

О ЗНАЧИМОСТИ L-АРГИНИН-НО СИСТЕМЫ В МЕХАНИЗМАХ РЕАЛИЗАЦИИ АНТИПИРЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МОЧЕВИНЫ В УСЛОВИЯХ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭНДОТОКСИНЕМИИ

Висмонт Ф.И., Жадан С.А., Висмонт А.Ф.

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

Ключевые слова: монооксид азота, мочевины, бактериальная эндотоксинемия, L-аргинин-НО-система.

Резюме: в опытах на крысах и кроликах установлено, что активность L-аргинин-НО системы имеет значение в механизмах реализации антипиретического действия мочевины в условиях бактериальной эндотоксинемии. Повышение активности L-аргинин-НО системы, как и уровня мочевины в крови является одним из факторов эндогенного антипиреза.

Resume: in experiments on rats and rabbits, it was found that the activity of the L-arginine-NO system is important in the mechanisms of realization of the antipyretic action of urea under conditions of bacterial endotoxemia. An increase in the activity of the L-arginine-NO system, as well as the level of urea in the blood, is one of the factors of endogenous antipyresis.

Актуальность. К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значимости активности L-аргинин-НО системы и мочевины в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии.

Ранее нами было показано, что как центральное, так и системное введение в организм аминокислоты L-аргинина оказывает выраженный антипиретический эффект в условиях эндотоксиновой лихорадки [1, 2]. Учитывая имеющиеся в литературе сведения о значимости аминокислоты аргинина для процессов мочевинообразования и биосинтеза монооксида азота NO [3, 5, 10], можно было предположить, что утечка аргинина из цикла синтеза мочевины будет вносить существенный вклад в пул эндогенного аргинина и сказываться на активности L-аргинин-НО системы, уровне NO, имеющего важное значение для протекания различных физиологических и патологических процессов и регуляции температуры тела, в частности, при эндотоксинемии [2, 4].

Цель: выяснить значимость активности L-аргинин-НО системы и мочевины в регуляции температуры тела при бактериальной эндотоксинемии.

Задачи: 1. Исследовать температуру тела, содержание мочевины и нитратов/нитритов в плазме крови у крыс и кроликов при бактериальной эндотоксинемии; 2. Определить влияние введения в организм как мочевины, так и L-аргинин гидрохлорида на температуру тела, содержание мочевины и нитратов/нитритов в плазме крови у крыс и кроликов при бактериальной эндотоксинемии; 3. Выяснить особенности изменения температуры тела, уровня мочевины и нитратов/нитритов в плазме крови у крыс при бактериальной эндотоксинемии в условиях угнетения активности NO-синтазы.

Материалы и методы. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных крысах и кроликах обоего пола. Животные до постановки эксперимента адаптировались к условиям вивария, температура воздуха в виварии поддерживалась на уровне 20–22°C, что находится в пределах термонейтральной зоны для крыс. При выполнении работы особое внимание было уделено содержанию животных. Они получали полно-

ценный пищевой рацион в соответствии с правилами содержания лабораторных животных. Питьевой режим соответствовал принципу *al libitum*.

В связи с имеющимися в литературе данными о том, что у животных в течение суток происходит значительное колебание уровня ряда гормонов и биогенных аминов в крови, которые сопровождаются изменениями в энергетическом и пластическом обмене, опыты проводили в строго определенное время (8–12 ч утра).

Для создания модели бактериальной эндотоксинеми, 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. 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 определяли фотометрически. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитратов/нитритов ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) [7]. С целью выяснения значимости активности L-аргинин-NO системы в регуляции температуры тела использовали неселективный ингибитор NO-синтазы метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США). Ректальную температуру у крыс и кроликов измеряли с помощью электротермометра ТПЭМ-1. В ряде опытов регистрацию температуры тела у крыс осуществляли при помощи телеметрической установки Mini Mitter (модель 4000, США). Полученные данные обработаны общепринятыми методами статистики с использованием t-критерия Стьюдента. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. Опыты показали, что внутрибрюшинное введение ЛПС крысам ($n=12$) приводило к медленному нарастанию температуры тела и к слабо выраженной 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 бактериального эндотоксина. 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).

