

В. В. Лобанова, Ф. И. Висмонт

ОБ УЧАСТИИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ И РАЗВИТИЯ ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА У КРЫС В УСЛОВИЯХ АЛКОГОЛЬНОЙ ИНТОКСИКАЦИИ РАЗЛИЧНОЙ ТЯЖЕСТИ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Современная медицина стоит перед проблемой неуклонного роста алкогольной патологии. А как известно, заболеваемость и смертность при регулярном употреблении алкогольных напитков связана с токсическим воздействием этанола на важнейшие органы человека и в первую очередь, печень. К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении аргиназы печени в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии.

Целью исследования было выяснение значимости аргиназы печени в процессах детоксикации и развития оксидативного стресса у крыс при хронической этаноловой интоксикации различной тяжести.

В опытах на крысах с использованием современных физиологических, биохимических методов исследования и фармакологического подхода было установлено, что в изменениях детоксикационной функции печени и развитии оксидативного стресса, индуцированных хронической интоксикацией этанолом, участвует аргиназа печени. Направленность и выраженность изменений активности аргиназы и детоксикационной функции печени при хронической алкоголизации зависит от тяжести хронической алкогольной интоксикации. Под влиянием ежедневного интрагастрального введения в течение 60 дней 30 % водного раствора этанола (3,5 г 92 % этанола на кг массы тела) у животных в условиях развития окислительного стресса угнетается активность аргиназы и детоксикационной функции печени, а введение 10 % водного раствора этанола (1,0 г 92 % этанола на кг массы тела) в течение 2-х месяцев приводит к повышению активности аргиназы печени и процессов детоксикации. Действие в организме ингибитора аргиназы N^ω-гидрокси-нор-L-аргинина способствует развитию характерных изменений в процессах детоксикации и перекисного окисления липидов в печени при хронической алкогольной интоксикации, вызываемой интрагастральным введением этанола в дозе 3,5 г/кг в течение 60 дней.

Ключевые слова: *хроническая этаноловая интоксикация, детоксикация, аргиназа печени, перекисное окисление липидов.*

V. V. Lobanova, F. I. Vismont

ON THE PARTICIPATION OF LIVER ARGINASE IN THE DETOXIFICATION PROCESSES AND DEVELOPMENT OF OXIDATIVE STRESS IN RATS UNDER ALCOHOLIC INTOXICATION OF DIFFERENT SEVERITY

Modern medicine faces the problem of the steady growth of alcoholic pathology. And as you know, morbidity and mortality with regular consumption of alcoholic beverages is associated with the toxic effects of ethanol on the most important human organs and, first of all, the liver. To date, a sufficient number of facts have accumulated indicating the importance of liver arginase in vital processes in health and disease.

The aim of the study was to elucidate the significance of liver arginase in the detoxification processes and the development of oxidative stress in rats with chronic ethanol intoxication of different severity.

In experiments on rats using modern physiological, biochemical research methods and a pharmacological approach, it was found that liver arginase participate in changes in liver detoxification

function and the development of oxidative stress induced by chronic ethanol intoxication. The direction and severity of changes in arginase activity and liver detoxification function during chronic alcoholism depends on the severity of chronic alcohol intoxication. Under the influence of daily intragastric administration for 60 days, a 30 % aqueous solution of ethanol (3.5 g 92 % ethanol per kg of body weight) in animals under conditions of development of oxidative stress inhibited the activity of arginase and detoxification function of the liver, and the introduction of 10 % aqueous solution of ethanol (1.0 g 92 % ethanol per kg of body weight) for 2 months leads to an increase in the activity of liver arginase and detoxification processes. The action in the body of the arginase inhibitor N^ω-hydroxy-nor-L-arginine contributes to the development of characteristic changes in the processes of detoxification and lipid peroxidation in the liver during chronic alcohol intoxication caused by intragastric the introduction of ethanol at a dose of 3.5 g/kg for 60 days.

Key words: *chronic ethanol intoxication, detoxification, liver arginase, lipid peroxidation.*

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].

Биохимические проявления токсического действия этанола на организм сложны и многообразны. Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что токсические метаболиты, активация свободно-радикальных процессов, процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) вносят весомый вклад в повреждение печени, вызываемое этанолом [5]. К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении аргиназы печени в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии [2, 9]. Учитывая, что активность аргиназы печени лимитирует доступность L-аргинина для NO-синтазы [8], были основания полагать, что ее активность будет сказываться на синтезе монооксида азота (NO), который играет важную роль в процессах жизнедеятельности, механизмах детоксикации в частности [4]. Однако исследования с целью выяснения значимости аргиназы печени в процессах детоксикации у крыс при хронической алкоголизации различной тяжести не проводились.

