

УДК 616-036.111

## **ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ НА РАЗВИТИЕ ПЕЧЕНОЧНОЙ ДИСФУНКЦИИ ПРИ СИСТЕМНОМ ВОСПАЛИТЕЛЬНОМ ОТВЕТЕ**

В. Ю. Земко, О. Е. Прищепова, Д. Ю. Пиньковская

кафедра анестезиологии и реаниматологии Витебский государственный Орден дружбы народов медицинский университет, г. Витебск, Республика Беларусь

Научный руководитель — к.м.н., доцент В. К. Окулич

**Резюме.** Клетки Купфера при гиперактивации иммунной системы могут приводить к повреждению печени, что является одним из механизмов отторжения трансплантата при пересадке печени. Они составляют совокупность резидентных тканевых макрофагов в организме, образующихся из моноцитов и продуцирующих провоспалительные и противовоспалительные цитокины, кислородные радикалы и протеазы. Проведено изучение влияния печеночной дисфункции на развитие системного воспалительного ответа и рассмотрены возможные пути воздействия химических веществ на модуляцию системного воспалительного ответа.

**Ключевые слова:** печень, печеночная дисфункция, системный воспалительный ответ.

## **ROLE OF HEPATIC DYSFUNCTION IN THE SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE**

V.Y. Zemko, O.E. Prishchepova, D.Y. Pinkovska

Department of Anesthesiology and Intensive Care of Vitebsk State Order of Friendship of Peoples Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Supervisor — Candidate of Medical Sciences, Associate Professor V.K. Okulich

**Summary.** Kupffer cells, when the immune system is hyperactivated, can lead to liver damage, which is one of the mechanisms of transplant rejection in liver transplantation. They constitute a set of resident tissue macrophages in the body, formed from monocytes and producing pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, oxygen radicals, and proteases. A study was made of the influence of hepatic dysfunction on the development of a systemic inflammatory response and considered possible ways in which chemicals affect the modulation of the systemic inflammatory response.

**Key words:** liver, hepatic dysfunction, systemic inflammatory response.

**Введение.** Печень является одним из часто поражаемых органов при септических состояниях. Она участвует в иммунном ответе и регулирует широкий спектр метаболических и защитных реакций. Установлено, что прогрессирование печеночной недостаточности коррелирует с повышенным риском летального исхода [1]. Вместе с тем изучение изменений функционального состояния печени при системном воспалительном ответе представляет определенный научно-практический интерес.

**Цель исследования:** изучить влияние химических веществ при системном воспалительном ответе на развитие печеночной дисфункции.

**Материалы и методы.** Исследовано влияние лекарственных средств на функцию печени на 30 лабораторных крысах. В работе соблюдены требования гуманного обращения с экспериментальными животными, содержащиеся в методических указаниях «Положение о порядке использования лабораторных животных в научно-исследовательских работах и

педагогическом процессе УО «Витебский государственный медицинский университет» и мерах по реализации требований биомедицинской этики»-2010. Постановка экспериментального исследования с использованием лабораторных животных соответствует рекомендациям Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals for Experimental and Other Scientific Purposes: Strasbourg, Council of Europe, 51 pp; 18.03.1986), Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986 (Council Directive on the Approximation of Laws, Regulations and Administrative Provisions of the Member States Regarding the Protection of Animal Used for Experimental and Other Scientific Purposes) и рекомендациям FELASA Working Group Report (1994- 1996), ТКП 125- 2008. Лабораторные животные были разделены на 11 групп: 5 опытных и 5 групп сравнения, 1 контрольная. Исследование проводилось в несколько этапов: на первом этапе крысам вводили внутрибрюшинно 0,5 мл суспензии *Klebsiella pneumoniae* \*10<sup>5</sup> для развития системного воспалительного ответа. На втором этапе проводили исследование влияния химических веществ, ингибирующих активность клеток Купфера, на функцию печени. Лекарственные препараты вводили по схеме внутривенно (водный экстракт диаллил трисульфида), внутримышечно (суспензия наночастиц меди), внутрибрюшинно (поливинилпирролидон, ингибитор интерлейкина-6), внутривенно (ингибитор С1) с последующим забором крови для биохимического исследования сыворотки крови (глюкоза, альбумин, аспартаттрансаминаза, аланинтрансаминаза, общий белок, билирубин, мочевины, креатинин, альфа-амилаза) (Таблица 1).

