

## **Роль купферовских клеток и тиреоидного статуса организма в развитии оксидативного стресса у крыс при хронической алкогольной интоксикации**

*Белорусский государственный медицинский университет*

В опытах на крысах показано, что хроническая алкогольная интоксикация (интрагастральное ежедневное введение этанола в дозе 3,5 г/кг) приводит к снижению температуры тела, детоксикационной функции печени и уровня трийодтиронина в крови. Гипертиреоз способствует развитию оксидативного стресса и содействует поражению печени у крыс с хронической этаноловой интоксикацией. Ключевые слова: клетки Купфера, детоксикация, тиреоидный статус, алкогольная интоксикация.

Проблема алкоголизма, алкогольной зависимости стара как сама медицина и продолжает оставаться одной из важнейших проблем современной медицины. Однако в патогенезе алкоголизма до сих пор еще очень много чего не выяснено[3].

Известно, что процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ), является ведущим механизмом повреждения клеток и гепатоцитов [6], в частности, при употреблении алкоголя [4]. В последнее время показана значимость клеток Купфера (КК) в процессах ПОЛ в печени, индуцированных СС14 [5,13]. Показано, что печень играет важную роль в метаболизме гормонов щитовидной железы[11]. Установлено, что от функционального состояния печени зависит активность процессов дейодирования йодсодержащих гормонов [11], имеющих важное значение в формировании прооксидантно-оксидантного состояния организма [6,13].

В то же время исследования по выяснению роли КК в механизмах повреждения печени и формирования тиреоидного статуса малочисленны и находятся в стадии накопления фактов. Исследования по выяснению значимости купферовских клеток в развитии оксидативного стресса при алкогольной интоксикации вообще не проводились.

Целью данной работы было выяснение роли КК и тиреоидного статуса организма в развитии оксидативного стресса у крыс при хронической алкогольной интоксикации.

**Материал и методы**

Опыты выполнены на 200 взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 160 – 180 г. Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводили на крысах путем ежедневного интрагастрального введения животным этанола (3,5 г/кг) в течение 60 дней. Селективную депрессию КК вызывали у животных внутрибрюшинным введением раствора гадолиния хлорида (GdCl<sub>3</sub>) в дозе 10 мг/кг. Экспериментальный гипертиреоз у крыс воспроизводили с помощью синтетического гормона трийодтиронина гидрохлорида (Liothironin, «Berlin Chemie», Германия), который на 1%

крахмальном растворе вводили зондом в полость желудка животным ежедневно в течении 20 дней в дозе 30 мг/кг. Ректальную температуру измеряли электротермометром ТПЭМ-1.

О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), степени токсичности крови (СТК) и содержанию в плазме крови средних молекул (СМ). У крыс о ПНС (гексенал 100 мг/кг, внутривенно) судили по времени нахождения животных в положении на боку. Определение содержания в крови СМ проводили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В. М. Моиним и соавт. [1], СТК способом, предложенным О. А. Радьковой и соавт. [2] (1985). О тяжести поражения печени судили по активности в плазме крови АлАТ и АсАТ. Определение активности АлАТ и АсАТ в плазме крови проводили колориметрически динитрофенилгидразиновым методом [7]. Содержание общего белка и альбуминов в плазме крови определяли общепринятыми методами [7].

Активность процессов ПОЛ в крови и печени оценивали по содержанию в них таких продуктов как малоновый диальдегид (МДА), диеновые конъюгаты (ДК), основания Шиффа (ОШ), а состояние системы антиоксидантной защиты по концентрации  $\alpha$ -токоферрола ( $\alpha$ -ТФ) и активности каталазы (КТ). Концентрацию МДА определяли спектрофотометрически методом М. Mihara, М. Uchiyama [12]. Определение концентрации ДК проводилось спектрофотометрически по методу, предложенному В.А. Костюком и др.[8]. Для определения уровня ОШ использовался спектрофотометрический метод В.Л. Fletcher et al. [10]. Содержание  $\alpha$ -ТФ в крови и ткани печени определяли флюоресцентным методом Р.Ч. Черняускене с соавт. [9]. Активность КТ определяли колориметрическим методом М.А. Королюка и соавт. (1984), в модификации В.Н. Корнейчука с соавт. (1992).

