

О ЗНАЧИМОСТИ ВЗАИМОСВЯЗИ И ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ АРГИНАЗЫ И L-АРГИНИН-НО СИСТЕМЫ ПЕЧЕНИ В МЕХАНИЗМАХ РЕАЛИЗАЦИИ ВЛИЯНИЯ ТРИЙОДТИРОНИНА НА ПРОЦЕССЫ ДЕТОКСИКАЦИИ И ТЕМПЕРАТУРУ ТЕЛА

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

В опытах на крысах установлено, что тиреоидный статус и температура тела зависят от функционального состояния печени, ее детоксикационной функции. Показано, что взаимодействие аргиназы и L-аргинин-НО системы печени имеет важную значимость в механизмах реализации влияния йодсодержащих гормонов на процессы детоксикации и температуру тела. Изменения процессов детоксикации у крыс в условиях как токсического поражения печени CCl_4 , так и депрессии как аргиназы печени, так и L-аргинин-НО системы, в значительной степени обусловлены сдвигами содержания трийодтиронина в плазме крови. Депрессия L-аргинин-НО системы метиловым эфиром N^G -нитро L-аргинина, но не аргиназы печени L-валином ослабляет гепатотоксичное действие CCl_4 , а также его угнетающее влияние на процессы, детоксикации и терморегуляции.

Ключевые слова: *аргиназа печени, L-аргинин-НО система, трийодтиронин, детоксикация, температура тела.*

V. V. Lobanova, F. I. Vismont

ABOUT THE IMPORTANCE OF INTERACTION LIVER ARGINASE AND L-ARGENINE-NO SYSTEM IN THE MECHANISMS OF TRIIODOTHYRONINE INFLUENCING ON DETOXICATION PROCESSES AND BODY TEMPERATURE

It has been established in the experiments on rats, that thyroid status and body temperature depend on a functional condition of the liver and its detoxication function. We also established that liver arginase and L-arginine-NO system interaction has a great value in the mechanisms of triiodothyronine influencing on detoxication processes and body temperature. Variations in processes of detoxication in rats in both toxic lesion and of a liver arginase and L-arginine-NO system depression, are due to shifts in triiodothyronine content in blood plasma. L-arginine-NO system but not liver arginase depression

diminished hepatotoxic effect of CCl_4 and its depression influence on detoxication and thermoregulation processes.

Key words: *liver arginase, L-arginine-NO system, triiodothyronine, detoxication, body temperature.*

Известно, что ведущим универсальным звеном в патогенезе нарушений жизнедеятельности при экстремальных состояниях организма и различных заболеваниях, как инфекционной, так и неинфекционной природы является токсинемия, выраженность которой во многом определяется активностью детоксикационной функции печени [3, 7].

Данные литературы свидетельствуют о том, что активность аргиназы печени имеет значение в процессах образования монооксида азота (NO), детоксикации и жизнедеятельности организма в норме и при патологии [1, 6, 15]. Обнаружено, что от функционального состояния печени зависит активность процессов метаболизма йодсодержащих гормонов щитовидной железы [5, 12], которые участвуют в регуляции температуры тела и процессов детоксикации [4, 8]. Рядом авторов выявлено, что изменение уровня тиреоидных гормонов в крови тесно коррелирует с продукцией в организме монооксида азота (NO) [4, 9, 14], который участвует в механизмах детоксикации и терморегуляции [4, 10]. Можно было предположить, что NO участвует в реализации биологических эффектов тиреоидных гормонов, в частности их влияния на процессы детоксикации и теплообмена. Учитывая, что активность аргиназы сказывается на активности L-аргинин-NO системы, системы определяющей уровень NO и имеющей важное значение в процессах жизнедеятельности и регуляции температуры тела в норме и при патологии [10, 15], были основания полагать, что в механизмах реализации биологических эффектов тиреоидных гормонов, их влияния на процессы детоксикации и теплообмена имеет значение и активность аргиназы печени. Однако участие аргиназы и L-аргинин-NO системы печени, значимость их взаимодействия в механизмах реализации биологических эффектов тиреоидных гормонов не было предметом специального комплексного исследования.

