

Ф. И. Висмонт, В. В. Лобанова, А. Н. Глебов

**ОБ УЧАСТИИ КЛЕТОК КУПФЕРА И МОНООКСИДА АЗОТА
В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ И РАЗВИТИИ
ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА В ПЕЧЕНИ
ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ ЭТАНОЛОВОЙ ИНТОКСИКАЦИИ**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

В опытах на крысах показано, что активность процессов детоксикации и выраженность оксидативного стресса при хронической алкогольной интоксикации зависит от активности клеток Купфера и процессов образования монооксида азота. Хроническая этаноловая интоксикация сопровождается угнетением процессов детоксикации, повышением содержа-

ния в крови продуктов перекисного окисления липидов, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, активности аланин- и аспаратаминоминотрансфераз. Угнетение активности купферовских клеток хлоридом гадолиния, как и депрессия NO-синтазы L-NAME, ослабляют 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 аспаратаминоминотрансфераз в плазме крови и температуры тела при хронической алкоголизации крыс. Активность клеток Купфера и процессов образования монооксида азота является важным фактором в механизмах реализации влияния этанола на процессы детоксикации и перекисидации в печени.

Ключевые слова: клетки Купфера, монооксид азота, хроническая алкогольная интоксикация, детоксикация, гадолиния хлорид, перекисное окисление липидов.

F. I. Vismont, V. V. Lobanova, A. N. Glebov

ROLE OF KUPFER CELLS AND NITRIC OXIDE IN DETOXICATION PROCESSES AND OXIDATIVE STRESS IN RAT'S LIVER WITHIN CHRONIC ALCOHOL INTOXICATION

In experiments on rats it was shown, that detoxication processes activity and level of oxidative stress within chronic alcohol abuse depends on Kupfer cells functional state and nitric oxide production. Chronic alcohol intoxication causes depression of detoxication processes, increase in content of lipid peroxidation products, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, and the activity of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in plasma. Inhibition of Kupfer cells activity by gadolinium chloride 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 alcohol intoxication. Functional state of Kupfer cells and nitric oxide production is the factor of realization ethanol influence on detoxication and peroxidation processes in the liver.

Key words: Kupfer cells, nitric oxide, chronic alcohol intoxication, detoxication, gadolinium chloride, lipid peroxidation.

Проблема алкоголизма, алкогольного повреждения печени является одной из важнейших проблем современной медицины, а также важнейшей государственной проблемой. Однако в патогенезе хронической алкогольной интоксикации до сих пор остается еще много неизученного.

Известно, что развитие оксидативного (окислительного) стресса является ведущим механизмом повреждения клеток печени, в частности, при чрезмерном употреблении алкоголя [3, 11]. Степень выраженности цитолитического синдрома, как показано рядом авторов, напрямую связана с реактивностью печеночных макрофагов – клеток Купфера (КК) [7, 14]. Показана значимость КК в процессах детоксикации и оксидативном стрессе [4, 5], и особенно в избыточной продукции различных активных цитотоксических веществ, в частности монооксида азота (NO) [8, 14]. Однако исследования по выяснению роли КК в механизмах алкогольного повреждения печени малочисленны и находятся в стадии накопления фактов. Исследования по выяснению значимости КК и L-аргинин-NO системы, ответственной за образование NO [8, 13], в процессах детоксикации и развитии оксидативного стресса при алкогольной интоксикации вообще не проводились.

Целью работы было выяснение значимости КК и монооксида азота в процессах детоксикации и развитии оксидативного стресса в печени у крыс при хронической алкогольной интоксикации.

Материал и методы

Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 160–180 г. Модель хронической алкогольной интоксикации воспроизводил путем ежедневного интрагастрального введения животным этанола (3,5 г/кг) в течение 60 сут. Селективную депрессию КК вызывали у животных введением внутрибрюшинно водного раствора гадолиния хлорида (GdCl_3) в дозе 10 мг/кг [14, 5]. Для выяснения значимости NO в процессах детоксикации и развития оксидативного стресса при этаноловой интоксикации использовали неселективный блокатор NO-синтазы – метиловый эфир N^g-нитро-L-аргинина (L-NAME) (Sigma, USA) вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 25 мг/кг. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитратов/нитритов ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) [12].

