

**О ЗНАЧИМОСТИ КЛЕТОК КУПФЕРА И L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ
В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ И РАЗВИТИИ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА
У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АЛКОГОЛИЗАЦИИ**

Висмонт Ф. И., Лобанова В. В.

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

Реферат. В опытах на крысах показано, что хроническая этаноловая интоксикация сопровождается активацией клеток Купфера, угнетением процессов детоксикации, увеличением содержания продуктов перекисного окисления липидов в крови и печени и уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови, а также повышением активности аланин- и аспаратаминотрансфераз. Угнетение активности купферовских клеток гадолиния хлоридом, как и депрессия NO-синтазы метиловым эфиром N^G -нитро-L-аргинина, ослабляет токсическое действие этанола на печень, а также развитие характерных изменений в процессах перекисного окисления липидов, детоксикации, уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, активности аланин- и аспаратаминотрансфераз в плазме крови и температуры тела при хронической алкоголизации крыс. Активность клеток Купфера, L-аргинин-NO системы и процессов образования монооксида азота являются важными фактора-

ми в механизмах реализации влияния этанола на детоксикацию и процессы перекисного окисления липидов в печени.

Ключевые слова: клетки Купфера, L-аргинин-NO система, монооксид азота, хроническая этаноловая интоксикация, детоксикация, гадолиния хлорид, перекисное окисление липидов.

Введение. Одной из актуальнейших проблем современной медицины, имеющей государственную значимость, является неуклонный рост алкогольной патологии, приводящей к сокращению продолжительности жизни и отрицательно сказывающейся на состоянии здоровья.

Заболееваемость и смертность при регулярном потреблении алкогольных напитков связана с токсическим воздействием этанола на важнейшие органы человека, в первую очередь на печень [1]. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что токсические метаболиты этанола, активация процессов перекисного окисления липидов (далее — ПОЛ), развитие оксидативного (окислительного) стресса вносят весомый вклад в поражение печени, вызванное действием этанола [1, 2].

Степень выраженности цитолитического синдрома, как установлено рядом авторов, напрямую связана с реактивностью печеночных макрофагов — клеток Купфера (далее — КК) [3, 4]. Показана значимость КК в развитии оксидативного стресса и особенно для избыточной продукции различных активных цитотоксических веществ, в частности монооксида азота (NO) [4]. В то же время малочисленность исследований по выяснению роли КК в механизмах алкогольного повреждения печени свидетельствует лишь о накоплении фактов в подтверждение этого предположения. Данные о влиянии КК и L-аргинин-NO системы, ответственной за образование NO [5], на процессы детоксикации и развитие оксидативного стресса при алкогольной интоксикации вообще отсутствуют, хотя участие КК и L-аргинин-NO системы в этих процессах вполне закономерно.

Цель работы — выявление значимости клеток Купфера и монооксида азота в процессах детоксикации и в развитии оксидативного стресса в печени у крыс при хронической алкоголизации.

Материалы и методы. Опыты выполнены на 112 взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 180–220 г. Рацион крыс состоял из комбикорма КК-92/ПХЧ-5, количество которого определялось нормами кормления лабораторных животных. Питьевой режим соответствовал принципу *ad libitum*.

Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводили путем ежедневного интрагастрального введения животным 30 %-го раствора этанола (из расчета 3,5 г 92 %-го этанола на 1 кг массы) в течение 60 сут. Селективную депрессию КК вызывали путем введения внутривентриально водного раствора гадолиния хлорида — $GdCl_3$ (Sigma, США) в дозе 10 мг/кг [6]. Для выяснения роли NO в процессах детоксикации и развитии оксидативного стресса при этаноловой интоксикации использовали неселективный блокатор NO-синтазы — метиловый эфир N^G -нитро-L-аргинина (L-NAME). L-NAME (Sigma, USA) вводили крысам внутривентриально в дозе 25 мг/кг. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NO_3^-/NO_2^-) [7].

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 (с 8 до 12 ч утра).

О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (далее — ПНС), степени токсичности крови (далее — СТК) и содержанию в плазме крови «средних молекул» (далее — СМ), о ПНС (гексенал 100 мг/кг, внутривентриально) — по времени нахождения животных в положении на боку. Для определения содержания в крови СМ использовали метод кислотно-этанольного осаждения, разработанный В. М. Моиным и соавт. (1989), для оценки СТК — способ, предложенный О. А. Радьковой и соавт. (1985). Активность аланинаминотрансферазы (далее — АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (далее — АсАТ) в плазме крови определяли с помощью динитрофенилгидразинового метода, концентрацию общего белка и альбуминов в плазме — с использованием рефрактометрического метода.

