

ЗНАЧИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ И КЛЕТОК КУПФЕРА В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ И ФОРМИРОВАНИЯ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТИ

Лобанова В.В., Висмонт Ф.И.

*Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра патологической физиологии, г. Минск*

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

Резюме: в опытах на крысах установлено, что активность аргиназы печени и клеток Купфера определяют выраженность процессов детоксикации и формирование тиреоидного статуса при хронической алкогольной интоксикации. Направленность и выраженность изменений активности аргиназы и детоксикационной функции печени при хронической алкоголизации зависит от тяжести хронической алкогольной интоксикации.

Resume: in experiments on rats, it was found that the activity of liver arginase and Kupffer cells determine the severity of detoxification processes and the formation of thyroid status in chronic alcohol intoxication. The direction and severity of changes in the activity of arginase and the detoxification function of the liver in chronic alcoholism depends on the severity of chronic alcohol intoxication.

Актуальность. 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 связана с токсическим воздействием этанола на важнейшие органы человека и в первую очередь, печень [1].

К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении клеток Купфера (КК) и аргиназы печени в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии [2, 3]. Известно, что печень играет значимую роль в процессах детоксикации и метаболизме гормонов щитовидной железы [4, 5]. Учитывая, что активность аргиназы печени лимитирует доступность L-аргинина для NO-синтазы [6], были основания полагать, что ее активность будет сказываться на синтезе монооксида азота (NO), который играет важную роль в процессах жизнедеятельности, механизмах детоксикации в частности [7].

Цель: выяснить значимость активности аргиназы печени и КК в процессах детоксикации и формировании тиреоидного статуса у крыс в условиях алкогольной интоксикации различной тяжести.

Задачи: 1. Исследовать влияние хронической этаноловой интоксикации различной тяжести на температуру тела, процессы детоксикации и формирование тиреоидного статуса у крыс; 2. Определить уровень нитратов/нитритов в плазме крови у экспериментальных животных в условиях хронической этаноловой интоксикации различной тяжести; 3. Выяснить особенности процессов детоксикации и формирования тиреоидного статуса у крыс при хронической этаноловой интоксикации различной тяжести в условиях угнетения активности аргиназы печени; 4. Выяснить

особенности процессов детоксикации и формирования тиреоидного статуса у крыс при хронической этаноловой интоксикации различной тяжести в условиях угнетения активности L-аргинин-NO системы.

Материалы и методы. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 180–220 г.

Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводили на животных путем интрагастрального введения этанола. Одна группа животных получала ежедневно интрагастрально 10%, а другая 30% водный раствор этанола (из расчета 1,0 г и 3,5 г 92% этанола на кг массы тела животного, соответственно) в течение 60 дней. Селективную депрессию КК вызывали у животных внутрибрюшинным введением раствора гадолиния хлорида ($GdCl_3$), в дозе 10 мг/кг [8] Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически [9]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NO_3^-/NO_2^-) [10].

О детоксикационной функции печени, процессах детоксикации 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. Определение содержания в крови СМ проводили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В.М. Моиным с соавт. (1989), 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.

С целью выяснения значимости аргиназы печени и NO в процессах детоксикации и формирования тиреоидного статуса использовали ингибитор аргиназы N^{ω} -гидрокси-нор-L-аргинин (nor-NOHA) фирмы BACHEM (Германия) и неселективный ингибитор NO-синтазы – метиловый эфир N^G -нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США). Nor-NOHA в дозе 10,0 мг/кг вводили крысам внутрибрюшинно ежедневно в течение 4-х недель. L-NAME (25,0 мг/кг) также вводили однократно крысам – внутрибрюшинно, за 30 мин до интрагастрального введения животным этанола в течение 60 дней.

Уровень в плазме крови общего трийодтиронина (T_3) и тетраiodтиронина (T_4) определяли радиоиммунным методом с помощью наборов реактивов РИА- T_3 -СТ и РИА- T_4 -СТ производства УП ХОП ИБОХ НАН Республики Беларусь. Ректальную температуру измеряли электротермометром ТПЭМ-1 (НПО «Медфизприбор», Российская Федерация). Декапитацию производили через один час после последнего введения этанола (опыт) или физиологического раствора (контроль).