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). У крыс о ПНС (гексенал 100 мг/кг, внутрибрюшинно) судили по времени нахождения животных в положении на боку. Определение содержания в крови СМ проводили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В. М. Моиним и соавт. [1], СТК способом, предложенным О. А. Радьковой и соавт. [2]. Определение активности аланинамино-

□ Оригинальные научные публикации

трансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в плазме крови проводили динитрофенилгидразиновым методом. Концентрацию общего белка и альбуминов в плазме и определяли рефрактометрическим 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 спектрофотометрически методом M. Mihara, M. Uchiyama [10], В. А. Костюка и др. [6] и В. L. Fletcher et al. [9] соответственно.

Ректальную температуру измеряли электротермометром ТПЭМ-1. Взятие для исследований крови и ткани печени у животных проводилось за возможно минимальное время после декапитации. Все эксперименты выполнены с учетом принципов биоэтики и положений, которые предусмотрены «Европейской конвенцией по защите экспериментальных животных» [Страсбург, 1986].

Полученные данные обработаны статистически с использованием пакетов прикладного программного обеспечения «Statsoft Statistica 8.0», «Microsoft Office Excel 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 обсуждение

Установлено, что в условиях хронической алкогольной интоксикации у крыс угнетаются процессы детоксикации, снижается температура тела, концентрация общего белка и альбуминов в плазме крови, а также активируются процессы ПОЛ в крови и печени. Так через 60 сут после ежедневного введения в желудок этанола у животных снижалась на $1,1 \pm 0,14$ °C ($p < 0,05$, $n = 12$) ректальная температура. Выявлено, что у животных в этих условиях повышается в плазме крови уровень СМ и СТК. Концентрация СМ повышалась на 38,5% ($p < 0,05$, $n = 8$), а СТК была выше на 57,8% ($p < 0,05$, $n = 8$), по сравнению с животными в контроле (через 60 сут. после ежедневного интрагастрального введения бидистиллированной воды). ПНС после хронической затравки этанолом возрастала, по сравнению с животными контрольной группы, на 24,5% ($p < 0,05$, $n = 7$). ПНС у животных ($n = 10$) в контроле составляло $28,2 \pm 3,51$ мин.

Опыты показали, что хроническая алкоголизация приводит к снижению в плазме крови концентрации общего белка до $56,6 \pm 1,5$ г/л (на 10,2%,

$p < 0,05$, $n = 9$). Содержание альбуминов снижалось до $13,5 \pm 1,1$ г/л (на 28,7%, $p < 0,05$, $n = 9$). Уровень АлАТ и АсАТ – важнейших показателей тяжести поражения печени, в крови у алкоголизированных животных, по сравнению с соответствующим контролем, повышался на 488,5% ($p < 0,05$, $n = 9$) и 196,3% ($p < 0,05$, $n = 9$) и составлял $2,71 \pm 0,15$ и $1,77 \pm 0,16$ мккат/л соответственно.

Обнаружено, что действие этанола в организме у животных сопровождается повышением в плазме крови уровня ДК, МДА и ОШ на 36,3% ($p < 0,05$, $n = 9$), 58,5% ($p < 0,05$, $n = 9$) и 50,8% ($p < 0,05$, $n = 8$) соответственно. В печени содержание ДК возрастало на 25,3% ($p < 0,05$, $n = 9$), МДА на 36,5% ($p < 0,05$, $n = 9$) и ОШ на 22,3% ($p < 0,05$, $n = 9$).

