

Яроцкая Н.Н., Косинец В.А., Самсонова И.В.

Влияние метаболической коррекции на характер экспрессии каспазы-3 в печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните

Учреждение образования "Витебский государственный медицинский университет", г.Витебск, Республика Беларусь

Yarotskaya N.N., Kosinets V.A., Samsonova I.V.

The effect of metabolic correction on the caspase-3 expression pattern in liver at the experimental widespread purulent peritonitis

Резюме

Целью исследования явилось изучение в динамике экспрессии маркера апоптоза каспазы-3 в печени кроликов при экспериментальном распространенном гнойном перитоните на фоне метаболической коррекции. Материалы и методы: кусочки печени 55 кроликов для иммуногистохимического и морфологического анализа. Результаты исследования: установлено позитивное влияние метаболической коррекции препаратом, содержащим янтарную кислоту и креатинфосфат, на структурно-функциональное состояние ткани печени и экспрессию маркера апоптоза каспазы-3 при экспериментальном распространенном гнойном перитоните. Выводы: снижение интенсивности экспрессии каспазы-3 служит ранним маркером изменения баланса «апоптоз-некроз» в ткани печени, связанного с нарушением энергетического метаболизма в гепатоцитах вследствие выраженной интоксикации продуктами клеточной биodeградации бактерий и их токсинами. **Ключевые слова:** распространенный гнойный перитонит, каспаза-3, «Неотон», «Цитофлавин»

Summary

The aim of the study was to investigate the dynamics of the expression of apoptosis marker caspase-3 in rabbit liver at the experimental widespread purulent peritonitis on metabolic correction. Materials and methods: immunohistochemical and morphological analysis of 55 rabbits liver specimens. The study showed a metabolic correction positive effect on the liver tissue structural-functional state and apoptosis marker caspase-3 expression at the experimental widespread purulent peritonitis. Conclusions: the decrease of the caspase-3 expression intensity is an early marker of "apoptosis-necrosis" balance in the liver tissue associated with the hepatocytes energy metabolism violation due to severe intoxication by the products of bacteria cellular biodegradation and their toxins.

Keywords: widespread purulent peritonitis, caspase-3, "Neoton", "Citoflavin"

Введение

Перитонит - тяжелое неотложное хирургическое состояние, следствием которого является синдром системной воспалительной реакции, с последующим развитием полиорганной недостаточности [1].

В результате переза и энтеральной недостаточности кишечника становится основным источником интоксикации. Важнейшим барьером на пути бактериальных токсинов из кишечника в системный кровоток является печень. В связи с этим расстройство системы детоксикации может привести к тяжелым метаболическим расстройствам не только в данном органе, но и во всем организме [2].

Апоптоз, или запрограммированная смерть клеток, является важным физиологическим энергозависимым процессом и является ключевым элементом поддержания гомеостаза.

Благодаря апоптозу в печени происходит непрерывный процесс обновления клеток и поддержание ее структурно-функциональной организации. В условиях избыточного воздействия эндотоксинов в гепатоцитах развиваются дистрофические и некротические изменения и регенераторные и детоксикационные возможности печени становятся недостаточными [3].

Соотношение двух форм гибели клеток - апоптоз и некроз - имеет важное значение при развитии синдрома полиорганной недостаточности. Это во многом определяется тем, что индукция одного из процессов ведет к подавлению другого [4].

Исследователи выделяют два основных пути апоптоза: наружный (рецепторный) и внутренний (митохондриальный) [5]. При этом возможно взаимовлияние этих путей друг на друга посредством различных молекул [6].

Каспаза-3, являясь ключевым белком семейства цистеиновых протеаз, играет ключевую роль в инициации и реализации программы апоптоза и относится к группе эффекторных каспаз. Протеолитически каспаза-3 активируется другими каспазами, что представляет собой сложный регламентированный процесс распада клетки, играющий решающую роль в трансдукции сигнала апоптоза. Считается, что после активации ферментов данного семейства процесс гибели клетки становится необратимым [7].

В связи с тем, что внешнерцепторный и митохондриальный пути передачи сигналов для реализации программы апоптоза сходятся на стадии активации эффекторной каспазы-3, определение уровня экспрессии данного фермента является актуальным.