В качестве групп сравнения служили крысы, которым вводились внутривенно дистиллированная вода, внутримышечно вода для инъекций, внутрибрюшинно и внутривенно 0,9% физиологический раствор в том же объеме. Интактной группе крыс ничего не вводили. Ежедневно проводили наблюдение за крысами. Оценку жизнеспособности клеток печени проводили путем окрашивания 4-процентным раствором трипанового синего, который вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 мл всем лабораторным крысам прижизненно до выведения из эксперимента. При выведении из эксперимента производили забор печени и крови для последующего биохимического исследования.

**Таблица 1.** Исследуемые группы лабораторных животных

| Группа | Кол-во голов | Лекарственный препарат                     | Путь введения | Доза, мл | Кратность введения              |
|--------|--------------|--|---------------|----------|---------------------------------|
| 1      | 2            | <u>Дистиллированная вода</u>               | <u>p/os</u>   | 1,0      | каждые 5 дней в течение 28 дней |
| 2      | 3            | Водный экстракт <u>диаллил трисульфида</u> | <u>p/os</u>   | 1,0      | каждые 5 дней в течение 28 дней |
| 3      | 2            | Вода для инъекций                          | в/м           | 0,3      | 1 раз в 7 дней                  |
| 4      | 3            | Суспензия <u>наночастиц меди</u>           | в/м           | 0,3      | 1 раз в 7 дней                  |
| 5      | 6            | <u>Поливинилпирролидон</u>                 | <u>в/бр</u>   | 0,4      | ежедневно в течение 3 дней      |
| 6      | 2            | 0,9% раствор <u>NaCl</u>                   | <u>в/бр</u>   | 0,4      | ежедневно в течение 3 дней      |
| 7      | 6            | Ингибитор ИЛ-6                             | <u>в/бр</u>   | 0,05     | однократно                      |
| 8      | 2            | 0,9% раствор <u>NaCl</u>                   | <u>в/бр</u>   | 0,05     | однократно                      |
| 9      | 3            | Ингибитор С1                               | в/в           | 0,16     | однократно                      |
| 10     | 1            | 0,9% раствор <u>NaCl</u>                   | в/в           | 0,10     | однократно                      |
| 11     | 1            | Не вводили лекарственных средства          | -             | -        | -                               |

Материал фиксировали в 10% забуференном формалине в течение суток, после чего следовала стандартная гистологическая проводка и заливка в парафин в аппарате Thermo Scientific Excelsior ES. Парафиновые срезы печени изготовлены при помощи ротационного микротомы Thermo Scientific HM355S. Из биологического препарата печени изготавливали срезы, окрашенные эозином, в качестве контрольных использовали образцы печеночной ткани, окрашенные гематоксилин-эозином.

Полученные данные обрабатывали с использованием программы Statistica. В связи с ненормальностью распределения для проверки равенства медиан всех выборок использовали критерий Краскела-Уоллиса. Результаты принимали за статистически значимые при  $p < 0,05$ .

**Результаты исследования.** В таблице 2 представлены результаты биохимического исследования сыворотки крови при выведении из эксперимента.

Выявлены статистически значимые различия в уровнях общего белка, альбумина и АСТ между группами. Показатель альбумина был максимальный в группе 2 и составил 39,4; 38,5-40,3 г/л,  $p=0,02^*$ . При внутривенном введении ингибитора С1 выявлена статистически более низкий уровень глюкозы — 6,9; 6,55-7,35 ммоль/л, чем в случае внутривенного введения физиологического раствора 7,6; 7,5-7,7 ммоль/л,  $p=0,02$ , в остальных случаях статистически значимых различий не выявлено,  $p > 0,05$ . Уровень АСТ был выше нормы в

группах 2 и 7, что свидетельствовало о развитии синдрома цитолиза при использовании диаллил трисульфида и ингибитора ИЛ-6. Во всех группах, как в контрольных, так и опытных отмечено повышение альфа-амилазы и билирубина, однако значения между группами статистически значимо не различались. При оценке гистологических срезов печени жизнеспособность клеток путем окрашивания трипановым синим показала жизнеспособность гепатоцитов и клеток Купфера 100%. В качестве примера представлены рисунки препаратов печени 1-5.

