

МИКРОСОМАЛЬНАЯ МОНООКСИГЕНАЗНАЯ СИСТЕМЫ ГЕПАТОЦИТОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ГИПО- И ГИПЕРТИРЕОЗЕ

Нишантаев М.

*к.б.н., доцент, Ташкентский педиатрический медицинский институт,
Ташкент, Республика Узбекистан
tahamatjan@mail.ru*

Расулова М.

*PhD, доцент, Ферганский медицинский институт общественного здоровья,
Фергана, Республика Узбекистан
rasulova.moxidil@mail.ru*

Юлдашев Н.

*д.б.н., профессор, Ташкентский педиа в трический медицинский институт,
Ташкент, Республика Узбекистан
y_nosir@rambler.ru*

Нарушения функции щитовидной железы, проявляющейся как гипотиреоз или гипертиреоз, являются широко распространёнными патологическими состояниями. По результатам эпидемиологических исследований распространённость гипотиреоза в отдельных группах населения достигает 10-12 % [10], а гипертиреоз среди женщин встречается приблизительно 2 %, среди мужчин – 0,2 % [15]. Так как тиреоидные гормоны оказывают влияние, прямое или косвенное, на практически все обменные процессы в организме через энергетический обмен, представлял интерес их эффект на одну из главных метаболизирующих систем печени – монооксигеназную ферментную систему, локализованную в эндоплазматическом ретикулуле гепатоцитов.

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилась оценка состояния монооксигеназной системы печени при экспериментальном гипо- и гипертиреозе у крыс.

Материал и методы. Опыты проведены на 50 белых крысах-самцах массой 180-220 г. Животные содержались в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище. Протокол экспериментов соответствовал этическим нормам, изложенным в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных», а также в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях.

Гипотиреоз у 20 крыс вызывали внутрибрюшинным введением мерказолила в дозе 1 мг на 100 г массы тела в течение 15 дней [9]. Гипертиреоз у 20 крыс вызывали подкожным введением L-тироксина (Berlin Chemie AG-Menarini, Германия) в дозе 400 мкг/кг в течение 14 дней [7]. 10 крыс служили контролем.

Для оценки метаболической активности монооксигеназной системы печени проводили гексеналовый тест. Гексенал животным вводили в дозе 100 мг/кг, внутрибрюшинно. Учитывалось время между потерей и приобретением «рефлекса переворачивания». При этом, животных помещали в термостатирующую камеру с температурой 26°C.

После пробуждения крысы забивались под эфирным наркозом путём декапитации и собиралась кровь. В сыворотке крови определяли содержание свободного (Т3 св.) и общего трийодтиронина (Т3 об.), свободного (Т4 св.) и общего тироксина (Т4 об.), тиреотропного гормона (ТТГ) методом твердофазного иммуноферментного анализа ELISA, при помощи тест систем фирмы «Human» (Германия) на микропланшетном фотометре MR96A (Mindray, Китай).

Печень крыс отмывали от крови 1,5 % раствором калия хлорида (KCl) из шприца, обсушивали фильтровальной бумагой и помещали в чашку Петри, стоящую на льду. Затем 0,5 г ткани измельчали и переносили в пробирки для гомогенизатора, куда предварительно наливалось 1,5 мл охлаждённого 1,5 % раствора KCl. Пробирки помещали в гомогенизатор на средней скорости (1000 об./мин). Гомогенат центрифугировали с помощью центрифуги РС-6 (РФ) при 10 000 g в течение 20 мин. Надосадок сливали в микроцентрифужные пробирки. К супернатанту добавляли 0,04 М раствора кальция хлорида (CaCl₂) в соотношении 1:5 по объёму и пипетировали. Полученный раствор центрифугировали при 3000 g в течение 15 мин. Полученный супернатант сливали, а к осадку, содержащему обогащённую фракцию микросом, добавляли 3 мл 0,1 М раствора с pH 7,4 трис-буфера и пипетировали. Таким образом, была получена взвесь микросом [18], в которой определяли содержание и активность компонентов монооксигеназной системы.

Содержание цитохрома P-450 в микросомальной суспензии определяли по методу T. Omura и R. Sato [19]. Содержание цитохрома b5 определяли после восстановления опытных образцов суспензии микросом при добавлении НАДН. Скорость п-гидроксилирования анилина в микросомальной фракции оценивали по образованию п-аминофенола, а N-деметиляции амидопирина в микросомально-цитозольной фракции по образованию формальдегида [5]. Содержание белка в пробах определяли по Lowry et.al. [21].

