

ОБ УЧАСТИИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ И КЛЕТОК КУПФЕРА В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ И ФОРМИРОВАНИИ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭТАНОЛОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Лобанова В. В., Висмонт Ф. И.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Современная медицина стоит перед проблемой неуклонного роста алкогольной патологии. Как известно, заболеваемость и смертность при регулярном употреблении алкогольных напитков связана с токсическим воздействием этанола на важнейшие органы человека и в первую очередь, печень.

В опытах на крысах установлено, что действие в организме животных как ингибитора клеток Купфера (далее — КК) гадолиния хлорида, так и блокатора NO-синтазы метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина ослабляет, а ингибитора аргиназы N^ω-гидрокси-нор-L-аргинина усугубляет развитие характерных изменений детоксикационной функции печени, уровня трийодтиронина в крови и температуры тела при хронической этаноловой интоксикации.

Ключевые слова: хроническая этаноловая интоксикация, детоксикация, аргиназа печени, клетки Купфера, тиреоидный статус.

Введение. Современная медицина стоит перед проблемой неуклонного роста алкогольной патологии, патологии, приводящей к сокращению продолжительности жизни и отрицательно сказывающейся на состоянии здоровья.

Как известно, заболеваемость и смертность при регулярном потреблении алкогольных напитков связаны с токсическим воздействием этанола на важнейшие органы человека и в первую очередь, печень [1], а гепатоциты и клетки Купфера играют важную роль в процессах детоксикации [2].

К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении КК и аргиназы печени в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии [2, 3]. Степень выраженности цитолитического синдрома, как показано рядом авторов, напрямую связана с реактивностью КК. Показана значимость КК в оксидативном стрессе, и особенно в избыточной продукции различных активных цитотоксических веществ, в частности монооксида азота (NO) [4]. Известно, что печень играет значимую роль в процессах детоксикации и терморегуляции, а также метаболизме гормонов щитовидной железы, обеспечивая регуляцию их обмена и поддержание оптимальной концентрации в крови. Учитывая, что активность аргиназы печени лимитирует доступность L-аргинина для индуцибельной NO-синтазы, есть основания полагать, что ее активность будет сказываться на синтезе NO, который играет важную роль в механизмах детоксикации, процессах дейодирования йодсодержащих гормонов и терморегуляции. Однако исследования с целью выяснения значимости аргиназы печени и клеток Купфера в процессах детоксикации и формировании тиреоидного статуса у крыс при хронической алкоголизации не проводились.

Цель работы — выяснение значимости аргиназы печени и клеток Купфера в процессах детоксикации и формировании тиреоидного статуса у крыс при хронической этаноловой интоксикации.

Материалы и методы. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 180–220 г. Опыты проводили в строго определенное время (8–12 ч утра). Рацион крыс состоял из комбикорма КК-92/ПХЧ-5, количество которого определялось Нормами кормления лабораторных животных. Питьевой режим соответствовал принципу *ad libitum*.

В связи с тем, что в литературе имеются данные о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания уровня ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, опыты проводили в строго определенное время (8–12 ч утра).

Модель хронической этаноловой интоксикации воспроизводили на крысах путем ежедневного интрагастрального введения животным 30 %-го раствора этанола (из расчета 3,5 г 92 %-го этанола на кг массы тела животного) в течение 60 дней. Селективную депрессию КК вызывали у животных внутрибрюшинным введением водного раствора гадолиния хлорида ($GdCl_3$) в дозе 10 мг/кг. Активность аргиназы в печени определяли спектрофотометрически [5]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NO_3^-/NO_2^-) [6]. 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). ПНС (гексенал 100 мг/кг, внутрибрюшинно) оценивали по времени нахождения животных в положении на боку (Парк Д. В., 1973). Определение содержания в крови СМ проводили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В. М. Моиним с соавт. (1987), СТК-способом, предложенным О. А. Радьковой с соавт. (1985). О тяжести повреждения печени судили по активности в плазме крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ). Определение активности АлАТ и АсАТ в плазме крови проводили колориметрически динитрофенилгидразиновым методом.

