

## АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КУПФЕРА В РЕГУЛЯЦИИ СОДЕРЖАНИЯ ОБЩЕГО ХОЛЕСТЕРИНА В ПЕЧЕНИ И ЛИПОПРОТЕИНАХ КРОВИ И ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

Чепелева Е.Н., Висмонт Ф.И.

*Белорусский государственный медицинский университет,  
кафедра патологической физиологии, г. Минск*

**Ключевые слова:** перитонит, сепсис, клетки Купфера, холестерин, липопротеины.

**Резюме:** *установлено, что в условиях экспериментального перитонита у крыс развивается вторичная атерогенная дислиппротеинемия. В изменениях содержания общего холестерина в печени, общего холестерина, холестерина липопротеинов и температуры тела при перитоните участвуют клетки Купфера и монооксид азота.*

**Resume:** *it was found that in conditions of experimental peritonitis in rats, secondary atherogenic dyslipoproteinemia develops. Kupffer cells and nitrogen monoxide are involved in changes in the content of total cholesterol, lipoproteins and body temperature during peritonitis.*

**Актуальность.** 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.

Известно, что печеночная недостаточность сопровождается значительными нарушениями обменных процессов, особое значение среди которых имеют изменения метаболизма липидов, в частности, обмена липопротеинов (ЛП) сыворотки крови [3, 4]. 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 [5].

Также 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 [6, 7]. 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 [8, 9].

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 и температуры тела при перитоните остается во многом не изученной.

**Цель:** выяснить значимость активности КК в регуляции содержания общего ХС в печени и ЛП крови и температуры тела у крыс с CLP-перитонитом.

**Материал и методы.** Опыты выполнены на 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. Питательный режим соответствовал принципу *ad libitum*.

Для создания экспериментального перитонита использована модель лигирования и последующего однократного пунктирования слепой кишки – *cecal ligation and puncture (CLP)* [10]. Для этого крысам под гексеналовым наркозом (100 мг/кг, внутривенно) 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). Пассажи 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 [10]. В качестве контроля использовали ложнопериабдоминальных (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 внутривенным введением водного раствора гадолиния хлорида ( $GdCl_3$ ) в дозе 10 мг/кг. Считается, что  $GdCl_3$  является селективным ингибитором КК.

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. Для определения содержания общего ХС, ХС ЛПВП в сыворотке крови и ХС в тканевых гомогенатах проводили экстракцию липидов по методу M. A. Креховой, M. K. Чехрановой. Содержание ХС в сухих липидных экстрактах сыворотки крови определяли с использованием реакции Либермана-Бурхарда. Расчет содержания ХС суммарной фракции ЛПОНП+ЛПНП проводили по формуле:  $ХС\ ЛПОНП+ЛПНП = \text{общий ХС сыворотки крови} - ХС\ ЛПВП$ . Коэффициент атерогенности рассчитывали по формуле:  $\text{Коэффициент атерогенности} = (ХС\ ЛПОНП + ЛПНП) / ХС\ ЛПВП$ .

Продукцию NO определяли по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ).

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 ( $\bar{X} \pm S_x$ ). Статистически достоверными считали различия при  $p < 0,05$ .

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

Выявлено, что содержание общего ХС в печени крыс после CLP-операции повышалось на  $14,1\%$  ( $p < 0,05$ ): у ЛО составляло  $0,298 \pm 0,007$  мг/100 мг ткани ( $n = 10$ ), а у крыс с перитонитом  $0,340 \pm 0,014$  мг/100 мг ткани ( $n = 10$ ). Также имело место повышение уровня общего ХС в сыворотке крови на  $23,3\%$  ( $p < 0,05$ ) с  $2,66 \pm 0,14$  ( $n = 10$ ) до  $3,28 \pm 0,11$  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  $1,32 \pm 0,09$  ммоль/л ( $n = 10$ ) до  $0,83 \pm 0,07$  ммоль/л ( $n = 10$ ), повышался уровень ХС ЛПОНП + ЛПНП 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 ( $n = 10$ ). 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 дислипотеинемии.

