

## ОБ УЧАСТИИ МОНООКСИДА АЗОТА В МЕХАНИЗМЕ АНТИПИРЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МОЧЕВИНЫ В УСЛОВИЯХ ЭНДОТОКСИНОВОЙ ЛИХОРАДКИ

Зенькович В. В., Висмонт Ф.И.

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск  
кафедра патологической физиологии

**Ключевые слова:** монооксид азота, мочевины, эндотоксिन, лихорадка, температура тела.

**Резюме:** Монооксид азота имеет существенную значимость в механизме антипиретического действия мочевины в условиях эндотоксической лихорадки. Введение мочевины в кровоток понижает температуру тела у кроликов при лихорадке и приводит к возрастанию в плазме крови уровня  $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ . Развитие лихорадки в условиях действия L-NAME сопровождается повышением уровня мочевины, ослаблением процессов ПОЛ в крови и менее выраженным подъемом температуры тела.

**Resume:** Nitric oxide has a significant importance in the mechanism of urea antipyretic action under the conditions of endotoxin fever. Introduction of urea in the bloodstream decreases the body temperature in rabbits with endotoxin fever and causes increasing of  $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$  level in blood plasma. The development of fever under the conditions of L-NAME action is accompanied by decreasing of lipid peroxidation processes, increasing in the content of urea in blood and less significant rise in body temperature.

**Актуальность.** Известно, что мочевины имеет особую значимость в процессах жизнедеятельности в норме и патологии. Ранее нами было установлено, что введение в организм мочевины оказывает выраженный антипиретический эффект и что L-аргинин-NO система участвует в патогенезе эндотоксической лихорадки. Учитывая, что последним этапом образования мочевины является гидролитическое расщепление аргининазой аминокислоты L-аргинина, являющейся основным источником образования монооксида азота (NO) [8], который играет важную роль в механизмах регуляции температуры тела [6], исследование значимости NO в механизме антипиретического действия мочевины представлялось весьма перспективным.

**Цель:** выяснить значимость монооксида азота в механизме антипиретического действия мочевины при эндотоксической лихорадке.

**Задачи:** 1. Исследовать температуру тела у животных в условиях действия в организме бактериального эндотоксина E.Coli; 2. Изучить характер изменений уровня нитратов/нитритов в плазме крови крыс при эндотоксической лихорадке; 3. Установить характер изменений уровня мочевины в плазме крови у животных при эндотоксической лихорадке; 4. Выяснить особенности изменения температуры тела и уровня мочевины в крови после введения L-аргинина солянокислого в условиях эндотоксической лихорадки; 5. Изучить влияние ингибитора NO-синтазы – метилового эфира NG-нитро-L-аргинина L-NAME на процессы терморегуляции.

**Материал и методы.** Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах (n=29) массой 160–180 г и взрослых кроликах (n=13) обоего пола массой 2,5–3 кг. Для создания общепринятой модели эндотоксической лихорадки, использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) – эндотоксин

E.Coli (серотип 0111:B4 Sigma, США), который вводили однократно крысам внутрибрюшинно в дозе 5 мкг/кг, кроликам в краевую вену уха в дозе 0,5 мкг/кг. Все наблюдения производились в термонеutralных условиях (20 – 22°C).

Взятие для исследований крови и ткани печени у животных проводилось за возможно минимальное время после декапитации. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме крови нитратов/нитритов ( $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ ) [7]. Концентрацию мочевины в плазме крови определяли фотометрически, а количественное содержание свободных аминокислот - методом жидкостной хроматографии. Активность процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови и печени оценивали по содержанию в них таких продуктов, как малоновый диальдегид (МДА), диеновые конъюгаты (ДК) и основания Шиффа (ОШ). Ректальную температуру измеряли у крыс и кроликов с помощью электротермометра ТПЭМ-1. Все полученные цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной биологической статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

### **Результаты и их обсуждение.**

В опытах на крысах и кроликах установлено, что при эндотоксиновой лихорадке возникают значительные изменения не только показателей теплообмена, но и содержания  $\text{NO}_3^- / \text{NO}_2^-$ , мочевины, а также свободного аргинина в плазме крови. 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 28,3 % (p<0,05) и 51,7 % (p<0,05) и составляло соответственно  $6,8 \pm 0,41$  и  $9,2 \pm 1,12$  мкМоль/л.

Внутрибрюшинное введение ЛПС через 120 мин после инъекции вызывало повышение концентрации мочевины в плазме крови у крыс на 30,8% (p<0,05, n=7), что составляло  $4,4 \pm 0,51$  мМоль/л, а через 180 мин - на 26,6% (p<0,05, n=8), что составляло  $5,4 \pm 0,60$  мМоль/л. Действие ЛПС у крыс (n=7) через 120 мин после введения экзопирогена приводило к снижению на 32,4% (p<0,02) содержанию аргинина в плазме крови, которое составляло  $163,5 \pm 2,96$  мкМоль/л.

