

ВОЗМОЖНОЕ ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ СНИЖЕНИЯ СЫВОРОТОЧНОЙ АКТИВНОСТИ АЛАНИНАМИНОТРАНСФЕРАЗЫ

Хрипач Л.В.¹, Алексеева А.В.¹, Савостикова О.Н.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, e-mail: LKhripach@cspmz.ru

Увеличение сывороточной активности аланинаминотрансферазы (АЛТ_{сыв}) используется в настоящее время в клинической диагностике как один из основных маркеров повреждения гепатоцитов. Однако имеются данные, полученные в опытах на животных и рыбах, что токсичность различных химических веществ может проявляться и в снижении этого показателя. Цель исследования – изучить динамику изменения АЛТ_{сыв} с анализом зависимостей доза-время-эффект в хронических экспериментах по введению крысам ряда химических препаратов. Самцам крыс в течение 6 месяцев вводили с питьевой водой: сульфат серебра (0,01; 0,05; 0,5 и 5 мг/л), наночастицы серебра (НЧС, в тех же концентрациях), углеродные нанотрубки (0,75 и 1,5 мг/л), активированный уголь (0,15 и 0,3 мг/л) и карбонат кальция (3 мг/л). Для всех экспериментальных воздействий выявлен двухфазный характер изменения АЛТ_{сыв} – снижение на ранних сроках (2 и 5 недель) и увеличение на поздних (3 и 6 месяцев), с наиболее выраженными изменениями для сульфата серебра и наименее выраженными для НЧС. Анализ зависимостей доза-время-эффект вкуче с экспортным характером участия АЛТ печени в цикле Кэхилла свидетельствует о том, что снижение АЛТ_{сыв} отражает раннюю стадию повреждения гепатоцитов с подавлением экспрессии специализированного гена *ALTI* (и, по-видимому, других экспортных генов) с целью высвобождения ресурсов для собственной репарации. Полученные результаты позволяют предположить, что монотонное снижение АЛТ_{сыв} от года к году или наличие U-образной адаптационной петли могут оказаться ранними клинико-диагностическими маркерами повреждения клеток печени при профилактических осмотрах групп населения повышенного риска, подвергающихся воздействию профессиональных факторов в связи с проживанием в экологически неблагоприятных регионах или длительно принимающих гепатотропные лекарственные средства.

Ключевые слова: клинико-лабораторная диагностика, заболевания печени, аланинаминотрансфераза, крысы, хронический эксперимент, зависимости доза-время-эффект, цикл Кэхилла.

POSSIBLE DIAGNOSTIC SIGNIFICANCE OF A DECREASE IN SERUM ALANINE AMINOTRANSFERASE ACTIVITY

Khripach L.V.¹, Alekseeva A.V.¹, Savostikova O.N.¹

¹ Federal State Budgetary Institution “Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks” of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, e-mail: LKhripach@cspmz.ru

An increase in the serum activity of alanine aminotransferase (ALT_{ser}) is currently used in clinical diagnostics as one of the main markers of hepatocyte damage. However, there is evidence from animal and fish experiments that the toxicity of various chemicals may also be reduced. The aim of the study was to analyze dynamics of ALT_{ser}, with corresponding dose-time-effect relationships, in chronic toxicological experiments on rats treated with a number of chemicals. Male rats were received with drinking water for 6 months: silver sulfate (0.01; 0.05; 0.5 and 5 mg/L), silver nanoparticles (AgNP, in the same concentrations), carbon nanotubes (0.75 and 1.5 mg/L), activated carbon (0.15 and 0.3 mg/L) and calcium carbonate (3 mg/L). For all preparations, a two-phase character of ALT_{ser} change was revealed - a decrease in early period (2 and 5 weeks) and an increase in late period (3 and 6 months), with the most pronounced changes for silver sulfate and the least pronounced for AgNP. Dose-time-effect relationships, coupled with the clear export nature of liver ALT participation in the Cahill cycle, allows us to assume that a decrease in ALT_{ser} reflects an early stage of hepatocytes damage, with suppression of specialized *ALTI* expression (and, apparently, of other export genes), in order to free up resources for their own reparation. The results obtained suggest that monotonous decrease in ALT_{ser} from year to year or U-shaped adaptive loop may be early diagnostic markers of liver cell damage during preventive examinations of high-risk populations, exposed to occupational factors, living in polluted environment or taking hepatotropic drugs for a long time.