Уровень в плазме крови трийодтиронина (Т3) и тетраiodтиронина (Т4) определяли радиоиммунным методом с помощью тест-наборов производства ХОП ИБОХ НАН РБ

Взятие для исследований крови и ткани печени у животных проводилось за возможно минимальное время после декапитации.

Все полученные данные обработаны методами вариационной биологической статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Установлено, что в условиях хронической алкогольной интоксикации у крыс угнетаются процессы детоксикации, снижается температура тела, концентрация общего белка и альбуминов, Т3, но не Т4 в плазме крови, а также активируются процессы ПОЛ в крови и печени. Так через 60 суток после ежедневного введения в желудок этанола у животных снижалась на  $1,20 \pm 0,16$  ( $p < 0,05$ ,  $n=24$ ) ректальная температура. Выявлено, что у крыс в этих условиях повышается в плазме крови уровень СМ и СТК. Концентрация СМ повышалась на 41,7% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), а СТК была выше на 70,5% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), по сравнению с животными в контроле (через 60 дней после

ежедневного интрагастрального введения физ.раствора). ПНС после хронической затравки этанолом возрастала, по сравнению с контрольными животными, на 29,3% ( $p < 0,05$ ,  $n=8$ ). ПНС у животных ( $n=8$ ) в контроле составляло  $28,2 \pm 3,51$  мин.

Обнаружено, что хроническая алкоголизация приводит к снижению в плазме крови концентрацию общего белка до  $58,2 \pm 1,4$  г/л (на 9,7%  $p < 0,05$ ,  $n=10$ ). Содержание альбуминов снижалось до  $13,4 \pm 0,9$  г/л (на 27,2%,  $p < 0,05$ ,  $n=10$ ). Уровень АлАТ и АсАТ крови, алкоголизированных животных, по сравнению с соответствующим контролем – интрагастральное введение физ.раствора повышался на 572,1 % ( $p < 0,05$ ,  $n=8$ ) и 190,5% ( $p < 0,05$ ,  $n=8$ ) и составлял  $116,8 \pm 6,20$  и  $118,4 \pm 12,56$  единиц Кармена соответственно.

Повышение уровня АлАТ и АсАТ в плазме крови, у алкоголизированных крыс, а также СТК и содержания СМ в ней, дали основания полагать, что токсинемия, нарушение функции печени имеют важное значение в патогенезе изучаемой патологии.

Известно, что активация процессов ПОЛ является одним из важнейших механизмов повреждения мембран и ферментативных систем клеток и гепатоцитов в частности. Установлено, что действие этанола в организме у животных сопровождается активацией процессов ПОЛ в крови и печени. Так уровень ДК, МДА и ОШ повышался в плазме крови на 36,3% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), 61,5 % ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) и 52,3% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ). В печени содержание ДК возрастало на 17,4% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), МДА на 39,5% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) и ОШ на 20,7% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ). Выявлено, что в этих условиях в организме у крыс, наряду с интенсификацией процессов ПОЛ в крови и печени, имеет место снижение на 60,7% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) и 38,8% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) концентрации а-ТФ, в то время как активность КТ была повышена на 27,1% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) и 25.9% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) в плазме крови и печени соответственно.

Хроническая алкоголизация у крыс ( $n=10$ ) сопровождалась также выраженными изменениями в системе гипофиз-щитовидная железа. Так после интрагастрального введения животным этанола отмечалось снижение в плазме крови уровня Т3 на 43,6% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), в то время как концентрация Т4 достоверно не изменялась по сравнению с контролем (интрагастральное введение физ.раствора). Содержание Т3 и Т4 в плазме крови животных контрольной группы составило  $8,7 \pm 0,7$  нМоль/л и  $73,1 \pm 11,44$  нМоль/л соответственно.

