

О ЗНАЧИМОСТИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ И МОЧЕВИНЫ КРОВИ В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ И РЕГУЛЯЦИИ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА ПРИ ЭНДОТОКСИНОВОЙ ЛИХОРАДКЕ

Зенькович В. В., Висмонт Ф. И.

Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра патологической физиологии,
г. Минск

Ключевые слова: аргиназа печени, мочевины, детоксикация, монооксид азота, липополисахарид, эндотоксिन, лихорадка.

Резюме: Проведено комплексное исследование значимости активности аргиназы печени и уровня мочевины крови в процессах детоксикации, регуляции L-аргинин-NO-системы и температуры тела при эндотоксической лихорадке. Установлено, что температура тела, активность процессов детоксикации и формирование терморегуляторных реакций организма у крыс и кроликов на действие в организме животных бактериальных эндотоксинов, зависят от активности аргиназы печени и уровня мочевины в крови.

Resume: A comprehensive study of significance of liver arginase activity, blood urea level in detoxification processes, L-arginine-NO system regulation, and body temperature at endotoxin fever was conducted. It has been established that the body temperature, detoxication function activity and formation of the thermoregulatory reactions of rats and rabbits organism's to the action of bacterial endotoxins depend on the liver arginase activity and the blood urea level.

Актуальность. В последние годы большое внимание уделяется изучению роли эндотоксинов в процессах жизнедеятельности организма. К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении мочевины и аргиназы печени в процессах жизнедеятельности в норме и патологии [1].

Имеются сведения о том, что между функциональным состоянием печени и процессами регуляции температуры тела существует тесная взаимосвязь [2, 3]. В то же время данные о значимости аргиназы печени и мочевины в процессах детоксикации и формирования терморегуляторных реакций организма при бактериальной эндотоксинемии отсутствуют.

Цель: выяснить значимость аргиназы печени и мочевины крови, взаимосвязи и взаимодействия цикла синтеза мочевины с циклом синтеза монооксида азота в процессах детоксикации и регуляции температуры тела при эндотоксической лихорадке.

Задачи: 1. Исследовать температуру тела, процессы детоксикации и ПОЛ плазмы крови у животных в условиях эндотоксической лихорадки; 2. Изучить характер изменений активности аргиназы печени, уровня мочевины и нитрат/нитритов в плазме крови у крыс при эндотоксической лихорадке; 3. Выяснить особенности изменения температуры тела, уровня мочевины, нитрат/нитритов в плазме крови, а также процессов детоксикации у крыс и кроликов при эндотоксической лихорадке в условиях угнетения активности аргиназы печени и NO-синтазы; 4. Определить влияние введения в организм мочевины и L-аргинина на температуру тела, уровень аргинина в плазме крови у крыс.

Материалы и методы. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных крысах (n=52) и кроликах (n=23) обоего пола. Для создания модели эндотоксиновой лихорадки, использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) – эндотоксин E.Coli (серия 0111:B4 Sigma, США), который вводили однократно крысам внутрибрюшинно в дозе 5 мкг/кг, кроликам внутривенно в дозе 0,5 мкг/кг. С целью выяснения значимости аргиназы печени и монооксида азота (NO) в процессах детоксикации и регуляции температуры тела использовали ингибитор аргиназы N^ω-гидрокси-нор-L-аргинин (nor-NOHA) фирмы BACHEM (Германия), а также L-валин (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) и неселективный блокатор NO-синтазы – метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США). Взятие для исследования крови у животных проводилось сразу же после декапитации. Содержание свободных аминокислот в плазме крови крыс определяли методом жидкостной хроматографии на аналитической колонке Zorbax Eclipse XDB-C₈. Содержание мочевины в плазме крови оценивали фотометрически; активность аргиназы печени – спектрофотометрически [4]. Продукцию NO определяли по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов (NO₃⁻/NO₂⁻) [5]. Ректальную температуру измеряли с помощью электротермометра ТПЭМ-1. Полученные данные обработаны общепринятыми методами статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение. Опыты показали, что внутрибрюшинное введение ЛПС крысам (n=12) приводило к медленному нарастанию температуры тела и к слабовыраженной гипертермии. Так, температура тела повышалась на 1,1°C (p<0,05) и 1,0°C (p<0,05) через 120 и 180 мин. после введения экзопирогена. Инъекция ЛПС кроликам (n=9) в кровоток приводила к быстрому нарастанию ректальной температуры и к выраженной гипертермии (на 0,6°C (p<0,05), 1,2°C (p<0,05) и 1,5°C (p<0,05) через 30, 60 и 120 мин. соответственно. Установлено также, что при эндотоксиновой лихорадке, наряду с повышением температуры тела, у крыс и кроликов повышается активность процессов детоксикации, процессов ПОЛ в крови и печени и снижается ТПА плазмы крови.