Keywords: laboratory diagnostics, liver diseases, alanine aminotransferase, rats, chronic experiment, dose-time-effect dependencies, Cahill cycle.

Увеличение сывороточной активности аланинаминотрансферазы (АЛТ_{сыв}) используется в настоящее время в клинической диагностике как один из основных маркеров повреждения гепатоцитов, в том числе при диагностике заболеваний печени [1], отводе регулярных доноров [2] и принятии решений о прекращении разработки или удалении из оборота гепатотоксичных лекарственных средств [3, с. 241]. Диагностическая значимость этого критерия основана на высоком уровне экспрессии гена *ALT1*, кодирующего цитозольный изофермент АЛТ, в клетках печени. При повреждении гепатоцитов факторами любой этиологии (химическими веществами, вирусами, аутоиммунными реакциями и т.д.) количество разрушающихся клеток в единицу времени начинает увеличиваться по сравнению с фоновыми значениями, обусловленными нормальным физиологическим процессом репопуляции, что вызывает увеличение содержания АЛТ в межклеточной жидкости и плазме крови. Снижение АЛТ_{сыв} наблюдается на поздних стадиях цирроза, когда значительно уменьшается количество функционирующих гепатоцитов, и при недостаточном поступлении в организм витамина В₆ (кофактора трансаминаз пиридоксаль 5'-фосфата).

Нормальными величинами АЛТ_{сыв} являются значения ниже 40 Ед/л у мужчин и ниже 31 Ед/л у женщин. Нижнюю границу нормы, составляющую для здоровых людей 5–10 Ед/л, часто не указывают, поскольку клинически значимым изменением маркера считается только увеличение. Тем не менее, в опытах на животных и других биологических моделях токсичность различных химических веществ (пестицидов, тяжелых металлов, лекарственных препаратов, природных токсинов и т.д.) нередко проявляется в снижении АЛТ_{сыв} вместо ожидаемого увеличения [4, 5, 6]. Таких случаев выявлено намного меньше, чем случаев увеличения показателя, но становится очевидным, что это не артефакты, а реальные, хотя и мало предсказуемые изменения, не связанные с определенной химической структурой токсиканта или определенным биологическим объектом [7, 8].

Большой вклад в легализацию этих данных внесла публикация Солтера с соавт. [9], в которой были сделаны первые шаги в попытке объяснения выявленного феномена: снижение активности АЛТ в печени крыс при введении им токсина синезеленых водорослей объясняется не ингибированием активного центра фермента, а подавлением экспрессии соответствующего гена, с параллельным дозозависимым снижением активности, количества белка и специфической мРНК АЛТ. Позднее нигерийские токсикологи Ojezele и Abatan [10], обсуждая свои данные по снижению АЛТ_{сыв} у цыплят под воздействием пестицидов и учитывая статью Солтера, высказали предположение о том, что снижение АЛТ_{сыв} отражает раннюю стадию повреждения гепатоцитов с подавлением их функциональной активности, но еще до нарушения целостности наружных мембран. Тем не менее, в рамках обычных токсикологических экспериментов длительностью от 4 суток до 2 месяцев (чаще всего 2–3

недели), включая и данные [10], выявлялись только однонаправленные эффекты – или снижение активности АЛТ, или ее увеличение.

Изучая токсичность наноматериалов и их аналогов иной степени дисперсности в хронических экспериментах на крысах длительностью 6 месяцев, авторы впервые обнаружили двухстадийные изменения АЛТ_{сыв} подопытных животных – сначала снижение, а затем увеличение [11, 12]. Этот факт был упомянут в текстах обеих статей, но подробному анализу зависимостей доза-время-эффект подвергались только целевые показатели окислительного стресса.

Цель данного исследования – изучить динамику изменения АЛТ_{сыв} с анализом зависимостей доза-время-эффект в хронических экспериментах по введению крысам ряда химических препаратов.

Материал и методы исследования. В работе использовали пять химических препаратов, описанных в таблице 1; там же приведены сокращенные названия, под которыми они будут упоминаться в тексте.

Препараты вводили крысам с питьевой водой в течение 6 месяцев. Каждая группа крыс состояла из 6 белых нелинейных самцов разводки питомника «Столбовая» с исходной массой 160–180 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария с безлимитным доступом к питьевой воде.