Выявлено, что внутривенное введение ЛПС, вызывало повышение концентрации мочевины в плазме крови у кроликов на 22,8% ($p < 0,05$, $n=7$) через 60 мин и на 25,2% ($p < 0,05$, $n=7$) через 120 мин после инъекции и снижение уровня аргинина на 57,7% ($p < 0,05$, $n=7$) и 42,3% ($p < 0,05$, $n=7$) соответственно.

Содержание мочевины в плазме крови у крыс через 120 и 180 мин после внутрибрюшинного введения ЛПС возрастало на 26,0% ($p < 0,05$, $n=8$) и 37,8% ($p < 0,05$, $n=7$) по сравнению с контролем (введение физраствора), которое составляло соответственно $4,4 \pm 0,50$ и $5,1 \pm 0,60$ ммоль/л.

Установлено, что при бактериальной эндотоксинеми, сопровождающейся лихорадкой, изменяется концентрация в плазме крови аминокислоты аргинина, а также $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ – конечных продуктов деградации NO. Действие ЛПС у крыс ($n=7$) через 120 и 180 мин после введения бактериального эндотоксина приводило к повышению уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови животных на 29,0% ($p < 0,05$) и 58,2% ($p < 0,05$) и составляло соответственно $7,1 \pm 0,38$ и $9,6 \pm 1,2$ мкмоль/л. При бактериальной эндотоксинеми (через 120 мин после инъекции ЛПС) снижалось содержание аргинина в плазме крови на 32,4% ($p < 0,05$, $n=7$).

Показано, что введение интактным кроликам в краевую вену уха 30% раствора мочевины (0,3 г/кг) или L-аргинина солянокислого (50 мг/кг) фирмы Carl Roth GmbH+Co.KG, (Германия) не влияет на температуру тела. Внутривенное введение мочевины или L-аргинина солянокислого на высоте подъема температуры тела при бактериальной эндотоксинеми, сопровождающейся лихорадкой (через 60 и 90 мин от момента инъекции ЛПС) приводило к понижению ректальной температуры у кроликов на $0,9 \pm 0,08^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=7$) и $0,8 \pm 0,10^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=7$); $0,8 \pm 0,07^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=6$) и $0,7 \pm 0,07^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=6$) через 15 и 30 мин после инъекции мочевины или аргинина соответственно.

Внутривенное введение L-аргинина моногидрохлорида (100 мг/кг) кроликам в условиях действия ЛПС оказывало выраженный антипиретический эффект и приводило к повышению содержания $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в крови. Снижение ректальной температуры на высоте эндотоксиновой лихорадке через 15 и 30 мин после введения аминокислоты составляло $0,7^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$) и $0,8^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$). Уровень $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови, через 30 мин после инъекции, повышался на 27,1% ($p < 0,05$, $n=7$) и составлял $10,3 \pm 1,20$ мкМоль/л соответственно.

В опытах на кроликах ($n=7$) установлено, что лихорадочная реакция, вызываемая бактериальным эндотоксином, ослабляется предварительным (за 30 мин до инъекции ЛПС) введением в кровоток метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME, 25 мг/кг) – ингибитора NO-синтазы (NOS) и сопровождается повышением уровня мочевины в плазме крови.

Установлено, что через 120 мин после инъекции ЛПС (0,5 мкг/кг) в условиях предварительного введения в кровоток L-NAME, ректальная температура у кроликов 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.

Ректальная температура у крыс ($n=12$), 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 ($n=12$), 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 $0,6^\circ\text{C}$.

Выявлено, что через 120 мин после инъекции ЛПС (5,0 мкг/кг) действие эндотоксина у крыс ($n=7$) в условиях предварительного введения L-NAME сопровождается, по сравнению с контролем (внутрибрюшинное введение физраствора и ЛПС), снижением в плазме крови уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ на 48,7% ($p < 0,05$) и повышением концентрации мочевины на 26,8% ($p < 0,05$), которые составили $4,3 \pm 0,40$ мкМоль/л ($n=7$) и $8,0 \pm 0,85$ мМоль/л ($n=7$), соответственно.