Полученные цифровые результаты были обработаны с помощью стандартных методов вариационной статистики с применением t-критерия Стьюдента.

Результаты исследования. Результаты исследований показали, что введение животным мерказолила в течение 15 дней приводило к статистически значимому снижению содержания общего ТЗ на 39,4 % от контроля (табл. 1). При этом, абсолютное значение уровня свободного ТЗ хотя и было повышено на 16,5 % от контроля, однако это повышение оказалось статистически не значимым.

Таблица 1.

Показатели тиреоидного статуса крыс при введении мерказолила и тироксина

Группы	ТЗ, об. нг/мл	ТЗ, св. пг/мл	Т4, об. нг/мл	Т4, св. пг/мл	ТТГ, мЕД/л
Контроль	1,32±0,23	2,24±0,32	6,19±0,18	0,97±0,07	1,42±0,13
Мерказолил	0,80±0,004*	2,61±0,31	5,96±0,39	0,31±0,06*	4,14±0,22*
Тироксин	0,81±0,02*	3,56±0,78*	5,38±0,45	1,32±0,01*	0,89±0,09*

Примечание: здесь и в табл. 2: * – $P < 0,05$ по сравнению с контролем.

В содержании общего Т4 существенных изменений от контроля не выявили. Однако содержание свободного Т4 оказалось ниже контроля на 68,0 %. Снижение содержания тиреоидных гормонов происходило на фоне существенного увеличения содержания ТТГ: оно оказалось выше контроля на 191,5 %. Результаты свидетельствуют о развитии гипотиреоза у крыс при введении мерказолила.

При введении L-тироксина экспериментальным животным в дозе 400 мкг на кг веса в течение 14 дней наблюдается статистически значимое снижение содержания общего ТЗ на 38,6 % (см. табл. 1). Количество свободного ТЗ оказалось выше от контроля на 58,9 %. Хотя общее содержание Т4 было повышено на 13,1 % от контроля, это повышение оказалось статистически не значимым. Количество свободного Т4 было на 36,1 % выше от контроля. Повышение уровня тиреоидных гормонов происходило на фоне снижения уровня ТТГ: оно было на 37,3 % ниже, чем в контроле. Результаты свидетельствуют о развитии гипертиреоза у крыс при введении L-тироксина.

Таким образом, введение животным мерказолила привело к развитию у них гипотиреоза, а L-тироксина – гипертиреоза.

Изучение метаболической активности монооксигеназной системы печени с помощью гексеналового теста показало, что у животных с гипотиреозом длительность гексеналового сна оказалась равной $38,6 \pm 1,58$ минутам, тогда как у контрольной группы она была равна $28,0 \pm 0,87$ минутам, т.е. гексеналовый сон у крыс с гипотиреозом оказался

удлинен на 37,9 % по сравнению с контрольным показателем (табл. 2). Значительное удлинение длительности гексеналового сна свидетельствует о существенном изменении функционального состояния монооксигеназной системы печени.

Таблица 2.**Содержание и активность компонентов микросомальной монооксигеназной системы печени при гипо- и гипертиреозе**

Группы животных	Длительность гексеналового сна, мин.	Содержание микросомальных цитохромов, нмоль/мг белка		Активность микросомальных ферментов, нмоль/мин • мг белка	
		P-450	b5	Анилин-гидроксилаза	Амидопирин-N-деметилаза
Контроль	28,0±0,87	0,99±0,09	0,41±0,03	0,94±0,08	2,79±0,16
Гипотиреоз	38,6±1,58*	0,75±0,03*	0,30±0,04*	0,70±0,05*	2,03±0,09*
Гипертиреоз	18,3±1,73*	0,35±0,02*	0,40±0,02	0,90±0,04	2,83±0,07

Результаты проведённых исследований показали, что содержание основного компонента монооксигеназной системы – цитохрома P-450 было снижено на 24,2 % от контрольного значения. Содержание цитохрома b5 было снижено от контрольного значения на 26,8 %. Анилингидроксилазная и амидопирин-N-деметилазная активность микросом у крыс с гипотиреозом оказалась ниже соответствующих контрольных значений на 25,5 и 27,2 % соответственно.

Результаты свидетельствуют как о снижении метаболизирующей функции печени, так и об ингибировании функциональной активности монооксигенажной системы эндоплазматического ретикулума гепатоцитов при экспериментальном гипотиреозе.