У кроликов внутривенное введение ЛПС одновременно с повышением ректальной температуры вызывало повышение концентрации мочевины в плазме крови 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. Уровень мочевины в крови у кроликов контрольной группы составлял через 60 и 120 мин после введения физиологического раствора  $2,9 \pm 0,20$  и  $3,1 \pm 0,27$  мМоль (n=6) соответственно.

Активность свободнорадикальных реакций и уровень образуемых ими продуктов, как известно, имеет важное значение для осуществления процессов терморегуляции и эндогенного антипиреза [3,4].

В опытах на крысах установлено, что действие бактериального эндотоксина в организме животных сопровождается возрастанием в плазме крови и ткани печени содержания основных продуктов ПОЛ: ДК, МДА и ОШ. Так, через 120 и 180 мин после инъекции ЛПС количество ДК в печени крыс увеличивалось на 25,6% (p<0,05, n=7) и 38,2% (p<0,05, n=7), а в плазме крови на 14,5% (p<0,05, n=7) на 180-й минуте эндотоксиновой 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 через 120 и 180 мин после введения ЛПС повышался в печени и плазме крови соответственно на 14,9% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ) и 20,6% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ), 95,1% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) и 128,1% ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ). У интактных животных ( $n=7$ ) концентрация ДК, МДА и ОШ в плазме крови и печени была равной соответственно  $0,65 \pm 0,036$   $\Delta D_{233}$ /мл,  $0,78 \pm 0,050$  мкМоль/мл,  $4,2 \pm 0,17$  ЕД/мл и  $15,3 \pm 1,21$   $\Delta D_{233}$ /г,  $16,5 \pm 0,59$  нМоль/г,  $127,1 \pm 12,35$  ЕД/г ткани.

Таким образом, полученные результаты свидетельствовали об активации процессов ПОЛ в крови и печени крыс в условиях эндотоксиновой лихорадки.

Учитывая способность мочевины оказывать стабилизирующее действие на мембраны [1], а через инактивацию протеолитических ферментов, препятствуя усилению протеолиза и на метаболизм пептидных гормонов, цитокинов и простагландинов, имеющих важное значение в терморегуляции [2], можно было предположить, что содержание мочевины в крови имеет значение в регуляции температуры тела при эндотоксиновой лихорадке.

Опыты на кроликах, показали, что введение в кровоток интактным животным 30%-го раствора мочевины (0,3 г/кг) не влияет на температуру тела. Введение в кровоток мочевины (0,3 г/кг) на высоте подъема температуры тела при эндотоксиновой лихорадке (через 60 и 90 мин от момента инъекции ЛПС) вызывало значительное понижение температуры тела и ослабление лихорадки. Так, через 15 и 30 мин от момента введения мочевины на высоте эндотоксиновой лихорадки (60 мин) ректальная температура у кроликов ( $n=8$ ) снижалась по сравнению с контролем на  $0,9 \pm 0,08^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) и  $0,8 \pm 0,10^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ).

Установлено, что развитие эндотоксиновой лихорадки (через 90 мин после инъекции экзопирогена) в условиях действия мочевины (введение мочевины за 30 мин до инъекции ЛПС) у экспериментальных животных сопровождается менее выраженными изменениями процессов ПОЛ в крови и печени. Так, содержание ДК, МДА и ОШ в плазме крови у кроликов ( $n=8$ ) в этих условиях развития эндотоксиновой лихорадки было ниже по сравнению с контролем (действие одного ЛПС) на 16,5% ( $p < 0,05$ ), 44,7% ( $p < 0,05$ ) и 35,8% ( $p < 0,05$ ), а в печени на 24,3% ( $p < 0,05$ ), 15,1% ( $p < 0,05$ ) и 37,2% ( $p < 0,05$ ) соответственно.

Учитывая, что гидролитическое расщепление аминокислоты L-аргинина является последним этапом образования мочевины, нами в экспериментах на кроликах было изучено влияние введения в кровоток L-аргинина солянокислого в дозе 50 мг/кг, дозе, не влияющей на температуру тела интактных животных. Опыты, выполненные на кроликах, показали, что введение в краевую вену уха L-аргинина солянокислого (50 мг/кг) в условиях действия в организме ЛПС, через 60 мин после инъекции эндотоксина, приводит к ослаблению лихорадки. Так, ЛПС (0,5 мг/кг) вызывал повышение температуры тела у кроликов ( $n=10$ ) на  $1,2 \pm 0,10^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) через 60 мин после инъекции, а через 90 мин отклонение составляло  $1,5 \pm 0,09^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ). Внутривенное введение L-аргинина солянокислого (50 мг/кг), спустя 60 и 90 мин после инъекции ЛПС оказывало выраженный антипиретический эффект. Снижение ректальной температуры на высоте лихорадки (через 15 и 30 мин после введения аминокислоты) составляло 0,8 и  $0,7^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ,  $n=6$ ) (рисунок 1).

