

ЗНАЧИМОСТЬ АКТИВНОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ У КРЫС ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭТАНОЛОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ

Лобанова В.В., Висмонт Ф.И.

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

Ключевые слова: аргиназа печени, детоксикация, хроническая этаноловая интоксикация.

Резюме: в изменениях детоксикационной функции печени и температуры тела, индуцированных хронической интоксикацией этанолом, участвует аргиназа печени. Действие в организме блокатора NO-синтазы метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина ослабляет, а ингибитора аргиназы N^ω-гидрокси-nor-L-аргинина способствует развитию характерных изменений детоксикационной функции печени и температуры тела при хронической алкогольной интоксикации.

Resume: liver arginase is involved in changes in liver detoxification function and body temperature induced by chronic ethanol intoxication. The action of the inhibitor of NO-synthase methyl ester N^G-nitro-L-arginine in the body weakens, and the inhibitor of arginase N^ω-hydroxy-nor-L-arginine contributes to the development of characteristic changes in the detoxification function of the liver and body temperature in 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]. В механизмах развития защитных реакций организма при состояниях, сопровождающихся токсинемией, важное значение имеет активность детоксикационной функции печени [2].

К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении аргиназы печени в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии. Выявлено, что активность аргиназы печени снижается при остром токсическом ее поражении [8], а также при алкогольной интоксикации [5]. Учитывая, что активность аргиназы печени лимитирует доступность L-аргинина для индуцибельной NO-синтазы [7], были основания полагать, что ее активность будет сказываться на синтезе монооксида азота (NO), который играет важную роль в процессах жизнедеятельности, механизмах детоксикации в частности. Однако исследования с целью выяснения значимости аргиназы печени в процессах детоксикации у крыс при хронической алкоголизации не проводились.

Цель: выяснить значимость аргиназы печени в процессах детоксикации у крыс при хронической этаноловой интоксикации.

Задачи: 1. Исследовать влияние хронической этаноловой интоксикации на процессы детоксикации и активность аргиназы печени у крыс; 2. Изучить влияние внутривенного введения ингибитора аргиназы N^ω-гидрокси-nor-L-аргинина на

процессы детоксикации, уровень нитратов/нитритов в плазме крови и температуру тела у крыс; 3. Выяснить особенности изменения процессов детоксикации и уровня нитратов/нитритов в плазме крови у крыс с хронической этаноловой интоксикацией в условиях угнетения активности аргиназы печени N^{ω} -гидрокси-пог-L-аргинином; 4. Выяснить особенности изменения процессов детоксикации и уровня нитратов/нитритов в плазме крови у крыс с хронической этаноловой интоксикацией в условиях действия в организме метилового эфира N^G -нитро-L-аргинина.

Материал и методы. Опыты выполнены на 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*.

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 часов утра).

Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводили на крысах путем ежедневного интрагастрального введения животным 30%-ного раствора этанола (из расчета 3,5 г 92%-ного этанола на кг массы тела животного) в течение 60 дней. Активность аргиназы в печени определяли спектрофотометрически [6]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NO_3^-/NO_2^-) [9].

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, внутривенно) оценивали по времени нахождения животных в положении на боку. Определение содержания в крови СМ проводили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В.М. Моиним с соавт. [3], СТК способом, предложенным О.А. Радьковой с соавт. [4]. О тяжести повреждения печени судили по активности в плазме крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Определение активности АлАТ и АсАТ в плазме крови проводили колориметрически динитрофенилгидразиновым методом.

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 один час после последнего введения этанола (опыт) или физиологического раствора (контроль).

Все эксперименты выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с лабораторными животными, а также требованиями Директивы Европейского этического комитета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986 г. и «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментах и иных научных целях» от 18.03.1986 г. и ТКП 125-2008 «Надлежащая лабораторная

практика», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь №56 от 28.03.2008 г.

Полученные данные обработаны статистически с использованием пакетов прикладного программного обеспечения «Statsoft (USA) Statistica 8.0», «Microsoft Office 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 водного раствора этанола в течение 60 дней приводит к выраженным изменениям температуры тела, детоксикации, активности аргиназы печени, уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и активности трансаминаз в плазме крови. Ректальная температура снижалась (через 60 дней от начала эксперимента) на $1,1 \pm 0,14^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=20$).

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 физ. раствора 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. Установлено, что хроническая алкоголизация приводит к снижению в плазме крови концентрации общего белка до $56,6 \pm 1,5$ г/л (на 12,2%, $p < 0,05$, $n=8$). Содержание альбуминов снижалось до $13,5 \pm 1,1$ г/л (на 28,7%, $p < 0,05$, $n=8$). 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.