Цель исследования - изучить в динамике экспрессию каспазы-3 в печени кроликов при экспериментальном распространенном гнойном перитоните на фоне применения метаболической коррекции препаратами «Цитофлавин» и «Неотон», содержащими креатинфосфат и янтарную кислоту.

Материалы и методы

Эксперимент проведен на 55 кроликах-самцах породы шиншилла, массой 2600-3000 г. Животные были распределены на следующие группы: I – интактные (n=5); II – 6-ти часовой распространенный гнойный перитонит без хирургического лечения (n=5); III – контрольная, хирургическое лечение перитонита (n=15); IV – хирургическое лечение перитонита с применением в послеоперационном периоде препарата «Цитофлавин» (n=15); V – хирургическое лечение перитонита с применением в послеоперационном периоде препарата «Неотон» (n=15).

Работу с экспериментальными животными проводили согласно рекомендациям Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях от 18.03.1986, Директиве Совета ЕЭС от 24.11.1986, рекомендациям FELASA (1994-1996) и ТКП 125-2008.

Моделирование перитонита проводили путем однократного интраабдоминального введения полимикробной аэробно-анаэробной взвеси *E. coli* (штамм 0111 K58 НИ С 130-53) и *V. fragilis* (штамм 323) из расчета 6 млрд. микробных тел на 1 кг массы кролика. Количество микробных тел рассчитывали по стандарту мутности McFarland. Через 6-ть часов после введения микроорганизмов в III-ей, IV-ой и V-ой группах животных с целью лечения перитонита и устранения энтеральной недостаточности выполняли лапаротомию, санацию брюшной полости, декомпрессию тонкой кишки. Животные IV-ой и V-ой групп получали внутривенно капельно препараты «Цитофлавин» (28,6 мг янтарной кислоты на 1 кг массы) и «Неотон» (0,05 г на 1 кг массы) соответственно, животные III-ей группы – эквивалентный объем 0,9%-ного раствора натрия хлорида.

Животных II-й группы выводили из эксперимента (летальная доза нембутала) через 6-ть часов после заражения, животных III-ей, IV-ой и V-ой групп – на 1-е, 3-и и 5-е сутки после операции.

«Цитофлавин» – раствор для инфузий, содержащий янтарную кислоту, никотинамид, рибоксин и рибофлавин. Выбор препарата обусловлен тем, что янтарная кислота является энергетическим субстратом дыхательной цепи митохондрий, а также обладает детоксицирующим, антигипоксическим и антиоксидантным свойствами [8].

«Неотон» – метаболическое средство, содержащее креатинфосфат, который образуется в митохондриях и является соединением, обеспечивающим механизм быстрого ресинтеза АТФ [9].

Для иммуногистохимического исследования кусочки печени фиксировали в 10%-ом растворе нейтрального формалина в течение 24 часов. После стандартной гистологической проводки и заливки в парафин изготавливали срезы толщиной 3-4 мкм, монтировали на высокоадгезивные предметные стекла (Leica Microsystems Plus Slides). Депарафинирование и иммуногистохимическое окрашивание проводили по стандартному протоколу в автоматическом режиме в иммуногистостейнере Leica BOND-MAX с использованием поликлональных антител Anti-Caspase-3 antibody ab4051 («Abcam», Великобритания) в разведении 1:100 при времени экспозиции 60 мин. Экспрессию белков выявляли в цитоплазме и цитолемме гепатоцитов в виде коричневого окрашивания различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого).

Оценку экспрессии каспазы-3 в гепатоцитах осуществляли при 400 кратном увеличении в 10 случайно выбранных полях зрения с использованием бинокулярного микроскопа Leica DM 2000 с цифровой камерой и лицензионной программой Leica Application Suite, version 3.6.0. Морфометрическую оценку проводили с использованием программы ImageJ 1.45s, в рамках которой количественно оценивали интенсивность окрашивания препаратов. Количественные данные по выраженности экспрессии каспазы-3 представляли в виде интенсивности экспрессии (ИЭ), которую рассчитывали по формуле:

$$ИЭ = \frac{\text{значение экспрессии (в пикселях)}}{\text{общая площадь образца}} \times \text{площадь экспрессии}$$

где ИЭ – интенсивность экспрессии маркера каспазы-3 в ткани печени.

