

Ф. И. Висмонт, А. Н. Глебов

**ОБ УЧАСТИИ МОНООКСИДА АЗОТА В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ,
ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ И ФОРМИРОВАНИЯ
ПРООКСИДАНТНО-АНТИОКСИДАНТНОГО СОСТОЯНИЯ
У КРЫС И КРОЛИКОВ НА ДЕЙСТВИЕ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЭНДОТОКСИНА
В УСЛОВИЯХ ТОКСИЧЕСКОГО ПОРАЖЕНИЯ ПЕЧЕНИ**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

В опытах на крысах и кроликах установлено, что развитие эндотоксиновой лихорадки в условиях депрессии процессов синтеза монооксида азота (NO) сопровождается более выраженной активацией процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в плазме крови и печени, менее значимым повышением температуры тела и активности детоксикационной функции печени. Показано, что действие бактериального эндотоксина в условиях токсического поражения печени четыреххлористым углеродом (CCl₄) не вызывает повышения температуры тела, активации детоксикационной функции печени и сопровождается более значимым повышением в плазме крови продуктов ПОЛ. Особенности изменения детоксикационной функции печени, процессов ПОЛ и температуры тела у крыс на действие бактериального эндотоксина в условиях острого токсического поражения печени CCl₄ связаны с изменением процессов образования NO.

Ключевые слова: детоксикация, терморегуляция, перекисное окисление липидов, монооксид азота, бактериальный эндотоксин, печень.

F. I. Vismont, A. N. Glebov

**THE ROLE OF NITRIC OXIDE IN THE PROCESSES OF DETOXIFICATION,
THERMOREGULATION AND PROOXIDANT-ANTIOXIDANT BALANCE IN RATS
AND RABBITS WITH TOXIC LIVER DAMAGE DURING EXPERIMENTAL ENDOTOXINEMIA**

In experiments on rats and rabbits it was found that the development of endotoxin-associated fever in case of nitric oxide (NO) synthesis depression is accompanied by a more pronounced changes of lipid peroxidation (LPO) and antioxidant system activity in plasma and in liver, and a less significant increase in body temperature and activity of liver detoxification function. It is shown that the action of bacterial endotoxin in terms of toxic liver damage caused by carbon tetrachloride (CCl₄) does not lead to body temperature increase and to activation of liver detoxification functions but is accompanied by a significant increase in plasma LPO products. Changes in liver detoxification function, lipid peroxidation processes and the body temperature of rats during bacterial endotoxemia in acute toxic liver damage caused by carbon tetrachloride (CCl₄) associated with the change in NO formation.

Key words: detoxification, thermoregulation, lipid peroxidation, nitric oxide, bacterial endotoxin, liver.

Общеизвестно, что ведущим звеном в патогенезе нарушений жизнедеятельности при экстремальных состояниях организма и различных заболеваниях является интоксикация, выраженность которой предопределяется активностью детоксикационной функции печени [6, 7].

В литературе имеются сведения о том, что между процессами детоксикации и регуляции температуры тела существует тесная взаимосвязь [1, 2, 3, 11]. В ряде исследований выявлено соответствие между повышением уровня эндотоксина в крови, признаками недостаточности печени и развитием лихорадочного состояния [2, 3]. В последнее время установлено, что патогенные эффекты эндотоксинов на метаболизм и функции различных клеток и гепатоцитов, в частности, связаны с усиленной продукцией активированными макрофагами, а особенно клетками Купфера – монооксида азота (NO) [7, 9]. Рядом исследователей показана значимость NO в терморегуляции и механизмах развития эндотоксиновой лихорадки [8, 12, 13, 14].

Известно, что в условиях токсического поражения печени четырёххлористым углеродом (CCl₄) в ней повышается активность процессов свободнорадикального окисления [5], а в сыворотке крови повышается концентрация нитратов/нитритов (NO₃⁻/NO₂⁻) – конечных продуктов де-

градации NO [4]. В то же время данные о характере изменений детоксикационной функции печени, процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в ней и температуры тела у экспериментальных животных на действие бактериального эндотоксина в условиях токсического поражения печени отсутствуют.

Цель исследования состояла в выяснении значимости NO в процессах детоксикации, терморегуляции и формировании прооксидантно-антиоксидантного состояния организма на действие бактериального эндотоксина у крыс и кроликов с острым токсическим поражением печени.