В опытах на крысах установлено, что в развитии оксидативного стресса при хронической алкогольной интоксикации участвуют клетки Купфера. Обнаружено, что действие в организме селективного ингибитора КК GdCl<sub>3</sub> в дозе 10 мкг/кг, в дозе подавляющей функцию КК, сопровождается активацией процессов ПОЛ в печени, повышением активности системы гипофиз-щитовидная железа и процессов детоксикации. Так, внутрибрюшинное введение раствора GdCl<sub>3</sub> приводило, через 12 часов после введения препарата к повышению содержания в плазме крови и печени ДК, МДА и ОШ, а также температуры тела (на 1,1<sup>o</sup>C,  $p < 0,05$ ,  $n=9$ ). Действие в организме ингибитора КК сопровождалось, через 12 часов после введения в

кровоток, возрастанием уровня Т3 в плазме крови у крыс (n=7) на 171,1% (p<0,05). Концентрация Т4 в крови в этих условиях была на 38,9% (p<0,05) ниже по сравнению с животными в контроле (n=7). Через 24 часа после внутрибрюшинного введения GdCl<sub>3</sub> концентрация Т3 и Т4 в плазме крови у крыс (n=6) была уже в пределах значений у животных в контроле (введение физ. раствора внутрибрюшинно).

Учитывая, что в условиях функциональной недостаточности гепатоцитов, вызванной этанолом, в крови значительно снижается, а депрессии КК повышается содержание Т3 – гормона, играющего важную роль в термогенезе и уровень которого во многом определяется процессами дейодирования в печени [11] были основания полагать, что активность процессов ПОЛ в печени, определяя функциональное состояние гепатоцитов и КК может иметь значение не только в поддержании тиреоидного статуса в норме, но и в условиях хронической алкогольной интоксикации. Подтверждение было получено в опытах при выяснении особенностей изменения теплообмена, процессов ПОЛ и активности системы гипофизитовидная железа при действии в организме животных этанола в условиях депрессии КК GdCl<sub>3</sub>.

Опыты показали, что хроническая алкогольная интоксикация у животных, которым предварительно, за 12 часов до интрагастрального введения этанола, вводили 1 раз в неделю в течение 60 дней внутрибрюшинно ингибитор КК GdCl<sub>3</sub> (10 мг/кг), сопровождается менее выраженной активацией процессов детоксикации, ПОЛ в крови и печени, менее значимым понижением уровня АлАТ, АсАТ, Т3 в плазме крови и температуры тела.

Так, температура тела у крыс контрольной группы, которым предварительно за 12 часов до интрагастрального введения этанола внутрибрюшинно вводили физ.раствор (1 раз в неделю в течение 60 дней) понижалась на 1,20С (p<0,005, n=24), а в опыте, у животных, которым предварительно внутрибрюшинно вводили GdCl<sub>3</sub>, снижалась на 0,50С (p<0,005, n=8).

Установлено, что у алкоголизированных крыс, получавших GdCl<sub>3</sub> (10 мг/кг), уровень СМ в плазме крови и показатель ее токсичности были ниже по сравнению с контрольными животными на 30,5% (p<0,005, n=8) и 37,1% (p<0,005, n=8) соответственно.

Выявлено, что действие этанола в организме у крыс в условиях депрессии КК GdCl<sub>3</sub> сопровождается менее выраженными изменениями активности АлАТ и АсАТ, а также содержания продуктов ПОЛ в крови и печени животных. Так, активность АлАТ и АсАТ в плазме крови, важнейших показателей тяжести поражения печени, у опытных животных по сравнению с контрольными (внутрибрюшинное введение физ.раствора и хроническая алкоголизация) была ниже на 63,5% (p<0,005, n=8) и 40,1% (p<0,005, n=8) соответственно. Концентрация ДК в печени уменьшалась на 47,1% (p<0,005, n=7), а в плазме крови на 31,3% (p<0,005, n=8). Содержание МДА в печени в этих условиях снижалась на 19,2% (p<0,005, n=7), в плазме крови на 28,4% (p<0,005, n=8). Уровень ОШ понижался в печени и в плазме крови соответственно на 60,7% (p<0,005, n=6) и 33,5% (p<0,005, n=7). Обнаружено,

