

*Н.А. Степанова, М.А. Глебов, Ф.И. Висмонт*

## **Об участии монооксида азота в механизмах формирования тиреоидного статуса и терморегуляторных реакций организма на действие бактериального эндотоксина в условиях токсического поражения печени**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

В опытах на крысах и кроликах выявлено, что в условиях острого токсического поражения печени четыреххлористым углеродом у животных снижается уровень трийодтиронина в плазме крови и температура тела. При повреждении печени четыреххлористым углеродом действие бактериального эндотоксина не только не вызывает повышения температуры тела, но и усугубляет нарушения тиреоидного статуса и гипотермию, вызываемые гепатотропным ядом. Угнетение активности NO-синтазы ослабляет изменения тиреоидного статуса и температуры тела, вызываемые четыреххлористым углеродом.

Ключевые слова: монооксид азота, трийодтиронин, терморегуляция, бактериальная эндотоксинемия, токсическое поражение печени

Рядом исследований показано, что печень играет важную роль в метаболизме гормонов щитовидной железы, обеспечивая регуляцию их обмена и поддержание оптимальной концентрации в крови [7, 9]. Установлено, что от функционального состояния печени зависит активность процессов теплообмена [2, 5] и дейодирования йодсодержащих гормонов щитовидной железы [9], участвующих в регуляции температуры тела [1, 3, 8]. Многочисленные данные клинических и экспериментальных исследований свидетельствуют, что монооксид азота (NO), являясь высокоэффективным регулятором процессов жизнедеятельности, играет важную роль в регуляции функционального состояния печени [3, 6], терморегуляции [3, 4], в патогенезе эндотоксинемии [2, 3].

Установлено, что при бактериальной эндотоксинемии изменяется активность системы гипофиз - щитовидная железа [2, 3] и повышается уровень продуктов деградации NO [10]. Однако значимость функционального состояния печени в терморегуляции при бактериальной эндотоксинемии до сих пор остается мало изученной. Участие NO в механизмах регуляции температуры тела и уровня тиреоидных гормонов при действии бактериального эндотоксина в условиях депрессии функциональной активности клеток печени не было предметом специального комплексного исследования.

Целью исследования было выяснение роли NO в механизмах формирования тиреоидного статуса и терморегуляторных реакций организма на действие бактериального эндотоксина в условиях токсического поражения печени.

Материалы и методы. Опыты выполнены на 56 взрослых ненаркотизированных белых крысах самцах массой 160-220 г и 27 кроликах самцах массой 2,5-3,5 кг. Животные до постановки эксперимента адаптировались к условиям вивария.

Опыты проводили в строго определенное время (8-12 часов утра).

В работе использовали экспериментальные модели: эндотоксиновой лихорадки, гипертиреоза, острого токсического поражения печени.

Для создания модели эндотоксиновой лихорадки у животных применяли бактериальный липополисахарид (ЛПС) пирогенал (филиал «МЕДГАМАЛ» НИИЭМ РАМН, Россия), который вводили кроликам в краевую вену уха в дозе 0,5 мкг/кг, крысам внутривенно в дозе 5,0 мкг/кг. Острое токсическое поражение печени вызывали интрагастральным введением животным раствора четыреххлористого углерода (CCl<sub>4</sub>), приготовленного на подсолнечном масле в соотношении 1:1, из расчета 5,0 мл/кг крысам и 2,0 мл/кг кроликам.

Для выяснения роли NO в процессах формирования тиреоидного статуса и терморегуляции использовали ингибитор NO-синтазы L-NNA (NG-нитро-L-аргинин). L-NNA («Sigma», USA) вводили кроликам внутривенно, крысам внутривенно в дозе 20 мг/кг.

Экспериментальный гипертиреоз у крыс воспроизводили с помощью синтетического гормона трийодтиронина гидрохлорида (Lyothyronine «Berlin-Chemie», Германия), который на 1% крахмальном растворе вводили зондом в полость желудка крысам ежедневно в дозе 30 мкг/кг в течение 20 дней.

У крыс и кроликов температуру кожи, как и ректальную температуру (температуру в прямой кишке на глубине 3,0 и 5,0 см соответственно), измеряли электротермометром ТПЭМ-1.