Принимая во внимание роль аргиназы печени в регуляции синтеза монооксида азота в гепатоцитах и уровня мочевины в крови, изучены характер изменений активности аргиназы печени, уровня мочевины, а также содержания NO₃⁻/NO₂⁻ в плазме крови у крыс при эндотоксиновой лихорадке. Опыты, выполненные на крысах, показали, что действие ЛПС у крыс через 120, 180 и 330 мин после введения в организм экзопирогена приводило к повышению активности аргиназы в печени на 53,1% (n=8), 39,2% (n=7) и 23,3% (n=7) (p<0,05) соответственно, по сравнению с контролем. Активность аргиназы в печени у крыс контрольной группы через 120, 180 и 330 мин после внутрибрюшинного введения физраствора составляла 5,6±0,27 (n=7), 5,0±0,22 (n=7) и 5,4±0,29 (n=7) мкмоль мочевины/г сырой ткани·час.

Выявлено, что действие ЛПС в организме у крыс через 120, 180 и 330 мин после инъекции экзопирогена сопровождается повышением на 26,0% (n=8, p<0,05), 30,7% (n=8, p<0,05) и 39,8% (n=7, p<0,05) у опытных животных по сравнению с контролем (введение физраствора) концентрации мочевины в плазме крови, которая составляла

соответственно $4,4 \pm 0,50$; $5,1 \pm 0,60$ и $5,2 \pm 0,43$ мМоль/л (рис. 1). При эндотоксической лихорадке, через 120 мин после инъекции ЛПС, в плазме крови у крыс снижалось на 32,4% содержание аргинина, которое составляло $0,164 \pm 0,013$ мМоль/л (рис. 1).

Внутривенное введение ЛПС, одновременно с ростом ректальной температуры, вызывало повышение концентрации мочевины в плазме крови у кроликов на 39,8% ($p < 0,05$, $n=7$) через 60 мин и на 77,8% ($p < 0,05$, $n=7$) через 120 мин. после инъекции и снижение уровня аминокислоты аргинина на 57,7% и 42,3% (с $0,26 \pm 0,016$ до $0,11 \pm 0,024$ и $0,15 \pm 0,026$ мМоль/л) соответственно.

Действие ЛПС у крыс ($n=7$) через 120 и 180 мин после введения экзопирогена приводило к повышению уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови животных на 28,2 % ($p < 0,05$) и 58,4 % ($p < 0,05$) и составляло соответственно $6,8 \pm 0,1$ и $9,5 \pm 1,27$ мкМоль/л (рис. 1).