Все эксперименты выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными. Полученные цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной биологической статистики с помощью критерия Стьюдента. Все данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического ($\bar{X} \pm Sx$). Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. В опытах на крысах выявлено, что ежедневное интрагастральное введение животным 30% водного раствора этанола (3,5 г 92% этанола на кг массы тела) в течение 60 дней 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 23,8% ($p < 0,05$, $n=12$). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС в контрольной группе животных (ежедневное интрагастральное введение физраствора в течение двух месяцев, $n=10$) составили 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·час. Активность АлАТ и АсАТ, важнейших показателей тяжести поражения печени, в крови у алкоголизированных 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. Ректальная температура снижалась (через 60 дней от начала эксперимента) на $1,1 \pm 0,14$ °С ($p < 0,05$, $n=20$). Интрагастральное введение этанола через 60 дней алкоголизации, приводило у крыс ($n=8$) к повышению в плазме крови уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ на 79,1% ($p < 0,01$) и который составлял $11,02 \pm 1,34$ мкМоль/л.

Установлено, что в результате длительного (60 дней) ежедневного интрагастрального введения этанола в дозе 3,5 г/кг у животных имеет место снижение в плазме крови уровня T_3 на 62,6% ($p < 0,05$, $n=7$), в то время как концентрация T_4 достоверно не изменялась по сравнению с контролем (ежедневное интрагастральное введение физраствора в течение 60 дней). Содержание T_3 и T_4 в плазме крови животных контрольной группы ($n=7$) составило $3,7 \pm 0,71$ нМоль/л и $73,1 \pm 11,44$ нМоль/л соответственно.

Хроническая алкоголизация животных этанолом в дозе 1,0 г/кг массы тела в течение 60 дней приводила к повышению активности аргиназы и детоксикационной функции печени и не сопровождалась достоверными изменениями температуры тела и уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови. При этом СТК понижалась на 27,1% ($p < 0,05$, $n=9$), уровень СМ в плазме крови на 19,7% ($p < 0,05$, $n=9$), а ПНС на 20,8% ($p < 0,05$, $n=10$). Активность аргиназы печени в этих условиях повышалась на 30,5% ($p < 0,05$, $n=8$) и составляла $6,0 \pm 0,51$ мкМоль мочевины/г сырой ткани·час. Активность АлАТ и АсАТ в крови у алкоголизированных животных, по сравнению с соответствующим контролем, достоверно не изменялись, хотя имели тенденцию к повышению.

Обнаружено, что в условиях депрессии аргиназы печени, вызванной ежедневным внутрибрюшинным введением в течение 2-х месяцев крысам ($n=10$) ингибитора аргиназы *nor*-NOHA в дозе 10 мг/кг, действие этанола (в дозе 3,5 г/кг массы тела) сопровождается более значимым угнетением процессов детоксикации и более выраженным повышением уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме. У таких алкоголизированных животных в условиях угнетения аргиназы печени *nor*-NOHA значения основных показателей печеночной детоксикации (СМ в плазме крови, степень ее токсичности, ПНС) были выше по сравнению с контрольными (физраствор внутрибрюшинно один раз в день в течение 60 дней и этанол интрагастрально ежедневно в течение двух месяцев) на 29,3% ($p < 0,05$, $n=7$), 21,6% ($p < 0,05$, $n=8$) и 34,7% ($p < 0,05$, $n=8$) соответственно.

Выявлено, что действие в организме у крыс ($n=9$) ингибитора NO-синтазы метилового эфира L-NAME (ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 60 дней) в дозе 25 мг/кг ослабляет токсическое действие этанола (в дозе 3,5 г/кг массы тела) на печень. Действие этанола в указанной дозе у крыс в условиях предварительной инъекции (за 30 мин до интрагастрального введения животным этанола в течение 60 сут) L-NAME, по сравнению с контрольной группой животных (внутрибрюшинное введение физраствора и хроническая алкоголизация) сопровождалось менее выраженными изменениями процессов детоксикации, а также менее значимым повышением уровня АЛАТ, АсАТ и $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови. ПНС, уровень СМ в плазме крови и СТК у опытных крыс ($n=9$), подвергшихся хронической алкоголизации, по сравнению с животными контрольной группы были ниже на 24,6% ($p<0,05$), 31,8% ($p<0,05$) и 29,2% ($p<0,05$) соответственно. Активность АЛАТ и АсАТ плазмы крови у крыс, подвергшихся хронической алкоголизации в условиях угнетения в организме животных NO-синтазы по сравнению с животными контрольной группы были 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 59,3% ($p<0,05$, $n=8$).