Активность процессов ПОЛ в крови и печени оценивали по содержанию в них таких продуктов, как малоновый диальдегид (далее — МДА), диеновые конъюгаты (далее — ДК), основания Шиффа (далее — ОШ). Концентрацию МДА, ДК и ОШ определяли спектрофотометрическим методом М. Mihága, М. Uchiyama (1978), В. А. Костюка (1984) и В. L. Fletcher с соавт. (1973) соответственно.

Ректальную температуру измеряли электротермометром ТПЭМ-1. Забор крови и ткани печени для исследований производили сразу же после декапитации животных. Декапитацию производили через 1 ч после последнего введения этанола (опыт) или физраствора (контроль).

Все эксперименты выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными, а также с требованиями Директивы Европейского этического комитета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 и «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах

и иных научных целях» от 18.03.1986 г. и ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная практика», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь № 56 от 28.03.2008.

Для статистической обработки полученных данных использовали программы Statistica 8.0, MS Excel 2000, Graph Pad Prism4. Анализ выявленных в двух независимых группах различий между количественными показателями, распределение которых статистически значимо не отличалось от нормального, проводили с помощью t-критерия Стьюдента в модификации Уэлча (Welch's test). Количественные показатели представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($\bar{X} \pm S_x$), качественные — в виде относительных величин. Различия между экспериментальными группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что в условиях хронической этаноловой интоксикации у крыс угнетаются процессы детоксикации, снижаются температура тела, концентрация общего белка и альбуминов, повышаются уровень $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, активность АлАТ и АсАТ в плазме крови, а также активируются процессы ПОЛ в крови и печени. Смертность животных через 60 сут ежедневного интрагастрального введения этанола составила 14 %.

Так, через 60 сут после ежедневного введения в желудок этанола ректальная температура у животных ($n = 20$) снизилась на $1,1 \pm 0,14$ °C ($p < 0,05$). При этом концентрация СМ в плазме крови крыс ($n = 10$) увеличилась на 38,5 % ($p < 0,05$), а СТК ($n = 10$) была на 57,8 % выше ($p < 0,05$), чем в контроле (через 60 сут после ежедневного интрагастрального введения физраствора). ПНС после хронической затравки этанолом возросла на 24,5 % по сравнению с таковой у животных контрольной группы ($p < 0,05$, $n = 7$). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС в контроле (ежедневное интрагастральное введение физраствора в течение 2 мес., $n = 10$) составили соответственно $0,69 \pm 0,012$ г/л, $1,3 \pm 0,11$ ед. и $27,8 \pm 3,22$ мин.

Опыты показали, что хроническая алкоголизация крыс ($n = 8$) приводит к снижению концентрации общего белка в плазме крови до $56,6 \pm 1,5$ г/л (на 12,2 %, $p < 0,05$). Содержание альбуминов у животных снизилось до $13,5 \pm 1,1$ г/л (на 28,7 %, $p < 0,05$). Активность АлАТ и АсАТ, важнейших показателей тяжести поражения печени, в крови алкоголизированных животных повысилась на 488,5 и 196,3 % по сравнению с контролем ($p < 0,05$) и составила $2,71 \pm 0,13$ и $1,77 \pm 0,16$ мккат/л соответственно.

Обнаружено, что действие этанола в организме животных в течение 60 сут сопровождается повышением в плазме крови уровней ДК, МДА и ОШ на 39,3 ($p < 0,05$, $n = 7$), 58,5 ($p < 0,05$, $n = 8$) и 50,8 % ($p < 0,05$, $n = 7$) соответственно. В печени содержание ДК возросло на 29,3 % ($p < 0,05$, $n = 7$), МДА — на 36,5 % ($p < 0,05$, $n = 7$), ОШ — на 23,3 % ($p < 0,05$, $n = 7$). У крыс контрольной группы (физраствор интрагастрально ежедневно 60 сут, $n = 8$) содержание ДК, МДА и ОШ в плазме крови составило соответственно $0,59 \pm 0,051$ D233/мл, $0,71 \pm 0,058$ мкмоль/мл и $5,4 \pm 0,52$ ЕД/мл, а в печени — $14,5 \pm 1,38$ D233/г ткани, $17,1 \pm 0,71$ мкмоль/г ткани и $136,4 \pm 13,5$ ЕД/г ткани.