Выявлено, что в условиях хронической этаноловой интоксикации у животных изменяется в плазме крови концентрация $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ – конечных продуктов деградации NO [12, 13]. Действие этанола у крыс ($n = 8$) приводило к повышению уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови животных на 79,1% ($p < 0,05$) и который составлял $11,02 \pm 1,34$ мкмоль/л. Действие в организме у крыс GdCl_3 (10 мг/кг внутривентриально один раз в неделю в течение 60 сут) достоверно не сказывалось на показателях детоксикации, содержания продуктов ПОЛ в плазме крови и печени, а также активности АлАТ и АсАТ плазмы крови. У крыс контрольной группы ($n = 7$) 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 один раз в неделю внутривентриально водный раствор GdCl_3 в течение 60 сут., была равна $0,49 \pm 0,01$ и $0,63 \pm 0,03$ мккат/л соответственно.

Опыты показали, что хроническая алкогольная интоксикация у крыс, которым предварительно, за 12 часов до интрагастрального введения этанола, вводили один раз в неделю в течение 60 суток 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 уровня АлАТ и АсАТ в плазме крови и температуры тела. Так, концентрация ДК в печени опытных животных была на 49,2% ($p < 0,05$, $n = 8$), а в плазме крови на 33,5% ($p < 0,05$, $n = 8$) **меньше чем у животных контрольной группы** (внутривентриальное введение воды для инъекции и хроническая алкоголизация, $n = 9$). Содержание МДА в печени в этих условиях было меньше на 21,1% ($p < 0,05$, $n = 8$), а в плазме крови на 29,2% ($p < 0,05$, $n = 8$). Уровень ОШ был ниже в печени и в плазме крови соответственно на 62,2% ($p < 0,05$, $n = 8$) и 34,1% ($p < 0,05$, $n = 8$). Активность АлАТ и АсАТ в плазме крови у опытных животных ($n = 8$) по сравнению с контрольными (внутривентриальное введение воды для инъекции и хроническая алкоголизация) была ниже на 65,5% ($p < 0,05$) и 42,3% ($p < 0,05$) соответственно и составляла $1,21 \pm 0,05$

и $1,07 \pm 0,10$ мккат/л соответственно. Снижение температуры тела составляло $0,5 \pm 0,12$ °С.

Выявлено, что действие в организме ингибитора NO-синтазы L-NAME 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 у крыс в условиях предварительного (за 30 мин до интрагастрального введения животным этанола в течение 60 сут) введения 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 ($n = 8$), подвергшихся хронической алкоголизации, по сравнению с животными контрольной группы (внутрибрюшинное введение воды для инъекции и хроническая алкоголизация) были выше на 27,1% ($p < 0,05$), 78,3% ($p < 0,05$) и 21,2% ($p < 0,05$) соответственно, а содержание альбумина и общего белка – ниже на 19,3% ($p < 0,05$), и 12,7% ($p < 0,05$). Активность АлАТ и АсАТ плазмы крови у крыс, подвергшихся хронической алкоголизации в условиях блокады в организме животных 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% ($p < 0,05$, $n = 7$).

Обнаружено, что хроническая этаноловая интоксикация у крыс ($n = 8$), предварительно получивших L-NAME по сравнению с животными контрольной группы приводит к уменьшению количества ДК в печени на 39,2% ($p < 0,05$), а в плазме крови на 36,0% ($p < 0,05$). Концентрация МДА в печени в этих условиях снижалась на 27,6% ($p < 0,05$), в плазме крови на 50,3% ($p < 0,05$). Уровень ОШ снижался в печени и в плазме крови соответственно на 60,5% ($p < 0,05$) и 36,7% ($p < 0,05$).

Выявленные особенности изменений в детоксикационной функции и процессах ПОЛ в печени, а также уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ – конечных продуктов деградации NO, при хронической алкогольной интоксикации в условиях функциональной недостаточности КК, дали основания предположить, что активность КК определяет выраженность процессов детоксикации и оксидативного стресса при хронической алкогольной интоксикации. Учитывая, что как депрессия КК GdCl_3 , так и угнетение NO-синтазы L-NAME ослабляет гепатотоксическое действие этанола, а также его угнетающее влияние на процессы детоксикации и активность процессов ПОЛ, были основания полагать, что продукция КК NO может иметь значение в реализации влияния этанола на процессы детоксикации и ПОЛ в печени.