Целью настоящего исследования явилось выяснение значимости аргиназы и L-аргинин-NO системы печени, их взаимодействия в механизмах реализации влияния трийодтиронина на процессы детоксикации и теплообмена.

Материалы и методы. Опыты выполнены на взрослых беспородных ненаркотицированных белых крысах обоего пола массой 160–220 г. Животные до постановки эксперимента в течение недели адаптировались к условиям вивария и получали полно-ценный пищевой рацион в соответствии с нормами содержания лабораторных животных.

Острое токсическое поражение печени вызывали интрагастральным введением животным раствора CCl_4 , приготовленного на растительном масле в соотношении 1:1, из расчёта 5,0 мл/кг веса. Экспериментальный гипотиреоз у животных воспроизводили с помощью тиреостатика мерказолила (НПО «Укрмедпрепараты», Украина). Мерказолил в дозе 25 мг/кг на 1% крахмальном растворе вводили интрагастрально металлическим зондом с оливой ежедневно в течение 20 дней. Для создания модели гипертиреоза использовался синтетический препарат трийодтиронина гидрохлорид (Liiothronin, «Berlin Chemie», Германия), который на 1% крахмальном растворе вводили животным также интрагастрально ежедневно в течение 20 дней в дозе 30 мг/кг.

С целью выяснения значимости аргиназы печени и L-аргинин-NO системы в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела использовали L-аргинин моногидрохлорид (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) – субстрат как для аргиназы, так и для NO-синтазы, ингибиторы аргиназы N^o-гидрокси-нор-L-аргинин (nor NOHA) фирмы

BACHEM (Германия) и L-валин фирмы Carl Roth GmbH+Co.KG (Германия), а также неселективный блокатор NO-синтазы – метиловый эфир N^o-нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США). Nor-NOHA в дозе 10 мг/кг вводили животным внутривенно ежедневно в течение недели, а L-валин (100 мг/кг) однократно за 30 мин до начала опыта. Раствор L-аргинина моногидрохлорид (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) в дозе 100 мг/кг вводили внутривенно.

Взятие для исследований крови у животных проводилось сразу после декапитации. Кровь после декапитации собирали в охлажденные центрифужные пробирки с добавлением гепарина и центрифугировали 10 мин (5000 g при +4 °C). Полученную плазму использовали в дальнейшей работе. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически [11]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитрат/нитритов (NO_3^-/NO_2^-) в плазме крови [13]. О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), содержанию в плазме крови фракции «средних молекул» (СМ) и степени токсичности крови (СТК). Определение содержания СМ производили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В. М. Мойным с соавт. (1989), СТК-способом, предложенным О. А. Радьковой с соавт. (1985). О ПНС у крыс (гексенал 100,0 мг/кг, внутривенно) судили по времени нахождения животных в боковом положении (1973). О тяжести поражения печени судили по активности в плазме крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ). Определение активности АлАТ и АсАТ в плазме крови проводили колориметрически динитрофинилгидразиновым методом [2]. Уровень в плазме крови тиреотропного гормона (ТТГ), трийодтиронина (T_3) и тетраидтиронина (T_4) определяли радиоиммунным методом с помощью тест-наборов производства ХОП ИБОХ НАН Беларуси.

Температуру тела (температуру в прямой кишке на глубине 3,0 см) измеряли термометром ТПЭМ-1. В ряде опытов регистрацию температуры тела у крыс осуществляли при помощи телеметрической установки Mini Mitter (модель 4000, США). Полученные цифровые данные обработаны при помощи общепринятых методов вариационной биологической статистики с использованием критерия Стьюдента. Все данные представлены в виде среднего арифметического и средней ошибки среднего арифметического ($\bar{X} \pm S_x$). Достоверность результатов учитывали при «p» менее 0,05.