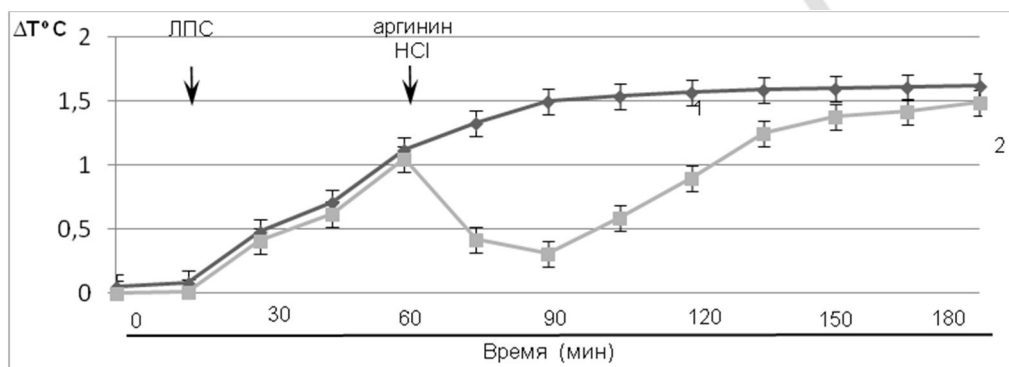


Рис. 1 – Изменение температуры тела у кроликов после введения в кровоток L-аргинина солянокислого в дозе 50 мг/кг (2) в условиях действия ЛПС (0,5 мкг/кг).

В исследованиях по изучению биологической роли NO широко используются ингибиторы фермента его образования NO-синтетазы – ложные аналоги L-аргинина, в частности его метиловые эфиры. Нами были использован широко применяемый в экспериментах *in vivo* и *in vitro* ингибитор NO-синтетазы метиловый эфир N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинин (L-NAME).

В опытах на кроликах установлено, что лихорадочная реакция, вызываемая бактериальным эндотоксином, ослабляется предварительным введением (за 30 мин до инъекции ЛПС) в кровоток L-NAME (25 мг/кг), существенно не влияющего в указанной дозе на температуру тела в норме. Так, у животных через 120 мин после инъекции ЛПС (0,5 мкг/кг) в условиях предварительного введения в кровоток L-NAME, ректальная температура повышалась с 38,8±0,128°С до 39,3±0,128°С (p<0,05, n=6), в то время как у животных контрольной группы (n=7) с 38,6±0,10°С до 40,3±0,11°С (рисунок 2).