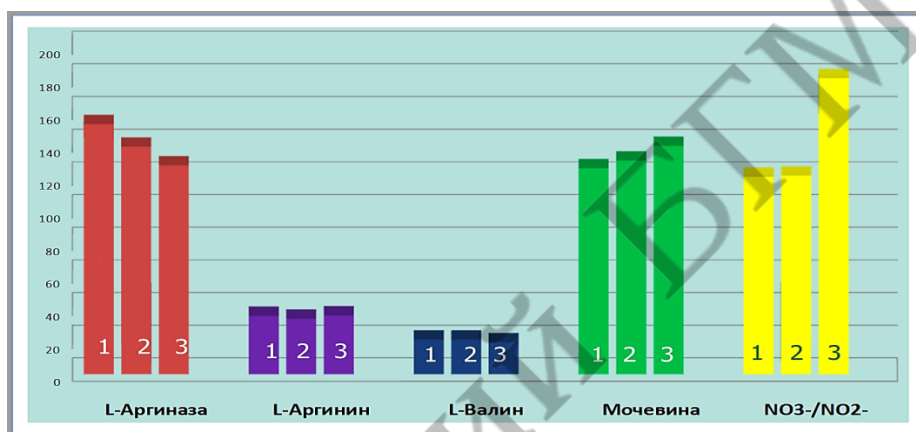


Рис. 1 – Изменение активности L-аргиназы, уровней свободного аргинина, L-валина, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, концентрации мочевины в плазме крови у крыс после внутрибрюшинного введения ЛПС (5 мкг/кг) через 120 мин (1), 180 мин (2) и 330 мин (3)

С целью выяснения значимости аргиназы печени в регуляции температуры тела использовался ингибитор аргиназы L-валин (100 мг/кг), который вводили за 30 мин до начала опыта, крысам – внутрибрюшинно, а кроликам – внутривенно. опыты показали, что депрессия аргиназы печени L-валином в условиях эндотоксической лихорадки препятствует активации детоксикационной функции печени и повышению температуры тела (рис. 2).

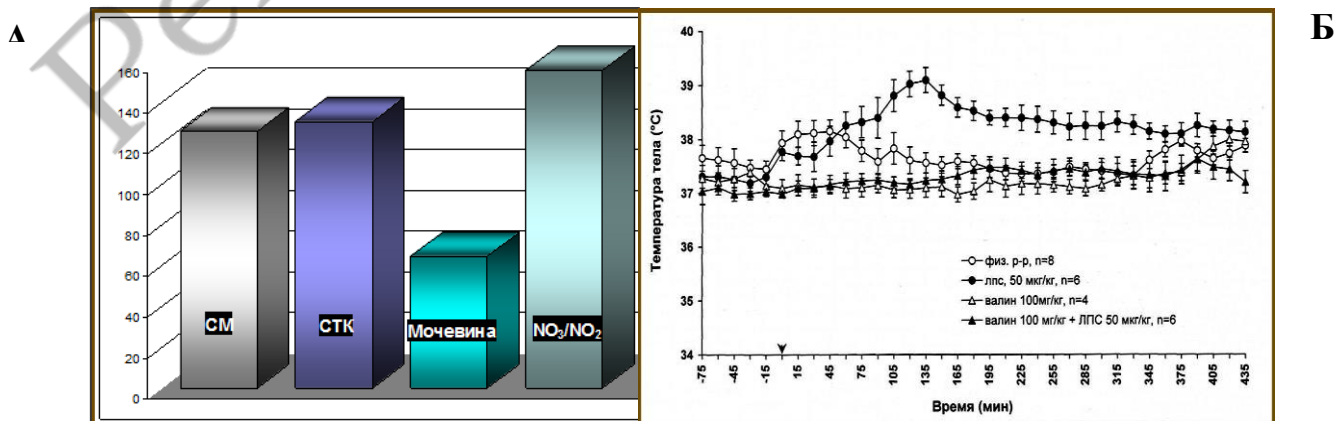


Рис. 2 – Изменение содержания «средних молекул», мочевины, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ (А) и ректальной температуры (Б) при эндотоксиновой лихорадке у крыс в условиях депрессии аргиназы печени L-валином (100 мл/кг)

Принимая во внимание, что действие в организме бактериальных эндотоксинов вызывает экспрессию NO-синтазы и образование больших количеств NO, изучен характер изменения $T^{\circ}\text{C}$ тела при действии ЛПС в условиях угнетения активности L-аргинин-NO системы.

В опытах на крысах и кроликах установлено, что лихорадочная реакция, вызываемая ЛПС, ослабляется предварительным введением в кровотоки (за 30 мин до инъекции ЛПС) L-NAME (25 мг/кг). В экспериментах на крысах выявлено, что действие ЛПС (5 мкг/кг) в условиях предварительного введения в организм животных L-NAME (25 мг/кг) сопровождалось ослаблением лихорадочной реакции (рис. 3). Так, ректальная температура у крыс, получивших только ЛПС повышалась на $1,2^{\circ}\text{C}$ и $1,1^{\circ}\text{C}$ через 120 и 180 мин. после инъекции, в то время как у животных, которые получили ЛПС в условиях действия L-NAME наблюдалось повышение температуры в указанные промежутки времени после введения эндотоксина всего лишь на $0,8^{\circ}\text{C}$ и $0,6^{\circ}\text{C}$.

