

## ИММУНОМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ У ЖИВОТНЫХ НА ФОНЕ ИШЕМИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ: КОРРЕКЦИЯ АЛЛОГЕННЫМИ ГЕПАТОЦИТАМИ

Терехова С. В., Быстрова Н. А., Литвинова Е. С., Чуева Т. В.

*ГБОУ ВПО Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия (305041, г. Курск, ул. К. Маркса, 3) ganneta@list.ru*

В настоящее время вопросы патогенеза, диагностики и лечения острых заболеваний печени остаются одними из актуальных в медицине как ввиду сложности диагностики и выбора оптимальных методов лечения, так и вследствие тенденции к росту количества больных этими заболеваниями. Появление и развитие клеточных технологий создали серьезные научные предпосылки в этой области. Целью исследования явилось изучение иммунотропной и метаболической активности аллогенных гепатоцитов и их культуральной жидкости у животных в условиях ишемического поражения печени. Эксперименты проведены на здоровых половозрелых крысах линии Вистар, массой 180–200 г. Острое ишемическое поражение печени вызывали пережатием гепатодуоденальной связки после ее инфильтрации 0,5 мл 0,5 % раствора новокаина с помощью турникета в течение 20 минут. У экспериментальных животных в условиях ишемического поражения печени установлены выраженные изменения иммунной реактивности, функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов и гепатоцитов. Определена эффективность использования аллогенных гепатоцитов и их культуральной жидкости в коррекции нарушений иммунной реактивности, функциональной активности гепатоцитов и нейтрофилов.

Ключевые слова: ишемическое поражение печени, аллогенные гепатоциты, культуральная жидкость, иммунометаболический статус.

## IMMUNE AND METABOLIC DISTURBANCES AT ANIMALS AGAINST THE ISCHEMIC LESION OF THE LIVER: CORRECTION BY ALLOGENIC HEPATOCYTES

Terehova S. V., Bystrova N. A., Lytvinova E. S., Chueva T. V.

*Kursk state medical university, Kursk, Russia (305041, Kursk, street K. Marksa, 3) ganneta@list.ru*

Now questions of a pathogenesis, diagnostics and treatment of acute diseases of liver remain one of actual in medicine because of complexity of diagnostics and a choice of optimum methods of treatment and because of the tendency to growth of quantity sick of these diseases. Occurrence and development of cellular technologies have framed serious scientific preconditions in this area. A research objective was studying immune and metabolic activity of allogenic hepatocytes and them culture broth at animals in the conditions of an ischemic lesion of a liver. Experiments are spent on healthy rats of a line of Vistar with mass of 180–200 the acute ischemic lesion of a liver caused crossclamping of hepatoduodenal ligaments after its infiltration of 0,5 % of the solution of Novocainum of 0,5 ml within 20 minutes. At experimental animals in the conditions of an ischemic lesion of a liver the expressed changes of immune reactance, functional activity of neutrophils and hepatocytes are established. Efficiency of use of allogenic hepatocytes and them culture broth in correction of disturbances of immune reactance, functional activity of hepatocytes and neutrophils is defined.

Key words: ischemic lesion of a liver, allogenic hepatocytes, culture broth, the immune and metabolic status.

**Введение.** Иммунные нарушения, возникающие при гипоксии различного генеза, и механизмы их развития остаются все еще мало изученными. Функции иммунной системы осуществляются на фоне метаболических процессов и их сдвигов, вызываемых действием на организм различных агентов, а также клеток печени – гепатоцитов. Типовые метаболические сдвиги, возникающие при гипоксии различного генеза, сочетаются и с определенными особенностями нарушений метаболизма в тех или иных органах и тканях, обусловленными спецификой их структурно-функциональной организации, природой индуцирующего агента и первичным звеном его воздействия на клетки и организм в целом [3]. Взаимосвязь

многочисленных метаболических сдвигов, нарушений функциональной активности гепатоцитов, возникающих при гипоксии, с функцией иммунной системы до настоящего времени изучена недостаточно, так же как не установлены наиболее эффективные способы фармакологической коррекции [7].

В настоящее время вопросы патогенеза, диагностики и лечения острых заболеваний печени остаются одними из актуальных в медицине как ввиду сложности диагностики и выбора оптимальных методов лечения, так и вследствие тенденции к росту количества больных этими заболеваниями. Появление и развитие клеточных технологий создали серьезные научные предпосылки в этой области [6, 7].