Выявлено, что в этих условиях у крыс изменяется содержание в плазме крови  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  – конечных продуктов деградации NO. Развитие перитонита у крыс приводило к повышению концентрации  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови животных на 81,8 % ( $p < 0,05$ ): с  $5,27 \pm 0,46$  мкмоль/л у ЛО ( $n = 8$ ) до  $9,58 \pm 1,27$  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 [15, 18], можно было предположить, что в выявленных изменениях обмена 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, содержания ХС ЛП, уровня  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в условиях действия в организме животных селективного ингибитора КК  $\text{GdCl}_3$ .

Обнаружено, что действие в организме у крыс  $\text{GdCl}_3$  в дозе 10 мкг/кг – дозе, подавляющей эндотоксинобезвреживающую функцию КК, – сопровождается изменениями температуры тела. Внутривентриальное введение раствора  $\text{GdCl}_3$  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 (внутривентриальное введение физ. раствора 1,0 мл). Концентрация в плазме крови  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в этих условиях снижалась на 37,5 % ( $p < 0,05$ ;  $n = 8$ ) и составляла  $3,5 \pm 0,37$  мкмоль/л.

Депрессия КК  $\text{GdCl}_3$  ослабляла развитие характерных изменений содержания общего ХС в печени и ЛП плазмы крови и температуры тела у крыс с перитонитом. Применение  $\text{GdCl}_3$  приводило к менее значительному повышению уровня  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в крови. Уровень  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови крыс с перитонитом, получивших  $\text{GdCl}_3$ , по сравнению с животными с перитонитом, но получивших физ. раствор, был ниже на 31,8 % ( $p < 0,05$ ) и составил  $6,51 \pm 1,04$  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 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 внутривентриально 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 внутривентриально вводили  $\text{GdCl}_3$  (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 25,8 % ( $p < 0,01$ ) и 28,6 % ( $p < 0,01$ ) соответственно.

**Выводы:** Полученные данные свидетельствуют о том, что в условиях экспериментального перитонита у крыс развивается вторичная атерогенная дислиппротеинемия. В изменениях содержания холестерина в печени и липопротеинах крови и температуре тела при перитоните (CLP-модель) участвуют клетки Купфера и NO. Снижение активности клеток Купфера при перитоните, по-видимому, играет компенсаторную роль, ослабляя развитие характерных изменений содержания общего холестерина в печени, холестерина липопротеинов в крови и препятствует развитию вторичной дислиппротеинемии.

### Литература

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. Чепелева, Е. Н. Особенности метаболизма холестерина липопротеинов крови у крыс при экспериментальном перитоните / Е. Н. Чепелева, Ф. И. Висмонт // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: рецензир. сб. науч. трудов / М-во здравоохранения Республики Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т; редкол.: С. П. Рубникович, В. Я. Хрыщанович. – Минск : БГМУ, 2020. – Вып. 10. – С. 390–394.
4. Lipid metabolism in inflammation-related diseases / С. Zhang [et al.] // Analyst. – 2018. – Vol. 143. – P. 4526–4536.
5. 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, N 12. – P. 2199–2203.
6. Висмонт, Ф. И. О роли клеток Купфера и гепатоцитов в механизмах реализации влияния триглицеридов на процессы детоксикации и регуляции температуры тела / Ф. И. Висмонт, С. А. Артюшкевич // Белорусский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13, № 3. – С. 45–47.
7. Висмонт, Ф. И. Эндотоксинемия, дисрегуляция и формирование предболезни / Ф. И. Висмонт // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. – 2018. – Т. 15, № 1. – С. 7–16.
8. Volmar, B. Modulation of Kupfer cells activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats / B. Volmar, D. Rettinger, G. A. Wanner // Shock. – 1996. – Vol. 6, N 6. – P. 434–441.
9. 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.
10. 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.