

С.А. Артюшкевич

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 (GdCl₃) 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 α -токоферрола (α -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 α -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 GdCl₃ 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 GdCl₃ 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^oC, $p < 0,05$, $n=9$). 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 GdCl₃ 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 GdCl₃.

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 GdCl₃ (10мг/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 GdCl₃, снижалась на 0,50С (p<0,005, n=8).

Установлено, что у алкоголизованных крыс, получавших GdCl₃ (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 GdCl₃ 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 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// Здоровоохранение, 2002. – № 5. – С. 32-35.
6. Давыдовский, А.Г. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантные процессы в печени при бактериальной эндотоксемии. Минск. “Нолур”, 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.