**Цель исследования** – изучение иммуотропной и метаболической активности аллогенных гепатоцитов и их культуральной жидкости у животных в условиях ишемического поражения печени.

**Материал и методы исследования.** Эксперименты проводили на 56 здоровых половозрелых крысах линии Вистар, массой 180–200 г. В опытах использовали животных, прошедших карантинный режим вивария Курского государственного медицинского университета и не имевших внешних признаков каких-либо заболеваний. Все исследования проводили в одно и то же время суток, с 8 до 12 ч, с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей (г. Страсбург, Франция, 1986) и согласно правилам лабораторной практики РФ (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.).

Острое ишемическое поражение печени вызывали оперативным методом под внутрибрюшинным гексеналовым наркозом (30 мг/кг веса). Операция выполнялась из верхнесрединного лапаротомного доступа. Ишемию печени вызывали пережатием гепатодуоденальной связки после ее инфильтрации 0,5 мл 0,5 % раствора новокаина с помощью турникета в течение 20 минут [1]. Аллогенные гепатоциты и их культуральную жидкость вводили внутрибрюшинно в объеме 0,1 мл по 10 000 000 клеток в 1 мл.

Для оценки неспецифической резистентности устанавливали фагоцитарно-метаболическую активность полиморфноядерных лейкоцитов по фагоцитарному числу (ФЧ) и фагоцитарному индексу (ФИ), показателям спонтанного и индуцированного зимозаном НСТ-теста опсонизированного зимозаном (о/з) и неопсонизированного (н/з) [9]. Оценка иммунологической реактивности основывалась на показателях гуморального иммунного ответа (ГИО) (количество антителообразующих клеток – АОК) и гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (разнице масс регионарного и контрлатерального лимфатических узлов – РМ и по разнице количества в них кариоцитов – РК) [5].

В сыворотке крови экспериментальных животных определяли концентрацию общего билирубина, общего белка, фибриногена и активность аспартат- и аланинаминотрансфераз (АЛТ и АСТ), щелочной фосфатазы (ЩФ),  $\gamma$ -глутамилтранспептидазы (ГГТ), ставили тимоловую пробу (ТП) и определяли протромбиновый индекс (ПТИ). Величины всех перечисленных показателей определяли унифицированными методами с использованием стандартных наборов реактивов [8]. Выраженность перекисного окисления липидов оценивали по содержанию ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА), кроме этого, в сыворотке крови определяли активность каталазы [2, 10]. Статистическую обработку результатов исследования проводили, используя параметрические и непараметрические методы [4].

**Результаты исследования.** В условиях ложной операции (без моделирования ИПП) достоверных различий между изучаемыми показателями иммунометаболического статуса получено не было (табл. 1, 2).

Таблица 1

**Иммунная реактивность и функция полиморфноядерных лейкоцитов при введении аллогенных гепатоцитов и их культуральной жидкости на фоне ишемического поражения печени (M $\pm$ m)**

Показатели	Единицы измерения	1	2	3	4	5
		Интактные животные	Ложная операция	ИПП	АГ	Культуральная жидкость АГ
АОК	10 <sup>3</sup> /сел.	19,7 $\pm$ 1,4	21,6 $\pm$ 2,1	8,4 $\pm$ 0,93 <sup>*1,2</sup>	9,1 $\pm$ 1,2 <sup>*1,2</sup>	14,2 $\pm$ 1,2 <sup>*1-4</sup>
РМ	мг	3,12 $\pm$ 0,07	3,04 $\pm$ 0,04	2,01 $\pm$ 0,04 <sup>*1,2</sup>	4,27 $\pm$ 0,04 <sup>*1-3</sup>	3,15 $\pm$ 0,05 <sup>*3,4</sup>
РК	10 <sup>6</sup>	1,83 $\pm$ 0,08	1,8 $\pm$ 0,21	0,92 $\pm$ 0,02 <sup>*1,2</sup>	2,24 $\pm$ 0,03 <sup>*1-3</sup>	1,93 $\pm$ 0,12 <sup>*3,4</sup>
ФИ	%	71,7 $\pm$ 3,6	69,7 $\pm$ 4,2	46,8 $\pm$ 3,0 <sup>*1,2</sup>	56,0 $\pm$ 2,0 <sup>*1-3</sup>	65,0 $\pm$ 2,6 <sup>*3,4</sup>
ФЧ	абс.	2,54 $\pm$ 0,14	2,47 $\pm$ 0,14	1,5 $\pm$ 0,05 <sup>*1,2</sup>	2,36 $\pm$ 0,16 <sup>*3</sup>	2,05 $\pm$ 0,3
НСТ-сп.	mOD	0,79 $\pm$ 0,05	0,77 $\pm$ 0,03	0,49 $\pm$ 0,02 <sup>*1,2</sup>	0,58 $\pm$ 0,09 <sup>*1,2</sup>	1,1 $\pm$ 0,1 <sup>*1-4</sup>
НСТ-ст. н/з	mOD	0,89 $\pm$ 0,07	0,87 $\pm$ 0,04	0,54 $\pm$ 0,04 <sup>*1,2</sup>	0,79 $\pm$ 0,08 <sup>*3</sup>	1,29 $\pm$ 0,13 <sup>*1-4</sup>
НСТ-ст. о/з	mOD	0,93 $\pm$ 0,04	0,95 $\pm$ 0,03	0,55 $\pm$ 0,05 <sup>*1,2</sup>	0,96 $\pm$ 0,05 <sup>*3</sup>	1,62 $\pm$ 0,12 <sup>*1-4</sup>

