

О значимости аргиназы печени, монооксида азота и мочевины крови в регуляции температуры тела при эндотоксической лихорадке

Висмонт А. Ф., Жадан С. А., Писарик Д. М., Висмонт Ф. И.

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Реферат. Проведено комплексное исследование значимости активности аргиназы печени и уровня мочевины крови в регуляции L-аргинин-NO системы и температуры тела при эндотоксической лихорадке.



Установлено, что действие бактериального эндотоксина в организме приводит к повышению температуры тела, уровня мочевины и нитратов/нитритов в крови у крыс и кроликов. Депрессия аргиназы печени как N^o-гидрокси-нор-L-аргинином, так и L-валином препятствует повышению температуры тела и развитию характерных изменений в процессах теплообмена на действие эндотоксина. Мочевина, введенная в кровоток кроликам и внутривенно крысам, понижает температуру тела у животных в условиях эндотоксической лихорадки, а также устраняет характерные для действия бактериального эндотоксина изменения содержания L-аргинина в плазме крови. По-видимому, утечка аргинина из цикла синтеза мочевины в реакции синтеза монооксида азота в печени имеет важное значение в патогенезе эндотоксической лихорадки, а усиление использования аргинина в процессах образования мочевины — в механизмах эндогенного антипиреза.

Ключевые слова: аргиназа печени, мочевина, монооксид азота, детоксикация, эндотоксическая лихорадка.

Введение. 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, 2, 3]. Имеются сведения о том, что между функциональным состоянием печени и процессами регуляции температуры тела существует тесная взаимосвязь. Рядом исследователей выявлено, что изменение уровня мочевины в крови коррелирует с продукцией в организме монооксида азота (NO), играющего важную роль в терморегуляции и в процессах образования которого имеет значение аргиназа печени [3]. В то же время данные о значимости аргиназы печени, NO и мочевины в процессах формирования терморегуляторных реакций организма при бактериальной эндотоксинемии отсутствуют.

Цель работы — выяснение значимости аргиназы печени, NO и мочевины крови, взаимосвязи и взаимодействия цикла синтеза мочевины с циклом синтеза NO в регуляции температуры тела при эндотоксической лихорадке.

Материалы и методы. Опыты выполнены на ненаркотизированных белых крысах обоего пола массой 160–180 г и взрослых кроликах обоего пола массой 2,5–3,0 кг. Животные получали полноценный пищевой рацион в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Питьевой режим соответствовал принципу *ad libitum*.

В связи с тем, что в литературе имеются данные о том, что у животных в течение суток происходят значительные колебания 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). Все наблюдения производили в термонеutralных условиях (20–22 °C). Для создания модели эндотоксической лихорадки, использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) — эндотоксин *E. Coli* (серия 0111:B4 Sigma, США), который вводили однократно крысам внутривенно в дозе 5 мкг/кг, кроликам внутривенно в дозе 0,5 мкг/кг. Для оценки вегетативных показателей в процессе развития лихорадки проводили наряду с определением частоты дыхания регистрацию частоты сердечных сокращений. Частоту дыхания фиксировали с помощью угольной манжетки и регистрировали на 4-канальном чернильнопишущем электрокардиографе в определенные интервалы времени. Частоту сердечных сокращений контролировали по ЭКГ. С целью выяснения значимости аргиназы печени и монооксида азота (NO) в процессах регуляции температуры тела использовали ингибитор аргиназы N^o-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].

Температуру кожи уха у кроликов, как и ректальную температуру у крыс и кроликов (в прямой кишке на глубине 3,0 и 5,0 см соответственно), измеряли с помощью электротермометра ТПЭМ-1 (НПО «Медфизприбор», Российская Федерация). В ряде опытов регистрацию глубокой температуры тела у бодрствующих крыс осуществляли при помощи телеметрической установки Mini Mitter (модель 4000, США).



Эксперименты на крысах и кроликах проводились в соответствии с этическими нормами обращения с животными. Полученные цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной биологической статистики с помощью критерия Стьюдента. Все данные представлялись в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического ($X \pm S_x$). Достоверность результатов учитывали 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 слабовыраженной гипертермии. Так, температура тела повышалась на $1,1^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$) и $1,0^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$) 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 $0,6^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$), $1,2^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$) и $1,5^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$) через 30, 60 и 120 мин соответственно.

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 $5,6 \pm 0,27$ ($n = 7$), $5,0 \pm 0,22$ ($n = 7$) и $5,4 \pm 0,29$ ($n = 7$) мкмоль мочевины/г сырой ткани \cdot ч.

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. 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.

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.

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.

