и развитием вторичной дислипопротеинемии.

Известно, что КК быстро активируются в ответ на бактериальный эндотоксин [31, 32, 39]. В процессе активации КК под действием бактерий или эндотоксина эти клетки проявляют высокую фагоцитарную активность и низкую способность секретировать медиаторы, воздействующие на клетки другой тканевой принадлежности в составе печени. Это состояние КК позволяет противостоять возбудителю инфекции без повреждающих воздействий на другие ткани печени. Однако при более интенсивном активирующем воздействии эндотоксином КК переходят в «праймированное» состояние. В этом физиологическом состоянии их фагоцитарная активность снижается, а секреторная, напротив, стимулируется [36]. КК выделяют в синусоидальное пространство разнообразные по своей химической природе вещества (цитокины – ФНО-α, ИЛ-1β, ИЛ-6; производные жирных кислот –простагландины; ферменты – протеазы; а также АФК и АФА), которые могут не только повреждать гепатоциты, но и вызывать их гибель, действуя непосредственно на эти клетки [39–41].

Показано, что элиминация КК усиливает повреждение печени после частичной гепатэктомии. Этот факт свидетельствует о протекторной функции КК в упомянутых условиях [40, 42]. Имеются данные о том, что низкие концентрации цитокинов, высвобождаемые из КК, защищают гепатоциты от клеточной гибели и в некоторых случаях стимулируют их пролиферацию, в то время как высокие концентрации оказывают на гепатоциты повреждающее действие. В итоге продукция, не адекватная реакция КК на эндотоксин может стать не реакцией компенсации, а патологической [39].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие экспериментального перитонита (CLP-модель) у крыс через 24 ч сопровождается формированием гипотиреоидного состояния, вторичной атерогенной дислипидемии, снижением температуры тела, активности аргиназы и детоксикационной функции печени, а также повышением уровня NO_x в плазме крови. У животных в этих условиях повышается активность АлАТ и АсАТ в сыворотке крови, содержание общего ХС в печени и сыворотке крови, а также ХС ЛПОНП + ЛПНП в сыворотке крови и Ка, вместе с тем снижается содержание ХС ЛПВП в сыворотке крови, уровень йодсодержащих гормонов в плазме крови и соотношение активности АсАТ/АлАТ. Установлено, что в выявленных изменениях активностей аргиназы, детоксикационной функции печени, тиреоидного статуса, содержания общего ХС в печени, ХС ЛП в сыворотке крови, уровня NO_x в плазме крови и температуры тела у крыс с экспериментальным перитонитом имеет значение активность КК. Угнетение активности КК $GdCl_3$ ослабляет развитие атерогенной дислипидемии, восстанавливает сниженные уровни T_3 и cT_3, нормализует уровень NO_x в плазме крови, активности аргиназы и детоксикационной функции печени и температуры тела после CLP-операции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1.*Marzougui Y., Missaoui K., Hannachi Z. et al.* Peritonites post operatoires: facteurs pronostiques de mortalite [Postoperative peritonitis: prognostic factors of mortality] // Arch Inst Pasteur Tunis. 2014. Vol. 91, № 1–4. P. 67–76.
2.*Яковлев М.Ю.* Системная эндотоксинемия // М.: Наука, 2021. 184 с.
3.*Nguyen-Lefebvre A.T., Horuzsko A.* Kupffer cell metabolism and function // J Enzymol Metab. 2015. Vol. 1, № 1. Art. ID 101. P. 1–26.
4.*Karimi M.H., Geramizadeh B., Malek-Hosseini S.A.* Tolerance Induction in Liver // Int J Organ Transplant Med. 2015. Vol. 6, № 2.P. 45–54.
5.*Lekkou A., Mouzaki A., Siagris D. et al.* Serum lipid profile, cytokine production, and clinical outcome in patients with severe sepsis // Journal of Critical Care. 2014. Vol. 29, № 5. P. 723–727. DOI: 10.1016/j.jcrc.2014.04.018.
6.*Fan Y., Chen J., Liu D. et al.* HDL-S1P protects endothelial function and reduces lung injury during sepsis in vivo and in vitro // The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2020. Vol. 126. Art. ID 105819. DOI: 10.1016/j.biocel.2020.105819.
7.*Tanaka S., Diallo D., Delbosc S. et al.* High-density lipoprotein (HDL) particle size and concentration changes in septic shock patients // Ann. Intensive Care. 2019. Vol. 9, № 1. Art. ID 68. P. 1–9. DOI: 10.1186/s13613-019-0541-8.