**Таблица 2.** Результаты биохимического исследования сыворотки крови при выведении из эксперимента (Me; LQ-UQ).

| Показатель<br>Группа             | Глюкоза, ммоль/л       | Альбумины,<br>г/л       | АЛАТ,<br>U/L              | АсАТ,<br>U/L              | Общий<br>белок, г/л       | Мочевина,<br>ммоль/л      | Билирубин общий,<br>мкмоль/л | Креатинин, мкмоль/л      | Амилаза, U/L                 |
|----------------------------------|------------------------|-------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| 1                                | 7,2;<br>7,13<br>7,18   | 30,4;<br>29,9-<br>31,0  | 48,7;<br>47,5-<br>50,0    | 191,4;<br>173,4-<br>209,5 | 72,6;<br>71,3-<br>73,9    | 4,94;<br>4,77<br>5,12     | 17,4;<br>17,35-<br>17,45     | 71,1;<br>69,9-<br>72,3   | 1691,5;<br>1687,3-<br>1695,8 |
| 2                                | 6,9;<br>6,5-<br>7,4    | 39,4;<br>38,5-<br>40,3  | 58,1;<br>57,1-<br>59,4    | 244;<br>232,9-<br>264,5   | 69,2;<br>69,15-<br>69,3   | 5,1;<br>5,0-<br>5,5       | 14,8;<br>14,7-<br>16,3       | 75,5;<br>72-<br>81,3     | 1908;<br>1844-<br>1972       |
| 3                                | 6,6;<br>6,55-<br>6,65  | 35,2;<br>34,4-<br>36    | 44,3<br>42,6-<br>45,9     | 232,4;<br>222,3-<br>242,5 | 74,8;<br>72,6-<br>76,9    | 5,57;<br>5,5-<br>5,64     | 23,75;<br>22,68-<br>24,83    | 92,05;<br>88,3-<br>95,8  | 1744;<br>1715,5-<br>1772,5   |
| 4                                | 6,3;<br>6,3-<br>6,6    | 35,6;<br>33,55-<br>36,6 | 45,1;<br>43,6-<br>49,8    | 190,4;<br>189,9-<br>237,3 | 70,5;<br>70,1-<br>71,1    | 6,91;<br>6,13-<br>6,95    | 26,5;<br>26,2-<br>27,95      | 75,8;<br>74,2-<br>76,9   | 2003;<br>1802-<br>2007,5     |
| 5                                | 6,1;<br>5,3-<br>6,3    | 36;<br>35,1-<br>38,3    | 54,2;<br>52,3-<br>67      | 190,4;<br>182,7-<br>190,8 | 78,2;<br>78,1-<br>82,3    | 8,17;<br>7,8-<br>8,9      | 18,4<br>17,8<br>20,2         | 72,5;<br>70,6-<br>72,9   | 2126;<br>2037-<br>2272       |
| 6                                | 6,45;<br>6,3-<br>6,6   | 36,9;<br>36,3<br>37,6   | 45,8;<br>41,5-<br>50,0    | 173,3;<br>161,4-<br>185,3 | 84,8;<br>84,4-<br>85,1    | 5,5;<br>5,4-<br>5,7       | 16,95;<br>16,1-<br>17,8      | 122,5;<br>97,1-<br>147,9 | 2163,5;<br>2133,8-<br>2193,3 |
| 7                                | 6,6;<br>6,4<br>6,6     | 35,7;<br>35,1-<br>36,1  | 69,6;<br>60,5-<br>75,8    | 255,2;<br>247,6-<br>266,6 | 78,8;<br>68,7-<br>79,1    | 6,3;<br>5,98-<br>6,92     | 18,1;<br>18,1-<br>18,8       | 73,3;<br>69,9-<br>74,8   | 2093;<br>2054-<br>2185       |
| 8                                | 7,35<br>7,125<br>7,575 | 37,3<br>36,55<br>38,05  | 51,05<br>50,525<br>51,575 | 192,1<br>188,8<br>195,4   | 74,85<br>72,975<br>76,725 | 7,59<br>7,515<br>7,665    | 18,1<br>18,05<br>18,15       | 68,9<br>68,35<br>69,45   | 1908,5;<br>1872,3-<br>1944,8 |
| 9                                | 6,9<br>6,55<br>7,35    | 38,2<br>37,9<br>38,25   | 68,1<br>58,2<br>89,05     | 191,6<br>186,75<br>208,3  | 76,2<br>74,5<br>76,65     | 7,75<br>7,495<br>7,955    | 16,2<br>14,35<br>19,3        | 73,9<br>71,1<br>73,9     | 1707;<br>1642,5-<br>1756,5   |
| 10                               | 7,6<br>7,5<br>7,7      | 40,2<br>39,8<br>40,6    | 51,5<br>49<br>54          | 194<br>192,6<br>195,4     | 79,1<br>78,5<br>79,7      | 8,055<br>7,6875<br>8,4225 | 19,25<br>19,075<br>19,425    | 70,4<br>67,75<br>73,05   | 1874;<br>1793-<br>1955       |
| Критерий<br>Краскала-<br>Уоллиса | p>0,05                 | p=0,02*                 | p>0,05                    | p=0,03*                   | p=0,04*                   | p>0,05                    | p>0,05                       | p>0,05                   | p=0,03*                      |