О тяжести поражения печени судили по активности в плазме крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ), а также по отношению АлАТ/АсАТ. Определение активности АлАТ и АсАТ в плазме крови проводили колориметрически динитрофенилгидразиновым методом. Содержание в плазме крови тиреотропного гормона (ТТГ) и йодсодержащих гормонов щитовидной железы (трийодтиронина – Т3, тироксина – Т4) определяли радиоиммунным методом при помощи тест-наборов ХОП ИБОХ НАН Беларуси. Все полученные данные обработаны с помощью общепринятых методов вариационной статистики. Достоверность отличий между двумя группами показателей оценивали по t-критерию Стьюдента для независимых выборок. Все данные представлены в виде среднего арифметического и ошибки среднего арифметического ( $\bar{x} \pm s_x$ ). Результаты считали статистически значимыми при значении  $p < 0,05$ .

Результаты и обсуждение. В опытах на крысах и кроликах показано, что функциональное состояние печени имеет важное значение в формировании тиреоидного статуса организма и терморегуляторных реакций при действии бактериального эндотоксина.

Установлено, что внутривенное введение крысам (n=12) ЛПС (5,0 мкг/кг) приводит к медленному нарастанию температуры тела и слабовыраженной гипертермии. Температура тела повышалась на 1,3 °С ( $p < 0,05$ ) и 1,2 °С ( $p < 0,05$ ) через 120 и 180 мин после инъекции экзопирогена и составляла  $38,9 \pm 0,1$  °С и  $38,8 \pm 0,12$  °С. Введение в кровотоки ЛПС (0,5 мкг/кг) кроликам (n=9) приводило к быстрому и значительному повышению у животных ректальной температуры. Температура тела возрастала на 0,6 °С ( $p < 0,05$ ), 1,3 °С ( $p < 0,05$ ) и 1,6 °С ( $p < 0,05$ )

через 30, 60 и 120 мин после введения эндотоксина.

Выявлено, что в условиях эндотоксиновой лихорадки повышается активность системы гипофиз-щитовидная железа. Действие ЛПС (5,0 мкг/кг) у крыс (n=10) приводило через 120 и 180 мин после введения экзопирогена к повышению уровня ТТГ в плазме крови на 33,3% (p<0,05) и 38,5% (p<0,05) по сравнению с контролем, соответственно. В этих условиях у крыс, через 180 мин от момента инъекции эндотоксина, содержание Т3 в крови снижалось на 30,2% (p<0,05), а концентрация Т4 возрастала на 24,3% (p<0,05). Введение ЛПС (0,5 мкг/кг) в кровотоки кроликам (n=6) приводило через 30 и 60 мин после инъекции, к повышению на 20,1% (p<0,05) и 25,3% (p<0,05) уровня ТТГ в плазме крови, в то время как содержание Т4 понижалось на 49,9% (p<0,05) и 21,5% (p<0,05), соответственно. Концентрация Т3 в крови у животных понижалась на 31,4% (p<0,05) через 60 мин от момента инъекции препарата по сравнению с животными контрольной группы. Содержание ТТГ, Т3 и Т4 в плазме крови у животных контрольной группы (n=8) через 30 и 60 мин после введения в кровотоки апирирогенного физиологического раствора, составляло: 31,2±2,15 мМЕ/л, 8,9±0,63 нМоль/л, 72,1±12,30 нМоль/л и 30,5±2,84 мМЕ/л, 8,5±0,60 нМоль/л, 73,6±10,21 нМоль/л.

В литературе имеются многочисленные сведения о том, что от функционального состояния печени зависит активность процессов дейодирования и деградации йодсодержащих гормонов щитовидной железы [7, 9]. В последние годы [2, 5] показана зависимость между значениями температуры тела в условиях эндотоксиновой лихорадки и функциональным состоянием печени.

Были основания полагать, что функциональное состояние печени будет сказываться на температуре тела, тиреоидном статусе организма и характере формирования терморегуляторных реакций у крыс и кроликов при действии ЛПС. Опыты выполненные на крысах и кроликах, в условиях поражения печени СС14, подтвердили сделанное предположение.

