

Е.Н. Чепелева, Ф.И. Висмонт

**ЗНАЧИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ И КЛЕТОК КУПФЕРА
В РАЗВИТИИ ВТОРИЧНОЙ АТЕРОГЕННОЙ ДИСЛИПИДЕМИИ И
ФОРМИРОВАНИИ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА У КРЫС С
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ**

Кафедра патологической физиологии

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск

E.N. Chepeleva, F.I. Vismont

**SIGNIFICANCE OF THE ACTIVITY OF LIVER ARGINASE AND KUPFFER
CELLS IN THE DEVELOPMENT OF SECONDARY ATHEROGENIC
DYSLIPIDEMIA AND THE FORMATION OF THYROID STATUS IN RATS
WITH EXPERIMENTAL PERITONITIS**

Department of Pathological Physiology

Belarusian State Medical University, Minsk

Резюме: установлено, что в условиях экспериментального перитонита у крыс снижается активность аргиназы печени, повышается содержание $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и снижается уровень йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови, развивается вторичная атерогенная дислипидопроteinемия.

Ключевые слова: перитонит, клетки Купфера, аргиназа печени, холестерин липопротеинов, йодсодержащие гормоны, печень.

Resume: it has been established that under conditions of experimental peritonitis in rats, the activity of liver arginase decreases, the content of $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ increases and the level of iodine-containing thyroid hormones in the blood decreases, secondary atherogenic dyslipoproteinemia develops.

Keywords: peritonitis, Kupffer cells, liver arginase, cholesterol lipoproteins, iodine-containing hormones, liver.

Актуальность. Перитонит является хирургической, общеклинической и общепатологической проблемой. 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.

Известно, что печеночная недостаточность сопровождается значительными нарушениями обменных процессов, особое значение среди которых имеют изменения метаболизма липидов, в частности обмена липопротеинов (ЛП) сыворотки крови [1, 2]. 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 [3].

Показано, что при септических состояниях и перитоните имеет место выраженная эндотоксинемия. К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении аргиназы печени и клеток Купфера (КК) в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии, в процессах детоксикации и элиминации эндотоксинов в печени [4, 5]. Также 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) [6], под воздействием которых происходят изменения в системе нейроэндокринной регуляции органов и систем.

Рядом исследователей выявлено, что печень участвует в регуляции обмена ХС ЛП сыворотки крови, метаболизме гормонов и физиологически активных веществ и, в частности, гормонов щитовидной железы, обеспечивая поддержание их оптимальной концентрации в крови [7].

Однако, несмотря на то что исследования по выяснению роли функционального состояния печени в патогенезе септических состояний многочисленны, значимость активности аргиназы печени и 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: выяснить значимость активности аргиназы печени и КК в развитии вторичной атерогенной дислипидемии и формировании тиреоидного статуса у крыс с экспериментальным перитонитом.

Материалы и методы. Опыты выполнены на взрослых белых крысах обоего пола массой 180–220 г. Для создания экспериментального перитонита использована модель лигирования и последующего однократного пунктирования слепой кишки – CLP (cecal ligation and puncture) [7]. В качестве контроля использовали ложноперированных (ЛО) крыс, которым под наркозом проводили разрез передней брюшной стенки без извлечения и пунктирования слепой кишки.

Селективную депрессию КК вызывали у животных за 12 ч до CLP-операции или ложной операции внутрибрюшинным введением водного раствора гадолиния хлорида ($GdCl_3$) в дозе 10 мг/кг. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически.

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 липопротеинов очень низкой плотности (ЛПОНП) и липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) из сыворотки крови выделяли путем осаждения по методу M. Burstein, J. Samaille (1955). Для определения содержания общего ХС, ХС липопротеинов высокой плотности (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 оценивали с использованием реакции Либермана–Бурхарда, а содержание ХС суммарной фракции ЛПОНП + ЛПНП – по формуле: $ХС\ ЛПОНП + ЛПНП = \text{общий ХС сыворотки крови} - ХС\ ЛПВП$.

Коэффициент атерогенности рассчитывали по следующей формуле: $\text{коэффициент атерогенности} = (ХС\ ЛПОНП + ЛПНП) / ХС\ ЛПВП$.

Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NO_3^-/NO_2^-), содержание общего трийодтиронина (T_3) и тироксина (T_4) в плазме крови – 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 аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) (АлАТ/АсАТ) в сыворотке крови. Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови определяли колориметрическим динитрофенилгидрозиновым методом.