что действе этанола в организме животных, получавших  $GdCl_3$ , сопровождается менее значительным снижением уровня ТЗ в плазме крови. Так концентрация ТЗ и Т4 в плазме крови у крыс с хронической алкогольной интоксикацией составляла  $0,6 \pm 0,12$  нМоль/л ( $n=10$ ) и  $46,1 \pm 4,75$  нМоль/л ( $n=9$ ), а у животных, которым наряду с алкоголизацией вводили  $GdCl_3$  составляла  $1,0 \pm 0,13$  нМоль/л ( $n=9$ ) и  $51,3 \pm 4,18$  нМоль/л ( $n=9$ ). Уровень ТЗ и Т4 в плазме крови интактных животных,  $1,6 \pm 0,12$  нМоль/л ( $n=8$ ) и  $55,2 \pm 3,14$  нМоль/л ( $n=8$ ) соответственно.

Выявленные особенности изменений в процессах ПОЛ в печени при хронической алкогольной интоксикации в условиях функциональной недостаточности КК, дали основания предположить, что уровень ТЗ в крови определяет характер процессов ПОЛ в печени при хронической алкогольной интоксикации.

Известно, что у людей и крыс более  $2/3$  циркулирующего  $3,5,3'$ -трийодтиронина, высокоэффективного тиреоидного гормона, продуцируется из тироксина путем  $5'$ -дейодирования последнего [11]. По-видимому, выявленные изменения в системе гипофиз-щитовидная железа при хронической алкоголизации в условиях поражения печени  $GdCl_3$ , обусловлены функциональным состоянием КК и, возможно, является важным звеном оптимизации тиреоидного статуса организма при этом состоянии.

Учитывая значимость содержания ТЗ в крови в выявленных особенностях протекания процессов ПОЛ в печени на действие этанола в условиях угнетения КК  $GdCl_3$ , представляло интерес выяснить влияние гипертиреоза, вызываемого ТЗ, на состояние детоксикационной функции печени и характер формирования прооксидантно-антиоксидантного статуса организма у крыс с хронической алкогольной интоксикацией.

Выявлено, что у гипертиреоидных крыс активируются процессы детоксикации и ПОЛ в плазме крови и печени. Так, через 20 дней после ежедневного интрагастрального введения трийодтиронина гидрохлорида ( $30$  мкг/кг) у животных отмечалась увеличение содержания основных продуктов ПОЛ. Количество ДК в печени увеличивалось на  $45,2\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), а в плазме крови на  $32,1\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ). Концентрация МДА в печени в этих условиях возрастала на  $21,4\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ), в плазме крови на  $31,1\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ). Уровень ОШ повышался в печени и в плазме крови соответственно на  $66,2\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) и  $37,1\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ).

ПНС в этих условиях сокращалась на  $19,2\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) и составляла  $21,7 \pm 1,92$  мин. Содержание в плазме крови СМ снижалась на  $23,5\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), а СТК уменьшалась на  $19,2\%$  ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ).

Полученные данные дали основания заключить, что уровень ТЗ в крови, который во многом определяется процессами дейодирования в печени [11], имеет значение для протекания процессов ПОЛ и детоксикации у крыс с хронической алкогольной интоксикацией.

Подтверждение было получено на гипертиреоидных крысах, которые подвергались хронической алкоголизации. Как показали опыты, ежедневное

интрагастральное введение в течении 20 дней трийодтиронина гидрохлорида (30 мкг/кг) на 1% крахмальном растворе и последующее в течении 60 дней ежедневное введение зондом в желудок утром(1000) и вечером (1800) этанола и трийодтиронина гидрохлорида вызывают более выраженные изменения в процессах ПОЛ в печени, детоксикации, более значимое повышение активности АлАТ и АсАТ и снижение содержания общего белка и альбуминов в плазме крови.

Выявлено, что действие этанола у крыс с гипертиреозом не приводит к снижению температуры тела. Ректальная температура была равна  $37,6 \pm 0,080^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0,05$ ,  $n=39$ ). Уровень СМ в плазме крови и СТК у гипертиреоидных крыс, подвергшихся хронической алкоголизации, по сравнению с животными контрольной группы (затравка этанолом эутиреоидных крыс) были выше на 78,3% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) и 21,2% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) соответственно. Активность АлАТ и АсАТ плазмы крови опытных животных по сравнению с контрольными были выше соответственно на 47,5% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) и 79,3% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ).