Выявлено, что в условиях хронической этаноловой интоксикации у животных изменяется в плазме крови концентрация $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ — конечных продуктов деградации NO [8, 10]. Интрагастральное введение этанола через 60 сут алкоголизации приводило к повышению уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови крыс ($n = 8$) до $11,02 \pm 1,34$ мкмоль/л (на 79,1 %, $p < 0,05$).

Действие GdCl_3 (10 мг/кг внутривентриально 1 раз в неделю в течение 60 сут) достоверно не сказывалось на показателях детоксикации, содержании продуктов ПОЛ в плазме крови и печени, а также на активности АлАТ и АсАТ плазмы крови животных ($n = 8$). У крыс контрольной группы ($n = 7$), получавших интрагастрально 1 раз в неделю физраствор в течение 60 сут, активность АлАТ и АсАТ в плазме крови составляла соответственно $0,56 \pm 0,04$ и $0,69 \pm 0,05$ мккат/л, а у животных опытной группы ($n = 8$), получавших 1 раз в неделю внутривентриально водный раствор GdCl_3 в течение 60 сут, — $0,49 \pm 0,01$ и $0,63 \pm 0,03$ мккат/л соответственно.

Опыты показали, что хроническая алкогольная интоксикация у крыс, которым предварительно, за 12 ч до интрагастрального введения этанола, вводили 1 раз в неделю в течение 60 сут внутривентриально ингибитор КК GdCl_3 (10 мг/кг), сопровождается менее выраженными изменениями в процессах детоксикации и содержания продуктов ПОЛ в крови и печени животных, а также менее значимым повышением в плазме крови уровней АлАТ, АсАТ, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и температуры тела.

Так, концентрация ДК в печени опытных животных ($n = 8$) была на 49,2 % ($p < 0,05$), а в плазме крови ($n = 8$) — на 35,5 % ($p < 0,05$) меньше, чем у животных контрольной группы ($n = 8$) после внутривентриального введения физраствора и хронической алкоголизации. Содержание МДА в печени в этих условиях было меньше на 24,1 % ($p < 0,05$), а в плазме крови — на 29,7 % ($p < 0,05$). Уровень ОШ в печени и в плазме крови был ниже на 52,2 и 34,1 % соответственно ($p < 0,05$).

Установлено, что в результате ежедневного интрагастрального введения 30 %-го раствора этанола в течение 60 сут уровень СМ в плазме крови и степень ее токсичности у крыс, которым 1 раз в неделю в течение 2 мес. предварительно (за 12 ч до введения этанола) внутривентриально вводили раствор GdCl_3 (10 мг/кг), были ниже по сравнению с контрольными (этанол интрагастрально ежедневно ($n = 8$)).

и физраствор внутривнутрибрюшинно 1 раз в неделю ($n = 8$) в течение 60 сут) на 25,2 и 28,5 % соответственно ($p < 0,05$). ПНС (гексенал внутривнутрибрюшинно 100 мг/кг) у крыс в условиях опыта уменьшалась по сравнению с аналогичным показателем у животных контрольной группы ($n = 9$) на 27,1% ($p < 0,05$). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС у крыс ($n = 8$) в контроле (этанол интрагастрально ежедневно и физраствор внутривнутрибрюшинно 1 раз в неделю в течение 60 сут) составили $1,13 \pm 0,029$ г/л, $2,8 \pm 0,32$ ед. и $35,2 \pm 3,68$ мин соответственно.

Активность АлАТ, АсАТ и уровень $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови у опытных животных ($n = 8$) по сравнению с контрольными (внутрибрюшинное введение физраствора и хроническая алкоголизация) были ниже на 65,5; 42,3 и 45,8 % ($p < 0,05$) и составляли $1,21 \pm 0,05$; $1,07 \pm 0,10$ мккат/л и $5,05 \pm 0,53$ мкМоль/л соответственно, а температура тела снизилась на $0,5 \pm 0,12$ °С ($p < 0,05$).

Выявлено, что действие ингибитора NO-синтазы L-NAME (ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 60 сут) в дозе 25 мг/кг (дозе, не влияющей на температуру тела) не приводит к достоверному изменению содержания основных продуктов ПОЛ в крови и печени.