Цель исследования: выяснить значимость активности аргиназы печени и монооксида азота в процессах детоксикации и развития оксидативного стресса у крыс в условиях алкогольной интоксикации различной тяжести.

Материал 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 те-

чение 60 дней. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически [7].

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, 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. (1989), СТК способом, предложенным О. А. Радьковой с соавт. (1985). 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.

Активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови и печени оценивали по содержанию в них таких продуктов как малоновый диальдегид (МДА), диеновые конъюгаты (ДК), основания Шиффа (ОШ). Концентрацию МДА, ДК и ОШ определяли спектрофотометрическим методом М. Mihara, М. Uchiyama [10], В. А. Костюка и др. [3] и В. L. Fletcher et al. [6] соответственно.

Ректальную температуру измеряли электротермометром ТПЭМ-1. 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 ($\bar{X} \pm Sx$). Достоверность результатов учитывали при $p < 0,05$.

Результаты и 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 деток-

сикационной 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 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. Активность АлАТ и АсАТ, важнейших показателей тяжести поражения печени, в крови у алкоголизованных 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 $1,1 \pm 0,14^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n = 20$).

Опыты показали, что в этих условиях в крови и печени у крыс повышается по сравнению с животными контрольной группы содержание продуктов ПОЛ в крови и печени. Обнаружено, что действие этанола (3,5 г 92 % этанола на кг массы тела) в организме у животных ($n = 8$) в течение 60 дней сопровождается повышением в плазме крови уровня ДК, МДА и ОШ на 38,9 % ($p < 0,05$), 59,1 % ($p < 0,05$) и 50,7 % ($p < 0,05$) соответственно. В печени содержание ДК возрастало на 29,3 % ($p < 0,05$), МДА на 36,3 % ($p < 0,05$) и ОШ на 23,3 % ($p < 0,05$). У крыс контрольной группы (физ. раствор интрагастрально ежедневно 60 дней, $n = 8$) содержание ДК, МДА и ОШ в плазме крови составляло соответственно $0,59 \pm 0,051$ Д233/мл, $0,71 \pm 0,058$ мкмоль/мл и $5,4 \pm 0,52$ ЕД/мл, а в печени $14,5 \pm 1,38$ Д233/г ткани, $17,1 \pm 0,71$ мкмоль/г ткани и $136,4 \pm 13,5$ ЕД/г ткани.

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. 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. Содержание продуктов ПОЛ, активность АлАТ и АсАТ в крови у алкоголизованных 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 N^{ω} -гидрокси-нор-L-аргинина (nor-NOHA) фирмы BACHEM (Германия) в дозе 10 мг/кг, действие этанола (в дозе 3,5 г/кг массы тела) сопровождается

более значимым угнетением процессов детоксикации, а также содержания продуктов ПОЛ в крови и печени.

Установлено, что у алкоголизованных 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 (физ. раствор 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. Обнаружено также, что действие этанола (3,5 г 92 % этанола на кг массы тела) в организме у животных ($n = 7$), получивших nor-NOHA, сопровождается повышением, по сравнению с животными контрольной группы, в плазме крови уровня ДК, МДА и ОШ на 56,0 % ($p < 0,05$), 81,1 % ($p < 0,05$) и 72,6 % ($p < 0,05$) соответственно. В печени содержание ДК возрастало на 44,7 % ($p < 0,05$), МДА на 61,3 % ($p < 0,05$) и ОШ на 39,7 % ($p < 0,05$). У крыс контрольной группы (физ. раствор интрагастрально ежедневно в течение 60 дней и хроническая алкоголизация) ($n = 8$) содержание ДК, МДА и ОШ в плазме крови составляли $0,91 \pm 0,062$ Д233/мл, $1,22 \pm 0,091$ мкмоль/мл и $8,4 \pm 0,69$ ЕД/мл, а в ткани печени $19,0 \pm 1,63$ Д233/г ткани, $24,0 \pm 0,93$ мкмоль/г ткани $164,3 \pm 15,6$ ЕД/г ткани соответственно.