Примечание – \* отмечены статистически значимые различия.

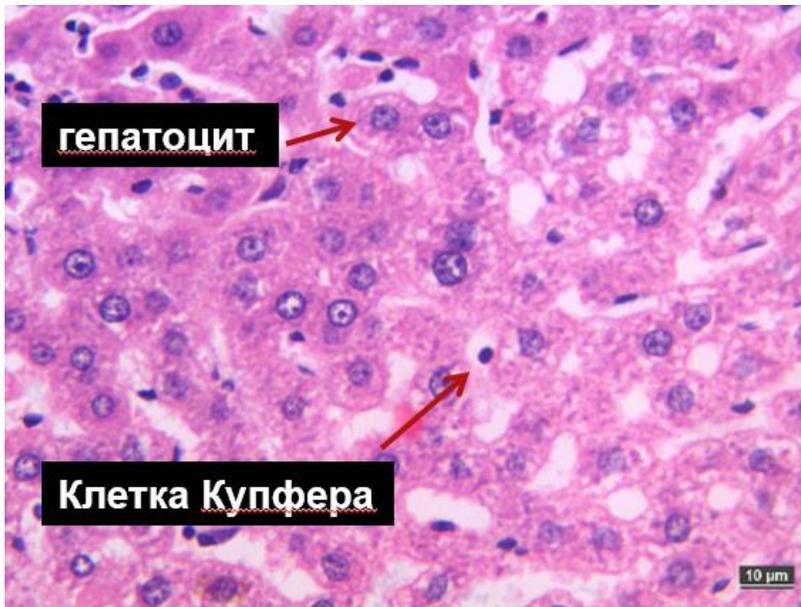


Рис. 1 – Препарат, окрашенный гематоксилин-эозином (в/вб введение 0,9% NaCl)

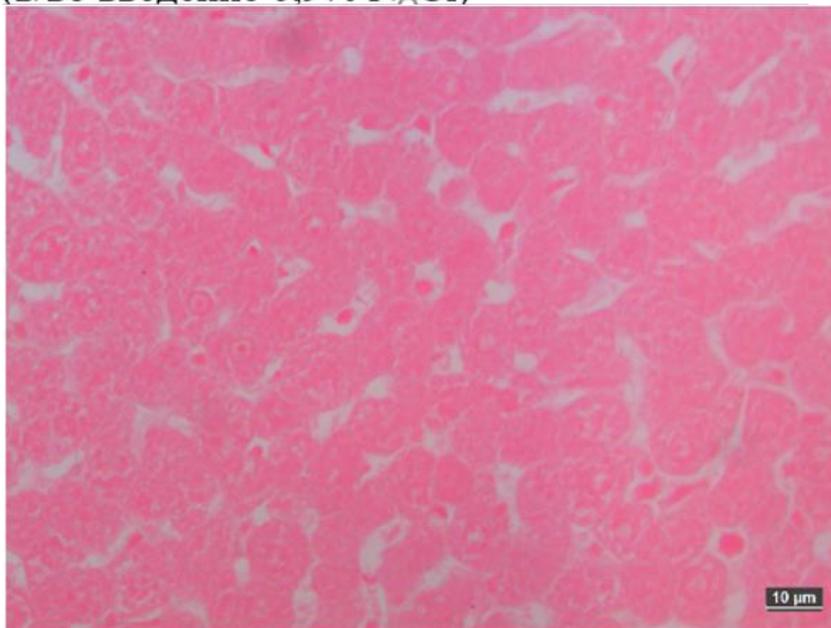


Рис. 2 – Препарат, окрашенный эозином (в/вб введение 0,9% NaCl)

