

УДК 616.36-002:612.118.22:616.89-008.441.13-036.12:616-092.9

О значимости активности аргиназы печени и L-аргинин-NO системы в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и поддержания температуры тела у крыс при хронической алкоголизации

Лобанова В. В., Висмонт Ф. И.

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

Реферат. В опытах на крысах установлено, что хроническая алкоголизация животных сопровождается снижением активности аргиназы печени, температуры тела, уровня три- и тетраидтиронины в плазме крови, увеличением продолжительности наркотического сна и повышением уровня нитратов/нитритов, «средних молекул», степени токсичности крови, а также активности АЛАТ и АсАТ в плазме крови. Действие в организме животных ингибитора NO-синтазы метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина ослабляет, а ингибитора аргиназы N^o-гидрокси-нор-L-аргинина, как и L-валина усугубляет развитие характерных изменений детоксикационной функции печени, уровня триидтиронины в крови и температуры тела при хронической этаноловой интоксикации.

По-видимому, взаимодействие аргиназы и L-аргинин-NO системы печени, их активность, определяют выраженность процессов детоксикации, формирования тиреоидного статуса и поддержания температуры тела при хронической алкогольной интоксикации, что имеет значение в патогенезе этаноловой интоксикации.

Ключевые слова: аргиназа печени, L-аргинин-NO система, триидтиронин, детоксикация, температура тела.

Введение. Современная медицина стоит перед проблемой неуклонного роста алкогольной 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, 2].

В механизмах развития защитно-приспособительных реакций организма при состояниях, сопровождающихся токсинемией, важное значение имеют активность детоксикационной функции печени и системы гипофиз-щитовидная железа [3, 4].

К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значимости аргиназы печени в процессах детоксикации и жизнедеятельности организма в норме и при патологии [5]. Показано, что от функционального состояния печени зависит активность процессов метаболизма, йодсодержащих гормонов щитовидной железы [6], имеющих важное значение в процессах детоксикации [3].

Рядом исследователей выявлено, что изменение уровня тиреоидных гормонов в крови тесно коррелирует с продукцией в организме монооксида азота (NO) [4], в процессах образования которого имеет значение аргиназа печени [7]. Учитывая, что активность аргиназы печени лимитирует доступность L-аргинина как основного субстрата для индуцибельной NO-синтазы [7], а соответственно, 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, были основания полагать, что взаимодействие аргиназы и L-аргинин-NO системы печени, их активность, имеют значение в регуляции ее детоксикационной функции и формировании тиреоидного статуса при хронической алкогольной интоксикации. Однако участие аргиназы и L-аргинин-NO системы печени, значимость их взаимодействия в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и поддержания температуры тела при хронической алкогольной интоксикации не было предметом специального комплексного исследования.



Цель работы — выяснение значимости активности аргиназы и L-аргинин-NO системы печени в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и поддержания температуры тела у крыс при хронической алкоголизации.

Материалы и методы. Исследование было проведено на ненаркотизированных взрослых белых крысах-самцах массой 180–220 г.

Учитывая, что у животных, в зависимости от времени суток, происходят значимые колебания содержания ряда гормонов и физиологически активных веществ в крови, которые оказывают значительное влияние на процессы пластического и энергетического обмена, все манипуляции с животными проводились в строго определенное время суток (с 8 до 12 часов утра). Соблюдался световой и шумовой режим.

Экспериментальная модель хронической этаноловой интоксикации воспроизводилась на крысах при помощи ежедневного интрагастрального введения животным 30%-го водного раствора этанола (из расчета 3,5 г 92%-го этанола на кг массы тела) на протяжении 60 дней. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрическим методом (W. Geyer, D. Dabich, 1971). Продукцию монооксида азота (NO) оценивалась по суммарному уровню нитратов/нитритов ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) в плазме крови (H. Moshage с соавт., 1995). Детоксикационную функцию печени и степень эндогенной интоксикации оценивали по степени токсичности крови (СТК), продолжительности наркотического сна (ПНС), а также по содержанию в плазме крови «средних молекул» (СМ). ПНС (введение гексена в дозе 100 мг/кг внутривенно) оценивали по времени пребывания животных в положении на боку (Д. В. Парк, 1973). Методом кислотно-этанольного осаждения (В. М. Моин с соавт., 1987) проводилось определение содержания в крови СМ, а оценка СТК осуществлялось способом, предложенным О. А. Радьковой с соавт. (1985). О тяжести повреждения печени судили по активности в сыворотке крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Определение активности АлАТ и АсАТ в плазме крови было проведено с помощью колориметрического динитрофенилгидразинового метода.