Изучение метаболической активности печёночной монооксигенажной системы у крыс с гипертиреозом с помощью гексеналового теста показало, что продолжительность гексеналового сна составляла 18,3±1,73 минуты, а у контрольной группы она равнялась 28,0±0,87 минутам, т.е. длительность гексеналового сна у крыс с гипертиреозом снизилась на 34,6 % (см. табл. 2).

Результаты исследований показали, что у крыс с гипертиреозом содержание ключевого компонента печёночной монооксигенажной системы – цитохрома P-450 было снижено на 64,7 % по сравнению с контрольным значением. Содержание цитохрома b5 от контроля не отличалось. Активность анилингидроксилазы и амидопирин-N-деметилазы микросом печени у крыс с гипертиреозом также не отличалась от контрольных значений.

Результаты свидетельствуют об активации метаболизирующей функции печени, на фоне снижения уровня основного компонента монооксигеназной системы – цитохрома Р-450 при экспериментальном гипертиреозе.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о нарушении функционально-метаболического состояния монооксигеназной системы печени у крыс как при экспериментальном гипотиреозе, так и гипертиреозе. При гипотиреозе нарушение функционирования монооксигеназной системы печени характеризовалось удлинением длительности гексеналового сна, снижением как содержания микросомальных цитохромов, так и их активности. В то же время, при гипертиреозе нарушение функционирования этой системы выражалось в укорочении длительности гексеналового сна и снижении содержания цитохрома Р-450, при этом активность микросомальных ферментов оставалась практически неизменной.

Обсуждение результатов. Известно, что ведение животным таких тиреостатиков как мерказолил, метилтиоурацил, пропилтиоурацил вызывает у них состояние гипотиреоза. Мерказолил – $C_4H_6N_2S$ (1,3-Дигидро-1-метил-2Н-имидазол-2-тион) – это специфический синтетический тиреостатик, угнетающий активность йодпероксидазы, которая участвует в синтезе гормонов щитовидной железы [13]. Действительно, результаты наших исследований показали развитие гипотиреоза у экспериментальных крыс при введении им мерказолила. Поскольку нас интересовало функционально-метаболическое состояние монооксигеназной системы гепатоцитов на фоне гипотиреоза, мы провели исследование, в ходе которого изучалась длительность гексеналового сна у экспериментальных животных. Известно, что наркотическое действие гексенала обусловлено только целой молекулой, а не его метаболитами [11]. Гексенал, являясь субстратом первого типа, метаболизируется в цитохром Р-450 зависимой монооксигеназной системе гепатоцитов: при этом гидроксيليруется его циклогексильная группа и этот продукт далее окисляется до 3'-кетогексабарбитала. Последнее, в свою очередь, подвергается N-деметилованию. Определённая часть препарата также N-деметируется при атоме азота в третьем положении, что приводит к образованию норгексабарбитала. Именно поэтому активность цитохрома Р-450 определяет содержание целой молекулы гексенала, а длительность гексеналового сна, наоборот, определяет активность метаболическую функцию монооксигеназной системы печени.

В наших исследованиях было показано значительное удлинение длительности гексеналового сна у крыс с гипотиреозом, что свидетельствует об угнетении метаболической активности ферментов монооксигеназной системы гепатоцитов. Об удлинении длительности гексеналового сна у крыс с гипотиреозом сообщалось также в работе [4].



По литературным данным известно, что при мерказолиловом гипотиреозе наблюдаются значительные нарушения структуры печёночной ткани, выражающиеся в изменении внутридолькового кровотока, дистрофическими и некротическими поражениями гепатоцитов, торможении пролиферации и дифференцировки клеток [8]. Структурные нарушения наблюдаются даже после месяца отмены мерказолила. Однако, что является причиной структурных изменений: гипотиреоз или прямое влияние мерказолила на печёночную ткань остаётся неизвестной.

Однако в 2016 году появилось сообщение, раскрывающее некоторые стороны нарушения функционирования печени при введении мерказолила [22]. Метаболитом мерказолила является N-метилтиомочевина. Авторы в *in vitro* исследованиях инкубировали этот метаболит с митохондриями печени интактных мышей, а также в *in vivo* исследования ввели его мышам и оценивали структурно-функциональные показатели их митохондрий. N-метилтиомочевина вызывал снижение активности сукцинатдегидрогеназы, увеличение образования митохондриальных активных форм кислорода, активацию перекисного окисления липидов и набухание наряду с коллапсом потенциала митохондриальной мембраны как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Он также снижал уровень глутатиона и АТФ. Эти исследования наводят на мысль о том, что нарушение функции печени могло обуславливать введение мерказолила.