Материал и методы. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах самцах массой 160–220 г и кроликах самцах массой 2,5–3,5 кг. Для создания модели эндотоксиновой лихорадки применяли бактериальный липополисахарид (ЛПС) – эндотоксин *Escherichia coli* (Serotype O111:B4, «Sigma», США), который вводили кроликам в краевую вену уха в дозе 0,5 мкг/кг, крысам внутривенно в дозе 5,0 мкг/кг. Для выяснения роли NO использовались неселективный блокатор NO-синтазы N^G-нитро-L-аргинин (L-NNA, «Sigma», USA), который вводили крысам внутривенно на апиногенном физ. растворе в дозе 20 мг/кг. Острое токсическое поражение печени вы-

зывали однократным интрагастральным введением животным гепатотропного яда $CC1_4$, приготовленного на подсолнечном масле в соотношении 1:1 из расчета 5,0 мл/кг веса.

О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), содержанию фракции средних молекул (СМ) в плазме крови и степени её токсичности (СТК). ПНС (гексенал 100 мг/кг внутривентриально) оценивали по времени нахождения животных в положении на боку. Определение содержания в крови СМ проводили методом кислотно-этанольного осаждения, разработанным В. М. Моиным с соавт. (1989), СТК определяли способом, предложенным О. А. Радьковой с соавт. (1985). Выраженность цитолиза в печени оценивали по активности в плазме крови аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспартатаминотрансферазы (АсАТ). Определение активности АлАТ и АсАТ в плазме крови проводили колориметрически динитрофенилгидразинным методом. Активность процессов ПОЛ в крови и печени оценивали по содержанию в них малонового диальдегида (МДА), диеновых конъюгатов (ДК), оснований Шиффа (ОШ), а состояние системы антиоксидантной защиты – по активности каталазы (КТ) и содержанию α -токоферола (α -ТФ).

Продукцию NO оценивали по суммарному уровню NO_3^-/NO_2^- [10]. У крыс и кроликов ректальную температуру, измеряли электротермометром ТПЭМ-1. Все полученные данные обработаны методами вариационной биологической статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение. Установлено, что внутривентриальное введение крысам ($n = 12$) ЛПС (5,0 мкг/кг) приводит к медленному нарастанию температуры тела и слабовыраженной гипертермии. Температура тела повышалась на 1,3 °C ($p < 0,05$) и 1,2 °C ($p < 0,05$) через 120 и 180 мин после инъекции экзопирогена и составляла 38,9±0,1 °C и 38,8±0,12 °C. 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 °C ($p < 0,05$), 1,3 °C ($p < 0,05$) и 1,6 °C ($p < 0,05$) через 30, 60 и 120 мин после введения эндотоксина.

Длительность наркотического сна у крыс на высоте эндотоксической лихорадки (через 120 и 180 мин после введения ЛПС) уменьшалась на 23,0% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 25,2% ($p < 0,05$, $n = 7$). Действие в организме животных эндотоксина через 120 мин после инъекции приводило к повышению в плазме крови уровня СМ (на 17%, $p < 0,05$, $n = 6$) и достоверно не сказывалось на СТК.

Выявлено, что при эндотоксической лихорадке изменяется концентрация в плазме крови NO_3^-/NO_2^- – конечных продуктов деградации NO. Действие ЛПС у крыс ($n = 7$) через 120 и 180 мин после введения экзопирогена приводило к повышению уровня NO_3^-/NO_2^- в плазме крови животных на 29,6% ($p < 0,05$) и 60,7% ($p < 0,05$) и составляло соответственно 7,0±0,40 и 9,8±1,30 мкмоль/л.

Установлено, что действие ЛПС в организме сопровождается активацией процессов ПОЛ. Так, количество ДК в печени увеличивалось на 25,6% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 38,2% ($p < 0,05$, $n = 7$) через 120 и 180 мин после инъекции эндотоксина, а в плазме крови на 14,5% ($p < 0,05$, $n = 7$) на 180 мин пирогеновой лихорадки. Концентрация МДА в печени в этих условиях возрастала, соответственно, на 18,8% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 32,2% ($p < 0,05$, $n = 7$), в плазме крови на 70,8% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 91,5% ($p < 0,05$, $n = 6$). Уровень ОШ повышался в плазме на 95,1% ($p < 0,05$, $n = 6$) и 128,1% ($p < 0,05$, $n = 6$). У животных контрольной группы

($n = 7$), через 180 мин после инъекции физ. раствора, концентрация ДК, МДА, и ОШ в плазме крови и печени была равной соответственно 0,65±0,036 A_{233} /мл и 15,3±1,21 A_{233} /г ткани, 0,78±0,050 мкмоль/мл и 16,5±0,59 нмоль/г ткани, 4,2±0,71 ЕД/мл и 127,1±12,35 ЕД/г ткани.