Так, в опытах на крысах установлено, что острое токсическое поражение печени СС14 сопровождается угнетением процессов теплообмена и снижением температуры тела. Затравка крыс СС14 (5,0 мл/кг), через 24 и 48 часов от момента введения гепатотропного яда, приводила к снижению температуры тела на 1,2±0,13 °С (n=12) и 1,5±0,13 °С (n=10), соответственно. Интрагастральное введение масляного раствора СС14 (2,0 мл/кг) кроликам, вызывало у животных (n=7) снижение ректальной температуры на 1,4±0,11 °С через 12 часов и на 1,6±0,12 °С через 24 часа после введения препарата.

Исследования, выполненные на крысах и кроликах показали, что развитие гипотермии в условиях поражения печени СС14, сопровождается выраженным угнетением системы гипофиз-щитовидная железа. Интрагастральное введение крысам гепатотропного яда в дозе 5,0 мл/кг приводило, через 24 и 48 часов после затравки, к снижению по сравнению с контролем (введение в желудок подсолнечного масла) в плазме крови у животных содержания ТТГ, Т3 и Т4 на 28,6% (p<0,05, n=10) и 43,0% (p<0,05, n=9), 44,3% (p<0,05, n=10) и 50,8% (p<0,05, n=9), 62,7% (p<0,05, n=10) и 39,6% (p<0,05, n=9). Уровень ТТГ, Т3 и Т4 в крови у кроликов через 24 часа после интрагастрального введения масляного раствора

СС14 (2,0 мл/кг) понижался на 28,1% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ), 42,0% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) и 30,3% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ), соответственно, и составлял  $23,4 \pm 3,08$  мМЕ/л,  $4,3 \pm 0,46$  нМоль,  $39,7 \pm 5,88$  нМоль/л.

В опытах на крысах и кроликах обнаружено, что пиретическая реакция на ЛПС предупреждается предварительным интрагастральным введением животным, за 24 часа до инъекции ЛПС, раствора СС14. Показано, что действие ЛПС в этих условиях не только не вызывает повышения температуры тела, но и сопровождается более значительным снижением в плазме крови концентрации ТЗ и повышением, а не понижением, как у животных контрольной группы, в ней концентрации Т4.

В опытах на кроликах ( $n=8$ ) показано что, лихорадочная реакция, вызываемая введением ЛПС, ослабляется предварительным введением в организм животных ингибитора синтеза NO L-NNA (20 мг/кг). Так, через 120 мин после инъекции ЛПС, в условиях предварительного (за 30 мин до инъекции эндотоксина) введения в кровоток L-NNA ректальная температура повышалась с  $38,8 \pm 0,12$  °C до  $39,9 \pm 0,13$  °C ( $p < 0,05$ ), в то время как у животных контрольной группы ( $n=7$ ) с  $38,7 \pm 0,10$  °C до  $40,3 \pm 0,20$  °C. Установлено, что предварительное введение в организм животных ингибитора синтеза NO не только ослабляет лихорадочную реакцию на действие бактериального эндотоксина, но и препятствует активации системы гипофиз - щитовидная железа в этих условиях.

Предварительное введение в организм L-NNA (20 мг/кг) не только ослабляло лихорадочную реакцию на ЛПС, но и развитие гипотермии на интрагастральное введение СС14 у крыс. Действие СС14 в условиях предварительного внутрибрюшинного введения L-NNA, через 24 часа после введения в желудок гепатотропного яда, приводило к менее значительному, по сравнению с контролем (действие СС14) повышению активности АлАТ и АсАТ в плазме крови на 26,7%, ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) и 24,0% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), т.е. сопровождалось менее выраженным цитолизом. Обнаружено, что действие СС14 в условиях блокады синтеза NO в организме сопровождается менее значимым снижением уровня ТЗ (на 26,2%,  $p < 0,05$ ), Т4 (на 44,7%  $p < 0,05$ ) и увеличением концентрации ТТГ (на 59%  $p < 0,05$ ) в плазме крови по сравнению с соответствующим контролем (действие СС14).

Выявлено, что через 21 день после ежедневного интрагастрального введения трийодтиронина гидрохлорида в дозе 30 мкг/кг у гипертиреоидных крыс повышается температура тела на 0,7 °C ( $p < 0,05$ ,  $n=8$ ). Развитие эндотоксиновой лихорадки у гипертиреоидных крыс характеризовалось более высокими значениями температуры тела, однако, скорость подъёма температуры не изменялась. Установлено, что введение трийодтиронина гидрохлорида в условиях угнетения в организме NO-синтазы (L-NNA, 20 мг/кг, внутрибрюшинно за 30 мин до введения ТЗ) не приводит к повышению температуры тела.