С целью выяснения значимости аргиназы печени в регуляции температуры тела использовался ингибитор аргиназы N^0 -гидрокси-нор-L-аргинин (nor-NOHA) фирмы BACHEM (Германия), а также L-валин (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия), которые вводили за 30 мин до начала опыта крысам — внутрибрюшинно, а кроликам — внутривенно.

В опытах на крысах установлено, что лихорадочная реакция на внутрибрюшинное введение ЛПС у крыс ослабляется предварительным ежедневным внутрибрюшинным введением в течение 7 дней раствора nor-NOHA в дозе 10 мг/кг, и полностью устраняется как однократным внутрибрюшинным введением (за 30 мин до инъекции экзопирогена), так и многократным введением аминокислоты L-валина в дозе 100 мг/кг.

Так, температура тела у крыс ($n = 7$) в контроле (через 7 дней после ежедневного внутрибрюшинного введения 1,0 мл физраствора) под влиянием внутрибрюшинного введения ЛПС (5,0 мкг/кг) через 120 и 180 мин от начала инъекции эндотоксина, повышалась на $1,2 \pm 0,14^\circ\text{C}$ и $1,1 \pm 0,11^\circ\text{C}$ ($p < 0,01$), соответственно, а в условиях действия nor-NOHA через 2 и 3 ч после введения ЛПС — на $0,5 \pm 0,06$ и $0,4 \pm 0,02^\circ\text{C}$ ($n = 8$). В условиях действия в организме L-валина, лихорадочная реакция у крыс на ЛПС не развивалась, даже если экзопироген вводили в дозе 50 мкг/кг (рисунок 1).

Установлено, что через 120 мин после инъекции ЛПС в условиях действия в организме животных L-валина уровень мочевины в плазме крови снижается, а содержание $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ повышается по сравнению с контролем на $35,2\%$ и $55,7\%$ ($p < 0,01$, $n = 7$), соответственно.

В опытах на крысах и кроликах установлено, что лихорадочная реакция, вызываемая ЛПС, ослабляется предварительным введением в кровоток (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. 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 ($n = 10$), которые получили ЛПС в условиях действия L-NAME имело место повышение температуры в указанные промежутки времени после введения эндотоксина всего лишь на $0,8^\circ\text{C}$ и $0,6^\circ\text{C}$.

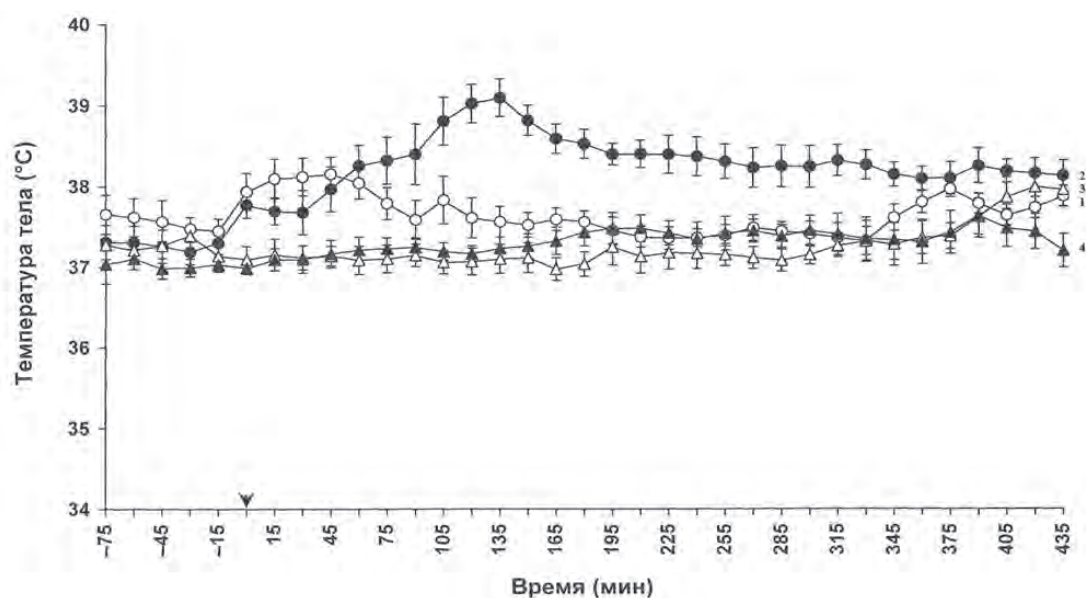


Рисунок 1 — Изменения ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения:
 1 — физраствора ($n = 8$); 2 — ЛПС (50 мкг/кг, $n = 6$); 3 — L-валина (100 мг/кг, $n = 6$);
 4 — ЛПС (50 мкг/кг) в условиях действия L-валина (100 мг/кг, $n = 7$); стрелка — момент
 введения ЛПС (50 мкг/кг); n — количество животных в группе

У кроликов через 120 мин после инъекции ЛПС (0,5 мкг/кг) в условиях предварительного введения в кровоток L-NAME ректальная температура повышалась с $38,8 \pm 0,12$ °C до $39,3 \pm 0,128$ °C ($p < 0,05$, $n = 6$), в то время как у животных контрольной группы ($n = 7$) с $38,6 \pm 0,10$ °C до $40,3 \pm 0,11$ °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.

