

ИЗМЕНЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОВРЕЖДЕНИЯ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ГЕПАТИТЕ И СПОСОБ ИХ КОРРЕКЦИИ

© 2018 г. В. А. Черешнев², З. А. Шафигуллина^{1,2}, С. Ю. Медведева^{1,2}, И. Ф. Гетте², С. А. Бриллиант², И. Г. Данилова^{1,2*}

*E-mail: ig-danilova@yandex.ru

¹ФГАОУ ВО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б. Н. Ельцина», Институт естественных наук и математики, Екатеринбург, Россия;

²ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», Екатеринбург, Россия

В данной статье представлена комплексная оценка биохимических, гематологических показателей экспериментальных животных после токсического воздействия гепатотропного яда – тетрахлорметана (CCl₄). А также произведена количественная оценка лимфоцитов разного иммунотипа в печени как при действии CCl₄, так и на фоне модуляции активности макрофагов.

Ключевые слова: тетрахлорметан, токсический гепатит, аминотрансферазы

DOI: 10.31857/S102872210002675-7

Адрес: 620049 Екатеринбург, ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук», Данилова Ирина Георгиевна.

Тел./факс: +79122434442; E-mail: ig-danilova@yandex.ru.

Авторы:

Черешнев В. А. академик, д.м.н., профессор, г.н.с. Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия;

Шафигуллина З. А. аспирант Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, Институт естественных наук и математики, м.н.с. Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия;

Медведева С. Ю., к.м.н., доцент кафедры медицинской биохимии и медицинской биофизики Уральского федерального университета имени первого Президента России Б. Н. Ельцина, в.н.с. Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия;

Гетте И. Ф., к.б.н., с.н.с. Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия;

Бриллиант С. А., м.н.с. Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия;

Данилова И. Г., д.б.н., доцент, заведующая лабораторией морфологии и биохимии Института иммунологии и физиологии Уральского отделения РАН, Екатеринбург, Россия;

Введение. Известно, что причиной развития острой печеночной недостаточности может быть отравление лекарственными препаратами, суррогатами алкоголя или промышленными ядами [1], к числу которых относится CCl₄. Вследствие патологических процессов может развиваться токсический гепатит, который проявляется тяжелым нарушением функций печени [2]. Несмотря на широкий спектр гепатопротекторов, клиницистам не всегда удается добиться стаби-

лизации течения гепатита, повышения регенераторной активности и предотвращения развития фиброза и цирроза печени. В связи с этим поиск эффективных способов коррекции токсических повреждений печени на сегодняшний день остается актуальной задачей.

Цель исследования: оценить изменение функциональных показателей повреждения печени при токсическом воздействии и на фоне модуляции активности макрофагов.

Материалы и методы. Эксперимент по моделированию токсического гепатита был выполнен на 30 крысах-самцах линии Wistar массой 180±10 г в соответствии с принципами Директивы 2010/63/EU ЕС. Было сформировано 6 групп животных: 1 – интактная, 2 – контрольная, 3 – CCl₄ 3 сутки, 4 – CCl₄+АФГ, 3 сутки, 5 – CCl₄ 7 сутки, 6 – CCl₄+АФГ, 7 сутки. Для создания модели токсического гепатита использовали CCl₄, который вводили животным экспериментальных групп однократно внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг веса. Инъекции иммуномодулятора аминофталгидразида экспериментальным животным осуществлялись в течении всего эксперимента внутримышечно из расчета 2 мг/кг. Крысам контрольной группы вводили аналогичную дозу 0,85% раствора хлорида натрия. Интактную группу составляли здоровые животные. Животных опытных групп выводили из эксперимента на 3 и 7 сутки передозировкой диэтилового эфира.

Биохимическое исследование плазмы крови включало определение активности аланинами-

нотрансферазы (АЛТ), аспаратаминотрансферазы (АСТ) и проводилось с использованием наборов реактивов фирмы Витал Диагностикс (Санкт-Петербург) на приборе DU800 Beckman Coulter и биохимическом анализаторе Cobas Integra 400 plus (производитель Roche).

Общий анализ периферической крови из хвостовой вены проводился на автоматическом гематологическом анализаторе Celly 70 Bioscode Nusel, предназначенном для ветеринарных исследований.