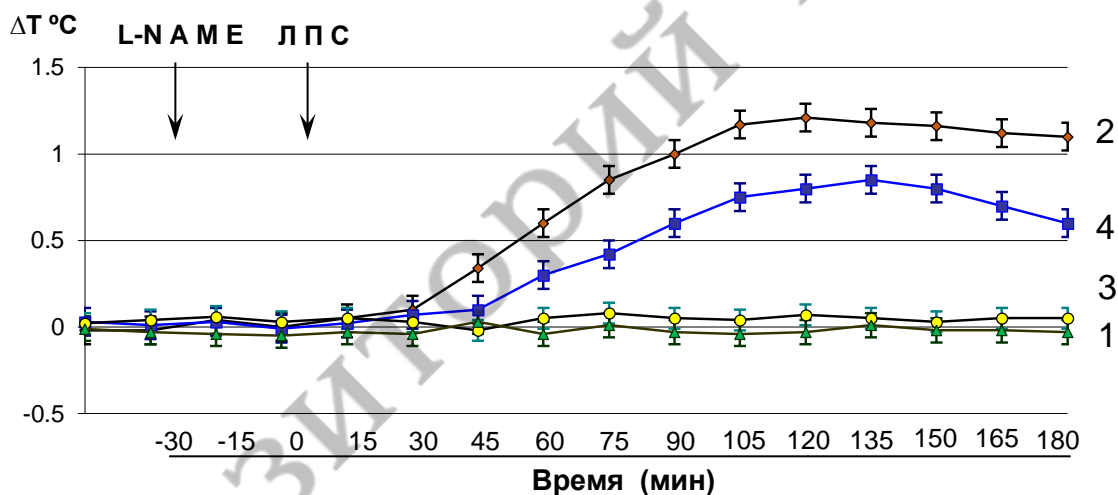


Рис. 3 – Изменение ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения: 1 – физ. раствора, 2 – ЛПС (5 мкг/кг), 3 – L-NAME (25 мг/кг), 4 – ЛПС (5 мкг/кг) в условиях действия L-NAME (25 мг/кг).

Примечание - ↓ (стрелка) – момент введения препаратов

У кроликов через 120 мин после инъекции ЛПС (0,5 мкг/кг) в условиях предварительного введения в кровотоки L-NAME, ректальная температура повышалась с $38,8 \pm 0,12^{\circ}\text{C}$ до $39,3 \pm 0,128^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=6$), в то время как у животных контрольной группы ($n=7$) с $38,6 \pm 0,10^{\circ}\text{C}$ до $40,3 \pm 0,11^{\circ}\text{C}$, т.е. развитие эндотоксиновой лихорадки в условиях действия ингибиторов NOS характеризовалось меньшей скоростью нарастания и меньшими значениями температуры тела.

Выявлено, что действие ЛПС в организме у крыс ($n=7$), предварительно (за 30 мин. до инъекции экзопирогена) получивших внутрибрюшинно L-NAME (25 мг/кг)

сопровождается значительным повышением уровня мочевины и более выраженными изменениями в процессах детоксикации, а также ПОЛ в крови и печени.

Учитывая, что гидролитическое расщепление аминокислоты аргинина является последним этапом образования мочевины, в экспериментах на кроликах было изучено влияние введения в кровоток L-аргинина. Опыты, выполненные на кроликах, показали, что введение в краевую вену уха L-аргинина солянокислого (50 мг/кг), спустя 60 и 90 мин после инъекции ЛПС, не только предотвращало дальнейшее повышение температуры тела, но и оказывало выраженный антипиретический эффект. Снижение ректальной температуры у животных на высоте лихорадки (через 15 и 30 мин после введения аминокислоты) составляло $0,8^{\circ}\text{C}$ и $0,7^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=6$). Антипиретический эффект аргинина солянокислого в значительной мере был обусловлен усилением у кроликов процессов теплоотдачи и усилением теплопродукции.