Для оценки морфологических изменений срезы, окрашенные гематоксилином-эозином и по методу Ван-Гизон, исследовали на световом оптическом уровне при увеличении $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью стандартного пакета статистических программ «STATISTICA 10.0» и «MS Excel». Величины анализируемых показателей в группах представляли в виде медианы (Me), интерквартильного интервала [25%; 75%]. Достоверность межгрупповых значений средних величин оценивали по критерию Манна-Уитни (U) и Уилкоксона (W). Различия принимались за достоверные при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Проведенное исследование показало, что инициация экспериментального распространенного гнойного

Таблица 1. Интенсивность экспрессии каспазы-3 в клетках печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните

Группа		Показатель	Экспрессия Caspase 3
1		2	3
Норма (n=5)		Медиана, %	2,97
		25-75 процентиль, %	2,25-3,64
6-ти часовой перитонит (n=5)		Медиана, %	1,52
			p1<0,0001
		25-75 процентиль, %	0,84-1,90
Контрольная (n=15)	1-е сутки	Медиана, %	2,88
			p1<0,0001 p2<0,0001
	25-75 процентиль, %		1,66-3,17
		3-е сутки	Медиана, %
			p3<0,002
	25-75 процентиль, %		1,17-2,11
5-е сутки		Медиана, %	3,41
		p3<0,0001	
25-75 процентиль, %		2,99-4,09	
	Цитофлава (n=15)	1-е сутки	Медиана, %
			p1<0,0001 p2<0,02 p4<0,03 p5=0,326
25-75 процентиль, %			1,20-2,48
		3-е сутки	Медиана, %
			p1<0,0001 p3<0,0005 p4<0,0001 p5=0,155
25-75 процентиль, %			1,80-2,92
	5-е сутки	Медиана, %	2,23
		p1<0,01 p3=0,813 p4<0,0001 p5<0,008	
25-75 процентиль, %		1,77-3,01	
	Неотон (n=15)	1-е сутки	Медиана, %
			p1<0,001 p2<0,003 p4=0,485
25-75 процентиль, %			1,40-2,43
		3-е сутки	Медиана, %
			p1<0,001 p3=0,733 p4=0,118
25-75 процентиль, %			1,28-2,64
	5-е сутки	Медиана, %	1,89
		p1<0,0001 p3=0,155 p4<0,0001	
25-75 процентиль, %		1,63-2,17	

Примечание: p1 - по сравнению с нормой; p2 - по сравнению с группой 6-ти часового перитонита; p3 - по сравнению с предыдущими сроками аналогичной группы; p4 - по сравнению с контрольной группой аналогичных суток; p5 - по сравнению с препаратом Неотон аналогичных суток

перитонита приводила к морфофункциональным изменениям в печени с развитием различной степени выраженности дистрофических изменений гепатоцитов, некрозом печеночных клеток, нарушением кровообращения, вос-

палительной инфильтрацией паренхимы во всех экспериментальных группах животных. Это сопровождалось изменением интенсивности экспрессии каспазы-3 как маркера завершающей стадии апоптоза в гепатоцитах.

Во II-й группе на фоне нарастания некробиотических и некротических изменений гепатоцитов, снижения митохондрической активности, нарушений внутриорганный кровотока и воспалительной инфильтрации экспрессия каспазы-3 продемонстрировала значительное снижение в 1,9 раза в сравнении с соответствующими значениями у животных интактной группы ($p < 0,0001$) (таб.1), (рис.1 - *эти и другие рисунки к статье см. на специальной цветной вставке журнала - прим. ред.*). Возможно, это являлось следствием не только повреждающего действия бактериального инфицирования, но и стремительного развития эндотоксикоза, связанного с повреждением мембранных структур гепатоцитов, нарушением мембранного потенциала митохондрий, вызванного истощением энергетических ресурсов клетки и развитием некроза.

В контрольной группе в срезах печени на протяжении всех сроков наблюдались выраженные гемодинамические нарушения, полиморфно-клеточная воспалительная инфильтрация, дистрофические, некробиотические и некротические изменения гепатоцитов. При этом на 1-е сутки после операции медиана экспрессии каспазы-3 незначительно снижалась в сравнении с интактной группой ($p < 0,0001$) и значительно в сравнении с группой 6-ти часового перитонита ($p < 0,0001$) (рис.2, 3). Однако, уже на 5-е сутки послеоперационного периода происходило нарастание ее экспрессии в 1,2 раза в сравнении с интактной группой на фоне уменьшения по сравнению с предыдущими сроками количества гепатоцитов с явлениями некроза, но сохранением высоких показателей дистрофически измененных клеток (рис. 4).