Результаты и обсуждение. В опытах на крысах установлено, что через 20 дней после ежедневного интрагастрального введения трийодтиронина гидрохлорид в дозе 30 мг/кг у животных активируются процессы детоксикации, повышается активность аргиназы печени (на 41,0%, $p < 0,05$, $n = 7$) и температура тела (на 0,7 °C, $p < 0,05$, $n = 8$). ПНС у крыс в этих условиях уменьшалась на 27,2% ($p < 0,05$, $n = 7$) и составляла $20,9 \pm 2,3$ мин. Содержание в плазме крови СМ снижалось на 23,5% ($p < 0,05$, $n = 7$), а степень ее токсичности уменьшалась на 19,2% ($p < 0,05$, $n = 7$). При этом концентрация в плазме крови трийодтиронина (T_3) возрастала с $1,2 \pm 0,1$ до $1,9 \pm 0,2$ нМоль/л (на 58,3% $p < 0,05$, $n = 8$), а тетраидтиронина (T_4) снижалась с $44,7 \pm 3,1$ до $17,2 \pm 2,0$ нМоль/л (на 61,5%, $p < 0,05$, $n = 8$).

Депрессия функциональной активности щитовидной железы мерказолилом приводила к снижению активности аргиназы печени (на 25,6%, $p < 0,05$, $n = 7$), угнетению процессов детоксикации и снижению температуры тела. Так, до начала введения мерказолила ректальная температура у крыс

□ Оригинальные научные публикации

опытной группы ($n = 10$) составляла $37,3 \pm 0,10$ °C, а через 20 дней его применения снижалась на $0,9$ °C ($p < 0,05$). Концентрация T_3 и T_4 в плазме крови у гипотиреоидных крыс, по сравнению с контрольной группой (интрагастральное введение 1% крахмального раствора в течение 20 дней) снижалась в 2,5 раза ($p < 0,05$) и 3,2 раза ($p < 0,05$) и составила, соответственно, $0,54 \pm 0,07$ нМоль/л ($n = 7$) и $16,4 \pm 1,05$ нМоль/л ($n = 7$). ПНС у крыс в этих условиях увеличивалась на 28,2% ($p < 0,05$, $n = 7$) и составляла $31,6 \pm 2,85$ мин. Содержание в плазме крови гипотиреоидных крыс СМ повышалось на 17,4% ($p < 0,05$, $n = 7$), а СТК возрастала на 14,1% ($p < 0,05$, $n = 6$).

Выявлено, что в условиях поражения печени CCl_4 у крыс угнетаются процессы детоксикации, снижается температура тела, активность аргиназы печени и концентрация T_3 , T_4 и ТТГ в плазме крови. Так, через 12 и 24 часа после введения в желудок масляного раствора CCl_4 у крыс ректальная температура снижалась, соответственно, на $1,2 \pm 0,12$ °C ($p < 0,05$, $n = 12$) и на $1,7 \pm 0,13$ °C ($p < 0,05$, $n = 10$). Активность аргиназы печени у крыс ($n = 7$) в этих условиях (по отношению к животным в контроле) снижалась на 47,2% ($p < 0,05$) и 61,8% ($p < 0,05$) соответственно, а содержание NO_3^-/NO_2^- возрастала на 31,5% ($p < 0,01$) и 58,4% ($p < 0,01$) соответственно. Активность аргиназы печени у крыс контрольных групп (через 12 и 24 часа после интрагастрального введения 1% крахмального раствора) составляла соответственно $3,6 \pm 0,30$ ($n = 7$) и $3,8 \pm 0,33$ ($n = 7$) мкМоль мочевины/г. сырой ткани \times час.