В то же время в опытах на крысах было показано, что гипотиреоз снижает интоксикацию тиацетамидом – веществом, используемым в моделировании цирроза печени [17]. При этом, сам тиацетамид не является гепатотоксичным, гепатотоксичностью обладают его метаболиты [12], которые образуются при участии цитохрома P-450 2E1 [20]. Следовательно, можно сделать заключение о том, что именно гипотиреоз является причиной снижения активности монооксигеназной системы печени.

Результаты исследований метаболического статуса печени у гипертиреозидных крыс были несколько неожиданными: метаболическая функция печени увеличивалась на фоне уменьшения цитохрома P-450, в то время функциональное состояние монооксигеназной системы оставалось на уровне контроля.

Если учитывать усиленный метаболизм в организме при гипертиреозе, то этот факт действительно был бы очень простым и понятным, но уменьшение длительности гексеналового сна идёт на фоне значительного уменьшения количества цитохрома P-450, ответственного за метаболизм гексенала. Вообще снижение содержания цитохрома P-450 при гипертиреозе было зарегистрировано и в ряде других исследований. Например, J.E. Leakey и соавт. (1982) обнаружили, что

содержание цитохрома Р-450 снижается на фоне введения тироксина. Однако при этом активность монооксигеназной системы не снижалась [16]. Такие же результаты были получены в работе Н.Х. Абляевой (1989) [1]: гипертиреоз приводил к снижению содержания цитохрома Р-450 и к двукратному увеличению активности НАДФН-цитохром С-редуктазы. По результатам работы Н.Х. Абляевой, уменьшение содержания цитохрома Р-450 при гипертиреозе является результатом его деградации до цитохрома Р-420. В этом случае высокую функциональную активность печёночной монооксигеназной системы можно объяснить только с позиции повышения каталитической активности ферментов этой системы.

Действительно, в нормальных условиях в микросомах только 5 % цитохрома Р-450 находится в активном состоянии [2]. Следовательно, хотя количество молекул цитохрома Р-450 уменьшается, функциональная активность монооксигеназной системы может поддерживаться или даже увеличиваться, если их каталитическая активность увеличивается. В этом случае увеличение метаболической активности печени можно объяснить за счёт повышения функциональной активности монооксигеназной системы.

С другой стороны, нельзя исключать непосредственное влияние высоких доз тироксина на мозг. Известно, что тироксин сам по себе является антигипногенным фактором. Наблюдаемое при гипертиреозе уменьшение длительности гексеналового сна может быть следствием введения тироксина, которое и приводит к повышению уровня серотонина в больших полушариях головного мозга и в промежуточном мозге [6]. Избыточное содержание тиреоидных гормонов приводит к повышению возбудимости нейронов [3], что может и нарушить продолжительность сна [14].

Список использованной литературы:

1. Абляева Н.Х. Тиреоидная регуляция структурно-функциональной дифференцировки митохондрий и микросом в онтогенезе. Автореф. Дисс. Д.б.н. – Т, 1989. – 54 с.
2. Арчаков А.И. Оксигеназы биологических мембран. М. «Наука». – 1983. – 54 с.
3. Васильева В.М., Баканов М.И. Биохимические изменения при неврологической патологии // Биомед. химия. – 2005. – т. 51, вып. 6. – С. 581 – 602.
4. Висмонт Ф.И., Висмонт А.Ф., Микулич А.Т. Об участии валина крови в механизмах реализации влияния трийодтиронина на процессы детоксикации и терморегуляции. // Фундаментальные науки – медицине: материалы Междунар. науч. конф. (Минск, 17 мая 2013 г.). В 2 ч. Ч. 1. / Нац. акад. наук Беларуси, Ин-т физиологии; редкол.: И.В Залуцкий и др. – Минск: Беларус навука, 2013. – С. 133-136.
5. Влияние фамотидина (Кваматела) на функциональное состояние системы биотрансформации ксенобиотиков / И.Л. Блинков, С.В. Желябовская, М.В. Журавлева, А.И. Шатихин // Клиническая фармакология и терапия. – 2000, №2. – С. 43-46.

6. Городецкая И.В., Гусакова Е.А. Влияние йодсодержащих гормонов щитовидной железы на центральный отдел стресс-лимитирующей системы // Вестник ВГМУ. – 2018. – т. 17, № 3. – С. 7-15.

7. Зенков А.Л., Годовалов А.П., Шилов Ю.И. Фагоцитарная активность перитонеальных клеток крыс при тиреотоксикозе в эффекторную фазу иммунного ответа // Медицинская иммунология. – 2017. – т. 19, Специальный выпуск. – С. 31.