Выявленные изменения экспрессии каспазы-3 демонстрирует активацию процесса апоптоза и связаны, вероятно, с системным иммуновоспалительным ответом организма на действие бактериальных токсинов и развитием цитокин-опосредованного гипервоспаления.

Мощный иммунный ответ, необходимый для эффективной ликвидации очага воспаления наносит значительный сопутствующий ущерб, в котором токсичные ферменты в виде окислителей, выйдя из активированных клеток иммунной системы, способны уничтожить здоровые клетки печени. Это приводит к расстройству в системе детоксикации, угнетению окислительного фосфорилирования, тем самым нарушая работу антиоксидантной системы организма. Чрезмерное количество нейтрофилов в печени провоцирует также окислительные повреждения ткани, способствуя развитию некроза.

В группе животных, получавших препарат "Цитофлавин", в печени также выявлялись дистрофические, некробиотические и некротические изменения гепатоцитов, нарушения внутриорганный кровотока, полиморфно-клеточная воспалительная инфильтрация. Однако, эти изменения были значимо ниже таковых в контрольной группе и на 5-е сутки приближались к значениям в интактной группе. При этом экспрессия каспазы-3 на 1-е сутки была ниже в 1,5 раза в сравнении с интактной ($p < 0,0001$) и контрольной группами ($p < 0,03$) (рис. 5,6). Снижение экспрессии каспазы-3 на ранних сроках наблюдения свидетельствовало об угнетении процесса апоптоза, что обусловлено, вероятно, попаданием значительного количества токсинов в клетки печени. Однако, к 5-м суткам происходило постепенное

нарастание интенсивности экспрессии, которое приближалось к значению интактной группы (рис.7). Это указывало на позитивное влияние входящих в состав препарата компонентов (в частности, янтарной кислотой), способствующих устранению последствий цитотоксичности, заметному антиоксидантному эффекту, нормализации энергетических процессов в гепатоцитах и восстановлению структурно-функциональной организации паренхимы печени.

Полученные данные в группе лабораторных животных, получавших препарат "Неотон", продемонстрировали достоверно значимое снижение экспрессии каспазы-3 в течение всего срока наблюдения (рис.8,9). Эти изменения развивались на фоне сохранения умеренно выраженных гемодинамических расстройств, воспалительной полиморфно-клеточной воспалительной инфильтрации паренхимы, дистрофических, некробиотических и некротических изменений гепатоцитов, выраженность которых постепенно снижалась, но оставалась большей по сравнению с интактной группой на протяжении всего периода наблюдения (рис.10).

Как известно, апоптоз является энергозависимым процессом, и ухудшение состояния печени на фоне эндотоксикоза приводит к тяжелому дефициту энергии, клеточной дегенерации и оксидативному стрессу, что нарушает нормальную реализацию программы апоптоза и приводит к доминированию некротических процессов.

Выявленный характер экспрессии каспазы-3 обусловлен, надо полагать, нарушением энергетического баланса продукции АТФ (метаболизма) в клетках печени вследствие выраженной интоксикации микробными токсинами и продуктами клеточной биодеградациии с нарушением в системе передачи энергии в дыхательной цепи ферментов митохондрий.

Выводы

1. Экспериментальный перитонит сопровождается дегенеративными изменениями значительной части паренхимы печени с нарушением программы энергозависимого процесса апоптоза, о чем свидетельствует изменение экспрессии каспазы-3 в гепатоцитах.
2. Применение препаратов, содержащих янтарную кислоту и креатинфосфат, при экспериментальном распространенном гнойном перитоните способствует восстановлению клеточного гомеостаза в печени и баланса «апоптоз – некроз» с более выраженным эффектом у препарата, содержащего янтарную кислоту.
3. Угнетение энергетического метаболизма, развивающегося при перитоните, определяет важность раннего начала проведения мероприятий, направленных на коррекцию патологических изменений в ткани печени и предотвращение развития печеночной дисфункции. ■

