

УДК (616.24-002):616.35-092.9

Л.В.Вохминцева

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ НАРУШЕНИЯ ПЕЧЕНИ  
НА ФОНЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ***ГОУ ВПО Новосибирский государственный медицинский университет***РЕЗЮМЕ**

С целью исследования структурно-функционального состояния печени у крыс с экспериментальной пневмонией провели гистологическое исследование лёгких и печени, оценили состояние лизосом в гомогенате печени, активность аминотрансфераз и содержание белка и общего билирубина в сыворотке крови.

Пневмонию моделировали интратрахеальным введением сефадекса А-25 в дозе 5 мг/кг веса. Воспаление в лёгких сопровождалось повышением уровня аминотрансфераз сыворотки и общего билирубина, снижением общего белка крови, а также развитием дистрофических процессов в печени. Пневмония сопровождалась активацией лизосом (повышение уровня свободной активности лизосомальных ферментов в гомогенате), что является механизмом адаптации в условиях воспалительного процесса в лёгких крыс. Однако повреждение лизосомальных мембран и утечка кислой фосфатазы и катепсина Д в цитоплазму (повышение неседиментируемой активности) и сыворотку крови являются одной из причин повреждения печени.

**SUMMARY**

L.V.Vokhmintseva

**STRUCTURAL AND FUNCTIONAL  
DISTURBANCES OF LIVER IN THE SETTING  
OF EXPERIMENTAL PNEUMONIA**

To study the effect of pneumonia on function and structure of liver we investigated the histological status of the liver, lysosome activity in the liver homogenate, aminotransferases activity, total protein and total bilirubin levels in serum.

Sephadex-pneumonia in a rat model (intratracheal injection of Sephadex A-25 at a concentration of 5 mg/kg body weight) lead to elevated serum level of aminotransferases and total bilirubin level, to decreased total protein level in serum, to appeared histological markers of liver dysfunction. Sephadex-pneumonia induced the activation of lysosome (the elevation of free lysosome enzyme activity) for adaptation liver cells in setting of experimental pneumonia in rat. But the injury of lysosome membrane and lysosomal leakage with increase of nonsedimentational level of lysosome enzyme activity in rat liver homogenate and elevation of serum acid phosphatase and cathepsin D activities is one of the reasons of liver damage.

Заболевания органов дыхания сопровождаются повреждениями в других органах и тканях. Внеболь-

ничная пневмония молодого возраста в ряде случаев сопровождается поражением миокарда [3]. Экстрапульмонарным проявлением хронического бронхита помимо дисфункции скелетных мышц и остеопороза является развитие ренальной патологии [2]. Резекция части легкого, показаниями к которой являются хирургическое лечение эмпиемы плевры, бронхоэктазы, инфекционные легочные заболевания, эмболизация бронхиальных артерий, приводит к гемодинамическим изменениям и нарушениям печеночной циркуляции, ведущей к повреждению печени [14].

Поскольку печень занимает особое место в развитии любой воспалительной реакции, так как является органом, обеспечивающим гомеостатические реакции целого организма, а также выполнении одной из важнейших функций – иммунитета [9], очевидно, что структурно-функциональная целостность органа является необходимым условием для благоприятного развития и разрешения любых воспалительных заболеваний в организме. Механизмы, лежащие в основе патогенеза в повреждении печени при заболеваниях органов дыхания, остаются недостаточно раскрытыми.

Целью настоящей работы явилось исследование структурно-функционального состояния печени у крыс с экспериментальной пневмонией.

**Материалы и методы исследований**

Исследования проведены на крысах-самцах линии Вистар полученных из вивария НГМУ массой 200-220 г. Животные находились на обычном полноценном общевиварном рационе со свободным доступом к воде в едином температурном и световом режимах. Экспериментальные исследования проводились в осенне-зимний период в одно и то же время – с 9 до 13 часов. Пневмонию (n=12) моделировали интратрахеальным введением с помощью специального зонда под эфирным наркозом суспензии сефадекса А-25 («Pharmacia Uppsala», Швеция) в дозе 0,5 мг/100 г (диаметр гранул 40-100 мкм), приготовленной на тёплом физиологическом растворе [4]. Биологический материал забирали на 2, 10, и 20 сутки после введения сефадекса А-25. При заборе биологического материала животные находились под эфирным наркозом. Контролем служил материал от интактных животных (n=16) соответствующего возраста, находившихся на общевиварном рационе.