Таблица 1

Характеристики препаратов, вводившихся крысам с питьевой водой

Препарат	Сокращ. название	Производитель, характеристики	Концентрации в питьевой воде
Сульфат серебра Ag ₂ SO ₄	СС	АО «Ленреактив», марка «хч»	0,01; 0,05; 0,5 и 5 мг Ag/л воды
Наночастицы серебра	НЧС	ООО «Сентоза Факторинг НП», Ø 14±2 нм	0,01; 0,05; 0,5 и 5 мг Ag/л воды
Углеродные нанотрубки («Таунит»)	УНТ	ООО «НаноТЦ», Ø 15 – 40 нм	0,75 и 1,5 мг/л воды
Активированный уголь («Флотосорб А»)	АУ	АО «Сорбент», частицы 10–100 мкм	0,15 и 0,3 мг/л воды
Карбонат кальция («Мицеллат»)	М	ООО «Славянская аптека», коллоидный препарат меловых отложений, частицы 0,3–1,2 мкм	3 мг Са/л воды

Пробы крови отбирали из подъязычной вены крыс через 2, 5, 12 и 24 недели после начала опыта. Активность АЛТ в сыворотках определяли на биохимическом анализаторе ChemWell Combi 2910 (Awareness, USA) с использованием тест-наборов ЗАО «Вектор-Бест» «Трансаминаза-АЛТ-Ново» (В-8016), основанных на определении 2,4-динитрофенилгидразона пировиноградной кислоты методом Райтмана–Френкеля.

Математический анализ полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Statistica for Windows v. 7.0. Для оценки статистической значимости различий использовали двусторонний тест Манна–Уитни.

Результаты исследования и их обсуждение. Четыре из пяти изучаемых препаратов представляли собой коллоидные растворы нано- (НЧС, УНТ) или микрочастиц (АУ, М). Однако полученные данные не обусловлены специфическим воздействием частиц, поскольку наиболее активным препаратом – с точки зрения времени возникновения и амплитуды изменений АЛТ_{сыв} – оказался раствор СС (табл. 2). В таблице 2 полученные данные представлены в формализованном виде – показаны только те экспериментальные точки, в которых содержание АЛТ_{сыв} статистически значимо отличалось от соответствующего контроля. На ранних сроках экспериментального воздействия (через 5 недель для всех изучаемых препаратов и уже через 2 недели для СС) происходило снижение АЛТ_{сыв}, а на более поздних сроках – 3 и 6 месяцев – увеличение (для НЧС увеличение было слабым и не достигло уровня статистической значимости). Таким образом, впервые экспериментально показано, что снижение и увеличение сывороточной активности АЛТ в ответ на введение токсичных соединений – это не противоположные реакции, а две стадии одного и того же процесса.

Таблица 2

Статистически значимые изменения АЛТ_{сыв} (в % от контрольных значений) при хроническом введении крысам изучаемых препаратов с питьевой водой

Время	С, мг/л	СС ^{а)}	НЧС ^{а)}	АУ ^{б)}	УНТ ^{в)}	М ^{г)}
2 недели	С1					
	С2	64,9 ↓				-
	С3			-	-	-
	С4	44,8 ↓		-	-	-
5 недель	С1	70,6 ↓	83,2 ↓	62,2 ↓	54,6 ↓	61,8 ↓
	С2		74,0 ↓	60,0 ↓	57,6 ↓	-
	С3			-	-	-
	С4			-	-	-
3 месяца	С1	148,5 ↑		139,3 ↑	131,3 ↑	139,6 ↑

	C ₂	135,3 ↑		139,6 ↑	138,9 ↑	-
	C ₃			-	-	-
	C ₄			-	-	-
6 месяцев	C ₁	138,7 ↑				140,5 ↑
	C ₂			126,2 ↑		-
	C ₃			-	-	-
	C ₄			-	-	-

Примечания

1. Концентрации препаратов в питьевой воде составляли:

^{a)} C₁-C₄ (0,01; 0,05; 0,5 и 5 мг/л в пересчете на Ag)

^{b)} C₁, C₂ (0,15 и 0,3 мг/л)

^{c)} C₁, C₂ (0,75 и 1,5 мг/л)

^{e)} C₁ (3 мг/л в пересчете на Ca)

2. Пустые клетки означают отсутствие статистически значимых отличий активности АЛТ в данной экспериментальной группе крыс от соответствующего контроля. Знаком дефиса отмечены неиспользовавшиеся экспериментальные варианты.