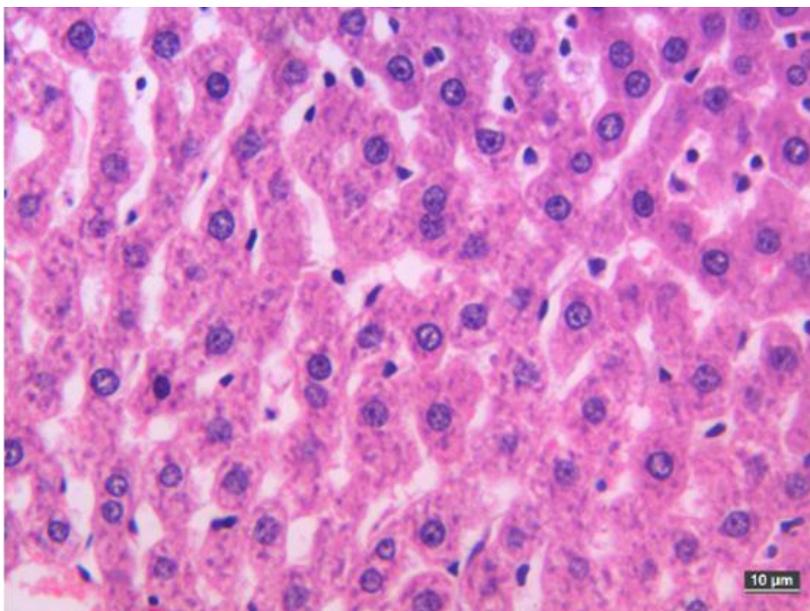


Рис. 3 – Препарат, окрашенный  
гематоксилин-эозином  
(в/бр введение поливинилпирролидона)

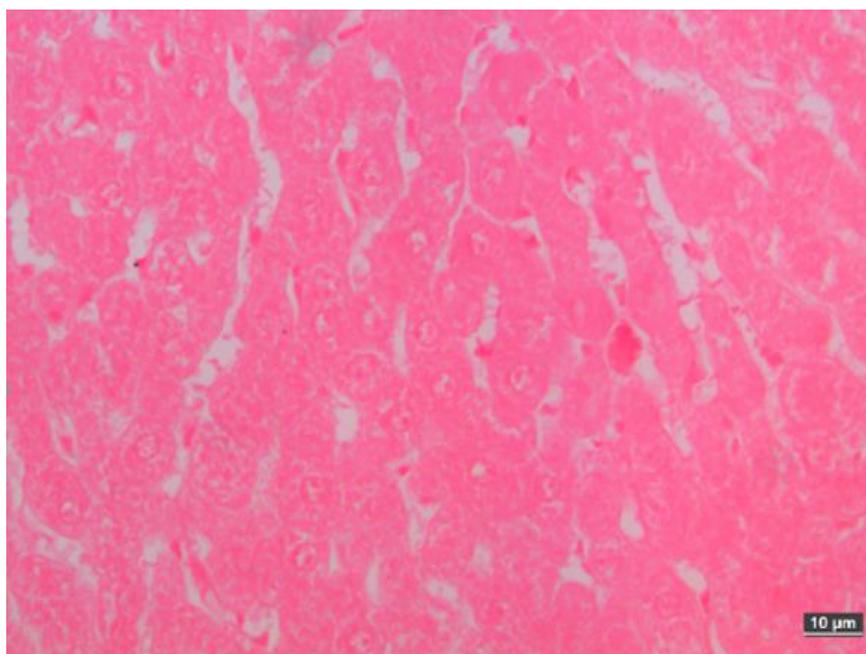


Рис. 4 – Препарат, окрашенный эозином  
(в/бр введение поливинилпирролидона)