Обнаружено, что действие ЛПС в организме у крыс, через 180 мин после инъекции, приводит к снижению концентрации α -ТФ на 39,2% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 25,1% ($p < 0,05$, $n = 7$) в плазме крови и печени соответственно. Активность КТ через 120 и 180 мин после введения эндотоксина снижалась в плазме крови – на 20,1% ($p < 0,05$, $n = 6$) и 24,8% ($p < 0,05$, $n = 7$), в печени – на 15,8% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 19,7% ($p < 0,05$, $n = 7$). Содержание α -ТФ и активность КТ в плазме крови и печени у крыс ($n = 7$) в контроле составляла 2,25±0,31 мкмоль/мл и 193,4±9,72 нмоль/г ткани, 13,5±3,47 ЕД/мл и 316,0±28,5 ЕД/г ткани соответственно.

Установлено, что в условиях поражения печени $CC1_4$ у крыс и кроликов угнетаются процессы детоксикации, снижается температура тела, а также активируются процессы ПОЛ в крови и печени, развивается стойкая и выраженная гипотермия. Так, через 12 и 24 ч после введения в желудок масляного раствора $CC1_4$, у крыс ректальная температура снижалась, соответственно, на 1,0±0,12 °C ($p < 0,05$, $n = 12$) и на 1,2±0,13 °C ($p < 0,05$, $n = 10$). У кроликов интрагастральное введение раствора $CC1_4$ вызывало снижение ректальной температуры на 1,2±0,11 °C ($p < 0,05$, $n = 7$) и 1,6±0,12 °C ($p < 0,05$, $n = 7$) через 12 и 24 ч соответственно. В опытах на крысах выявлено, что интрагастральное введение животным масляного раствора $CC1_4$ приводит к повышению в плазме крови уровня СМ и СТК. Концентрация СМ, через 12 и 24 ч от момента затравки животных $CC1_4$, повышалась на 25,3% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 32,4% ($p < 0,05$, $n = 7$). В этих условиях СТК была выше у опытных крыс по сравнению с таковым в контроле на 35,2% ($p < 0,05$, $n = 6$) и 56,4% ($p < 0,05$, $n = 7$) соответственно. ПНС у крыс, через 12 и 24 ч после введения раствора $CC1_4$, возрастала, по сравнению с животными, которым вводили интрагастрально подсолнечное масло, на 25,0% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 20,5% ($p < 0,05$, $n = 6$) соответственно. ПНС у животных ($n = 7$) в контроле (через 12 и 24 ч после введения в желудок подсолнечного масла в дозе 5,0 мл/кг) составила, соответственно, 27,3±3,22 и 28,0±3,30 мин.

Установлено, что действие $CC1_4$ в организме животных сопровождается активацией процессов ПОЛ в крови и печени. Так, через 24 ч после введения в желудок масляного раствора $CC1_4$, уровень ДК, МДА и ОШ повышался в плазме крови на 22,3% ($p < 0,05$, $n = 7$), 32,2% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 81,4% ($p < 0,05$, $n = 7$). В печени содержание ДК возрастало на 20,5% ($p < 0,05$, $n = 7$), МДА – на 36,0% ($p < 0,05$, $n = 7$), ОШ – на 50,6% ($p < 0,05$, $n = 7$). В этих условиях в организме у крыс, наряду с интенсификацией процессов ПОЛ в крови и печени, происходит угнетение антиоксидантной системы в исследуемых тканях. Через 24 ч после затравки, отмечалось снижение на 22,7% ($p < 0,05$, $n = 6$) и 26,2% ($p < 0,05$, $n = 6$) концентрации α -ТФ, а также активности КТ на 33,5% ($p < 0,05$, $n = 6$) и 40,3% ($p < 0,05$, $n = 6$) в плазме крови и печени соответственно.

В опытах на крысах и кроликах обнаружено, что пиретическая реакция на ЛПС предупреждается предварительным интрагастральным введением животным, за 24 часа до инъекции ЛПС, раствора $CC1_4$. Показано, что действие ЛПС в этих условиях не только не вызывает повышение температуры тела и активации детоксикационной функции

печени, но и сопровождается более значительным повышением в плазме крови продуктов ПОЛ.