Острое токсическое поражение печени CCl_4 приводило к повышению в плазме крови уровня СМ и СТК. Концентрация СМ через 12 и 24 часа от момента затравки животных CCl_4 повышалась на 28,2% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 39,1% ($p < 0,05$, $n = 7$). В этих условиях СТК была выше у опытных крыс по сравнению с таковыми в контроле на 48,1% ($p < 0,05$, $n = 6$) и 70,1% ($p < 0,05$, $n = 7$). ПНС у крыс через 12 и 24 часа после введения CCl_4 возрастала, по сравнению с животными, которым вводили интрагастрально подсолнечное масло, на 22,3% ($p < 0,05$, $n = 8$) и 25,8% ($p < 0,05$, $n = 9$), соответственно. Длительность наркотического сна у животных ($n = 7$) в контрольной группе (через 12 и 24 часа после введения в желудок подсолнечного масла в дозе 5,0 мл/кг) составила $22,8 \pm 2,16$ и $27,0 \pm 1,73$ мин, соответственно. Действие CCl_4 у крыс ($n = 8$) сопровождалось угнетением системы гипофизитовидная железа. Так, через 24 часа после введения животным гепатотропного яда наблюдалось снижение в плазме крови уровней T_3 – на 43,0% ($p < 0,05$), T_4 на 62,7% ($p < 0,05$) и ТТГ – на 28,6% ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (интрагастральное введение подсолнечного масла). Активность АлАТ и АсАТ крови, важнейших показателей тяжести поражения печени, через 12 и 24 часа после однократного введения масляного раствора CCl_4 (5,0 мл/кг) повысилась у экспериментальных животных (по сравнению с соответствующим контролем интрагастральное введение подсолнечного масла), соответственно, на 518,5% ($p < 0,05$) и 839,4% ($p < 0,05$, $n = 6$), 136,7% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 204,5% ($p < 0,05$, $n = 6$).

Установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение в течение недели крысам ингибитора аргиназы NO в дозе 10 мг/кг, как и ингибитора аргиназы L-валина в дозе 100 мг/кг статистически значимо не сказывались на ректальной температуре тела и приводили к снижению активности аргиназы печени на 71,2% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 83,5% ($p < 0,05$, $n = 8$) соответственно. У животных контрольной группы ($n = 7$), получавших внутрибрюшинно физраствор в течение недели, активность аргиназы печени составляла соответственно $5,7 \pm 0,51$ мкМоль мочевины/г сырой ткани \times час.

Острое токсическое поражение печени, через 12 и 24 часа после интрагастрального введения CCl_4 сопровождалось у животных ($n = 7$), которым в течение 7 дней ежедневно внутрибрюшинно вводили L-валин (100 мг/кг), более значи-

мым понижением температуры тела и значительным повышением ПНС, токсичности плазмы и уровня СМ в ней. Так, температура тела у крыс контрольной группы, которым предварительно в течение недели до интрагастрального введения масляного раствора CCl_4 внутрибрюшинно ввели физраствор, под влиянием CCl_4 через 12 и 24 часа от момента введения гепатотропного яда понижалась на 1,2 °C ($p < 0,05$, $n = 10$) и 1,5 °C ($p < 0,05$, $n = 8$), а в опыте, в условиях предварительного внутрибрюшинного введения L-валина, через 12 часов и сутки после введения CCl_4 , снижалась на 1,7 °C ($p < 0,05$, $n = 7$) и 2,0 °C ($p < 0,05$, $n = 7$) соответственно.

Выявлено, что действие CCl_4 в организме у крыс в условиях депрессии аргиназы печени L-валином сопровождается не только более значимым угнетением детоксикационной функции печени, но и более выраженными изменениями активности АлАТ и АсАТ в плазме крови животных. Также обнаружено, что действие CCl_4 в организме, в условиях предварительного введения в течение недели животным ингибитора аргиназы L-валина не вызывает понижение уровня T_4 и усугубляет снижение концентрации T_3 в плазме крови.