Для иммуногистохимического (ИГХ) исследования применяли моноклональные антитела mouse antirat CD3 clone G 4.18, CD45 clone OX-1, CD45 RA clone OX-33. Количественную оценку Т и В-лимфоцитов производили в единице площади в 20 полях зрения при увеличении $\times 1000$ на микроскопе Leica DM 2500, с использованием программы Leica Application Suite (V4).

Статистическая обработка результатов эксперимента выполнена с применением Statistica 10.0. Для сравнения двух независимых групп использован непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия между группами считались статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты. После внутрибрюшинного введения CCl_4 на 3 сутки возрастает активность маркеров повреждения клеток печени АСТ и АЛТ на 24% и 62% по сравнению с контролем, что обусловлено воздействием на клеточные органеллы токсичных метаболитов CCl_4 и образующихся свободных радикалов. На 7 сутки эксперимента поддерживается повышенный уровень АЛТ в плазме крови ($17,6 \pm 0,3$ мкмоль/мин·л) по сравнению с показателем у контрольной группы животных ($12,9 \pm 0,9$ мкмоль/мин·л). Применение АФГ на 3 и 7 сутки эксперимента приводит к достоверному снижению уровня аминотрансфераз до $17,2 \pm 0,8$ мкмоль/мин·л (АСТ) и $15,8 \pm 0,6$ мкмоль/мин·л (АЛТ) по сравнению с показателями 3 и 5 группы.

Количественная оценка лимфоцитов разного иммунофенотипа в печени крыс показала, что на 3 сутки эксперимента количество клеток экспрессирующих $CD45^+$ (лейкоцитов) увеличилось периваскулярно в 20 раз, а в паренхиме печени в 13 раз по сравнению с контролем. К 7 суткам токсического воздействия количество лейкоцитов в органе уменьшилось до $73,4 \pm 5,2$ клеток в 1 мм^2 (периваскулярно) и $71,9 \pm 6,2$ клеток в 1 мм^2 (в паренхиме), но оставалось выше показателей контрольной группы. На 3 сутки после введения АФГ количество лейкоцитов в парен-

химе печени и периваскулярно уменьшилось в 9 раз по сравнению с показателями контрольной группы. На 7 сутки у леченых животных количество лейкоцитов близко их количеству у контрольных животных. Анализ данных ИГХ показал, что количество $CD3^+$ (Т-лимфоцитов) резко возрастает на 3 сутки эксперимента в паренхиме в 15 раз, а периваскулярно в 31 раз по сравнению с контролем. К 7 суткам количество $CD3^+$ клеток снижается до $0,5 \pm 0,01$ клеток в 1 мм^2 среза (паренхима) и $0,4 \pm 0,01$ клеток в 1 мм^2 среза (периваскулярно), что ниже показателей контрольной группы. На 3 сутки после введения АФГ снижается количество Т-лимфоцитов в паренхиме печени на 17,6% и периваскулярно на 10,8%, по сравнению с показателями группы CCl_4 3 сутки. К 7 суткам после введения АФГ увеличивается количество Т-лимфоцитов в 5 раз в паренхиме и в 6 раз периваскулярно по сравнению с показателями 5 группы. Количество В-лимфоцитов остается стабильно низким во все периоды токсического воздействия CCl_4 за исключением 7 суток эксперимента на фоне введения АФГ, где отмечается увеличение количества В-лимфоцитов до значения $5,3 \pm 0,4$ клеток в 1 мм^2 среза клеток, близкого к показателю контрольной группы животных ($5,9 \pm 1,3$ клеток в 1 мм^2 среза).

При анализе периферической крови на 3 и 7 сутки токсического воздействия CCl_4 увеличивается количество лейкоцитов до $7,94 \pm 1,04$ Т/л и $6,53 \pm 1,95$ Т/л по сравнению с контролем ($5,18 \pm 0,44$ Т/л). Введение АФГ приводит к увеличению содержания лейкоцитов в периферической крови на 3 сутки 72,7%, на 7 сутки на 66% по сравнению с контролем. Также при введении АФГ на 7 сутки увеличивается абсолютное число лимфоцитов на 8% по сравнению с группой CCl_4 7 сутки. На 3 сутки после моделирования токсического гепатита и после введения АФГ наблюдается тенденция к снижению как абсолютного, так и относительного значения моноцитов в периферической крови по сравнению с контролем. На 7 сутки после введения CCl_4 отмечается увеличение абсолютного числа моноцитов их процентное содержание до $1,3 \pm 0,44$ Т/л и $19,75 \pm 0,75\%$ по сравнению с контролем $0,48 \pm 0,06$ Т/л и $9,8 \pm 0,58\%$. Применение АФГ на 7 сутки токсического воздействия CCl_4 приводит к увеличению процентного содержания моноцитов в 3 раза, а их абсолютное содержание возрастает в 5 раз. При развитии токсического гепатита на 3 сутки эксперимента и на фоне лечения АФГ увеличивается абсолютное количество и про-