Внутрибрюшинное введение крысам ингибитора NO-синтазы L-NNA в дозе 20 мг/кг – дозе, не влияющей на температуру тела, приводит к снижению детоксикационной функции печени и активности процессов ПОЛ. Действие в организме L-NNA (20 мг/кг), через 120 мин после введения, сопровождалось увеличением содержания основных продуктов ПОЛ в плазме крови и не приводило к достоверному изменению показателей системы антиоксидантной защиты. Уровень ДК, МДА и ОШ в плазме крови увеличился на 115,5% ($p < 0,05$, $n = 7$), 53,7% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 37,1% ($p < 0,05$, $n = 7$) соответственно через 120 мин после введения препарата. Содержание ДК, МДА и ОШ в печени достоверно не изменялось.

ПНС у крыс через 120 и 180 мин после введения L-NNA возрастала по сравнению с животными, получавшими физ. раствор, на 28,2% ($p < 0,05$, $n = 8$) и 33,6% ($p < 0,05$, $n = 10$). Действие в организме ингибитора NO-синтазы L-NNA приводило не только к повышению ПНС, но и сопровождалось, через 180 мин после инъекции препарата, повышением концентрации СМ в плазме крови (на 15,9%, $p < 0,05$, $n = 8$) и её токсичности (на 16,7%, $p < 0,05$, $n = 8$). Через 2 ч после инъекции L-NNA активность АлАТ и АсАТ у крыс повышалась (по сравнению с контролем – введением физ. раствора) на 37,6% ($p < 0,05$, $n = 7$) и 53,4% ($p < 0,05$, $n = 6$).

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

Развитие эндотоксикозной лихорадки в условиях блокады синтеза NO сопровождалось также более выраженными изменениями процессов ПОЛ и активности антиоксидантной системы в плазме крови и печени. В этих условиях, через 180 мин после инъекции ЛПС (5,0 мкг/кг), наблюдалось более значимое по сравнению с контролем (внутрибрюшинное введение физ. раствора и бактериального эндотоксина) повышение в плазме крови концентрации ДК – на 139,5% ($p < 0,05$), МДА – на 102,9% ($p < 0,05$), ОШ – на 71,3% ($p < 0,05$) и снижение активности КТ – на 49,1% ($p < 0,05$). В печени в этих условиях содержание ДК возрастало на 32,1% ($p < 0,05$), а активность КТ снижалась на 30,6% ($p < 0,05$).

Обнаружено, что действие CCl_4 у животных, предварительно получивших L-NNA, сопровождалось менее значимым снижением температуры тела и менее выраженным изменением детоксикационной функции печени. Так, через 24 часа после введения CCl_4 в условиях депрессии NO-синтазы L-NNA, содержание в плазме крови СМ было ниже на 22,3% ($p < 0,05$, $n = 8$), а степень её токсичности снижалась на 17,6% ($p < 0,05$, $n = 8$) по сравнению с соответствующим контролем (действие только CCl_4). ПНС у крыс, получивших CCl_4 в условиях действия L-NNA, через 24 часа после интрагастрального введения гепатотропного яда уменьшалась на 29,0% ($p < 0,05$, $n = 10$).

Выявлено, что введение CCl_4 через 24 часа после инъекции у крыс, предварительно получивших внутрибрюшинно L-NNA, приводило к менее значительному повышению активности АлАТ и АсАТ в плазме крови – на 26,7% ($p < 0,05$) и 24,0% ($p < 0,05$), (по сравнению с животными, которым ввели физиологический раствор внутрибрюшинно и раствор CCl_4 интрагастрально), т.е. сопровождалось менее выраженным цитолизом.

Установлено, что предварительное введение в организм животных блокатора синтеза NO препятствует активации детоксикационной функции печени на ЛПС.

В опытах на крысах установлено, что действие гепатотропного яда CCl_4 у животных, предварительно получивших L-NNA сопровождалось менее выраженным нарушением детоксикационной функции печени. Обнаружено, что через 24 часа после введения CCl_4 в этих условиях содержание в плазме крови СМ было ниже на 22,3% ($p < 0,05$, $n = 8$), а степень её токсичности снижалась на 17,6% ($p < 0,05$, $n = 8$) по сравнению с соответствующим контролем (действие только CCl_4). ПНС у крыс, получивших CCl_4 в условиях действия L-NNA через 24 часа после интрагастрального введения гепатотропного яда уменьшалась на 29,0% ($p < 0,05$, $n = 10$). Длительность наркотического сна у крыс в контроле (получивших за 30 мин до введения CCl_4 внутрибрюшинно физ. раствор) составляла $34,8 \pm 4,2$ мин.