8.*Гусаковская Э.В., Максимович Н.Е.* Характеристика изменений в организме крыс с острым экспериментальным перитонитом // Журнал Гродненского государственного медицинского университета. 2022. Т. 20, № 1. С. 91–97. DOI: 10.25298/2221-8785-2022-20-1-91-97.
9.*Amunugama K., Pike D.P., Ford D.A.* The lipid biology of sepsis // Journal of Lipid Research. 2021. Vol. 62. Art. ID 100090. P. 1–16. DOI: 10.1016/j.jlr.2021.100090.
10.Чепелева Е.Н., Висмонт Ф.И. Клетки 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 // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. 2021. Т. 18, № 4. С. 391–401. DOI: 10.29235/1814-6023-2021-18-4-391-401.
11.*Bermudes A.C.G., de Carvalho W.B., Zamberlan P. et al.* Changes in lipid metabolism in pediatric patients with severe sepsis and septic shock // Nutrition. 2018. Vol. 47. P. 104–109. DOI: 10.1016/j.nut.2017.09.015.
12.*Barlage S., Gnewuch C., Liebisch G. et al.* Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation // Intensive Care Medicine. 2009. Vol. 35, No. 11. P. 1877–1885. DOI: 10.1007/s00134-009-1609-y.
13.*Земко В.Ю., Окулич В.К., Дзядзько А.М.* Роль клеток Купфера в развитии иммунного ответа при трансплантации печени // Иммунопатология, аллергол, инфектол. 2021. № 2. С. 6–12.
14.*Yamada H., Umemoto T., Kawano M. et al.* High-density lipoprotein and apolipoprotein A-I inhibit palmitate-induced translocation of toll-like receptor 4 into lipid rafts and inflammatory cytokines in 3T3-L1 adipocytes // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2017. Vol. 484. P. 403–408. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.01.138.
15.*Fan Y., Chen J., Liu D. et al.* HDL-S1P protects endothelial function and reduces lung injury during sepsis in vivo and in vitro // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2020. Vol. 126. Art. ID 105819. DOI: 10.1016/j.biocel.2020.105819.
16.*Tanaka S., Labreuche J., Drumez E. et al.* Low HDL levels in sepsis versus trauma patients in intensive care unit // Ann. Intensive Care. 2017. Vol. 7. Art. ID 60. P. 1–8. DOI: 10.1186/s13613-017-0284-3.
17.*Zhang X., Wang L., Chen B.* Recombinant HDL (Milano) protects endotoxin-challenged rats from multiple organ injury and dysfunction // Biol. Chem. 2015. Vol. 396, № 1. P. 53–60. DOI: 10.1515/hsz-2014-0188.
18.*Barlage S. Gnewuch C. Liebisch G. et al.* Changes in HDL-associated apolipoproteins relate to mortality in human sepsis and correlate to monocyte and platelet activation // Intensive Care Med. 2009. Vol. 35, № 11. P. 1877–1885. DOI: 10.1007/s00134-009-1609-y.
19.*Артюшкевич С.А., Висмонт Ф.И.* Роль йодсодержащих гормонов в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при хронической этаноловой интоксикации // Медицина. 2008. № 8. С. 58–61.
20.*Sabatino L., Vassalle C., Del Seppia C. et al.* Deiodinases and the three types of thyroid hormone deiodination reactions // Endocrinol Metab (Seoul). 2021. Vol. 36, № 5. – P. 952–964. DOI: 10.3803/EnM.2021.1198.
21.*Galton V.A., Hernandez A.* Thyroid hormone metabolism: a historical perspective // Thyroid. 2023. Vol. 33, № 1. P. 24–31. DOI: 10.1089/thy.2022.0161.
22.*McAninch E.A., Bianco A.C.* Thyroid hormone signaling in energy homeostasis and energy metabolism // Ann N Y Acad Sci. 2014. Vol. 1311. P. 77–87. DOI: 10.1111/nyas.12374.
23.Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes [Electronic resource]. Mode of access: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32010L0063&qid=1660822800456&from=EN. Date of access: 05.05.2025.
24.Инструкция о порядке обращения с лабораторными животными. Национальный правовой Интернет-портал Республики Беларусь [Электронный ресурс]. URL: https://minzdrav.gov.by/upload/lcfiles/постановление_МЗ_МСХ_2024_164-124.pdf (дата обращения 05.05.2025).