центное соотношение гранулоцитов. На 7 сутки на фоне введения АФГ отмечается уменьшение процентного содержания гранулоцитов в 3 раза по сравнению с контролем.

Выводы. Развитие токсического гепатита характеризуется увеличением показателей цитолитического синдрома – АЛТ и АСТ в плазме крови. Применение АФГ, напротив, приводит к снижению данных показателей до уровня контрольных животных.

Токсическое действие тетрахлорметана в ранние сроки эксперимента приводит к увеличению содержания лимфоцитов и гранулоцитов, что свидетельствует о развитии экссудативного воспаления в ответ на повреждение. На 7 сутки действия CCl_4 компенсаторная реакция организма проявляется увеличением числа моноцитов и значительным снижением уровня гранулоцитов в периферической крови. Внутримышечное введение АФГ при токсическом гепатите приводит к увеличению содержания

лимфоцитов, моноцитов и снижению количества гранулоцитов.

Применение иммуномодулятора в ранние сроки эксперимента приводит к увеличению количества Т-лимфоцитов в печени, что доказывает их морфогенетическую роль и участие этих клеток в регенерации.

Исследования выполнены в рамках гос. задания ИИФ УрО РАН, тема № АААА-А18–1180205901070 и АААА-А18–118020590108–7

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Плеханов А. Н. Острая печеночная недостаточность – проблемы и перспективы их решения. Бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2012, 5 (87), 150–159. [Plekhanov A. N. Acute liver failure – problems and prospects for their solution. Bulletin VSSC of the RAMS, 2012, 5 (87), 150–159].
2. Brunt E. M., Tiniakos D. G. Histopathology of nonalcoholic fatty liver disease. World Journal of Gastroenterology, 2010, 16 (42), 5286–5296.

DIFFERENCES OF FUNCTIONAL INDICATORS OF LIVER DAMAGE IN EXPERIMENTAL TOXIC HEPATITIS AND THE METHODS OF THEIR CORRECTION

© 2018 V. A. Chereshnev², Z. A. Shafigullina^{1,2}, S. Yu. Medvedeva^{1,2}, I. F. Gette², S. A. Brilliant², I. G. Danilova^{1,2*}

*E-mail: ig-danilova@yandex.ru

¹Institute of Natural Sciences and Mathematics of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin. Ekaterinburg, Russia;

²Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS. Ekaterinburg, Russia

This article presents a complex evaluation of the biochemical, hematological parameters of experimental animals after the toxic effect of hepatotropic poison – carbon tetrachloride (CCl_4). A quantitative assessment of lymphocytes of different immunophenotypes in the liver was carried out both under the action of CCl_4 and with the modulation of macrophage activity.

Key words: carbon tetrachloride, toxic hepatitis, aminotransferase

Authors:

Chereshnev V. A., academician, Doctor of Medical Science, Professor, Chief Researcher of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

Shafigullina Z. A., post-graduate student Institute of Natural Sciences and Mathematics of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin, junior researcher of Laboratory of Morphology and Biochemistry of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

Medvedeva S. Yu., Ph.D. of Medical Sciences Institute of Natural Sciences and Mathematics of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin, associate professor, leading researcher of Laboratory of Morphology and Biochemistry of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

Gette I. F., Ph.D. of Biological Sciences, Senior Researcher of the Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

Brilliant S. A., junior researcher of Laboratory of Morphology and Biochemistry of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

Danilova I. G., ☒ doctor of biological sciences, associate professor Institute of Natural Sciences and Mathematics of the Ural Federal University named after the first President of Russia Boris Yeltsin, head of the Laboratory of Morphology and Biochemistry of the Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch of RAS, Ekaterinburg, Russia;

620049 Ekaterinburg, ul. Pervomayskaya, 106. E-mail: ig-danilova@yandex.ru.