*Примечание:* звездочкой отмечены достоверные отличия средних арифметических ( $p < 0,05$ ); цифры рядом со звездочкой – по отношению к показателям какой группы даны эти различия.

Кроме этого у данной группы животных снижается как метаболическая, так и фагоцитарная активность полиморфноядерных лейкоцитов (табл. 1).

В условиях моделирования ИПП у экспериментальных животных супрессируется иммунная реактивность: гуморальный иммунный ответ на эритроциты барана (снижение количества иммунных АОК) и гиперчувствительность замедленного типа (снижение РМ и РК) (табл. 1).

На 5-е сутки после моделирования ИПП в плазме крови экспериментальных животных происходит повышение активности АЛТ, АСТ, ЩФ и ГГТ, возрастает тимоловая проба, концентрация общего билирубина и снижается ПТИ. Эти изменения свидетельствуют

о возникновении у отравленных животных синдрома холестаза, цитолиза, снижении синтетической активности гепатоцитов и возникновении иммунного воспаления (табл. 2).

Кроме этого в данной группе животных возрастает в плазме крови уровень продуктов ПОЛ (МДА и АГП) при повышении активности каталазы (табл. 2).

Таблица 2

**Функциональная активность гепатоцитов, состояние процессов ПОЛ и активность каталазы при введении аллогенных гепатоцитов и их культуральной жидкости на фоне ишемического поражения печени (M±m)**

Показатели	Единицы измерения	1	2	3	4	5
		Интактные животные	Ложная операция	ИПП	АГ	Культуральная жидкость АГ
АСТ	Е/л	41,4±4,2	42,7±4,4	56,8±3,7 <sup>*1,2</sup>	49,8±2,1 <sup>*1-3</sup>	51,2±3,0 <sup>*1,2</sup>
АЛТ	Е/л	36,3±3,4	35,6±3,0	49,5±4,0 <sup>*1,2</sup>	46,0±4,7 <sup>*1,2</sup>	50,7±6,3 <sup>*1,2</sup>
ГГТ	Е/л	10,7±1,3	11,3±1,4	14,0±0,8 <sup>*1,2</sup>	14,0±0,7 <sup>*1,2</sup>	15,1±3,8 <sup>*1,2</sup>
ЩФ	Е/л	295,0±18,4	251,3±33,7	1136,3±95,6 <sup>*1,2</sup>	426,8±65,3 <sup>*1-3</sup>	382,5±22,3 <sup>*1-3</sup>
Билирубин	мкмоль/мл	13,1±2,1	12,6±3,4	19,6±2,3 <sup>*1,2</sup>	18,3±1,4 <sup>*1,2</sup>	19,1±1,2 <sup>*1,2</sup>
ПТИ	%	51,3±5,3	48,6±4,8	37,8±3,3 <sup>*1,2</sup>	42,2±2,9 <sup>*1,2</sup>	54,8±2,3 <sup>*3,4</sup>
ТП	ед. S-H	2,96±0,13	2,8±0,3	3,71±0,08 <sup>*1,2</sup>	3,8±0,11 <sup>*1,2</sup>	2,77±0,11 <sup>*3,4</sup>
АГП	усл. ед.	1,71±0,3	1,7±0,21	2,57±0,18 <sup>*1,2</sup>	1,67±0,19 <sup>*3</sup>	1,81±0,2 <sup>*3</sup>
МДА	мкмоль/л	3,64±0,9	3,71±0,27	8,13±0,9 <sup>*1,2</sup>	6,23±0,23 <sup>*1-3</sup>	4,27±0,11 <sup>*3,4</sup>
Каталаза	кат/л	10,6±1,7	12,4±3,0	14,2±1,9 <sup>*1</sup>	15,2±1,7 <sup>*1,2</sup>	12,7±1,3 <sup>*4</sup>