Выявлено, что в условиях хронической этаноловой интоксикации у животных изменяется в плазме крови концентрация $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ – конечных продуктов деградации NO. 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 ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 2-х недель крысам ингибитора аргиназы N^ω -гидрокси-нор-L-аргинина (nor-NOHA) фирмы VACHEM (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 nor-NOHA

действие этанола сопровождается более значимым угнетением детоксикационной функции печени, повышением уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме и 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 *pot*-NOHA на $1,6 \pm 0,13^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=8$). Содержание $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови у крыс с хронической алкогольной интоксикацией ($n=8$) получавших *pot*-NOHA, по сравнению с уровнем в контрольной группе животных (алкоголизация и внутрибрюшинное введение физ.раствора, $n=8$) было выше на 47,1% ($p < 0,05$).

Выявлено, что действие в организме у крыс ($n=8$) блокатора NO-синтазы метилового эфира N^G -нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США) (ежедневное внутрибрюшинное введение в течение 60 дней) в дозе 25 мг/кг – дозе, не влияющей на температуру тела, ослабляет токсическое действие этанола на печень.

Установлено, что действие этанола у крыс, в условиях предварительной (за 30 мин до итрагастрального введения животным этанола в течение 60 дней) инъекции в организм животным L-NAME, по сравнению с контрольной группой животных, ведет к менее выраженному угнетению процессов детоксикации. ПНС, уровень СМ в плазме крови и СТК у опытных крыс, подвергшихся хронической алкоголизации, по сравнению с животными контрольной группы (внутрибрюшинное введение физ.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, а содержание альбумина и общего белка – выше на 19,3% ($n=7$, $p < 0,05$), и 12,7% ($n=7$, $p < 0,05$). 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 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 39,1% ($p < 0,05$, $n=7$).

Выявленные особенности изменений детоксикационной функции печени, а также уровня в плазме крови $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ при хронической алкогольной интоксикации в условиях депрессии аргиназы печени, дали основания предположить, что активность аргиназы печени определяют выраженность процессов детоксикации при хронической алкогольной интоксикации.

Учитывая, что угнетение NO-синтазы L-NAME ослабляет гепатотоксическое действие этанола, а также его угнетающее влияние на процессы детоксикации, были основания полагать, что продукция NO в условиях хронической алкоголизации имеет значение в патогенезе хронической алкогольной интоксикации.

Выводы: хроническая этаноловая интоксикация у крыс сопровождается снижением температуры тела, 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 и температуры тела, индуцированных хронической интоксикацией этанолом, участвует аргиназа печени и монооксид азота. Действие в организме блокатора NO-синтазы L-NAME ослабляет, а ингибитора аргиназы *pot*-NOHA способствует развитию характерных изменений детоксикационной функции печени и температуры тела при 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, Ф. И. Эндотоксинемия, дизрегуляция и формирование предболезни / Ф. И. Висмонт // Весці НАН Беларусі. Серыя мед. навук. – 2018. – Т. 15, №1. – С. 7–16.
3. Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях: а.с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50. / В.М. Моин [и др.] – №4323421/28-14; заявлено 02.11.87; опубл. 07.11.89 // Открытия. Изобретения. – 1989. – № 41. – С. 415.
4. Способ определения токсичности биологических жидкостей: а.с. 1146570 СССР, МКИ б О1 № 1/28. / О.А. Радькова [и др.] – № 3458007/28-13; заявлено 18.06.84; опубл. 23.03.85 // Открытия. Изобретения. – 1985. – №41. – С. 415.
5. Трапезникова, С.С. Активность аргиназы различных тканей крысы при алкогольной интоксикации / С.С. Трапезникова, В.М. Гуртовенко, Д.Г. Навасардянц // Вопр. мед. химии. – 1983. – Т. 29, № 4. – С. 95–98.
6. 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.
7. Hallemeesch, M.M. Reduced arginine availability and nitric oxide production / M.M. Hallemeesch, W.H. Lamers, N.E. Deutz // Clin. Nutr. – 2002. – Vol. 21. – P. 273–279.
8. Mendez, J.D. Spermine increases arginase activity in the liver after carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Long-Evans rats / J.D. Mendez, H. De Haro, V.A. Conejo // Biomed. Pharmacother. – 2006. – Vol. 6, № 2. – P. 82–85.
9. 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.