Количество ДК в печени увеличивалось на 83,1% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), а в плазме крови на 69,5% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ). Концентрация МДА в печени в этих условиях повышалась на 47,7% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), в плазме крови на 70,6% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). Уровень ОШ возрастал в печени и в плазме крови соответственно на 105,6% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) и 56,8% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ).

Таким образом, выявленные неизвестные ранее особенности и закономерности изменения тиреоидных гормонов, процессов детоксикации и ПОЛ печени у крыс при хроническом действии в организме животных этанола в условиях функциональной недостаточности КК, позволяют заключить, что активность КК является важным фактором в реализации токсического влияния этанола на процессы ПОЛ и дейодирования гормонов щитовидной железы в печени.

#### Выводы

1. Тиреоидный статус организма, уровень трийодтиронина в крови в частности, определяет выраженность процессов ПОЛ и детоксикации в печени при хронической этаноловой интоксикации. Хроническая алкогольная интоксикация приводит к снижению температуры тела, детоксикационной функции печени и уровня трийодтиронина в крови у крыс. Гипертиреоз способствует развитию оксидативного стресса и содействует поражению печени в крыс с хронической этаноловой интоксикацией.

2. Клетки Купфера участвуют в изменениях прооксидантно-оксидантного состояния, детоксикационной функции печени и температуры тела, индуцированных хронической интоксикацией этанолом. Угнетение активности КК  $\text{GdCl}_3$  ослабляет развитие характерных изменений температуры тела, детоксикационной функции и в процессах ПОЛ в печени при хронической алкогольной интоксикации.

## Литература

1. А.с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50. Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях / В. М. Моин, В.В. Николайчик, В.В. Кирковский и др. – №4323421/28-14; заявлено 02.11.87; Опубл. 07.11.89. Бюл. № 41// Открытия. Изобретения. 1989. № 41. С. 415.
2. А.с. 1146570 СССР, МКИ б О1 № 1/28. Способ определения токсичности биологических жидкостей / О.А.Радькова, Г.А.Бояринов, И.Н.Балишина – №3458007/28-13; заявлено 18.06.84; Опубл. 23.03.85. Бюл. №11//Открытия. Изобретения. 1985. № 41. С.415.
3. Буко, В.У., Лукивская, О.Я, Хоха, А.М. Метаболические последствия алкогольной интоксикации. Минск. 2005 – 208с.
4. Буров, Ю.В., Ведерникова, Н.Н. Нейрохимия и фармакология алкоголизма. Москва. 1985.
5. Висмонт, Ф.И., Грищенко, К.Н. Участие клеток Купфера и гепатоцитов в формировании терморегуляторных реакций организма на действие бактериального эндотоксина// Здравоохранение, 2002. – № 5. – С. 32-35.
6. Давыдовский, А.Г. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантные процессы в печени при бактериальной эндотоксемии. Минск. “Holur”, 2004 – 104 с.
7. Камышников, В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. Минск. 2000. Т.1-2.
8. Костюк, В.А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов//Вопросы мед. химии. 1984. № 4. С. 125-127.
9. Черняускене, Р.Б., Варшкявичене, З.З. Одновременное флюорометрическое определение концентрации витаминов Е и А в сыворотке крови// Лаб. дело. 1984. №6. С. 362-365.
10. Fletcher, B.L., Dillard, C.L., Tappel, A.L. Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes//Analyt.Biochem.1973.Vol.52.N1.P.1-9
11. Kelly, G.S. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review // Altern. Med. Rev. – 2000. – № 4. – P.306-333
12. Mihara, M, Uchiyama, T. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test// Analyt. Biochem. 1978. Vol. 86. N1. P. 271-278.
13. Tapra, G., Pepper, I., Smok, G., Videla, L.A. Kupffer cells function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat// Free Radic. Res. 1997 Vol. 26(3). P. 267-279.