Экспериментальный гипотиреоз воспроизводили с помощью тиреостатика мерказолила (НПО «Укрмедпрепараты», Украина), который в дозе 25,0 мг/кг на 1 %-м крахмальном растворе вводили крысам интрагастрально ежедневно в течение 20 дней. Для создания модели гипертиреоза использовали синтетический препарат трийодтиронина гидрохлорид (Liothyronin, «Berlin Chemie», Германия), который на 1 %-м крахмальном растворе вводили животным интрагастрально ежедневно в течение 20 дней в дозе 30,0 мкг/кг.

С целью выяснения значимости аргиназы печени и NO в процессах детоксикации, формировании тиреоидного статуса и регуляции температуры тела использовали ингибитор аргиназы N^{ω} -гидрокси-нор-L-аргинин (nor-NOHA) фирмы BACHEM (Германия), а также L-валин (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) и неселективный ингибитор NO-синтазы — метиловый эфир N^G -нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США) [7]. Nor-NOHA в дозе 10,0 мг/кг вводили крысам внутрибрюшинно ежедневно в течение недели, а L-валин (100,0 мг/кг) за 30 мин до начала опыта, крысам — внутрибрюшинно, а кроликам — внутривенно. L-NAME (25,0 мг/кг) вводили однократно: кроликам — внутривенно, крысам — внутрибрюшинно. Ректальную температуру измеряли электротермометром ТПЭМ-1.

Взятие для исследований крови и ткани печени у животных проводилось за возможно минимальное время после декапитации. Декапитацию производили через 1 ч после последнего введения этанола (опыт) или физиологического раствора (контроль).

Все эксперименты выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными, требованиями Директивы Европейского этического комитета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 и «Ев-

ропейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и иных научных целях» от 18.03.1986 и ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008.

Полученные данные обработаны статистически с использованием пакетов прикладного программного обеспечения «Statistica 8.0», MS Office 2000, MS Excell 2000, «Graph Pad Prism4». Анализ различий между двумя независимыми группами по количественным показателям, распределение которых статистически значимо не отличалось от нормального, проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента в модификации Уэлча (Welch's test). Данные для количественных показателей представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($\bar{X} \pm S_x$), для качественных показателей в виде процентов. Различия между экспериментальными группами считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В опытах на крысах установлено, что ежедневное интрагастральное введение животным 30 %-го водного раствора этанола в течение 60 дней приводит к выраженным изменениям температуры тела, детоксикации, активности аргиназы печени, уровня три- и тетраiodтиронина, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и активности трансаминаз в плазме крови.

Опыты показали, что длительное интрагастральное введение этанола приводит к угнетению детоксикационной функции печени, что проявлялось повышением СТК на 57,8 % ($p < 0,05$, $n = 10$), уровня СМ в плазме крови на 38,5 % ($p < 0,05$, $n = 10$) и увеличением ПНС на 24,5 % ($p < 0,05$, $n = 7$). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС в контроле (ежедневное интрагастральное введение физраствора в течение 2 мес., $n = 10$) составил соответственно $0,69 \pm 0,012$ г/л, $1,3 \pm 0,11$ ед. и $27,8 \pm 3,22$ мин. Активность аргиназы печени в этих условиях снижалась на 54,7 % ($p < 0,05$, $n = 8$) и составляла $2,5 \pm 0,27$ мкмоль мочевины/г сырой ткани·ч. Активность АЛАТ и АсАТ, важнейших показателей тяжести поражения печени, в крови у алкоголизованных животных по сравнению с соответствующим контролем повышалась на 488,5 % ($p < 0,05$, $n = 8$) и 196,3 % ($p < 0,05$, $n = 8$) и составляла $2,71 \pm 0,13$ и $1,77 \pm 0,16$ мккат/л соответственно. Интрагастральное введение этанола через 60 дней алкоголизации приводило у крыс ($n = 8$) к повышению в плазме крови уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (конечных продуктов деградаций NO) на 79,1 % ($p < 0,01$), который составлял $11,02 \pm 1,34$ мкмоль/л. Ректальная температура снижалась (через 60 дней от начала эксперимента) на $1,1 \pm 0,14$ °C ($p < 0,05$, $n = 20$).