Яроцкая Н.Н., Косинец В.А., Самсонова И.В. Угнетение образования "Витебский государственный медицинский университет", г.Витебск, Республика Беларусь, Автор, ответственный за переписку - Самсонова И.В. адрес для переписки: 210021 Республика Беларусь г.Витебск ул.1 Целинная, 56-а тел. +375291929982 E-mail: samsonova_i@tut.by

Литература:

1. Верин В. К., Сафронова Б. М. Реактивные изменения тканей печени в условиях экспериментального перитонита. *Актуальные проблемы современной морфологии* 2008; 180–183.
2. Amersfoort E. S. Van, Berkel T. J. C. Van, Kuiper J. *Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. Clinical microbiology reviews* 2003; 16(3): 379-414.
3. Sundaram R. S., Gowtham L., Manikandan P., Venugopal V., Kamalakannan D. *Neuronal Apoptosis and Necrosis: Role of Excitotoxins, Calcium, Oxidative Stress. Int. J. of Research in Pharm. and Biomed. Sci* 2012; 3: 567-575.
4. Igney F.N., Krammer P.H. *Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. J. Leukocyte Biol* 2002; 71: 907-920.
5. Malhi H., Guicciardi M. E., Gores G. J. *Hepatocyte Death: A Clear and Present Danger. Physiol. Rev* 2010; 90 (3):1165–1194.
6. Bixi J., Chi-Hsun H., Jianguo Ch. *Activation of Endoplasmic Reticulum Stress Response Following Trauma-Hemorrhage Biochim. Biophys. Acta* 2008; 1782 (11): 621-626.
7. Datta G., Fuller B. J., Davidson B. R. *Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: Insights from transgenic knockout models. World J Gastroenterol* 2013; 19 (11): 1683–1698.
8. Якубовский С.В., Анищенко С.Л., Емельянова А.А., Чайка Л.Л. Влияние сукцинатсодержащих препаратов на структурные изменения в печени при остром экспериментальном холецистите. *Архив патологии* 2012; 6: 28-31.
9. Wallimann T., Malgorzata T.S., Schlattner U. *The creatine kinase system and pleiotropic effects of creatine. Springer* 2011; 40: 1271-1273.

Яроцкая Н.Н., Костиниц В.А., Самсонова И.В.

Влияние метаболической коррекции на характер экспрессии каспазы-3 в печени при экспериментальном распространенном гнойном перитоните

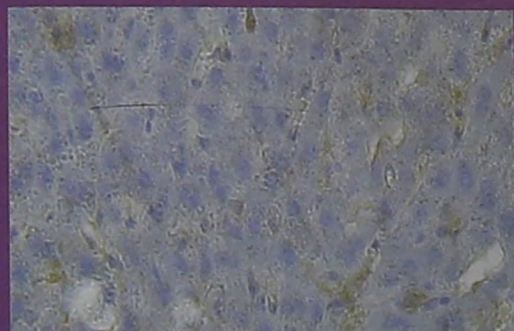


Рисунок 1 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени через 6-ть часов после индукции перитонита. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.

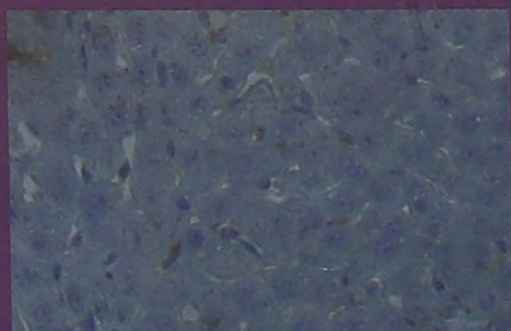


Рисунок 2 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени контрольной группы животных на 1-е сутки после операции. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.

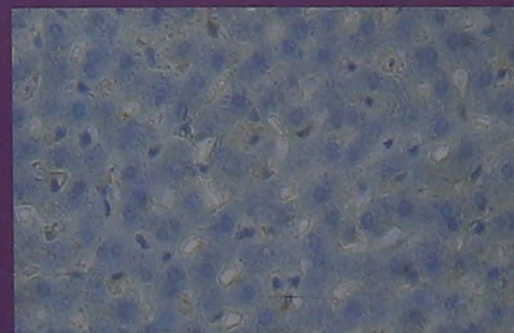


Рисунок 3 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени контрольной группы животных на 3-е сутки после операции. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.