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

Эксперименты проводили в соответствии с этическими нормами обращения с животными. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что в условиях экспериментального перитонита через 24 ч после CLP-операции, но не у ЛО крыс, ректальная температура снижалась на $1,1\text{ }^{\circ}\text{C}$: с $37,9 \pm 0,09$ до $36,8 \pm 0,21\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$; $n = 12$). Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови животных с перитонитом через 24 ч после CLP-операции возрастала. Развитие перитонита у крыс ($n = 10$) сопровождалось повышением активности АлАТ в сыворотке крови по сравнению с данным показателем у ЛО животных ($n = 10$) на $71,2\%$ ($p < 0,01$): активность составляла $0,59 \pm 0,05$ мккат/л у ЛО крыс и $1,01 \pm 0,09$ мккат/л у опытных животных после CLP-операции. Активность АсАТ в плазме крови крыс в этих условиях возрастала по сравнению с ее активностью у ЛО животных на $15,5\%$ ($p < 0,05$) и составляла $0,84 \pm 0,04$ мккат/л у ЛО крыс ($n = 10$) и $0,97 \pm 0,05$ мккат/л у опытных животных ($n = 10$). Соотношение активностей АлАТ/АсАТ составляло $0,70 \pm 0,04$ у ЛО крыс и $1,04 \pm 0,08$ у животных с перитонитом.

Выявлено, что содержание общего ХС в печени крыс после CLP-операции повышалось на $14,1\%$ ($p < 0,05$): у ЛО животных ($n = 10$) оно составляло $0,298 \pm 0,007$ мг/100 мг ткани, а у крыс с перитонитом ($n = 10$) – $0,340 \pm 0,014$ мг/100 мг ткани. Также имели место повышение уровня общего ХС в сыворотке крови на $23,3\%$ ($p < 0,05$) – с $2,66 \pm 0,14$ ($n = 10$) до $3,28 \pm 0,11$ ммоль/л ($n = 10$) и выраженные изменения в содержании ХС различных классов ЛП в сыворотке крови крыс: содержание ХС ЛПВП по сравнению с таковым у ЛО животных снижалось на $37,1\%$ ($p < 0,01$) – с $1,32 \pm 0,09$ ммоль/л ($n = 10$) до $0,83 \pm 0,07$ ммоль/л ($n = 10$), уровень ХС ЛПОНП + ЛПНП повышался на $82,8\%$ ($p < 0,001$) – с $1,34 \pm 0,07$ ммоль/л ($n = 10$) до $2,45 \pm 0,08$ ммоль/л ($n = 10$). Установлено, что в условиях перитонита имеет место возрастание коэффициента атерогенности (Ка) на $189,2\%$ ($p < 0,001$) – с $1,02 \pm 0,07$ ед. у ЛО крыс ($n = 10$) до $2,95 \pm 0,08$ ед. у опытных животных ($n = 10$).

Как следует из результатов исследования, 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 дислиппротеинемии.

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

Выявлено, что в этих условиях у крыс изменяется активность аргиназы печени и содержание в плазме крови $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ – конечных продуктов деградации NO.

Развитие перитонита у крыс приводило к снижению активности аргиназы печени на 31,3% ($p < 0,05$) и к повышению концентрации $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови животных на 81,8 % ($p < 0,05$). Активность аргиназы печени и концентрация $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови крыс с перитонитом ($n = 8$) составляли $3,1 \pm 0,26$ мкмоль мочевины/г. ткани час и $9,58 \pm 1,27$ мкмоль/л.

Учитывая, что КК играют важную эндотоксинэлиминирующую и эндотоксинобезвреживающую функцию в организме и в образовании целого ряда цитокинов, а также NO, участвующих в регуляции процессов жизнедеятельности, в частности в обмене тиреоидных гормонов и ЛП крови, были основания полагать, что в выявленных изменениях тиреоидного статуса организма, содержания ХС ЛП 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, активности аргиназы печени, содержания ХС ЛП, уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ 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 сопровождается изменением температуры тела и уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови животных. Внутривентриальное введение раствора GdCl_3 приводило через 12 ч после введения препарата к повышению температуры тела на $1,1^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$; $n = 12$) по сравнению с контрольными животными (внутривентриальное введение 1,0 мл физраствора). 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, чем в контрольной группе.

Депрессия КК GdCl_3 сопровождалась менее выраженным снижением активности аргиназы печени и ослабляла развитие характерных изменений уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы, общего ХС в печени и ЛП крови, а также температуры тела у крыс с перитонитом. Опыты показали, что предварительное (за 12 ч до CLP-операции) введение крысам GdCl_3 в дозе 10 мг/кг приводило к менее значимому снижению содержания общего T_4 в их крови по сравнению с животными контрольной группы ($n = 8$), подвергнутых CLP-операции и получивших внутривентриально 1,0 мл физраствора. Содержание T_4 в плазме крови крыс опытной группы ($n = 8$) увеличилось на 302,6 % ($p < 0,01$) по сравнению с его уровнем в крови животных контрольной группы ($n = 8$). Применение GdCl_3 препятствовало и практически устраняло снижение содержания T_3 у животных с перитонитом, а также приводило к менее значимому снижению активности аргиназы печени и не столь выраженному повышению уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в крови. Через 24 ч после CLP-операции концентрация T_3 в плазме крови крыс ($n = 8$), предварительно получивших GdCl_3 , составила $1,58 \pm 0,09$ нМоль/л, а у крыс с перитонитом ($n = 8$), предварительно получивших физраствор, – $1,24 \pm 0,06$ мМоль/л. Активность аргиназы печени у крыс с перитонитом, получивших GdCl_3 , по сравнению с животными с перитонитом, получившими физраствор, была выше на 17,8 % ($p < 0,05$), а уровень $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови животных был ниже на 31,8 %