Установлено, что хроническая алкоголизация у крыс сопровождается изменениями уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови (таблица).

Таблица — Изменение уровня три- и тетраiodтиронина в плазме крови и температуры тела у крыс в условиях хронической этаноловой интоксикации ($\bar{X} \pm S_x$)

Группа животных	T ₃ , нмоль/л	T ₄ , нмоль/л	Температура тела, °C
Контроль (К) (интактные животные)	$1,6 \pm 0,12$ ($n = 8$)	$55,2 \pm 3,14$ ($n = 8$)	$37,2 \pm 0,08$ ($n = 12$)
Контроль (К ₁) (физраствор интрагастрально ежедневно, 60 дней)	$3,7 \pm 0,71$ ($n = 7$)	$73,1 \pm 11,44$ ($n = 7$)	$37,4 \pm 0,11$ ($n = 10$)
Опыт (О) (этанол интрагастрально ежедневно, 60 дней)	$0,6 \pm 0,12^*$ ($n = 8$)	$56,1 \pm 5,95$ ($n = 8$)	$36,2 \pm 0,14^*$ ($n = 24$)

* — изменения достоверны по отношению к К₁ ($p < 0,05$).

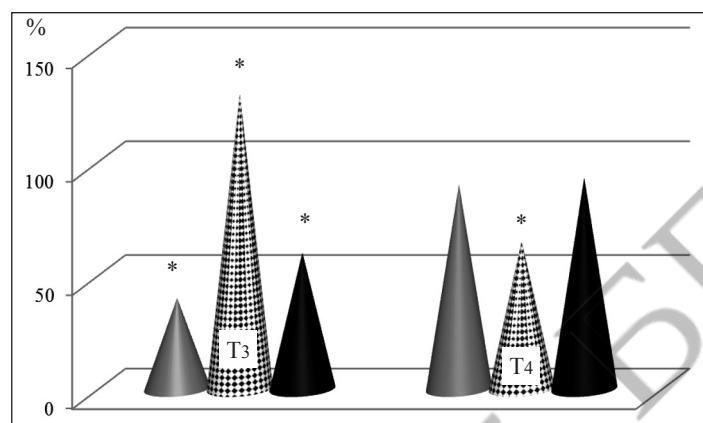
Примечание — n — число животных.

Так в результате длительного (60 дней) ежедневного интрагастрального введения 30 %-го раствора этанола у животных отмечалось снижение в плазме крови уровня трийодтиронина (T₃) на 62,6 % ($p < 0,05$, $n = 7$), в то время как концентрация тетраiodтиронина (T₄) достоверно не изменялась по сравнению с контролем (ежедневное интрагастральное введение физраствора в течение 60 дней). Содержание T₃ и T₄ в плазме крови животных контрольной группы ($n = 7$) составило $3,7 \pm 0,7$ и $73,1 \pm 11,44$ нмоль/л соответственно.

В опытах на алкоголизованных крысах было установлено, что угнетение КК GdCl₃ ослабляет развитие характерных изменений активности аргиназы, детоксикационной функции печени, а также температуры тела на действие этанола. Так, температура тела у крыс, которым предварительно за 12 ч до интрагастрального введения этанола внутривентриально вводили 1,0 мл физраствора (1 раз в неделю в течение 60 дней) по сравнению с контрольными животными (введение физраствора интрагастрально и внутривентриально), понижалась на 1,0 °C ($p < 0,05$, $n = 10$), а в опыте у животных, которым до алкоголизации