Для гистологического анализа кусочки легкого и печени фиксировали в 10%-ном растворе формалина, гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином (Меркулов Г.И., 1974).

Состояние лизосомального аппарата печени оценивали, определяя свободную, неседиментируемую и общую активности кислой фосфатазы и катепсина Д в гомогенате. Все процедуры, предшествующие инкуба-

ции гомогената, проводились на холоде при 4°C. Для приготовления гомогенатов печени, предварительно измельченные образцы печени суспендировали в 9 объёмах 0,25 М раствора сахарозы с 0,001 М ЭДТА, при pH 7,4. Оставшиеся неразрушенные соединительнотканые элементы удаляли центрифугированием (1000 об/мин в течение 3 мин.) при охлаждении. Свободную активность ферментов определяли немедленно после гомогенизации печени в 0,25 М растворе сахарозы, общую активность – в том же гомогенате после предварительной инкубации с 0,2% раствором тритона X-100 («Fergak», Германия) в соотношении 1:1. Неседиментируемую активность ферментов определяли в надосадочной жидкости после центрифугирования гомогената при 105000 g в течение 45 мин. на ультрацентрифуге Beckman (США), модель L5-75, ротор SW-65. Определение активности кислой фосфатазы проводили по методу de Duve et. al. [15]. В качестве субстрата использовали  $\beta$ -глицерофосфат натрия («Merck», Германия). Количество неорганического фосфата определяли по методу C. Fiske и J. Subbarow (1925). Активность фермента выражали в мкмоль фосфата/мин на 1 г белка. Определение активности катепсина Д осуществляли по методу A.J. Barrett [13], в качестве субстрата использовали гемоглобин («Reanal», Венгрия). Активность фермента выражали в мкмоль тирозина/мин на 1 г белка.

В сыворотке крови определяли активность внутриклеточных ферментов печени – аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы колориметрическим динитрофенилгидразиновым методом с применением наборов реагентов «ТРАНСАМИНАЗА-АЛТ-НОВО» и «ТРАНСАМИНАЗА-АСТ-НОВО» (ЗАО «Вектор-Бест»), активность аминотрансфераз выражали в Е/л.

В основе метода определения содержания общего билирубина лежит реакция билирубина с диазотированной сульфаниловой кислотой в присутствии кофеинбензоата натрия. Для определения общего билирубина использовали набор реагентов «БИЛИРУБИН-НОВО» (ЗАО «Вектор-Бест»). Концентрацию общего билирубина выражали в мкмоль/л.

Общий белок сыворотки крови определяли биуретовым методом с помощью наборов реагентов «ПРОТЕИН-НОВО» (ЗАО «Вектор-Бест»), концентрацию выражали в г/л. Концентрацию белка в гомогенате печени оценивали по методу J.H. Lowry et. al. (1951).

При статистическом анализе данных использовались следующие показатели вариационной статистики: среднее арифметическое значение (M), стандартная ошибка среднего значения (m). Определение достоверности различий сравниваемых параметров между разными выборками проводили с использованием непарного критерия Стьюдента (достоверным считали различия при  $p < 0,05$ ) [6].

### Результаты исследований и их обсуждение

Введение в трахею экспериментальных животных сефадекса А-25 сопровождалось развитием серозно-десквамативной пневмонии. На вторые сутки эксперимента наблюдали: полнокровие, очаги микрокровоизлияний, вокруг бронхов и сосудов крупного и среднего калибра формировались лимфо-макрофагальные инфильтраты с примесью нейтрофилов и эозинофилов.

Диффузное утолщение межальвеолярных перегородок было за счёт их инфильтрации макрофагами и лимфоцитами, а также единичными нейтрофилами, выявляли очаги эмфиземы. В просвете крупных бронхов воспалительный клеточный инфильтрат состоял преимущественно из нейтрофилов, на 10 сутки эксперимента отмечали сохранение полнокровия и очагов микрокровоизлияний. Плотные клеточные инфильтраты вокруг бронхов и кровеносных сосудов состояли преимущественно из лимфоцитов, макрофагов, а в отдельных участках образовывались лимфоидные фолликулы. Диффузные утолщения межальвеолярных септ наблюдались за счёт инфильтрации лимфоцитами и макрофагами. Очаги эмфиземы сохранялись. Было показано, что в этот срок исследования наблюдался приток макрофагов, которые заменяли нейтрофилы в очаге воспаления, и лимфоцитов с формированием лимфоидных фолликулов. Через 20 суток с момента введения сефадекса А-25 вокруг крупных бронхов и кровеносных сосудов отмечали крупные воспалительные клеточные инфильтраты преимущественно из лимфоцитов и макрофагов с некрозом слизистой бронхов. В то же время, вокруг бронхов среднего и мелкого калибра выраженность воспалительного инфильтрата была снижена, очаговое утолщение межальвеолярных перегородок было обусловлено преимущественно воспалительной инфильтрацией из лимфоцитов и макрофагов, также сохранялись очаги эмфиземы.