Установлено, что действие этанола в условиях предварительной (за 30 мин до интрагастрального введения этанола в течение 60 сут) инъекции L-NAME в организм животных ведет к менее выраженному угнетению процессов детоксикации, чем у животных контрольной группы. ПНС, уровень СМ в плазме крови и СТК у опытных крыс ($n = 9$), подвергшихся хронической алкоголизации, по сравнению с животными контрольной группы (внутрибрюшинное введение физраствора и хроническая алкоголизация) были ниже на 27,1; 48,3 и 24,2 % соответственно ($p < 0,05$), а содержание альбумина и общего белка — выше на 19,3 и 12,7 % ($p < 0,05$). Активность АлАТ и АсАТ плазмы крови у крыс, подвергшихся хронической алкоголизации в условиях действия в их организме ингибитора NO-синтазы, по сравнению с таковой у животных 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 % ($p < 0,05$, $n = 7$).

Обнаружено, что хроническая этаноловая интоксикация у крыс ($n = 9$), предварительно получивших L-NAME, по сравнению с таковой у животных контрольной группы приводит к уменьшению количества ДК в печени на 39,2 % ($p < 0,05$), а в плазме крови — на 28,6 % ($p < 0,05$). Концентрация МДА в печени в этих условиях снижалась на 27,6 % ($p < 0,05$), в плазме крови — на 30,3 % ($p < 0,05$). Уровень ОШ снижался в печени и в плазме крови соответственно на 50,5 ($p < 0,05$) и 36,7 % ($p < 0,05$).

Выявленные особенности изменений детоксикационной функции печени, процессов ПОЛ в крови и печени, а также уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови при хронической алкоголизации в условиях функциональной недостаточности КК дают основание заключить, что активность КК определяет выраженность процессов детоксикации и оксидативного стресса при хронической этаноловой интоксикации. Учитывая, что депрессия КК GdCl_3 , и угнетение NO-синтазы L-NAME ослабляют гепатотоксическое действие этанола, а также то, что последний оказывает угнетающее влияние на процессы детоксикации и активность процессов ПОЛ, есть основания полагать, что продукция КК NO имеет значение в реализации влияния этанола на процессы детоксикации и ПОЛ в печени.

Заключение:

1. Хроническая этаноловая интоксикация сопровождается у крыс активацией клеток Купфера, L-аргинин-NO системы, угнетением процессов детоксикации, повышением содержания в крови и печени продуктов перекисного окисления липидов, а в плазме крови — уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, активности аланин- и аспаргатаминогидролаз.

2. Угнетение активности клеток Купфера хлоридом гадолиния, как и депрессия NO-синтазы L-NAME, ослабляют токсическое действие этанола на печень и развитие характерных изменений в процессах перекисного окисления липидов, детоксикации, уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, активности аланин- и аспаргатаминогидролаз в плазме крови и температуры тела при хронической алкоголизации крыс.

3. Активность клеток Купфера, L-аргинин-NO системы и процессов образования NO имеют существенное значение в механизмах реализации влияния этанола на процессы ПОЛ и детоксикации в печени у крыс.

Литература

1. Буко, В. У. Метаболические последствия алкогольной интоксикации / В. У. Буко, О. Я. Лукивская, А. М. Хоха. — Минск, 2005. — 208 с.
2. Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms / C. Moncada [et al.] // Mol. Pharmacol. — 1994. — Vol. 46. — P. 786–791.
3. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени : обзор / Д. Н. Маянский // Пат. физиология. — 1985. — № 4. — С. 80–86.
4. Тейлор, Б. С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции / Б. С. Тейлор, Л. Х. Аларсон, Т. Р. Биллиар // Биохимия. — 1998. — Т. 63, вып. 7. — С. 905–923.

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

6. 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.

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

KUPFFER CELLS AND L-ARGININE-NO SYSTEM IMPORTANCE IN DETOXICATION PROCESSES AND OXIDATIVE STRESS IN RAT'S LIVER WITHIN CHRONIC ALCOHOLIZATION

Vismont F. I., Lobanova V. V.

Educational Establishment "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus

In experiments on rats it was shown, that chronic ethanol intoxication causes Kupffer cells activation, depression of detoxication processes, increase in content of lipid peroxidation products in blood and liver, level $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ and the activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in plasma. Inhibition of Kupffer cells activity by gadolinium chloride, as NO-synthase activity by L-NAME, reduces toxic effect of ethanol on the liver, as well as the development of typical changes in the processes of lipid peroxidation, detoxication, levels of $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ in blood plasma in rats with chronic alcoholization. Functional state of Kupffer cells and L-arginine-NO system activity, nitric oxide production is the important factors of realization ethanol influence on detoxication and peroxidation processes in the liver.

Keywords: kupffer cells, L-arginine-NO system, nitric oxide, chronic ethanol intoxication, detoxication, gadolinium chloride, lipid peroxidation.