Таким образом, выявленные неизвестные ранее особенности изменения детоксикации и процессов ПОЛ в печени при хронической алкоголизации животных в условиях как функциональной недостаточности КК, так и угнетения синтеза NO, дают основания заключить, что активность КК и процесс образования

NO имеют важное значение в механизмах изменения активности ПОЛ и детоксикации в печени при хронической этаноловой интоксикации.

Литература

1. А. с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50. Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях / В. М. Моин, В. В. Николайчик, В. В. Кирковский и др. – № 4323421/28-14; заявлено 02.11.87; Опубл. 07.11.87. Бюл. № 41 // Открытия. Изобретения. – 1987. – № 41. – С. 415.
2. А. с. 1146570 СССР, МКИ 6 01 № 1/28. Способ определения токсичности биологических жидкостей / О. А. Радькова, Г. А. Бояринов, И. Н. Балишина – № 3458007/28-13; заявлено 18.06.84; Опубл. 23.03.85. Бюл. № 11 // Открытия. Изобретения. – 1985. – № 11. – С. 616.
3. Буко, В. У. Метаболические последствия алкогольной интоксикации / В. У. Буко, О. Я. Лукивская, А. М. Хоха. – Минск, 2005. – 208 с.
4. Висмонт, Ф. И. О роли клеток Купфера и гепатоцитов в механизмах реализации влияния триодтиронина на процессы детоксикации и регуляции температуры тела / Ф. И. Висмонт, С. А. Артюшкевич // Белорусский медицинский журнал. – 2005. – Т. 13, № 3. – С. 45–47.
5. Висмонт, Ф. И. Роль клеток Купфера и α_1 -антитрипсина плазмы крови в регуляции детоксикационной функции печени, формировании тиреоидного статуса и терморегуляции при бактериальной эндотоксинемии / Ф. И. Висмонт, М. А. Глебов // Медицинский журнал. – 2013. – № 4 (46). – С. 54–57.
6. Костюк, В. А. Спектрофотометрическое определение диеновых конъюгатов / В. А. Костюк // Вопросы мед. химии. – 1984. – № 4. – С. 125–127.
7. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени / Д. Н. Маянский // Пат. физиол. и эксперим. медицина. – 1985. – № 4. – С. 80–86.
8. 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.
9. Fletcher, B. L. Fluorescent products of lipid peroxidation of mitochondria and microsomes / B. L. Fletcher, C. L. Dillard, A. L. Tappel // Analyt. Biochem. – 1973. – Vol. 52, № 1. – P. 1–9.
10. Mihara, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test / M. Mihara, T. Uchiyama // Analyt. Biochem. – 1978. – Vol. 86, № 1. – P. 271–278.
11. Moncada, C. Ethanol-derived immunoreactive species formed by free radical mechanisms / C. Moncada, V. Torres, G. Varghese, E. Albano, Y. Israel // Mol. Pharmacol. – 1994. – Vol. 46. – P. 786–791.
12. Moshage, H. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et al.] // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, № 6. – P. 892–896.
13. Scibior, D. Arginine – metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czeczot // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2004. – Vol. 58. – P. 321–332.
14. Tapra, G. Kupffer cells function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat / G. Tapra, I. Pepper, G. Smok, L. A. Videla // Free Radic. Res. – 1997. – Vol. 26(3). – P. 267–279.
15. Volmar, B. Modulation of Kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats / B. Volmar, D. Rettinger, G. A. Wanner [et al.] // Shock. – 1996. – Vol. 6, № 6. – P. 434–441.

Поступила 13.06.2016 г.