Воспалительный процесс в легких оказывал значительное влияние на структурно-функциональное состояние печени экспериментальных животных. В работе был проведен гистологический анализ срезов печени крыс, который показал, что на второй день после интра-трахеального введения сефадекса А-25 в печени сохранялось балочное строение печени, наблюдалось неравномерное полнокровие, гепатоциты находились в состоянии от средне-, крупновакуольной дистрофии до баллонной, синусоиды печени были сужены; отмечали гиперплазию синусоидных клеток. На 10 сутки эксперимента отмечали неравномерное полнокровие сосудов и синусоидов. Гепатоциты у животных находились в состоянии мелко-вакуольной дистрофии. Наблюдались единичные макрофагальные инфильтраты гранулёмы внутри дольки. К 20 суткам с момента введения сефадекса А-25 балочное строение печени было сохранено. Сохранялись мелко-вакуольная дистрофия и гиперплазия синусоидальных клеток.

Структурные нарушения в печени подтверждались увеличением в крови активности внутриклеточных ферментов – аланинаминотрансферазы и аспаратаминотрансферазы (табл. 1), с максимальным повышением на вторые сутки эксперимента (в 4,5 и 4,4 раза, соответственно). Исследование функциональной активности печени (табл. 1) показало, что в течение всего эксперимента наблюдалось снижение белоксинтезирующей функции печени, максимальное снижение общего белка сыворотки крови на 17,9% ( $p < 0,05$ ) отмечали на 2 сутки после введения сефадекса А-25. В этот же срок наблюдения показатели общего билирубина были наиболее высокими (повышение на 16,5%,  $p < 0,05$ ), что свидетельствует о нарушении детоксикационной функции печени. К 20 суткам эксперимента концентрация общего белка сыворотки крови повысилась до  $75,2 \pm 2,01$  г/л,

Таблица 1

**Изменение показателей, характеризующих функциональное состояние печени у крыс с пневмонией**

Сроки эксперимента	Аланинамино-трансфераза, Е/л	Аспаргатамино-трансфераза, Е/л	Общий билирубин, мкмоль/л	Общий белок, г/л
Контроль	134±6,5	270±19,3	7,9±0,58	79,9±1,66
2 сутки	609±42,6*	1201±63,4*	9,2±0,51*	65,6±2,58*
10 сутки	452±34,9*	529±37,4*	8,4±0,62	70,1±2,23*
20 сутки	430±30,7*	421±27,2*	8,1±0,57	75,2±2,01*

Примечание: здесь и далее статистически значимые различия обозначены \* – при сравнении различных сроков эксперимента с контролем.

Таблица 2

**Характеристика лизосомального аппарата печени у крыс с пневмонией в разные сроки эксперимента**

Сроки эксперимента	Свободная активность	Неседиментируемая активность	Общая активность
Кислая фосфатаза, мкмоль/мин.г			
Контроль	2,1±0,05	1,6±0,2	13,6±0,7
2 сутки	1,9±0,05	1,6±0,11	10,1±0,32*
10 сутки	3,9±0,19*	2,9±0,14*	11,9±0,61*
20 сутки	3,1±0,17*	1,8±0,08*	9,6±0,34*
Катепсин Д, мкмоль/мин.г			
Контроль	0,20±0,001	0,16±0,002	0,80±0,011
2 сутки	0,27±0,001*	0,19±0,001*	0,60±0,001*
10 сутки	0,75±0,002*	0,31±0,001*	1,01±0,002*
20 сутки	0,36±0,001*	0,26±0,001*	1,83±0,003*

но не достигла контрольных значений. Показатели общего билирубина в этот срок наблюдения достоверно не отличались от контроля.