Гипотиреоз у животных воспроизводили при помощи тиреостатика мерказолила («Укрмедпрепараты», Украина), который в дозе 25 мг/кг на 1%-м крахмальном растворе вводился крысам ежедневно интрагастрально на протяжении 20 дней. Гипертиреоидное состояние воспроизводили с помощью синтетического препарата трийодтиронина гидрохлорид (Liothyronin, Berlin Chemie, Германия), который в дозе 30 мкг/кг на 1%-м крахмальном растворе вводили животным интрагастрально ежедневно на протяжении 20 дней. Уровень в плазме крови трийодтиронина (T_3) и тетрайодтиронина (T_4) определяли радиоиммунным методом с помощью тест-наборов ХОП ИБОХ НАН Беларуси. Для выяснения значимости аргиназы печени и NO в процессах детоксикации, терморегуляции и формирования тиреоидного статуса использовали ингибитор аргиназы N^{ω} -гидрокси-нор-L-аргинин (nor-NOHA) (Bachem AG., 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) (Acros organics, США). Nor-NOHA в дозе 10 мг/кг, а L-валин — в дозе 100 мг/кг вводили крысам внутривенно ежедневно за 30 мин до начала эксперимента. L-NAME в дозе 25 мг/кг вводили крысам (за 30 мин до интрагастрального введения животным этанола или физраствора в течение 60 дней) внутривенно. Ректальную температуру измеряли медицинским электротермометром «ТПЭМ-1» (НПО «Медфизприбор», Российская Федерация).

Взятие ткани печени и крови у животных для исследований осуществлялось после их декапитации, которая проводилась через один час после последнего введения этанола (в опытной группе) или физиологического раствора (в контрольной группе).

Все эксперименты были выполнены в соответствии с этическими нормами по обращению с лабораторными животными.

Полученные в исследовании данные обрабатывались при помощи параметрических методов статистики. Значения моды, медианы и среднего значения совпадали, а значения эксцесса, асимметрии и их стандартные отклонения были равны нулю. Следовательно, данные подчиняются нормальному закону распределения Гаусса, что позволило применить параметрический критерий оценки достоверности (t -критерий Стьюдента). Все данные представлялись в виде среднего арифметического и его ошибки ($X \pm S_x$). Результаты считали статистически значимыми при значении $p < 0,05$, что является достаточным при проведении медико-биологических исследований. Статистическая обработка и графическая визуализация полученных данных выполнялись на персональном компьютере с помощью прикладных программ Statistica, Microsoft Excel и Graph Pad Prism 4.



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

Установлено, что в условиях длительной алкоголизации у животных развивается выраженная гипотермия. Уже через 20 дней от начала ежедневного интрагастрального введения этанола температура тела снижалась на $0,8^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n = 20$), а через 40 и 60 дней ректальная температура снижалась на $1,0 \pm 0,12^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n = 16$) и $1,1 \pm 0,15^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n = 12$) соответственно. Смертность животных через 60 дней ежедневного интрагастрального введения этанола составила 17 %.

Опыты показали, что продолжительное интрагастральное введение этанола также приводит к угнетению детоксикационной функции печени, что проявилось повышением уровня СМ в плазме крови — на 38,5 % ($p < 0,05$, $n = 10$), СТК на 57,8 % ($p < 0,05$, $n = 10$) и увеличением ПНС на 24,5 % ($p < 0,05$, $n = 7$). Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС в контрольной группе (при ежедневном интрагастральном введении физиологического р-ра на протяжении двух месяцев, $n = 10$) составило соответственно $0,69 \pm 0,012$ г/л, $1,3 \pm 0,11$ ед. и $27,8 \pm 3,22$ мин. Активность аргиназы печени после длительной алкоголизации животных снизилась на 54,7 % ($p < 0,05$, $n = 8$) и составила $2,5 \pm 0,27$ мкмоль мочевины/г сырой ткани · ч. Активность АлАТ и АсАТ, важнейших показателей тяжести повреждения печени, в крови у алкоголизированных животных в сравнении с соответствующим контролем повысилась на 488,5 % ($p < 0,05$, $n = 8$) и 196,3 % ($p < 0,05$, $n = 8$) и составила $2,71 \pm 0,13$ мккат/л и $1,77 \pm 0,16$ мккат/л соответственно. Интрагастральное введение этанола после 60 дней алкоголизации привело к повышению в плазме крови у крыс ($n = 8$) уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, конечных продуктов деградации NO на 79,1 % ($p < 0,01$), который составил $11,02 \pm 1,34$ мкмоль/л. Ректальная температура снизилась (спустя 60 дней от начала эксперимента) на $1,1 \pm 0,15^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n = 20$).