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 $0,8$ °C и $0,7$ °C ($p < 0,05$, $n = 8$).

В опытах на кроликах также установлено, что введение в кровоток L-аргинина гидрохлорида через 30 мин после инъекции приводит не только к снижению температуры тела у лихорадящих животных, но и к повышению содержания мочевины и $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в крови. Уровень мочевины и $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови повышался (по сравнению с соответствующим контролем — введение физраствора лихорадящим животным) на 29,8 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и 27,1 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и составлял $5,4 \pm 0,60$ ммоль/л ($n = 7$) и $10,3 \pm 1,20$ мкмоль/л ($n = 7$) соответственно.

Как известно, мочевина может оказывать стабилизирующее действие на мембраны, в частности мембраны лизосом, на ферментативную активность, а через инактивацию протеолитических ферментов, препятствуя усилению протеолиза, соответственно и на метаболизм пептидных гормонов, провоспалительных цитокинов, на процессы образования NO, имеющие важное значение в терморегуляции. Учитывая, что мочевина может играть важную роль в процессах образования и деградации целого ряда пептидных гормонов, цитокинов и простагландинов, участвующих в регуляции температуры тела, можно предположить, что мочевина крови может иметь значение в процессах терморегуляции и, в частности, в регуляции температуры тела при эндотоксиновой лихорадке.

Результаты исследований показали, что внутрибрюшинное введение крысам и введение в кровоток (краевую вену уха) интактным кроликам 30%-го раствора мочевины в дозе 0,1; 0,3 и 1,0 г/кг не

влияет на температуру тела, и только лишь в дозе 3,0 г/кг приводит к значительному ее снижению. Развитие гипотермии у крыс через 60 мин после внутрибрюшинного введения мочевины в дозе 3,0 г/кг сопровождалось снижением концентрации аргинина на 95,5 % ($p < 0,001$, $n = 7$). Содержание $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ у животных в этих условиях повышалось на 69,5 % ($p < 0,05$, $n = 7$) и составляло $10,4 \pm 0,41$ мкмоль/л.

Введение в кровоток кроликам мочевины в дозе 0,3 г/кг на высоте подъема температуры тела приводило к ослаблению лихорадки (рисунок 2).

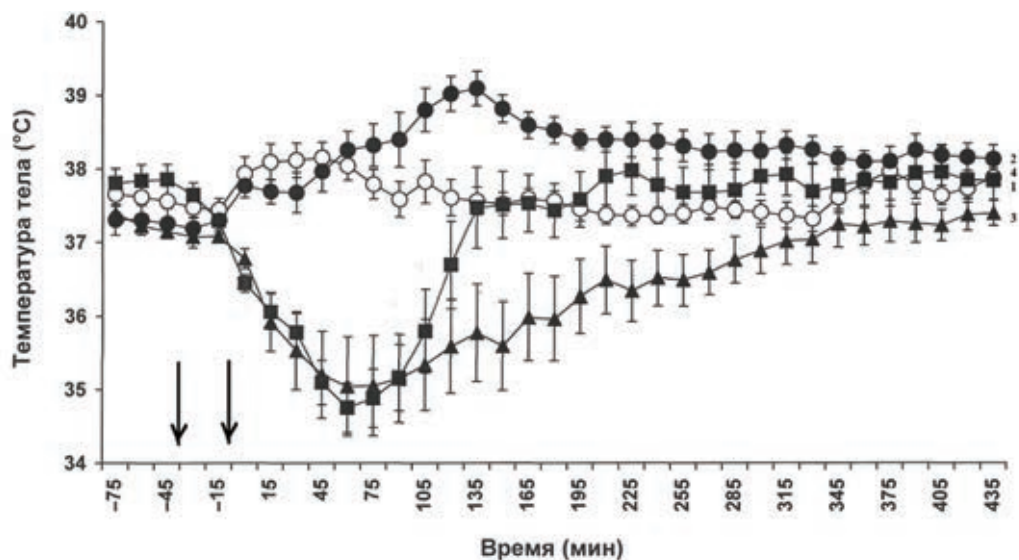


Рисунок 2 — Изменение ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения:
 1 — физраствор + физраствор ($n = 8$); 2 — физраствор + ЛПС (50 мкг/кг, $n = 7$);
 3 — мочевина (3,0 г/кг) + физраствор ($n = 7$); 4 — мочевина (3,0 г/кг) + ЛПС (50 мкг/кг, $n = 8$);
 стрелка — момент введения препаратов

Так, через 15 и 30 мин от момента введения мочевины, на высоте лихорадки (60 мин), ректальная температура снижалась по сравнению с контролем на $0,9 \pm 0,08$ °C ($p < 0,05$, $n = 12$) и $0,8 \pm 0,10$ °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 % ($p < 0,05$, $n = 7$).