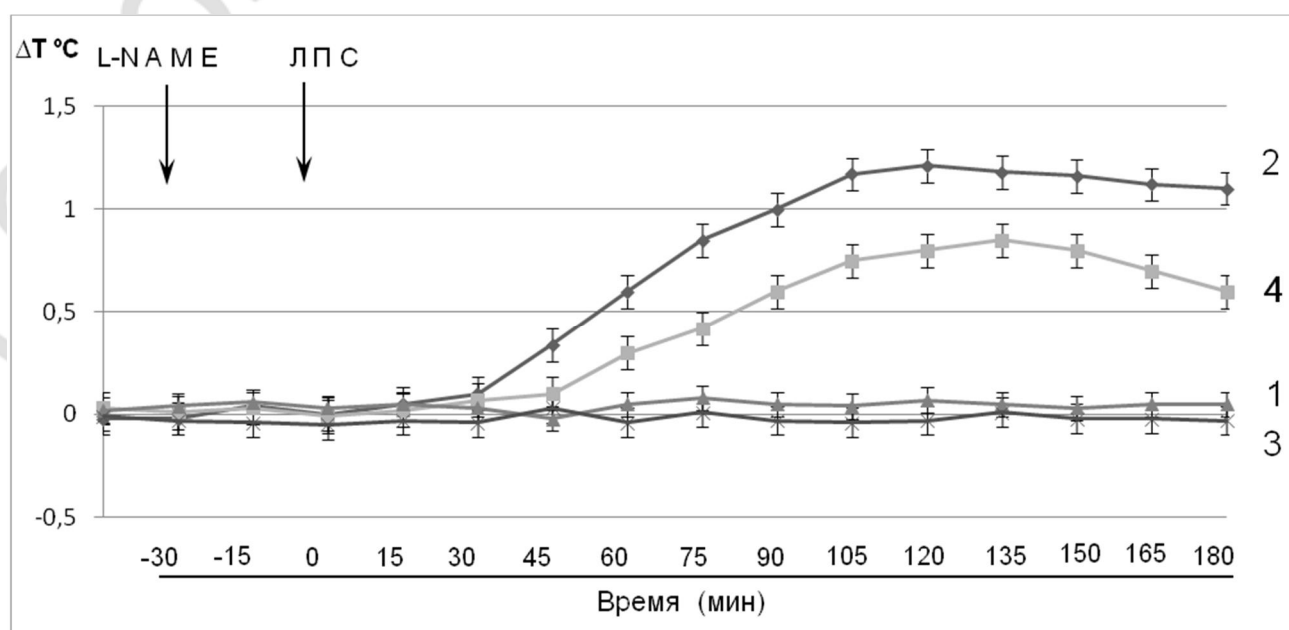


Рис. 2 – Изменение ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения: 1 – физ. раствора, 2 – ЛПС (5 мкг/кг), 3 – L-NAME (25 мг/кг), 4 – ЛПС (5 мкг/кг) в условиях действия L-NAME (25 мг/кг). Примечание – ↓ (стрелка) – момент введения препаратов



Выявлено, что действие ЛПС в организме у крыс ( $n=7$ ), предварительно (за 30 мин до инъекции экзопирогена) получивших внутривенно L-NAME (25 мг/кг), сопровождается не только менее значимым подъемом температуры тела и активности процессов ПОЛ в крови и печени, но и выраженным повышением уровня мочевины в плазме крови.

Следовательно, активность процессов ПОЛ в организме, как и формирование терморегуляторных реакций при действии ЛПС у крыс и кроликов зависит от состояния L-аргинин-NO системы и уровня мочевины в крови. Есть основания полагать, что при бактериальной эндотоксинеми не исключена утечка аргинина из цикла синтеза мочевины, что может вносить существенный вклад в пул эндогенного аргинина, имеющегося в гепатоцитах, а соответственно сказываться на активности L-аргинин-NO системы печени и уровне NO. По-видимому, утечка аргинина из цикла синтеза мочевины в цикл синтеза монооксида азота в печени имеет важное значение в механизмах развития эндотоксиновой лихорадки, а усиленное использование L-аргинина в процессах мочевинообразования – в механизмах эндогенного антипиреза.

**Выводы:** 1. Мочевина и L-аргинин-NO система печени, определяя уровень NO в ней, имеют важное значение в механизмах регуляции температуры тела у крыс и кроликов в условиях действия в организме животных бактериального эндотоксина; 2. Повышение уровня мочевины в крови является одним из факторов эндогенного антипиреза. Мочевина, введенная в кровотоки, понижает температуру тела у кроликов в условиях эндотоксиновой лихорадки и приводит в этих условиях к возрастанию в плазме крови уровня  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ , - конечного продукта деградации NO; 3. L-аргинин-NO система участвует в изменениях уровня мочевины крови, формировании терморегуляторных реакций организма на действие бактериального эндотоксина; 4. Развитие эндотоксиновой лихорадки у крыс в условиях действия в организме ингибированной NO-синтазы L-NAME, сопровождается более значительным повышением уровня мочевины, ослаблением процессов ПОЛ в крови и менее выраженным подъемом температуры тела.

### Литература

1. Гершенович, З.С. Защитное действие мочевины при гипероксии. Содержание свободной и связанной форм мочевины в мозге / З.С. Гершенович [и др.] // Вопросы медицинской химии. – 1972. - Т. 17, N 2. - С. 207-211.
2. Гурин, В.Н. Терморегуляция и биологически активные вещества плазмы крови / В.Н. Гурин, А.В. Гурин // Минск, 2004.
3. Давыдовский, А.Г. Свободнорадикальное окисление и антиоксидантные процессы в печени при бактериальной эндотоксинеми / А.Г. Давыдовский // Минск: ООО «Ковчег», 2004.
4. Маеда, Х. Оксид азота и кислородные радикалы при инфекции, воспалении и раке / Х. Маеда, Т. Акаике // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. - С. 1007 – 1019.
5. Шугалей, В.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду / В.С. Шугалей, Л.С. Козина // Физиологический журнал СССР им. И.М. Сеченова. – 1977. – Т. 63, № 8. - С. 1199-1202.
6. Gerstberger, R. Nitric oxide and body temperature control / R. Gerstberger // News Physiol. Sci. - 1999. - Vol. 14, № 2. - P. 30-36.
7. Moshage, H. Nitric and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et. all] // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, N 6. – P.892-896.

8. Scibor, D. Arginine-metabolism and functions in the human organism / D. Scibor, H.Czeczot // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2004. – Vol. 58. – P. 321-332.

Репозиторий БГМУ