предварительно внутрибрюшинно вводили $GdCl_3$ (10 мг/кг), снижалась на $0,5\text{ }^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n = 20$). Выявлено, что у алкоголизованных животных в условиях депрессии КК значения основных показателей печеночной детоксикации (уровень СМ в плазме крови, степень ее токсичности) были меньше по сравнению с контрольными (физраствор внутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 60 дней и этанол интрагастрально ежедневно в течение 2 мес.) на $25,2\%$ ($p < 0,05$, $n = 9$) и $28,5\%$ ($p < 0,05$, $n = 9$) соответственно. ПНС у крыс в этих условиях уменьшалась по сравнению с контролем на $27,1\%$ ($p < 0,05$, $n = 9$). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс ($n = 7$) в контроле (этанол интрагастрально ежедневно и физраствор внутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 60 дней) составили $1,13 \pm 0,029$ г/л, $2,8 \pm 0,32$ ед. и $35,4 \pm 3,68$ мин соответственно.

Обнаружено, что действие этанола в организме животных, получавших $GdCl_3$, сопровождается не только менее значительным угнетением процессов теплообмена и детоксикации, но и не столь значимым снижением уровня T_3 в плазме крови (рисунок).



- 1 — физраствор внутрибрюшинно 1 раз в неделю + этанол интрагастрально ежедневно, 60 дней, $n = 7$;
 2 — $GdCl_3$ (10 мг/кг) внутрибрюшинно 1 раз в неделю + физраствор интрагастрально ежедневно, 60 дней, $n = 7$;
 3 — $GdCl_3$ (10 мг/кг) внутрибрюшинно 1 раз в неделю + этанол интрагастрально ежедневно, 60 дней, $n = 8$;
 * — изменения достоверны по отношению к контролю (контроль — интактные животные)

Рисунок — Изменение (% к контролю) содержания трийодтиронина (T_3) и тетраiodтиронина (T_4) в плазме крови крыс с хронической этаноловой интоксикацией в условиях депрессии КК $GdCl_3$

Обнаружено, что действие этанола в организме животных, получивших $GdCl_3$, сопровождается не столь значимым снижением уровня T_3 в плазме крови. Так, концентрация T_3 и T_4 в плазме крови у крыс с хронической алкогольной интоксикацией (внутрибрюшинное введение физраствора 1 раз в неделю в течение 60 дней и интрагастральное введение 30 %-го раствора этанола в течение 60 дней) составляла $0,6 \pm 0,14$ ($n = 8$) и $50,7 \pm 5,86$ нмоль/л ($n = 8$), а у животных, которым за 12 ч до введения этанола 1 раз в неделю в течение 8 недель внутрибрюшинно вводился водный раствор $GdCl_3$, составляла $1,0 \pm 0,13$ ($n = 9$) и $51,3 \pm 4,18$ нмоль/л ($n = 9$).

Опыты показали, что хроническая алкогольная интоксикация у крыс, которым предварительно за 12 ч до интрагастрального введения этанола вводили один раз в неделю в течение 60 дней внутрибрюшинно ингибитор КК $GdCl_3$ (10 мг/кг), сопровождается менее значимым повышением уровня АЛАТ, АсАТ, NO_3^-/NO_2^- в плазме крови и температуры тела.

Установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 2 недель крысам ингибитора аргиназы N^{ω} -гидрокснор-L-аргинина (nog-NOHA) фирмы BACHEM (Германия) в дозе 10 мг/кг статистически значимо не сказывалось на температуре тела и приводило к снижению активности аргиназы печени на $70,8\%$ ($p < 0,05$, $n = 7$). Выявлено, что в условиях депрессии аргиназы печени nog-NOHA действие этанола сопровождается более значимым угнетением детоксикационной функции печени, повышением уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме, понижением температуры тела. Температура тела у крыс, подвергшихся хронической этаноловой интоксикации, снижалась на $1,2 \pm 0,16$ ($p < 0,01$, $n = 12$), а в условиях действия nog-NOHA на $1,6 \pm 0,13\text{ }^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n = 8$). Содержание NO_3^-/NO_2^- в плазме крови у крыс с хронической алкогольной интоксикацией ($n = 8$), получавших nog-NOHA, по сравнению с уровнем в контрольной группе животных (алкоголизация и внутрибрюшинное введение физраствора, $n = 8$) было выше на $47,1\%$ ($p < 0,05$).