3. Все табличные данные, кроме относящихся к мицеллату (М), опубликованы ранее вместе с 10 другими показателями в статьях [11, 12] с небольшими числовыми расхождениями (кратность различий по отношению к контролю определялась в [11, 12] по соотношению средних значений, а в таблице 2 – по соотношению медиан).

На рисунках 1 и 2 приведены зависимости доза-эффект и время-эффект для животных, которым вводили СС в концентрациях от 0,01 до 5 мг/л. Через 2 недели после начала введения крысам СС (рис. 1А) наблюдалось монотонное снижение АЛТ_{сыв}, связанное с концентрацией препарата в питьевой воде логарифмической зависимостью:

$$\text{АЛТ}_{\text{сыв}} (\text{Ед/л}) = -1,302 \ln C (\text{мг/л}) + 12,299 (R^2 = 0,9619).$$

На сроке 5 недель эта монотонная зависимость превращалась в типичную адаптационную петлю (рис. 1Б), возникающую из-за различий в скорости изменения маркера при разных концентрациях действующего вещества. Как это видно из сравнения графиков 1Б и 2Б, на сроке 5 недель у животных, получавших СС в самой низкой концентрации (0,01 мг/л), еще продолжается адаптивное снижение активности АЛТ, а при более высоких концентрациях уже начинается противоположный процесс – увеличение данного маркера, хотя все экспериментальные точки петли по-прежнему лежат ниже контроля. Аналогичная U-образная зависимость доза-эффект была получена при внесении инсектицида дельтаметрина в аквариумы с рыбками *Rhamdia quelen* [6].

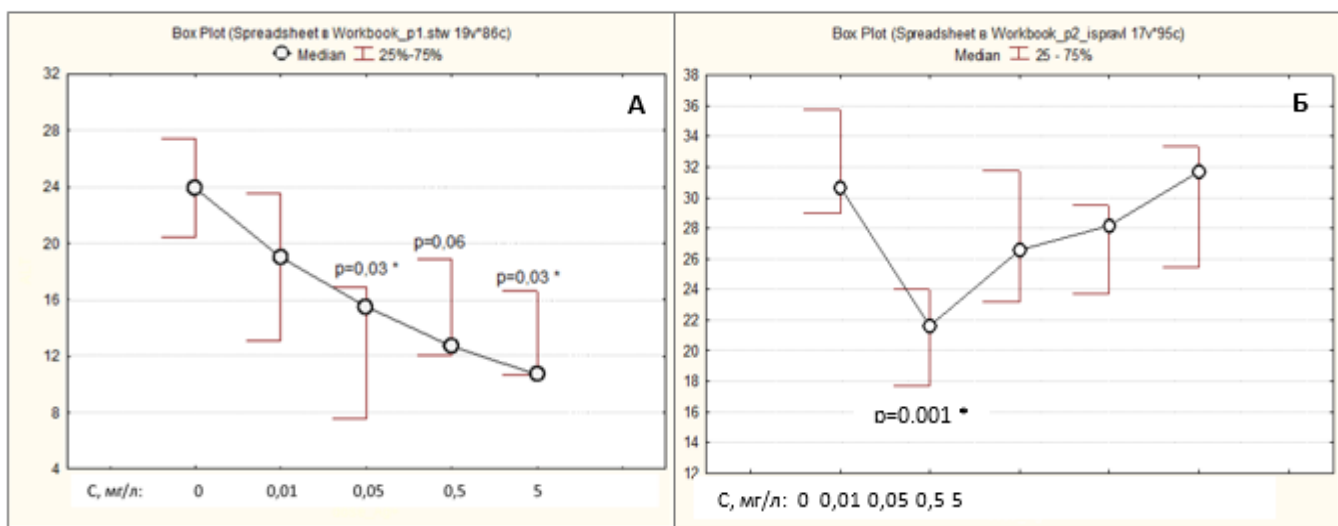


Рис. 1. Зависимости доза-эффект для АЛТ_{сыв} через 2 недели (А) и 5 недель (Б) после начала введения крысам СС в концентрациях от 0,01 до 5 мг/л