Результаты опытов свидетельствовали о том, что системное действие ингибитора NO-синтазы L-NAME способно влиять на уровень мочевины и $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в крови и формирование терморегуляторных реакций организма при бактериальной эндотоксинеми. Учитывая, что внутрибрюшинное введение мочевины, которое вызывает у крыс значительное снижение содержания $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и уровня аргинина в плазме крови, оказывает выраженный антипиретический эффект в условиях бактериальной эндотоксинеми, сопровождающейся лихорадкой, были основания полагать, что уровень мочевины в крови сказывается на активности L-аргинин-NO системы и, соответственно, на

уровне NO в условиях действия в организме ЛПС, а активность L-аргинин-NO системы может влиять на процессы мочевинообразования. Ослабление лихорадочной реакции на действие ЛПС в условиях угнетения активности NOS, может быть связано, как со снижением уровня NO, а, соответственно, влияния NO на сосудистые терморегуляторные реакции [8], на процессы теплоотдачи, так и с повышением содержания мочевины в крови в этих условиях и с ее влиянием на ферментативную активность [9], а через инактивацию протеолитических ферментов, препятствовать образованию таких цитокинов – «медиаторов» лихорадки как ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α , имеющих важное значение в механизмах терморегуляции [6].

Выводы: таким образом, на основании результатов проведенных нами исследований и данных литературы, есть основания заключить, что активность L-аргинин-NO системы и уровень мочевины в крови, взаимодействие между циклом оксида азота и циклом синтеза мочевины в печени играет важную роль в патогенезе эндотоксиновой лихорадки. Уровень мочевины в крови определяет активность L-аргинин-NO системы и температуру тела на действие в организме бактериального эндотоксина. По-видимому, NO и мочевина являются важными факторами формирования терморегуляторных реакций при бактериальной эндотоксинемии, а повышение уровней как NO, так и мочевины в крови является одним из факторов эндогенного антипиреза. Развитие бактериальной эндотоксинемии, сопровождающейся лихорадкой у крыс в условиях действия в организме ингибитора NO-синтазы L-NAME, сопровождается более значительным повышением уровня мочевины в крови и менее выраженным подъемом температуры тела.

Литература

1. Висмонт, Ф.И. Нейрохимические механизмы антипиретического действия L-аргинина / Ф. И. Висмонт, Н. Н. Степаненко // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 1997. – №2. – С. 102–106.
2. Висмонт, Ф. И. Об участии аргинина ликвора в формировании «установочного» уровня регуляции температуры тела при эндотоксиновой лихорадке Ф. И. Висмонт, А. Ф. Висмонт / БГМУ в авангарде медицинской науки и практики: сб. науч. трудов / М-во здравоохранения Республики Беларусь. Бел. гос. мед. ун-т, редкол. А. В. Сикорский, В.Я.Хрыщанович. – Минск: ГУ РНМББ 2019. – Вып. 9. – С. 316-322.
3. Тэйлор, Б.С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции / Б.С. Тэйлор, Л.Х.Аларсон, Т.Р. Биллиар // Биохимия. - 1998. - № 7. - С. 905-923.
4. Gerstberger, R. Nitric oxide and body temperature control / R. Gerstberger // News Physiol. Sci. - 1999. - Vol. 14. - № 2. - P. 30-36.
5. Getz, G.S. Arginine/Arginase NO NO NO / G.S. Getz, C.A. Reardon // Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. – 2006, - Vol. 26. – P. 237-240.
6. Kluger, M.J. Cytokines and fever / M.J. Kluger, W. Kozak, L.R. Leon // Neuroimmunomodulation. – 1995. – № 4. – P. 216–223.
7. 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.
8. Nitric oxide increases cutaneous and respiratory heat dissipation in conscious rabbits / M.L. Mathai [et all.] // Am. J. Physiol. – 1997. – Vol. 272, № 6. – P. 1691–1697.
9. Regulation of nitric oxide synthesis in uremia / M. Arese [et all.] // Nephrol. Dial. Transplant. – 1995. – Vol. 10. – P. 1386–1397.
10. Scibior, D. Arginine – metabolism and functions in the human organism / D.Scibior, H. Czczot // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2004. – Vol 58. – P. 321–332.