Следовательно, в условиях токсического поражения печени CCl_4 депрессия процессов образования NO L-NNA оказывает защитное влияние: препятствует угнетению детоксикационной функции печени, чрезмерной активации ПОЛ в ней, развитию цитолиза гепатоцитов. По-видимому, NO является одним из факторов регуляции функции гепатоцитов и их устойчивости к повреждающему действию CCl_4 , важным фактором в реализации влияния гепатотропного яда на процессы детоксикации и терморегуляции.

Таким образом, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что активность образования NO, в условиях токсического поражения печени CCl_4 , имеет важное значение для регуляции процессов детоксикации и ПОЛ. Особенности изменения детоксикационной функции печени, процессов ПОЛ и температуры тела у крыс на действие бактериального эндотоксина в условиях острого токсического поражения печени CCl_4 связаны с изменением процессов образования монооксида азота. По-видимому, интенсивность образования NO, оказывая влияние на процессы свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты клеток печени, является одним из факторов регуляции функции гепатоцитов и их устойчивости к повреждающему действию четырёххлористого углерода.

Литература

1. Висмонт, Ф. И. Механизмы изменения температуры тела у крыс и кроликов в зависимости от состояния детоксикационной функции печени и выраженности эндотоксемии / Ф. И. Висмонт // Функциональное состояние организма в норме и при патологии: Сб. науч. тр. Под ред. В. С. Улащика, А. Г. Чумака. – Мн.: РИВШ. – 2008. – С. 80–84.
2. Висмонт, Ф. И. Зависимость теплообмена от детоксикационной функции печени / Ф. И. Висмонт, В. Н. Гурин, А. В. Гури // Современные проблемы физиологии и санокреатологии: сб. науч. тр., посвящ. 70-летию со дня рождения акад. АН Молдовы Ф. И. Фурдуй. – Кишинев, 2005. – С. 67–75.
3. Грищенко, К. Н. Роль клеток Купфера в формировании тиреоидного статуса и терморегуляторных реакций организма на действие бактериального эндотоксина / К. Н. Грищенко, Ф. И. Висмонт // Здоровоохранение. – 2002. – № 5. – С. 32–35.
4. Коваленко, О. А. CCl_4 как индуктор L-аргинин зависимого синтеза NO / О. А. Коваленко, Н. И. Тарасова, В. Д. Микоян, А. Ф. Ванин // БЭБ и М. – 1996. – № 4. – С. 414–416.

5. Маеда, Х. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке / Х. Маеда, Т. Акаике // Биохимия. – 1998. – № 7. – С. 1007–1019.

6. Маянский, Д. Н. Клетки Купфера и патология печени / Д. Н. Маянский // Пат. физиология и эксперим. медицина. – 1985. № 4. – С. 80–86.

7. 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.

8. Gerstberger, R. Nitric Oxide and Body Temperature Control / R. Gerstberger // News Physiol. Sci. – 1999. – Vol. 14, № 2. – P. 30–36.

9. Li, J. Nitric Oxide. IV. Determinations of nitric oxide protection and toxicity in liver / J. Li, T. R. Billiar // Am. J. Physiol. – 1999. – Vol. 276, N 5. – P. 1069–1073.

10. Moshage, H. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et al.] // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, № 6. – P. 892–896.

11. Sehic, E. Blockade of Kupffer cells prevents the febrile and preoptic prostaglandin E2 responses to intravenous lipopolysaccharide in guinea pigs / E. Sehic, W. S. Hunter, A. L. Ungar, C. M. Blatteis // Annals N. Y. Acad. Sci., 1997. – Vol. 813. – P. 448–452.

12. Scammel, T. E. Inhibition of nitric oxide synthase produced hypothermia and depressia lipopolysaccharide fever / T. E. Scammel, J. K. Elmquist, C. B. Saper // Am. J. Physiol. – 1996. – Vol. 271. – P. 333–338.

13. Schmid, H. A. Role of nitric oxide in temperature regulation / H. A. Schmid, W. Riedel, E. Simon // Brain Res. – 1998. – Vol. 115. – P. 25–49.

14. Taylor, W. F. A role for nitric oxide in active thermoregulatory vasodilatation / W. F. Taylor, V. S. Bishop // Ann. J. Physiol. – 1993. – Vol. 264, № 5. – P. 1355–1359.