В опытах на кроликах также установлено, что введение L-аргинина солянокислого через 30 мин. после инъекции в кровоток приводит не только к снижению температуры тела у лихорадящих животных, но и к повышению уровня мочевины в крови. Уровень мочевины в крови повышался на 29,8% ($p < 0,05$, $n=7$) и составлял $5,4 \pm 0,60$ ммоль/л.

Принимая во внимание известные данные о том, что мочевина оказывает стабилизирующее действие на мембраны, инактивирует протеолитические ферменты, препятствует усилению протеолиза, можно было предположить, что повышение уровня мочевины в крови при эндотоксической лихорадке может иметь важное значение в регуляции $T^{\circ}\text{C}$ тела.

Опыты показали, что введение в кровоток кроликам мочевины в дозе 0,3 г/кг на высоте подъема $T^{\circ}\text{C}$ тела приводило к ослаблению лихорадки. Так, через 15 и 30 мин от момента введения мочевины, на высоте лихорадки (60 мин), ректальная температура снижалась по сравнению с контролем на $0,9 \pm 0,08^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=12$) и $0,8 \pm 0,10^{\circ}\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=12$). У крыс внутрибрюшинное введение мочевины в дозе 3,0 г/кг за 30 мин до инъекции ЛПС полностью устраняло развитие лихорадочной реакции. Установлено также, что внутривенное введение мочевины (0,3 г/кг) через 30 мин. после инъекции приводило у лихорадящих кроликов (90 мин. действия ЛПС) к повышению уровня аргинина на 29,3% ($p < 0,05$, $n=7$).

Выводы: 1. Температура тела, активность детоксикационной функции печени и формирование терморегуляторных реакций организма у крыс и кроликов на действие в организме животных бактериальных эндотоксинов, зависят от активности аргиназы печени и уровня мочевины в крови; 2. Действие эндотоксина в организме приводит к повышению температуры тела, уровня мочевины, $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$, продуктов ПОЛ в крови и процессов детоксикации у экспериментальных животных; 3. Депрессия аргиназы печени препятствует повышению температуры тела и развитию характерных изменений в процессах детоксикации, ПОЛ на действие ЛПС; 4. Мочевина, введенная в кровоток кроликам и внутрибрюшинно крысам, понижает температуру тела у животных в условиях эндотоксической лихорадки, а также ослабляет характерные для действия бактериального эндотоксина изменения в процессах ПОЛ, содержания L-аргинина и $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови; 5. Взаимодействие цикла синтеза мочевины с циклом синтеза NO в печени вносит

существенный вклад в процессы детоксикации и терморегуляции при бактериальной эндотоксинемии. Утечка аргинина из цикла синтеза мочевины в реакции синтеза NO в печени имеет важное значение в патогенезе эндотоксиновой лихорадки, а усиление использования аргинина в процессах образования мочевины – в механизмах эндогенного антипиреза.

Литература

1. Висмонт, А.Ф. Роль аргиназы печени и мочевины крови в процессах теплообмена, детоксикации, формирования тиреоидного статуса и тепловой устойчивости / А.Ф. Висмонт, Ф.И. Висмонт // Весці Нацыянальнай Акадэміі Навук Беларусі. Серыя медыцынскіх навук. - 2014. - N. 2. – С. 48-55.
2. Гурин, В.Н. Терморегуляция и биологически активные вещества плазмы крови / В.Н. Гурин, А.В.Гурин А.В. // . - Минск. 2004.
3. Гершенович, З.С., Защитный эффект аргинина при гипотермии / З.С. Гершенович, Я.И. Векслер // Биохимия. – 1963. – Т. 28. - № 6. – С. 937–940.
4. Geyer, J.W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // Anal. Biochem. – 1971. – Vol. 39, № 2. – P. 412–417.
5. Moshage, H. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et. all]. // Clin. Chem.-1995. – Vol.41, N 6 – P.892-896.