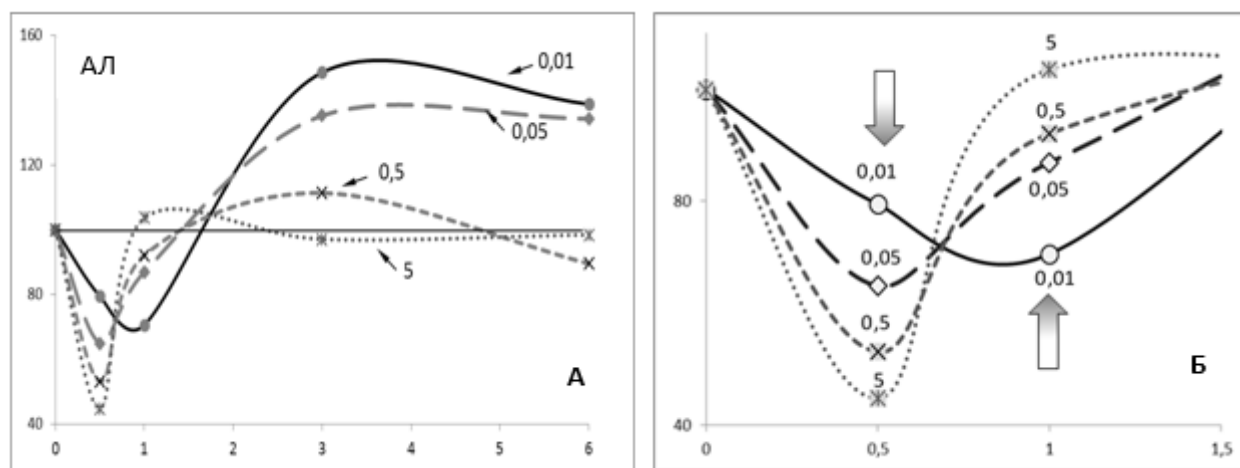


Рис. 2. Зависимости время-эффект (в % от контрольных значений АЛТ_{сыв} на этот же срок) при введении крысам СС в концентрациях от 0,01 до 5 мг/л. По оси абсцисс – время в месяцах. А – полная зависимость, Б – увеличенный фрагмент двух первых временных точек

Объяснить механизм возникновения вышеописанных изменений достаточно легко, если учесть, что катализируемая АЛТ реакция трансаминирования обратима (рис. 3А) и идет в печени и мышцах в противоположные стороны, образуя так называемый глюкозо-аланиновый цикл, или цикл Кэхилла (рис. 3Б). Биологический смысл этого цикла заключается в том, что избыток пирувата, образующийся в мышцах из глюкозы при высокой нагрузке, превращается митохондриальным изоферментом АЛТ в аминокислоту аланин. Аланин действует как челнок – он покидает мышечную клетку и с кровотоком перемещается в печень, где цитозольный изофермент АЛТ катализирует обратную реакцию, превращая его в пируват,

из которого затем образуется глюкоза. Таким образом, в печени АЛТ катализирует специализированную экспортную реакцию, которая не нужна гепатоцитам для выживания, а направлена на создание условий для усиленного снабжения мышц глюкозой. Поэтому снижение экспрессии специализированного гена *ALTI* на ранней стадии повреждения гепатоцитов представляется рациональным регуляторным решением, поскольку они получают возможность репарировать собственные повреждения, временно снизив обслуживающие функции.