Обнаружено, что действие CCl_4 у животных, предварительно получивших L-NAME, сопровождалось менее выраженным изменением детоксикационной функции печени. Так, через 24 часа после введения CCl_4 , в условиях депрессии NO -синтазы L-NAME, содержание в плазме крови СМ было ниже на 22,3% ($p < 0,05$, $n = 8$), а степень её токсичности снижалась на 17,6% ($p < 0,05$, $n = 8$) по сравнению с соответствующим контролем (действие только CCl_4). ПНС у крыс, получивших CCl_4 в условиях действия L-NAME, через 24 часа после интрагастрального введения гепатотропного яда уменьшалась на 29,0% ($p < 0,05$, $n = 10$).

Выявлено, что введение CCl_4 , через 24 часа после инъекции, приводит у крыс (предварительно получивших внутрибрюшинно L-NAME) к более значительному снижению в плазме крови концентрации T_3 (на 23,1%, $p < 0,05$, $n = 7$) и к менее выраженному (по сравнению с животными, которым ввели физраствор внутрибрюшинно и раствор CCl_4 интрагастрально) повышению активности АлАТ и АсАТ в плазме крови – на 26,7%, ($p < 0,05$, $n = 8$) и 24,0% ($p < 0,05$, $n = 7$).

Следовательно, полученные данные позволяют заключить, что активность аргиназы и L-аргинин- NO системы печени имеют важное значение в механизмах регуляции детоксикационной функции гепатоцитов и уровня йодсодержащих гормонов щитовидной железы в крови. Были основания полагать, что не только от функционального состояния системы гипофизитовидная железа, но и от активности аргиназы и L-аргинин- NO системы печени зависит тиреоидный статус организма и активность процессов детоксикации.

Для проверки правомочности сделанного нами предположения, представляло интерес выяснить, как будет изменяться температура тела и активность процессов детоксикации на действие экзогенного T_3 в условиях депрессии у животных L-аргинин- NO системы.

Опыты показали, что предварительное (за 12 час до интрагастрального введения T_3) внутрибрюшинное введение крысам ($n = 8$) L-валина (100 мг/кг) предупреждает повышение температуры тела индуцируемое ежедневным в течение 20 дней введением T_3 (30 мкг/кг).

В специальной серии исследований выявлено, что введение крысам ($n = 8$) экзогенного T_3 в условиях действия в организме ингибитора синтеза NO (L-NAME, 25 мг/кг, внутрибрюшинно за 30 мин до введения трийодтиронина гидрохлорида) не приводит к активации процессов детоксикации и повышению температуры тела. В контрольной группе животных (получавших вместо L-NAME физраствор, $n = 8$) на введение T_3 наблюдалось повышение температуры тела. Так, интрагастральное введение в течение 20 дней трийодтиронина гидрохлорида (30 мкг/кг) крысам, предварительно за

30 мин до инъекции ТЗ получавших внутривентриально физраствор, приводило к повышению у животных ректальной температуры на 0,8 °С ($p < 0,05$, $n = 8$), а в условиях действия ингибитора NO-синтазы (L-NAME, 25 мг/кг), действие Т₃ у животных ($n = 8$) не вызывало достоверных изменений температуры тела.

ПНС (гексенал 100 мг/кг внутривентриально) у крыс опытной группы, получавших в течение 20 дней ТЗ в условиях угнетения активности NO-синтазы L-NAME, через 12 часов после последнего интрагастрального введения гормона увеличивалась на 28,7% ($p < 0,05$, $n = 7$) по сравнению с животными в контроле. Длительность наркотического сна у крыс в контроле (интрагастральное введение Т₃ в дозе 30 мкг/кг в течение 20 дней и физиологического раствора внутривентриально за 30 мин до введения гормона) составляла $20,4 \pm 2,51$ мин ($n = 7$).

Наряду с увеличением ПНС, у гипертиреоидных крыс, предварительно получавших L-NAME, наблюдалось также повышение, по сравнению с животными контрольной группы, содержания в плазме крови СМ на 22,7% ($p < 0,05$, $n = 7$) Показатель токсичности крови у опытных крыс по сравнению с таковыми в контроле был выше на 24,3% ($p < 0,05$, $n = 6$).