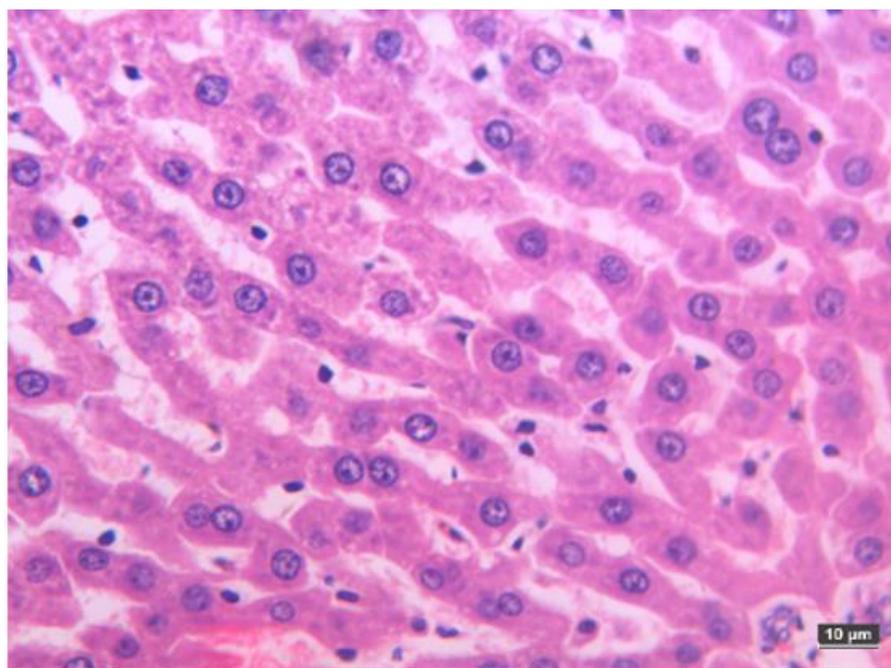
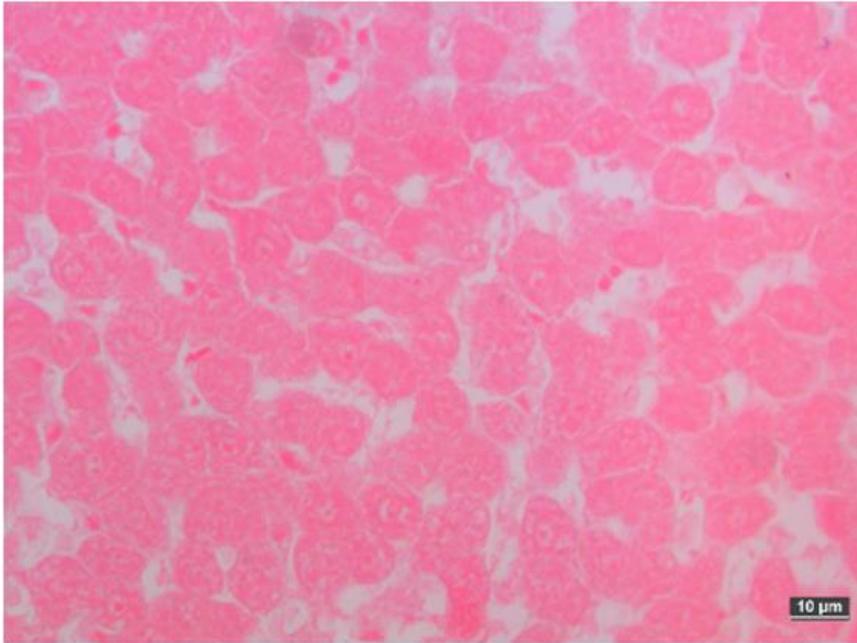


Рис.5 – Препарат, окрашенный  
гематоксилин-эозином (интактная группа)



**Рис. 6 – Препарат, окрашенный эозином  
(интактная группа)**

Вводимый прижизненно лабораторным животным витальный краситель трипановый синий избирательно окрашивает только мертвые ядра клеток, живые остаются неокрашенными, что свидетельствует о том, что гепатоциты и клетки Купфера на рисунках 2, 4, 6 сохранили жизнеспособность после введения описанных выше препаратов.

#### **Заключение**

При анализе влияния препаратов в развитии системного воспалительного ответа установлено, что диаллил трисульфид и ингибитор ИЛ-6 оказывают влияние на дисфункцию печени, однако ни один из исследованных препаратов не приводит к потере жизнеспособности ни гепатоцитов, ни клеток Купфера.

#### **Список литературы**

1. Цыркунов В.М., Андреев В.П., Кравчук Р.И., Кондратович И.А. Клиническая цитология печени: звездчатые клетки ИТО. Журнал ГрГМУ 2017; 4 (56): 90–9.