($p < 0,05$) и составлял соответственно $3,75 \pm 0,28$ мкМоль мочевины/г. ткани час ($n = 8$) и $6,51 \pm 1,04$ мкМоль/л ($n = 8$).

Выявлено, что у крыс с перитонитом в условиях депрессии КК ($n = 10$) отмечаются менее выраженные изменения содержания общего ХС в крови и печени, ХС ЛП в крови, а также менее значимое повышение уровня АЛАТ и АсАТ в плазме крови. Так, уровень общего ХС в крови и печени в этих условиях по сравнению с его уровнем у животных контрольной группы ($n = 10$), подвергшихся CLP-операции и получивших внутривентриально 1,0 мл физраствора, был ниже на 22,1 и 17,1 % ($p < 0,05$) соответственно. 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 22,6 % ($p < 0,01$; $n = 10$). Активность АЛАТ и АсАТ в плазме крови крыс опытной группы ($n = 10$) (развитие перитонита в условиях депрессии КК) по сравнению с животными с перитонитом, получившими физраствор ($n = 10$), понижалась на 25,8 и 28,6 % ($p < 0,01$) соответственно.

Температура тела у крыс с перитонитом, которым до CLP-операции предварительно внутривентриально вводили $GdCl_3$ (10 мкг/кг), была ниже на 0,6 °C ($p < 0,05$; $n = 12$) по сравнению с животными с экспериментальным перитонитом, которые получили 1,0 мл физраствора.

Выводы: полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях экспериментального перитонита у крыс через 24 ч после CLP-операции снижается активность аргиназы печени, уровень йодсодержащих гормонов щитовидной железы, повышается содержание NO_3^-/NO_2^- в крови, развивается вторичная атерогенная дислипидопроteinемия. В изменениях содержания общего холестерина в печени и липопротеинах крови, уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови и температуре тела при перитоните (CLP-модель) участвуют аргиназа печени, клетки Купфера и монооксид азота. Угнетение клеток Купфера при перитоните сопровождается менее выраженным снижением активности аргиназы печени, уровня трийодтиронина в крови и ослаблением развития характерных изменений в содержании общего холестерина в печени, холестерина липопротеинов и NO_3^-/NO_2^- в крови и препятствует развитию вторичной дислипидопроteinемии. Депрессия аргиназы печени усугубляет изменения содержания общего холестерина в липопротеинах крови и печени, трийодтиронина в крови и способствует развитию вторичной дислипидопроteinемии.

Литература

1. Короткевич, Т. В. Вторичная дислипидопроteinемия и дисфункция печени в условиях экспериментальной эндотоксинемии / Т. В. Короткевич, Ф. И. Висмонт // Здравоохранение. – 2006. – № 6. – С. 21–23.
2. Lipid metabolism in inflammation-related diseases / C. Zhang [et al.] // Analyst. – 2018. – Vol. 143, N 19. – P. 4526–4536.
3. HDL-cholesterol level and cortisol response to synacthen in critically ill patients / P. H. J. van der Voort [et al.] // Intensive Care Med. – 2003. – Vol. 29, № 12. – P. 2199–2203.
4. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени / Д. Н. Маянский // Патолог. физиология и эксперим. медицина. – 1985. – № 4. – С. 80–86.

5. Arginase as a Potential Biomarker of Disease Progression: A Molecular Imaging Perspective / G. S. Clemente [et al.] // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21, № 15. – P. 5291.
6. Nitric oxide synthase isoforms play distinct roles during acute peritonitis / J. Ni [et al.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 2010. – Vol. 25, N 1. – P. 86–96.
7. Greg Kelly, N. D. Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones : a review / N. D. Greg Kelly // Altern. Med. Rev. – 2000. – Vol. 5, № 4. – P. 306–333.
8. Моделирование экспериментального сепсиса путем выполнения лигирования и пункции слепой кишки (CLP-процедура) / Е. Ю. Шаповалова [и др.] // Ульянов. мед.-биол. журн. – 2020. – № 3. – С. 150–158.