Установлено, что действие этанола у крыс в условиях предварительной (за 30 мин до интрагастрального введения животным этанола в течение 60 дней) инъекции L-NAME по сравнению с контрольной группой животных ведет к менее выраженному угнетению процессов детоксикации. ПНС, уровень СМ в плазме

ме крови и СТК у опытных крыс, подвергшихся хронической алкоголизации, по сравнению с животными контрольной группы (внутрибрюшинное введение физраствора и хроническая алкоголизация, $n = 8$) были ниже на 27,1 % ($n = 9$, $p < 0,05$), 48,3 % ($n = 8$, $p < 0,05$) и 24,2 % ($n = 8$, $p < 0,05$) соответственно. Активность АлАТ и АсАТ плазмы крови у крыс, подвергшихся хронической алкоголизации в условиях действия в организме животных блокатора NO-синтазы, по сравнению с животными контрольной группы была ниже соответственно на 37,5 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и 48,8 % ($p < 0,05$, $n = 7$), а содержание $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ — на 39,1 % ($p < 0,05$, $n = 7$).

Выявленные особенности изменений детоксикационной функции печени, а также уровня в плазме крови йодсодержащих гормонов и $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ при хронической алкогольной интоксикации как в условиях функциональной недостаточности КК, так и депрессии аргиназы печени, дали основания предположить, что активность аргиназы печени и КК определяют выраженность процессов детоксикации и определяют формирование тиреоидного статуса при хронической алкогольной интоксикации.

По-видимому, выявленные особенности изменения детоксикационной функции печени и уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови у крыс при хронической алкоголизации в условиях депрессии КК GdCl_3 , могут быть обусловлены функциональным состоянием КК, активность которых, возможно, является важным звеном оптимизации тиреоидного статуса организма при этом состоянии.

Выявлено, что у гипотиреоидных крыс имеет место снижение активности аргиназы печени, температуры тела и процессов детоксикации. Так, до начала введения мерказолила ректальная температура у крыс опытной группы составляла $37,3 \pm 0,10$ °C ($n = 12$), а через 60 дней его применения снижалась на 0,9 °C ($p < 0,05$). ПНС у гипотиреоидных крыс ($n = 8$) увеличивалась на 29,4 % ($p < 0,05$), а содержание СМ — на 18,8 % ($p < 0,05$). СТК в этих условиях возрастала на 17,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой. У гипотиреоидных крыс снижалась активность аргиназы печени на 25,6 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и повышался уровень валина в крови на 22,5 % ($p < 0,05$, $n = 7$).

У гипертиреоидных крыс ($n = 7$) имело место повышение активности аргиназы, детоксикационной функции печени и температуры тела. Так, ПНС сокращалась на 26,5 % ($p < 0,05$) по отношению к контролю и составляла $21,4 \pm 2,65$ мин, содержание в плазме крови СМ снижалось на 21,6 % ($p < 0,05$), а СТК на 19,8 % ($p < 0,05$). У крыс с экспериментальным гипертиреозом температура тела повышалась на 0,7 °C ($p < 0,05$), а активность аргиназы печени — на 41,0 % ($p < 0,05$).

Угнетение аргиназы печени L-валином устраняло повышение температуры тела на действие экзогенного трийодтиронина. Так, ректальная температура у гипертиреоидных крыс ($n = 8$), получавших через день в течение 20 дней за 30 мин до интрагастрального введения T_3 внутрибрюшинно L-валин (100,0 мг/кг), была на 0,7 °C ($p < 0,05$) ниже температуры тела у животных контрольной группы и составляла $37,2 \pm 0,13$ °C.