Поскольку лизосомы непосредственно участвуют в адаптационных внутриклеточных процессах, в работе было исследовано структурно-функциональное состояние лизосомального аппарата печени. Для этой цели в гомогенате печени животных с экспериментальной пневмонией определяли общую, свободную и неседиментируемую активности лизосомальных ферментов – кислой фосфатазы и катепсина Д (табл. 2). В контроле свободная активность составила для кислой фосфатазы 2,1±0,05 мкм/мин.г (14,2% от общей активности), для катепсина Д – 0,20±0,001 мкм/мин.г (25% от общей активности). Соответственно отличались и показатели неседиментируемой активности: 1,6±0,11 мкм/мин.г (10,8% от общей активности) для кислой фосфатазы и 0,16±0,002 мкм/мин.г (20% от общей активности) для катепсина Д. Исследование лизосомального аппарата печени у крыс с пневмонией, вызванной интратрахеальным введением сефадекса А-25 показало снижение общей активности кислой фосфатазы в гомогенате печени во все сроки наблюдения. Максимальное понижение на 39,5% (p<0,05) от общей активности фермента регистрировали на 20 сутки эксперимента. Изменение общей активности катепсина Д характеризовалось снижением активности на 2 сутки после введения сефадекса А-25 и дальнейшим нарастанием активности до максимальных значений (1,83±0,003 мкм/мин.г, p<0,05) к 20 суткам эксперимента. Свой вклад в повышение общей активности лизосомальных ферментов в печени вносят и мигрирующие в орган лейкоциты, из которых наиболее высоким содержанием протеолитических ферментов отличаются клетки моноцитарного ряда [10]. Именно в этот срок

наблюдения (20 сутки) отмечались макрофагальные инфильтраты гранулемы внутри долек.

Повышение общей активности лизосомальных ферментов в гомогенате печени сопровождалось увеличением показателей как свободной активности кислой фосфатазы и катепсина Д, так и неседиментируемой активности лизосомальных ферментов, с максимальным повышением показателей на 10 сутки эксперимента. В этот срок наблюдения свободная активность кислой фосфатазы составила 32,8% от общей активности (в контроле 15%), а катепсина Д – 74% (в контроле 25%). Увеличение свободной активности лизосомальных ферментов свидетельствовало об активации лизосомального аппарата печеночных клеток, о вовлечении его во внутриклеточные перестройки клеток печени в ответ организма на воспалительный процесс в лёгких. Однако повышение неседиментируемой активности лизосомальных ферментов в свою очередь свидетельствовало о лабилизации лизосомальных мембран. Нарушение структуры, как мембраны лизосом и клеток печени, происходящее на фоне воспалительного процесса в лёгких, сопровождалось уменьшением общей активности кислой фосфатазы в гомогенате печени и увеличением активности лизосомальных ферментов в крови (табл. 3). К 20 суткам эксперимента наблюдалось снижение неседиментируемой активности кислой фосфатазы и катепсина Д, что свидетельствовало о процессах восстановления структурной целостности лизосом. Однако, показатели активности ферментов в сыворотке крови в этот срок наблюдения оставались высокими, так как источником ферментов лизосом в сыворотке крови служили не только клетки печени, но и ткань лёгких, а также лейкоциты крови, с повышением среди них доли активных клеток [1].

Полученные результаты согласуются с данными ис-

Таблица 3

**Динамика активности лизосомальных ферментов в сыворотке крови у крыс с пневмонией**

Сроки эксперимента	Кислая фосфатаза, мкМ/мин.л	Катепсин Д, мкМ/мин.л
Контроль	27,6±1,46	Нет
2 сутки	104,1±5,21*	1,44±0,003*
10 сутки	86,3±2,82*	1,05±0,002*
20 сутки	96,3±3,15*	1,04±0,002*

следований [12], показывающих повреждение печени при воспалительных внепеченочных патологиях, причем степень повреждения печени, оцененная по увеличению активности аланинаминотрансферазы, билирубина и снижению альбумина в сыворотке крови, положительно коррелирует с уровнем провоспалительных цитокинов – ИЛ-1β, ИЛ-6, ИЛ-10 [6, 7]. На роль главных клеток, участвующих в формировании дисфункции печени претендуют клетки Купффера [11]. Косвенным свидетельством важной роли именно этих клеток является полученные наши данные о наибольшем повышении свободной активности катепсина Д, а, следовательно, об активации лизосомального аппарата клеток Купффера, поскольку именно макрофаги являются основным источником этого фермента в печени [10]. Клетки Купффера секретируют моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1) с которым ассоциированы отёк и инфильтрация печени нейтрофилами. Усиление притока нейтрофилов наблюдается также за счет увеличение количества ICAM-1 на поверхности лейкоцитов и за счет усиления экспрессия E-селектина в эндотелиальных клетках [8]. Активированные нейтрофилы, доля которых увеличивается при пневмонии [1], являются источником активных метаболитов кислорода и лизосомальных ферментов, приводя тем самым к некротической гибели гепатоцитов [9].