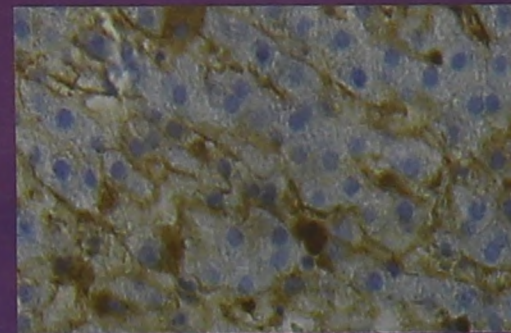


Рисунок 4 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени контрольной группы животных на 5-е сутки после операции. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.



Рисунок 5 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени с применением препарата «Цитофлавин» на 1-е сутки после операции. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.

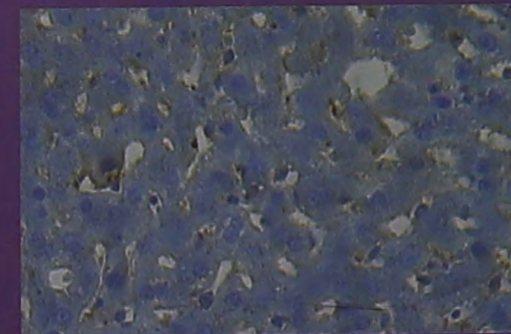


Рисунок 6 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени с применением препарата «Цитофлавин» на 3-е сутки после операции. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.

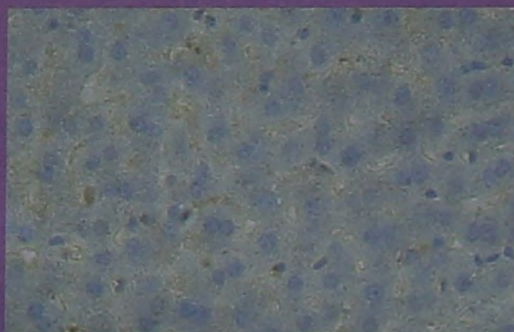


Рисунок 7 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени с применением препарата «Дитиофлавин» на 5-е сутки после операции. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.

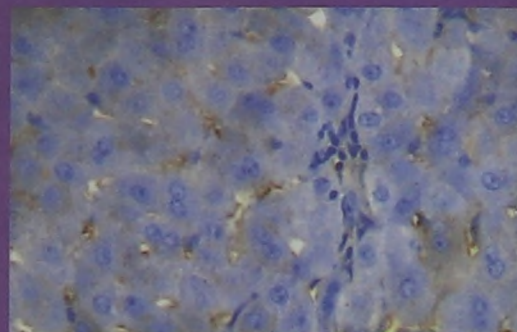


Рисунок 8 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени с применением препарата «Неотон» на 1-е сутки после операции. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.

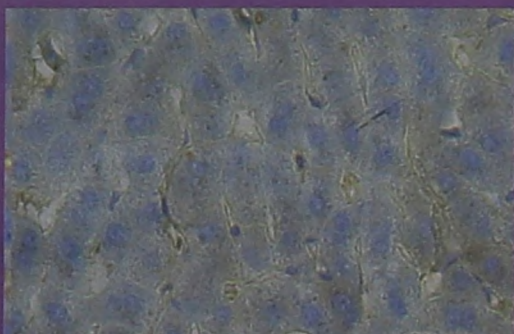


Рисунок 9 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени с применением препарата «Неотон» на 3-е сутки после операции. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.

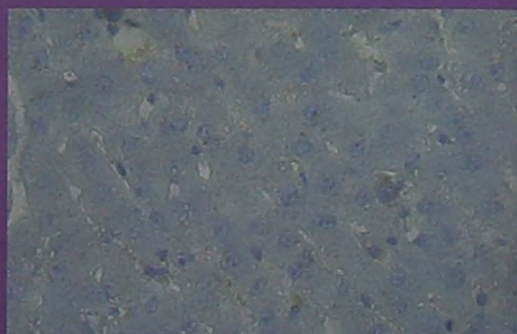


Рисунок 10 – Экспрессия каспазы-3 в паренхиме печени с применением препарата «Неотон» на 5-е сутки после операции. Окраска anti-Caspase-3 antibody, x400.