Обнаружено, что у крыс в результате хронической алкоголизации возникают изменения в тиреоидном статусе. Продолжительное (на протяжении 60 дней) ежедневное интрагастральное введение 30%-го водного раствора этанола приводило у животных к снижению уровня T_3 в плазме крови на 58,8 % ($p < 0,05$, $n = 8$), в то же время концентрация T_4 по сравнению с группой контроля (ежедневное интрагастральное введение физиологического раствора на протяжении 60 дней) достоверно не изменялась. Концентрация T_4 и T_3 в плазме крови у животных в контрольной группе ($n = 7$) составляла $71,1 \pm 11,04$ нмоль/л и $1,7 \pm 0,2$ нмоль/л соответственно.

Для выяснения значимости гормонов щитовидной железы в процессах детоксикации и изменения активности аргиназы печени при хронической алкоголизации проводились опыты по выяснению особенностей изменения активности аргиназы печени и процессов детоксикации у гипо- и гипертиреоидных животных.

Установлено, что через 20 дней после ежедневного интрагастрального введения трийодтиронина гидрохлорида 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 $0,7^\circ\text{C}$, $p < 0,05$, $n = 8$). 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 тетраiodтиронина (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 опытной группы ($n = 10$) составляла $37,3 \pm 0,10^\circ\text{C}$, а через 20 дней его применения снижалась на $0,9^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$). Концентрация T_3 и T_4 в плазме крови у гипотиреоидных крыс по сравнению с контрольной группой (интрагастральное введение 1%-го 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 СМ в плазме крови гипотиреоидных крыс повышалось на 17,4 % ($p < 0,05$, $n = 7$), а СТК возрастала на 14,1 % ($p < 0,05$, $n = 6$).

Установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение в течение недели крысам ингибитора аргиназы pofNOHA в дозе 10 мг/кг, как и ингибитора аргиназы L-валина в дозе 100 мг/кг статистически значимо не сказывалось на ректальной температуре тела и приводило 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·ч.

Выявлено, что действие этанола у крыс в условиях предварительной (за 30 мин до интрагастрального введения животным этанола в течение 60 дней) внутрибрюшинной инъекции в организм животных L-валина в дозе 100 мг/кг, по сравнению с животными контрольной группы, приводит к более выраженному угнетению процессов детоксикации. ПНС, уровень СМ в плазме крови и СТК у опытных крыс, которые подвергались хронической алкоголизации в условиях депрессии аргиназы печени, по сравнению с животными контрольной группы (внутрибрюшинное введение физраствора и хроническая алкоголизация, $n = 8$) были выше на 19,2 % ($p < 0,05$, $n = 8$), 37,3 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и 20,1 % ($p < 0,05$, $n = 7$) соответственно. Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови крыс, подвергшихся хронической алкоголизации, в условиях действия в организме L-валина в сравнении с животными контрольной группы повышалась на 34,5 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и 19,1 % ($p < 0,05$, $n = 7$) соответственно, а уровень $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ — на 67,6 % ($p < 0,05$, $n = 7$).

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 гипофиз-щитовидная 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 ч до интрагастрального введения T_3) внутрибрюшинное введение крысам ($n = 8$) L-валина (100 мг/кг) в течение 20 дней предупреждает повышение температуры тела, индуцируемое ежедневным в течение этого периода 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. Так, интрагастральное введение в течение 20 дней трийодтиронина гидрохлорида (30 мкг/кг) крысам, предварительно за 30 мин до инъекции T_3 получавших внутрибрюшинно физраствор, приводило к повышению у животных ректальной температуры на $0,8^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n = 8$), а в условиях действия ингибитора NO-синтазы (L-NAME, 25 мг/кг), действие T_3 у животных ($n = 8$) не вызывало достоверных изменений температуры тела.