8. Макарова Н.Г., Васильева Л.С., Гармаева Д.В. Структура печени при экспериментальном гипотиреозе // Сибирский медицинский журнал. – 2010. – № 3. – С. 70-73.

9. Мирошников С.В., Нотова С.В., Тимашева А.Б., Кван О.В., Мирошников С.В., Тимашева А.Б. Влияние экспериментального тиреотоксикоза и гипотиреоза на элементный статус лабораторных животных // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3.; URL: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=9336> (дата обращения: 23.08.2019).

10. Мохорт Т.В., Карлович Н.В. Гипотиреоз: распространённость, клиническая картина, диагностика, современные представления о целесообразности скрининга // Медицинские новости. — 2004. — №10. — С. 50-58.

11. Старкова Н.Т. Клиническая эндокринология: руководство. М.: Медицина, 1991. 512 с.

12. Токсико-алиментарная модель цирроза печени у крыс / Б.Б. Осипов, А.Н. Лызиков, А.Г. Скуратов, А.А. Призенцев // Проблемы здоровья и экологии. – 2018. – 1 (55). – С. 62-66.

13. Черкащенко О.С. Влияние триазавирина на активность ферментов детоксикации // WWW.MEDLINE.RU, том 12, Фармакология, май, 2011. – С. 458-463.

14. Яхно Н.Н. Болезни нервной системы: рук-во для врачей. В 2-х т./Н.Н. Яхно; под ред Н.Н. Яхно. – М.: Медицина, 2005. – т.2. – 512 с.

15. Abraham-Nordling M., Törring O., Lantz M. et al. Incidence of hyperthyroidism in Stockholm, Sweden, 2003–2005. Eur J Endocrinol. 2008; 158: 823–827.

16. Leakey J.E., Mukhtar H., Fouts J.R., Bend J.R. Thyroid hormone-induced changes in the hepatic monooxygenase system, heme oxygenase activity and epoxide hydrolase activity in adult male, female and immature rats // Chem. Biol. Interact. – 1982. Vol. 40(3). – P. 257-264.

17. Malik R., Hodgson H. The relationship between the thyroid gland and the liver // Quart. J. Med. – 2002. – Vol. 95, № 9. – P. 559-569.

18. Nikolic D., van Breemen R.B. New metabolic pathways for flavanones catalyzed by rat liver microsomes // Drug. Metab. Dispos. – 2004. – Vol. 32 (4). – P. 387–397.

-
19. Omura T., Sato R. The Carbon Monoxide-binding Pigment of Liver Microsomes. I. Evidence for Its Hemoprotein Nature // J. Biol. Chem. – 1964, v. 239. – P. 2370-2378.
 20. Potentiation of thioacetamide liver injury in diabetic rats is due to induced CYP2E1 / T. Wang et al. // J. Pharmacol. and Exp. Ther. – 2000. – Vol. 294, № 2. – P. 473-479.
 21. rotein measurement with the Folin Phenol reagent / O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall // J. Biol. Chem. – 1951, v. 193. – P. 265-275.
 22. The Postulated Hepatotoxic Metabolite of Methimazole Causes Mitochondrial Dysfunction and Energy Metabolism Disturbances in Liver / N. Hossein, A. Jamshidzadeh, R. Heidari, N. Abdoli, M. M. Ommati, F. Jafari, M. Zarei, B. Asadi. // Pharmaceutical Sciences. – 2016. – v. 22. – P. 217-226.
 23. Хайбуллина, З. Р., and У. К. Ибрагимов. "К вопросу о механизме действия токоферолов." Медицинский журнал Узбекистана 4 (2005): 81-86.
 24. Khabibullaev, S., N. Yuldashev, and N. Mamazulunov. "METABOLIC CHANGES IN THE BODY AS THE RESULT OF LONG-TERM USE OF ARTIFICIAL SWEETENER-SODIUM CYCLAMATE." Science and innovation 2.D10 (2023): 64-70.
 25. Турсунов, Д. Х., et al. "ВЛИЯНИЕ ЭКДИСТЕНА И ПРЕПАРАТОВ СРАВНЕНИЯ НА СОДЕРЖАНИЕ ФАКТОРА ФОН ВИЛЛЕБРАНДА И ЭНДОТЕЛИНА-1 ПРИ РАЗВИТИИ АЛЛОКСАНОВОГО ДИАБЕТА." Журнал теоретической и клинической медицины 2 (2018): 11-15.