Следовательно, результаты опытов свидетельствуют о том, что вещества, угнетающие активность NOS, при их системном действии, способны изменять уровень мочевины и $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в крови и формирование терморегуляторных реакций организма на действие бактериального эндотоксина. Учитывая, что внутрибрюшинное введение мочевины, которое вызывает у крыс значительное повышение содержания $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ и снижение уровня аргинина в плазме крови, оказывает выраженный анитипиретический эффект в условиях лихорадки; есть основание полагать, что уровень мочевины в крови сказывается на активности L-аргинин-NO системы и, соответственно, на уровне NO в условиях действия в организме ЛПС. Очевидно, что и 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 [6], на процессы теплоотдачи, так и с повышением содержания мочевины в крови в этих условиях и с ее влиянием на ферментативную активность [1, 2], 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 [7].

Заключение. На основании результатов проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Действие бактериального эндотоксина в организме приводит к снижению содержания аргинина, повышению уровня мочевины, нитратов/нитритов в крови и температуры тела у крыс и кроликов.

2. Депрессия аргиназы печени как N° -гидрокси-нор-L-аргинином, так и L-валином препятствует повышению температуры тела и содержания мочевины в крови, а также усугубляет повышение в ней уровня NO_3^-/NO_2^- на действие эндотоксина.

3. Мочевина, введенная в кровоток кроликам и внутрибрюшинно крысам, понижает температуру тела у животных в условиях эндотоксиновой лихорадки, а также устраняет характерные для действия бактериального эндотоксина изменения содержания L-аргинина в плазме крови.

4. Утечка аргинина из цикла синтеза мочевины в реакции синтеза монооксида азота в печени имеет важное значение в патогенезе эндотоксиновой лихорадки, а усиление использования аргинина в процессах образования мочевины — в механизмах эндогенного антипиреза.

Литература

1. Мочевина в живых организмах / З. С. Гершенович [и др.]. — Ростов н/Д: Изд-во Ростов. гос. ун-та. — 1970. — 83 с.
2. Шугалей, В. С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклимации к холоду / В. С. Шугалей, Л. С. Козина // Физиол. журн. СССР им. И. М. Сеченова. — 1977. — Т. 63, № 8. — С. 1199–1202.
3. 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. — № 2. — С. 48–55.
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, B. Kok, J. R. Huizenga, P. L. Jansen // Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41, № 6. — P. 892–896.
6. Nitric oxide increases cutaneous and respiratory heat dissipation in conscious rabbits / M. L. Mathai [et al.] // Am. J. Physiol. — 1997. — Vol. 272, № 6. — P. 1691–1697.
7. Kluger, M. J. Cytokines and fever / M. J. Kluger, W. Kozak, L. R. Leon // Neuroimmunomodulation J. — 1995. — № 4. — P. 216–223.

On the importance of liver arginase, nitrogen monoxide and blood urea in body temperature regulation during endotoxin fever

Vismont A. F., Zhadan S. A., Pisarik D. M., Vismont F. I.

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

A comprehensive study of the significance of liver arginase activity and blood urea level in the regulation of the L-arginine-NO system and body temperature in endotoxin fever was carried out.

In experiments on rats and rabbits it was found that the action of bacterial endotoxin in the body leads to an increase in body temperature, the level of urea and nitrates/nitrites in the blood in rats and rabbits. Depression of liver arginase by both N° -hydroxy-nor-L-arginine and L-valine prevents an increase in body temperature and the development of characteristic changes in heat exchange processes on the action of endotoxin. Urea, introduced into the bloodstream of rabbits and intraperitoneally to rats, lowers body temperature in animals under conditions of endotoxin fever, and also eliminates changes in the content of L-arginine in blood plasma characteristic of the action of bacterial endotoxin. The leakage of arginine from the urea synthesis cycle in the reaction of nitrogen monoxide synthesis in the liver is important in the pathogenesis of endotoxin fever, and the increased use of arginine in the processes of urea formation — in the mechanisms of endogenous antipyresis.

Keywords: liver arginase, urea, nitrogen monoxide, detoxification, endotoxin fever.

Поступила 14.06.2021