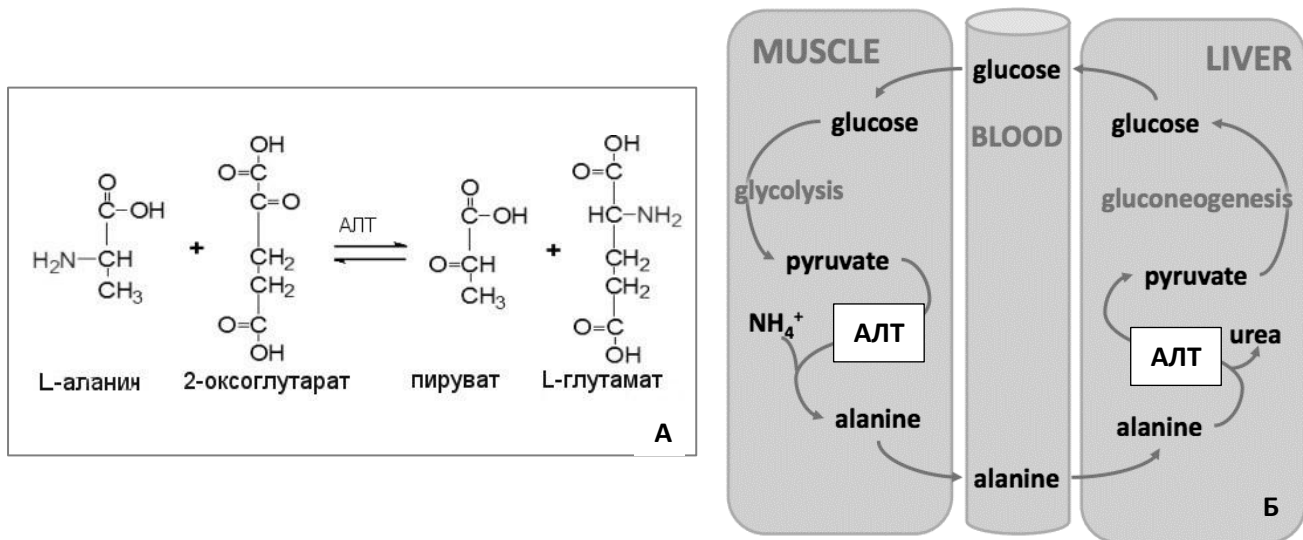


Рис. 3. Катализируемая АЛТ реакция трансминирования.

А) Обратимость реакции – в мышцах она идет справа налево, в печени – слева направо.

Б) Схема глюкозо-аланинового цикла (цикла Кэхилла)

Полученные данные позволяют предположить, что снижение АЛТ_{сыв} может оказаться клинико-диагностическим маркером ранней стадии повреждения гепатоцитов. Можно также предположить, что на этой стадии будет наблюдаться некоторое физическое ослабление пациентов, по крайней мере, с точки зрения индивидуальной выносливости. Однако вряд ли можно рассчитывать, что для целей диагностики достаточно будет только уточнить и ввести в практику определенное значение нижней границы АЛТ_{сыв} у здоровых людей. Сывороточная активность АЛТ зависит от генетического полиморфизма большого количества регуляторных, структурных и транспортных белков, определяющих запас прочности мембран гепатоцитов и момент их «пробоя» [13, 14]. В результате этот показатель имеет широкий диапазон нормы со скошенным влево распределением и длинным (примерно до 100 Ед/л) «хвостом», в котором находится 5–7% здоровых людей – носителей более редких наследственных сочетаний [15]. Эти объективные обстоятельства приводят к периодическим дискуссиям о пересмотре

верхней границы нормального диапазона АЛТ_{сыв}, но тем более не позволят ввести твердую нижнюю границу для относительно небольших адаптивных изменений.

Однако в тех случаях, когда есть возможность отследить динамику изменения АЛТ_{сыв} у конкретного человека, описанные в данной статье изменения могут оказаться полезными для ранней диагностики заболеваний печени. АЛТ_{сыв} – один из обязательных биохимических показателей при профилактических и диспансерных осмотрах широких контингентов людей, в том числе и работающих во вредных условиях. В отличие от опытов на животных, пусть и хронических, развитие повреждения печени у людей может занимать годы, а не месяцы. Монотонное снижение АЛТ_{сыв} от года к году или характерная адаптационная петля могут оказаться своевременным показанием для углубленного обследования состояния печени данного человека. Аналогичные, но более быстрые изменения будут наблюдаться и при длительном приеме лекарственных средств, потенциально способных повреждать гепатоциты. Одна из целей данной публикации – привлечь к полученным авторами данным внимание врачей клинической лабораторной диагностики, которые могут продолжить эти исследования на практическом уровне.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что снижение сывороточной активности АЛТ может оказаться ранним клинико-диагностическим маркером повреждения клеток печени при профилактических осмотрах групп населения повышенного риска, в том числе проживающих в экологически неблагоприятных регионах, подвергающихся воздействию профессиональных факторов или длительно принимающих гепатотропные лекарственные средства.

Список литературы

1. Маршалл В.Дж. Клиническая биохимия (пер. с англ., 6-е издание). М.: Бином, 2023. 408 с.
2. Кузнецов С.И., Кудинова Е.В., Жибурт Е.Б. Повышение активности аланинаминотрансферазы как причина отстранения регулярных доноров // Трансфузиология. 2020. № 21 (3). С. 239-244.
3. Yang X., Schnackenberg L.K., Shi Q., William F. Salminen W.F. Hepatic toxicity biomarkers. In: Gupta R.C. (Ed) Biomarkers in Toxicology. Academic Press, 2014. 1128 p. DOI: 0.1016/C2012-0-01373-7.
4. da Silva M.G., Amorim R.N., Câmara C.C., Fontenele J.D., Soto-Blanco B. Acute and sub-chronic toxicity of aqueous extracts of *Chenopodium ambrosioides* leaves in rats // Journal of Medicinal Food. 2014. Vol. 17. Is. 9. P. 979-984. DOI: 10.1089/jmf.2013.0134.