Учитывая, что как депрессия КК GdCl_3 , так и угнетение NO-синтазы L-NAME ослабляет гепатотоксическое действие этанола, а также его подавляющее влияние на процессы детоксикации и уровень йодсодержащих гормонов в крови, есть основания полагать, что продукция КК NO в условиях хронической алкоголизации имеет значение в патогенезе хронической алкогольной интоксикации.

Заключение. Хроническая этаноловая интоксикация у крыс сопровождается снижением температуры тела, уровня три- и тетраидтиронина в плазме крови, активности аргиназы печени, увеличением ПНС и повышением уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, СМ, СТК, а также активности АлАТ и АсАТ в плазме крови. В изменениях детоксикационной функции печени, тиреоидного статуса организма и температуры тела, индуцированных хронической интоксикацией этанолом, участвуют аргиназа печени и клетки Купфера. Действие в организме как ингибитора КК GdCl_3 , так и ингибитора NO-синтазы L-NAME ослабляет, а ингибитора аргиназы ng-NOHA способствует развитию характерных изменений детоксикационной функции печени, уровня трийодтиронина в крови и температуры тела при хронической алкогольной интоксикации. По-видимому, продукция купферовскими клетками NO в условиях алкоголизации имеет значение в патогенезе хронической алкогольной интоксикации.

Литература

1. Буко, В. У. Метаболические последствия алкогольной интоксикации / В. У. Буко, О. Я. Лукивская, А. М. Хоха // Минск : Белорусская наука, 2005. — 207 с.
2. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени : обзор / Д. Н. Маянский // Патолофизиология. — 1985. — № 4. — С. 80–86.
3. Висмонт, А. Ф. Роль аргиназы печени в процессах детоксикации и ее участие в механизмах регуляции температуры тела при бактериальной эндотоксинемии / А. Ф. Висмонт, Л. М. Лобанок // Доклады НАН Беларуси. — 2011. — Т. 55, № 2. — С. 83–87.
4. Тэйлор, Б. С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции / Б. С. Тэйлор, Л. Х. Аларсон, Т. Р. Биллиар // Биохимия. — 1998. — Т. 63, № 7. — С. 905–923.

5. Geyer, J. W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // Anal. Biochem. — 1971. — Vol. 39, № 2. — P. 412–417.

6. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et al.] // Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41, № 6. — P. 892–896.

7. Boucher, J. L. Selective inhibitors and substrates for arginases and nitric oxide syntheses / J. L. Boucher // Fund. Clin. Pharmacol. — 2004. — Vol. 18, № 1. — P. 5–15.

TO THE PARTICIPATION OF LIVER ARGINASE AND KUPFFER CELLS IN DETOXICATION PROCESSES AND THYROID STATUS FORMATION IN RATS WITH CHRONIC ETHANOL INTOXICATION

Lobanova V. V., Vismont F. I.

Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

Alcohol pathology is one of the most important problems of modern medicine. It's known that the high morbidity and mortality rate caused by regular use of alcoholic beverages is associated with toxic effects of ethanol on the most important human organs, primarily liver.

The aim of investigation was determination the liver arginase activity and Kupffer cells importance in detoxication processes and thyroid status formation in rats with chronic ethanol intoxication.

In experiments on rats it was established, that in conditions of liver arginase depression by N^o-hydroxy-L-arginine, chronic alcoholization is accompanied by a more significant inhibition of the liver detoxication function, an increase in the content of NO₃⁻/NO₂⁻ in plasma, decrease in body temperature. Inhibition of the Kupffer cells activity by gadolinium chloride reduces toxic effect of ethanol on the liver, as well as the development of typical changes in the liver arginase activity, detoxification processes and body temperature in rats with chronic ethanol intoxication.

Keywords: chronic ethanol intoxication, detoxification, liver arginase, Kupffer cells, thyroid status.

Поступила 24.07.2018