В изменениях детоксикационной функции печени и развития оксидативного стресса, индуцированных хронической интоксикацией этанолом, участвует аргиназа печени и монооксид азота. Направленность и выраженность изменений активности аргиназы и детоксикационной функции печени при хронической алкоголизации зависит от тяжести хронической алкогольной интоксикации. Под влиянием ежедневного интрагастрального введения в течение 60 дней этанола в дозе 3,5 г/кг массы тела у животных в условиях развития окислительного стресса угнетается активность аргиназы и детоксикационной функции печени, а введение этанола в дозе 1,0 г/кг массы тела в течение 2-х месяцев приводит к повышению активности аргиназы печени и процессов детоксикации. Действие в организме ингибитора аргиназы N^{ω} -гидрокси-нор-L-аргинина способствует развитию характерных изменений детоксикационной функции печени и процессов ПОЛ в крови и печени 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.

Литература

1. Буко, В. У. Метаболические последствия алкогольной интоксикации / В. У. Буко, О. Я. Лукивская, А. М. Хоха. – Минск: Беларуская навука, 2005. – 207 с.
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. Костюк, В. А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / В. А. Костюк, А. И. Потапович, Е. Ф. Лунец // Вопросы мед. химии. – 1984. – № 4. – С. 125–127.

4. 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.

5. Albano, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage / E. Albano // Proceedings of the nutrition society. – 2006. – Vol. 65. – P. 278–290.

6. Fletcher, B. L. Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes / B. L. Fletcher, C. L. Dillard, A. L. Tappel // Anal. Biochem. – 1973. – Vol. 52, № 1. – P. 1–9.

7. 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.

8. Lerzynski, G. In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle / G. Lerzynski, C. V. Suschek, V. Kolb-Bachoten // Nitric Oxide. – 2006. – Vol. 14, № 4. – P. 300–308.

9. 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.

10. Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, M. Uchiyama // Anal. Biochem. – 1978. – Vol. 86, № 1. – P. 271–278.

References

1. Buko, V. U., Lukivskaya O. Ya., Chocha A. M. Metabolicheskie posledstviya alkogol'noy intoksikazii [Metabolic effects of alcohol intoxication]. – Minsk, 2005. – 208 p.

2. Vismont, A. F., Lobanok L. M. Rol' arginazy pecheni v processach detoksikazii i ee uchastie v mekhanizmach regulyazii tem-

peratury tela pri bakterial'noy endotoksinemii [The role of arginase in liver detoxification process and its participation in the mechanisms of regulation of body temperature with bacterial endotoxemia]. Doklady NAN Belarusi [Reports of NAS of Belarus]. – 2011. – Vol. 55, № 2. – P. 83–87.

3. Kostyuk, V. A. Spektrofotometrisheskoe opredelenie dienovykh kon'yugatov [Spectrophotometric determination of diene conjugates]. Voprosy meditsinskoj khimii [Problems of Medical Chemistry]. – 1984. – № 4. – P. 125–127.

4. Teylor, B. S., Alarson L. Ch., Billiar T. R. Induzibel'naya sintaza oksida azota v pecheni: regulyaziya i funkzii [Inducible nitric oxide synthase in the liver: regulation and function]. Biokhimiya [Biochemistry]. – 1998. – Vol. 63, № 7. – P. 905–923.

5. Albano, E. Alcohol, oxidative stress and free radical damage. Proceedings of the nutrition society. – 2006. – Vol. 65. – P. 278–290.

6. Fletcher, B. L., Dillard C. L., Tappel A. L. Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes // Analytical Biochemistry. – 1973. – Vol. 52, № 1. – P. 1–9.

7. Geyer, J. W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates // Analytical Biochemistry. – 1971. – Vol. 39, № 2. – P. 412–417.

8. Lerzynski, G., Suschek C. V., Kolb-Bachoten V. In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle // Nitric Oxide. – 2006. – Vol. 14, № 4. – P. 300–308.

9. Mendez, J. D., De Haro H., Conejo V. A. Spermine increases arginase activity in the liver after carbon tetrachloride-induced hepatic injury in Long-Evans rats // Biomedical Pharmacotherapy. – 2006. – Vol. 6, № 2. – P. 82–85.

10. Mihara, M., Uchiyama T. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test // Analytical Biochemistry. – 1978. – Vol. 86, № 1. – P. 271–278.

Поступила 18.01.2022 г.