5. Gholami R., Davoodi R., Oujifard A., Nooryazdan H. Chronic effects of NeemAzal on biochemical parameters of grass carp, *Ctenopharyngodon idella* // *Aquaculture Research*. 2016. Vol. 47. Is. 1-6. P. 3867–3872. DOI: 10.1111/are.12837.
6. Galeb L.D., Ganeco L.N., Fredianelli A.C., Wagner R., Fam A.L., Rocha D.C., Kirschnik P.G., Pimpao C.T. Acute intoxication by deltamethrin in jundia: emphasis on clinical, biochemical and haematological effects // *Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology*. 2013. Vol. 2. Is. 3. P. 60–67.
7. Shahjahan M., Islam M.J., Hossain M.T., Mishu M.A., Hasan J., Brown C. Blood biomarkers as diagnostic tools: An overview of climate-driven stress responses in fish // *Science of the Total Environment*. 2022. Vol. 843. P. 156910. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.156910.
8. Rossato L.G., Costa V.M., Dallegrave E., Arbo M., Dinis-Oliveira R.J., Santos-Silva A., Duarte J.A., de Lourdes M., Palmeira C., Remião F. Cumulative mitoxantrone-induced haematological and hepatic adverse effects in a subchronic in vivo study // *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*. 2014. Vol. 114. Is. 3. P. 254-262. DOI: 10.1111/bcpt.12143.
9. Solter P., Liu Z., Guzman R. Decreased hepatic ALT synthesis is an outcome of subchronic microcystin-LR toxicity // *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2000. Vol. 164. Is. 2. P. 216-220. DOI: 10.1006/taap.2000.8895.
10. Ojezele M.O., Abatan O. Toxicological effects of chlorpyrifos and methidathion in young chickens // *African Journal of Biochemistry Research* 2009. Vol. 3. Is. 3. P. 048-051.
11. Рахманин Ю.А., Хрипач Л.В., Михайлова Р.И., Коганова З.И., Князева Т.Д., Железняк Е.В., Савостикова О.Н., Алексеева А.В., Воинова И.В., Круглова Е.В. Сравнительный анализ влияния нано- и ионной форм серебра на биохимические показатели лабораторных животных // *Гигиена и санитария*. 2014. № 1. С. 45-50.
12. Хрипач Л.В., Рахманин Ю.А., Михайлова Р.И., Князева Т.Д., Коганова З.И., Железняк Е.В., Савостикова О.Н., Алексеева А.В., Каменецкая Д.Б., Рыжова И.Н., Круглова Е.В., Ревазова Т.Л. Влияние углеродных нанотрубок и активированного угля на биохимические показатели состояния организма при хроническом введении препаратов крысам с питьевой водой // *Гигиена и санитария*. 2014. № 5. С.36-43.
13. Yuan X., Waterworth D., Perry J.R., Lim N., Song K., Chambers J.C., Zhang W., Vollenweider P., Stirnadel H., Johnson T., Bergmann S., Beckmann N.D., Li Y., Ferrucci J.L., Melzer D., Hernandez D., Singleton A., Scott J., Elliott P., Waeber G., Cardon L., Frayling T.M., Kooner J.S., Mooser V. Population-based genome-wide association studies reveal six loci influencing plasma levels of liver enzymes // *American Journal of Human Genetics*. 2008. Vol. 83. Is. 4. P. 520-528. DOI: 10.1016/j.ajhg.2008.09.012.

14. Ward L.D., Tu H.C., Quenneville C.B., Tsour S., Flynn-Carroll A.O., Parker M.M., Deaton A.M., Haslett P.A., Lotta L.A., Verweij N., Ferreira M.A. GWAS of serum ALT and AST reveals an association of SLC30A10 Thr95Ile with hypermanganesemia symptoms // *Nature Communications*. 2021. Vol. 12. Is. 1, P. 4571-4585. DOI: 10.1038/s41467-021-24563-1.
15. Johnston D.E. Special considerations in interpreting liver function tests // *American Family Physician*. 1999. Vol. 59. Is. 8. P. 2223-2230.