*Примечание:* звездочкой отмечены достоверные отличия средних арифметических ( $p < 0,05$ ); цифры рядом со звездочкой – по отношению к показателям какой группы даны эти различия.

Полученные результаты свидетельствуют о выраженных изменениях иммунной реактивности и функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов и гепатоцитов в условиях ишемического поражения печени.

Применение аллогенных гепатоцитов позволило у животных в условиях ИПП нормализовать ФЧ полиморфноядерных лейкоцитов и их кислородзависимую активность, корригировать, но не до уровня контрольной группы животных, количество АОК и ФИ нейтрофилов периферической крови (табл. 1, 2).

Культуральная жидкость АГ у животных с ИПП нормализует показатели гиперчувствительности замедленного типа, фагоцитарную активность нейтрофилов периферической крови, а в плазме крови ПТИ, значения ТП и концентрацию продуктов ПОЛ (АГП и МДА) (табл. 1, 2).

**Обсуждение результатов исследования.** Полученные результаты свидетельствуют о выраженных изменениях иммунной реактивности и функциональной активности полиморфноядерных лейкоцитов и гепатоцитов в условиях ишемического поражения печени и возможности использования аллогенных гепатоцитов и их культуральной жидкости в коррекции выявленных иммунометаболических нарушений.

Следует отметить, что применение культуральной жидкости оказывает более выраженное влияние на показатели иммунометаболического статуса в условиях ишемического поражения печени.

### Список литературы

1. Антопольская Е. В. Коррекция ишемии печени при ее резекции в условиях обескровливания / Е. В. Антопольская: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Харьков, 1988. – 21 с.
2. Кушманова О. Д., Ивченко Е. М. Руководство к лабораторным занятиям по биологической химии / О. Д. Кушманова, Е. М. Ивченко. – М.: Медицина, 1983. – С. 98–99.
3. Коррекция иммунометаболических нарушений у больных с критической ишемией нижних конечностей атеросклеротического генеза / В. А. Лазаренко, С. Б. Николаев, Н. А. Быстрова, А. И. Конопля // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2010. – № 2. – С. 77-83.
4. Лакин Г. Ф. Биометрия / Г. Ф. Лакин. – М.: Высшая школа, 1980. – 243 с.
5. Мальберг К. Метод локального гемолиза / К. Мальберг, Э. Зигль // Иммунологические методы. – М.: Медицина, 1987. – С. 262–267.
6. Новиков В. В. Растворимые формы мембранных антигенов клеток иммунной системы / В. В. Новиков, А. Ю. Барышников, А. В. Караулов // Иммунология. – 2007. – Т. 28, № 4. – С. 249-254.
7. Онищенко Н. А. Клеточные технологии и современная медицина / Н. А. Онищенко // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2004. – № 4. – С. 2-11.
8. Подымова С. Д. Болезни печени (руководство для врачей) / С. Д. Подымова. – М.: Медицина, 1998. – 704 с.
9. Руководство по иммунологическим методам в гигиенических исследованиях / Т. В. Федосеева, Л. В. Порядин, Л. В. Ковальчук и др. – М., 1993. – С. 319.
10. Стальная Н. Д. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты / Н. Д. Стальная, Т. Г. Гаришвилли // Современные методы в биохимии. – М., 1977. – С. 66-68.

### Рецензенты:

Снимщикова Ирина Анатольевна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой иммунологии и специализированных клинических дисциплин ФГБОУ ВПО «Орловский государственный университет», г. Орел.

Афанасьев Юрий Иванович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой внутренних болезней № 1 ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», г. Белгород.