Таким образом, наличие воспалительного процесса в лёгких крыс, вызванного интратрахеальным введением сефадекса А-25 приводило к развитию дистрофических изменений в гепатоцитах, гиперплазии синусоидальных клеток и формированию единичных макрофагальных гранулём, что сопровождалось снижением функциональной активности гепатоцитов. Активация лизосомального аппарата клеток печени, характеризовавшаяся повышением свободной активности лизосомальных ферментов, являлась не только биохимическим механизмом изменения структурно-функционального состояния печени в ответ на воспалительный процесс в лёгких, но и одной из причин развития повреждения клеток печени.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. Влияние цеолит содержащего сорбента на течение воспаления у крыс в лёгких с эксперимен-

тальной пневмонии [Текст]/А.Г.Ронинсон: автореф. дис. ... канд. мед. наук.-Новосибирск, 2004.-24 с.

2. Метаболические механизмы формирования респираторно-рентальной патологии [Текст]/Е.М.Иванов, А.В.Вязова, Т.П.Новгородцева//Бюл. физиол. и патол. дыхания.-2006.-Вып.23.-С.86-90.

3. Поражения миокарда у больных внебольничной пневмонией молодого возраста: клинико-инструментальное исследование [Текст]/И.М.Давидович, О.А.Афонасков, В.И.Скидан//Бюл. физиол. и патол. дыхания.-2005.-Вып.21.-С.20-23.

4. Противовоспалительный эффект отечественного будесонида на модели неинфекционного гранулематоза лёгких [Текст]/Сладкопеевцев А.С. [и др.]//Бюл. эксперим. биол. мед.-2001.-№5.-С.557-559.

5. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTIKA [Текст]/О.Ю.Реброва.-М.: Медиа Сфера, 2002.-312 с.

6. Changes of liver function in patients with serious acute respiratory syndrome [Text]/Tong Y.W. [et al.]//Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.-2003.-Vol.11, №7.-P.418-420.

7. Clinical characteristics and mechanism of liver injury in patients with severe acute respiratory syndrome [Text]/Duan Z.P. [et al.]//Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi.-2003.-Vol.11, №8.-P.493-496.

8. Effects of continuous low-dose infusion of lipopolysaccharide on expression of E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 messenger RNA and neutrophil accumulation in specific organ in dogs [Text]/Sakaue Y. [et al.]//Am. J. Vet. Res.-2005.-Vol.66, №7.-P.1259-1266.

9. Hypoxia leads to necrotic hepatocyte death [Text]/M.K.Smith, D.J.Mooney//J. Biomed. Mater Res. A.-2007.-Vol.80, №3.-P.520-529.

10. Isolated parenchymal, Kupffer and endothelial rat liver cells characterized by their lysosomal enzyme content [Text]/D.Knook, A.Seffelaar, A.De Leeuw//Biochem. Biophys. Res. Comm.-1980.-Vol.96.-P.250-257.

11. Kupffer cells and their mediators: the culprits in producing distant organ damage after trauma-hemorrhage [Text]/Hilderbrand F. [et al.]//Am. J. Pathol.-2006.-Vol.169, №3.-P.784-794.

12. Kupffer cell-dependent hepatitis occurs during influenza infection [Text]/Polakos N.K. [et al.]//Am. J. Pathol. 2006.-Vol.168, №4.-P.1404-1405.

13. Lysosome enzymes [Text]/A.J.Barrett//Lysosomes, a laboratory handbook.-Amsterdam-London, 1972.-P.46-149.

14. Thoracic surgery and liver dysfunction [Text]/Ono S. [et al.]//Nippon Geka Gakkai Zasshi.-1997.-Vol.98, №8.-P.667-670.

15. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue [Text]/C.de Duve, B.C.Pressman, E.A.Gianetto//Biochem. J.-1955.-Vol.60, №4.-P.604-617.

Поступила 08.05.2007