Установлено, что угнетение КК GdCl_3 ослабляет развитие характерных изменений активности аргиназы, детоксикационной функции печени, а также температуры тела на действие этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела. Так, температура тела у крыс, которым предварительно, за 12 часов до интрагастрального введения этанола, внутрибрюшинно вводили 1,0 мл физраствора (1 раз в неделю в течение 60 дней) по сравнению с контрольными животными (введение физраствора интрагастрально и внутрибрюшинно) понижалась на 1,0°C ($p<0,05$, $n=10$), а в опыте, у животных, которым до алкоголизации предварительно (за 12 ч до интрагастрального введения этанола) внутрибрюшинно (1 раз в неделю в течение 60 дней) вводили GdCl_3 (10 мг/кг), снижалась на 0,5°C ($p<0,05$, $n=20$). Выявлено, что у алкоголизированных животных в условиях депрессии КК значения основных показателей печеночной детоксикации (уровень – СМ в плазме крови, степень её токсичности), были меньше по сравнению с контрольными (физраствор внутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 60 дней и этанол интрагастрально ежедневно в течение 2 месяцев) 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 снижением температуры тела и угнетением детоксикации, но и 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 один раз в неделю в течение 60 дней и интрагастральное введение этанола в дозе 3,5 г/кг в течение 60 дней) составляла $0,6\pm 0,14$ нМоль/л ($n=8$) и $50,7\pm 5,86$ нМоль/л ($n=8$), а у животных, которым за 12 часов до введения этанола 1 раз в неделю в течение 8 недель внутрибрюшинно вводился водный раствор GdCl_3 , составляла $1,2\pm 0,13$ нМоль/л ($n=9$) и $51,3\pm 4,18$ нМоль/л ($n=9$).

Опыты показали, что хроническая алкогольная интоксикация (3,5 г 92% этанола на кг массы тела) у крыс (n=7), которым предварительно, за 12 час до интрагастрального введения этанола, вводили один раз в неделю в течение 60 дней внутрибрюшинно ингибитор КК $GdCl_3$ (10 мг/кг), сопровождается менее значимым (на 23,2% по отношению к контрольной группе животных, получивших физраствор внутрибрюшинно один раз в день в течение 60 дней и этанол интрагастрально ежедневно в течение двух месяцев) повышением уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови. Уровень NO_3^-/NO_2^- в плазме крови составлял $8,46 \pm 0,91$ мкМоль/л.

Выводы: результаты исследований дают основание заключить, что в изменениях детоксикационной функции печени и формировании тиреоидного статуса у крыс, индуцированных хронической интоксикацией этанолом, участвует аргиназа печени и клетки Купфера. Направленность и выраженность изменений уровня трийодтиронина в плазме крови, активности аргиназы и детоксикационной функции печени при хронической алкоголизации зависит от тяжести хронической алкогольной интоксикации. Депрессия клеток Купфера $GdCl_3$, как и действие в организме блокатора NO-синтазы метилового эфира N^G -нитро-L-аргинина ослабляет, а ингибитора аргиназы N^o -гидрокси-нор-L-аргинина способствует развитию характерных изменений в процессах детоксикации и уровня трийодтиронина в плазме крови при хронической алкогольной интоксикации, вызываемой интрагастральным введением 30% водного раствора этанола из расчета 3,5 г 92% этанола на кг массы тела в течение 60 дней. Данные исследований дают основания полагать, что активность аргиназы печени и клеток Купфера 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. – 207с.
2. 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.
3. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени: Обзор // Патолофизиология, 1985. – № 4. – С.80–86.
4. Kelly, G. S. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review / G. S. Kelly // Altern. Med. Rev. – 2000. – Vol. 4. – P. 306–333.
5. Tapra, G. Kupffer cells function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat / G. Tapra, I. Pepper, G. Smok, L. A. Videla // Free Radic. Res. – 1997. – Vol. 26(3). – P. 267–279.
6. Lorzynski, G. In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle / G. Lorzynski, C. V. Suschek, V. Kolb-Bachoten // Nitric Oxide. – 2006. – Vol. 14, № 4. – P. 300–308.
7. 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.
8. Volmar, B. Modulation of Kupfer cells activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats / B. Volmar, D. Rettinger, G. A. Wanner // Shock. – 1996. – Vol. 6; №6. – P. 434–441.
9. 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.
10. Moshage, H. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage, B. Kok, J. R. Huizenga, P. L. Jansen // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, №6. – P. 892–896.