Учитывая полученные данные, были основания полагать, что NO участвует в механизмах реализации влияния тиреоидных гормонов на температуру тела при действии бактериальных эндотоксинов.

Подтверждение было получено в серии экспериментов, выполненных на

гипертиреоидных животных. Опыты показали, что действие бактериального эндотоксина у гипертиреоидных крыс, не получавших ингибитор NO-синтазы L-NNA, сопровождается более высокими значениями ректальной температуры, чем у эутиреоидных. В то же время обнаружено, что у животных, получавших L-NNA ежедневно в течение 20 дней за 30 мин до введения в организм трийодтиронина, на введение ЛПС (5 мкг/кг) развивается слабо выраженная лихорадочная реакция. Следовательно, депрессия активности NO-синтазы L-NNA в организме не только препятствует активации системы гипофиз – щитовидная железа и подъему температуры тела на действие бактериального эндотоксина у крыс с нормальной функцией щитовидной железы, но и у гипертиреоидных животных.

Заключение. Таким образом, выявленные особенности изменения тиреоидного статуса и формирования терморегуляторных реакций организма у крыс на действие бактериального эндотоксина в условиях острого токсического поражения печени CCl<sub>4</sub> связаны с изменением активности процессов образования монооксида азота. В условиях токсического поражения печени CCl<sub>4</sub> у крыс, предварительно получавших L-NNA, действие пирогенала не усугубляет нарушения в системе гипофиз - щитовидная железа, вызываемое гепатотропным ядом и сопровождается возникновением характерной терморегуляторной реакции на эндотоксин и развитием лихорадки. Есть основания полагать, что NO является фактором регуляции активности системы гипофиз – щитовидная железа и температуры тела при эндотоксинемии.

#### Литература

1. Божко, А. П. Значение тиреоидных гормонов в реализации защитных эффектов Холодовой адаптации / А. П. Божко, И. В. Городецкая // Патол. физиология и эксперимен. терапия. 1994. № 4. С. 29–32.
2. Висмонт, Ф. И. Механизмы изменения температуры тела у крыс и кроликов в зависимости от состояния детоксикационной функции печени и выраженности эндотоксинемии / Функциональное состояние организма в норме и при патологии: сб. науч. тр.; под ред. В. С. Улащика, А. Г. Чумака. Минск: РИВШ, 2008. С. 80–84.
3. Висмонт, Ф. И. О роли монооксида азота в регуляции детоксикационной функции печени, тиреоидного статуса и температуры тела при эндотоксиновой лихорадке / Ф. И. Висмонт, Н. А. Степанова // Белорусский медицинский журнал. 2003. № 1. С. 29–32.
4. Гурин, А. В. Функциональная роль оксида азота в центральной нервной системе / А. В. Гурин // Успехи физиол. наук. 1997. Т. 28, № 1. С. 53–58.
5. Кучук, Э. Н. Особенности формирования терморегуляторных реакций организма на действие высокой внешней температуры и эндотоксина в условиях токсического поражения печени / Э. Н. Кучук, Ф. И. Висмонт // Здравоохранение. 2001. № 7. С. 28–29.
6. Тейлор, Б. С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функция / Б. С. Тейлор, Л. Х. Аларсон, Т. Р. Биллиар // Биохимия. 1998. Т. 63,

вып. 7. С. 905–923.

7. Туракулов, Я. Х. Активность конверсии тироксина в трийодтиронин в печени и почках крыс / Я. Х. Туракулов, Т. П. Ташходжаева, Г. М. Артыкбаева // Пробл. эндокринологии. 1991. Т. 37, № 4. С. 44–46.
8. Clark, W. G. Brain and pituitary peptides in thermoregulation / W. G. Clark, J. M. Lipton // Pharmacol. Ther. 1993. Vol. 22. P. 249–297.
9. Kelly, G. S. Peripheral metabolism of thyroid hormones: a review / G. S. Kelly // Altern. Med. Rev. 2000. № 4. P. 306–333.
10. Schmid, H. A. Role of nitric oxide in temperature regulation / H. A. Schmid, W. Riedel, E. Simon // Prog. Brain Res. 1998. Vol. 115. P. 87–110.