25.*Шаповалова Е.Ю., Демяшкин Г.А., Маланичев М.Ю. и др.* Моделирование экспериментального сепсиса путем выполнения лигирования и пункции слепой кишки (CLP-процедура) // Ульяновский медико-биологический журнал. 2020.№ 3. С. 150–158. DOI: 10.34014/2227-1848-2020-3-150-158.
26.*Capcha J.M.C., Moreira R.S., Rodrigues C.E. et al.* Using the cecal ligation and puncture model of sepsis to induce rats to multiple organ dysfunction // Bio-protocol. 2021. Vol. 11, № 7. Art. ID e3979. P. 1–9. DOI: 10.21769/BioProtoc.3979.
27.*Burstein M., Samaille J.* Sur la clarification du sérum lipémique par l'héparine in vitro // Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences (Paris). 1955. Vol. 241. № 9. P. 664–665.
28.*Крехова М.А., Чехранова М.К.* Фракционное определение эфиров холестерина в крови и тканях с помощью хроматографии в тонком слое // Вопр. мед. химии. 1971. Т. 17, № 1. С. 93–98.
29.*Du S.S., Qiang M., Zeng Z.C. et al.* Inactivation of Kupffer cells by gadolinium chloride protects murine liver from radiation-induced apoptosis // Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2010. Vol. 76, № 4. P. 1225–1234. DOI: 10.1016/j.ijrobp.2009.09.063.
30.*Vollmar B., Rüttinger D., Wanner G.A. et al.* Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats // Shock. 1996. Vol. 6, № 6. P. 434–441. DOI: 10.1097/00024382-199612000-00008.
31.*Sehic E., Hunter W.S., Ungar A.L. et al.* Blockade of Kupffer cells prevents the febrile and preoptic prostaglandin E2 responses to intravenous lipopolysaccharide in guinea pigs // Annals of the New York Academy of Sciences. 1997. Vol. 813, № 1. P. 448–452. DOI: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb51732.x.
32.*Volmar B., Rettinger D., Wanner G. A.* Modulation of Kupfer cells activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats // Shock. 1996. Vol. 6, № 6. P. 434–441. DOI: 10.1097/00024382-199612000-00008.
33.*Moshage H., Kok B., Huizenga J.R. et al.* Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation // Clinical Chemistry. 1995. Vol. 41, № 6. P. 892–896. DOI: 10.1093/clinchem/41.6.892.
34.*Камышников В.С.* Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике // 3-е изд. М. : МЕДпресс-информ. 2009. 896 с.
35.*Geyer J.W., Dabich D.* Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates // Anal. Biochem. 1971. Vol. 39, № 2. P. 412–417. DOI: 10.1016/0003-2697(71)90431-3.
36.*Моин В.М., Николайчик В.В., Кирковский В.В.* Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях: а. с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50 // Открытия. Изобретения. Промышленные образцы. Товарные знаки. 1987. № 41. С. 415.
37.*Радькова О.А., Бояринов Г.А., Балишина И.Н.* Способ определения токсичности биологических жидкостей: а. с. 1146570 СССР, МКИ б Ol № 1/28 // Открытия. Изобретения. Промышленные образцы. Товарные знаки. 1985. № 11. С. 616.
38.*Висмонт Ф.И., Артюшкевич С.А.* О роли клеток Купфера и гепатоцитов в механизмах реализации влияния трийодтиронина на процессы детоксикации и регуляции температуры тела // Белорусский медицинский журнал. 2005. Т. 13, № 3. С. 45–47.
39.*Элбакидзе Г.М.* Механизмы протекторного действия активированных эндотоксином клеток Купфера на гепатоциты // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. № 5. С. 48–54.
40.*Nguyen-Lefebvre A.T., Horuzsko A.* Kupffer cell metabolism and function // J Enzymol Metab. 2015. Vol. 1, № 1. Art. ID 101. P. 1–26.
41.*Чепелева Е.Н., Висмонт Ф.И.* О значимости активности аргиназы печени и клеток Купфера в развитии вторичной атерогенной дислипидемии и формировании тиреоидного статуса у крыс с экспериментальным перитонитом // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. 2023. Т. 20, № 1. С. 17–27. DOI: 10.29235/1814-6023-2023-20-1-17-27.
42.*Tapia G., Santibanez C., Farias J. et al.* Kupffer-cell activity is essential for thyroid hormone rat liver preconditioning // Mol. Cell Endocrinol. 2010. Vol. 323, № 2. P. 292–297. DOI: 10.1016/j.mce.2010.03.014.