Так, ПНС (гексенал 100 мг/кг внутрибрюшинно) у крыс опытной группы, получавших в течение 20 дней T_3 в условиях угнетения активности NO-синтазы L-NAME, через 12 ч 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 T_3 в дозе 30 мкг/кг в течение 20 дней и физиологического раствора внутрибрюшинно 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 % ($p < 0,05$, $n = 6$).

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

Установлено, что действие этанола у крыс в условиях предварительной (за 30 мин до интрагастрального введения животным этанола в течение 60 дней) инъекции в организм животных L-NAME, по сравнению с контролем, приводит к менее выраженному угнетению процессов детоксикации. ПНС, уровень СМ в плазме крови и СТК у опытных крыс, которые подверглись хронической алкоголизации, по сравнению с животными контрольной группы (внутрибрюшинное введение физиологического раствора 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 в плазме крови у крыс, подвергшихся хронической алкоголизации в условиях действия в организме животных блокатора NO-синтазы, в сравнении с животными контрольной группы, снизилась со-



ответственно на 48,8 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и 37,5 % ($p < 0,05$, $n = 7$), а уровень $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ — на 39,1 % ($p < 0,05$, $n = 7$).

Заключение. Таким образом, результаты проведенных исследований дают основание заключить, что:

- хроническая алкогольная интоксикация у крыс сопровождается снижением активности аргиназы печени, температуры тела, уровня три- и тетраiodтиронина в плазме крови, увеличением ПНС и повышением уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, СМ, СТК, а также активности АлАТ и АсАТ в плазме крови;
- действие в организме ингибитора NO-синтазы L-NAME ослабляет, а ингибитора аргиназы *nos*-НОНА способствует развитию характерных изменений детоксикационной функции печени, уровня трийодтиронина в крови и температуры тела при хронической алкогольной интоксикации;
- аргиназа и L-аргинин-NO система печени участвуют в реализации биологических эффектов тиреоидных гормонов, в частности их влияния на процессы детоксикации и температуру тела;
- изменения температуры тела и процессов детоксикации у крыс в условиях как депрессии 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.

На основании изложенного выше результаты выполненных исследований свидетельствуют о том, что взаимодействие аргиназы и L-аргинин-NO системы печени, их активность, определяют выраженность процессов детоксикации, формирование тиреоидного статуса и поддержание температуры тела при хронической алкоголизации, что имеет значение в патогенезе этаноловой 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. Лелевич, С. В. Центральные и периферические метаболические механизмы хронической алкогольной интоксикации / С. В. Лелевич, Е. В. Барковский // Наркология. — 2013. — № 7. — С. 50–56.
3. Висмонт, Ф. И. О роли клеток Купфера и гепатоцитов в механизмах реализации влияния трийодтиронина на процессы детоксикации и регуляции температуры тела / Ф. И. Висмонт, С. А. Артюшкевич // Белорусский медицинский журнал. — 2005. — Т. 13, № 3. — С. 45–47.
4. 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.
5. 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.
6. Greg Kelly, N. D. Peripheral Metabolism of Thyroid Hormones: A Review / N. D. Greg Kelly // Altern. Med. Rev. — 2000. Aug. 5 (4). — P. 306–333.
7. Scibior, D. Arginine — metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czeczot // Postepy Hig. Med. Dosw. — 2004. — Vol. 58. — P. 321–332.

About the significance of the liver arginase and L-arginin-NO system activity in detoxication processes, thyroid status formation and body temperature manifestation in rats during chronic alcoholization

Lobanova V. V., Vismont F. I.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

In experiments on rats, it was found that chronic alcoholization in rats is accompanied by a decrease in liver arginase activity, body temperature, the level of tri- and tetraiodothyronine in the blood plasma, an increase in the duration of narcotic sleep, level of nitrates/nitrites, «medium molecules», the degree of blood toxicity,



and also activity of ALT and AST in blood plasma. It was established that the N^G-nitro-L-arginine methylester NO-synthase inhibitor action in animals reduces than the effect of arginase inhibitor N^ω-hydroxy-nor-L-arginine, like L-valine, aggravates the development of characteristic changes in the liver detoxification function, the level of triiodothyronine in the blood and body temperature in chronic ethanol intoxication.

Apparently, the interaction of liver arginase and L-arginine-NO system, their activity, determine severity of the detoxification processes and the formation of the thyroid status in chronic ethanolic intoxication.

Keywords: liver arginase, L-arginine-NO system, triiodothyronine, detoxification, body temperature.

Поступила 14.06.2021