Таким образом, в условиях действия в организме ингибитора NO-синтазы L-NAME, трийодтиронин не оказывает свое характерное активирующее влияние на процессы детоксикации и термогенеза.

Таким образом, результаты проведенных исследований дают основание заключить, что аргиназа и L-аргинин-NO система печени участвуют в реализации биологических эффектов тиреоидных гормонов, в частности их влияния на процессы детоксикации и температуру тела. По-видимому, изменения температуры тела и процессов детоксикации у крыс в условиях как токсического поражения печени, так и депрессии как аргиназы печени, так и L-аргинин-NO системы, в значительной степени обусловлены сдвигами содержания трийодтиронина в плазме крови, определяющего во многом активность процессов термогенеза и детоксикации. Депрессия L-аргинин-NO системы, но не аргиназы печени, ослабляет гепатотоксическое действие CCl_4 , а также его угнетающее влияние на процессы детоксикации и терморегуляции.

Литература

1. Абдуллаев, Р. А. Активность аргиназы мозга и печени при гипотермии / Р. А. Абдуллаев, Э. З. Эмирбеков // Укр. биохим. журн. – 1991. – Т. 63, № 2. – С. 108–111.

2. Камышников, В. С. Справочник по клинко-биохимической лабораторной диагностике / В. С. Камышников. – Минск: Беларусь, 2002. – Т. 1. – 495 с.; Т 2. – 463 с.

3. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени / Д. Н. Маянский // Пат. физиология и эксперим. медицина. – 1985. – № 4. – С. 80–86.

4. Степанова, Н. А. О роли монооксида азота в регуляции функции щитовидной железы, детоксикационной функции печени и температуры тела при эндотоксиновой лихорадке / Н. А. Степанова, Ф. И. Висмонт // Вес. Нац. акад. наук Беларусі. Сер. біял. навук. – 2003. – № 1. – С. 36–41.

5. Туракулов, Я. Х. Активность конверсии тироксина в трийодтиронин в печени и почках крыс / Я. Х. Туракулов, Т. П. Ташкоджаева, Г. М. Артыкбаева // Пробл. эндокринологии. – 1991. – Т. 37, № 4. – С. 44–46.

6. Шугалей, В. С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклимации к холоду / В. С. Шугалей, Л. С. Козина // Физиол. ж. СССР им. И. М. Сеченова. – 1977. – Т. 63, № 8. – С. 1199–1202.

7. Яковлев, М. Ю. «Эндотоксинавая агрессия», как предболезнь или универсальный фактор патогенеза заболеваний человека и животных / М. Ю. Яковлев // Успехи современной биологии. – 2003. – Т. 123, № 1. – С. 31–40.

8. Acheson, K. J. A study of the relationship between thermogenesis and thyroid hormones / K. J. Acheson, A. G. Burger // Clin. Endocrinol. and Metab. – 1980. – Vol. 51, № 1. – P. 84–89.

9. Fernandez, V. Influence of hyperthyroidism on the activity of liver nitric oxide synthase in the rat / V. Fernandez [et al.] // Nitric Oxide. – 1997. – № 6. – P. 463–468.

10. Gerstberger, R. Nitric Oxide and Body Temperature Control / R. Gerstberger // News Physiol. Sci. – 1999. – Vol. 14, № 2. – P. 30–36.

11. 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.

12. Greg, Kelly, N. D. Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones: A Review // Altern. Med. Rev. – 2000. Aug. 5 (4). – P. 306–333.

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

14. Quesada, A. A nitric oxide synthase activity in hyperthyroid and hypothyroid rats / A. Quesada [et al.] // Eur. J. Endocrinology. – 2002. – Vol. 147. – P. 117–122.

15. Scibior, D. Arginine – metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czczot // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2004. – Vol. 58. – P. 321–332.