

Об участии аргинина ликвора в формировании «установочного» уровня регуляции температуры тела при эндотоксической лихорадке

Висмонт Ф. И., Висмонт А. Ф.

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

Реферат. В опытах на крысах и кроликах с использованием современных физиологических, биохимических методов исследования и фармакологического подхода установлено, что аргинин ликвора, уровень которого при бактериальной эндотоксинемии, сопровождающейся лихорадкой, понижается и введение которого в желудочки мозга проявляется в изменении выраженности и длительности терморегуляторных эффектов центрального действия норадреналина и ацетилхолина, является важным фактором изменения порогов возбудимости холодо- и теплочувствительных нейронов в гипоталамусе и формирования «установочного» уровня регуляции температуры тела при эндотоксической лихорадке.

Ключевые слова: эндотоксическая лихорадка, гипоталамус, хемореактивные свойства нейронов, аргинин, температура тела.

Введение. Лихорадка — один из сложнейших процессов, часто встречающихся при патологии у высших гомойотермных животных и человека.

Лихорадочная реакция организма характеризуется не только изменениями в процессах теплообмена и часто значимым повышением температуры тела, но также одновременно возникающими изменениями деятельности нервных центров и активности функциональных систем организма [1, 2, 3, 4, 5]. Принято считать, что смещение, (изменение) «установочного» уровня, уровня установочной точки (*Set point*) температурного гомеостаза на более высокий уровень (например, с 37 °С до 38–41 °С) является центральным звеном в патогенезе лихорадки [2, 4, 5]. Полагают, что этот механизм реализуется за счет изменения порогов возбудимости термочувствительных (холодовых и тепловых) нейронов медиальной преоптической области переднего гипоталамуса к температуре крови и афферентации от холодových и тепловых терморепрепторов организма. В результате изменения порогов возбудимости «холодовых» и «тепловых» нейронов гипоталамической области мозга изменяется чувствительность таких терморегулятоных нейронов в центрах терморегуляции к афферентной импульсации от холодových и тепловых рецепторов таким образом, что нормальную температуру крови, интерстициальной жидкости и нормальную афферентацию от терморепрепторов центр воспринимает как сигнал охлаждения, в результате чего повышается активность холодочувствительных и угнетается активность теплочувствительных нейронов переднего гипоталамуса, включаются механизмы терморегуляции, направленные на повышение температуры организма. Согласно современным представлениям это повышение биоэлектрической активности холодочувствительных нейронов и снижение активности теплочувствительных нейронов гипоталамической области мозга лежит в основе функциональной перестройки в центре терморегуляции, наблюдающееся при раздражении его клеточно-тканевыми (вторичными) пирогенами, так называемыми «медиаторами» лихорадки, идентифицированными как цитокины (интерлейкин-1 β , интерлейкин-6). Полагают, что эти изменения порогов термочувствительности холодо- и теплочувствительных нейронов переднего гипоталамуса под влиянием вторичных пирогенов и определяет на нейрональном уровне смещение вверх «установочного» уровня регулируемого температурного гомеостаза при лихорадке. Такие представления нашли отражение в обзорах, посвященных проблемам нейрофизиологии лихорадочной реакции, механизмам ее развития [3, 4, 7, 8].

Известно, что определяющую роль в центральных механизмах регуляции температуры тела играют нейромедиаторные системы гипоталамуса и, в частности, при лихорадке адренореактивные системы [1, 2, 5]. В научной литературе много внимания уделено роли пептидов и простагландинов группы E в регуляции функционального состояния ЦНС и активности нейромедиаторных систем мозга в центрах терморегуляции при лихорадке (*W. Feldberg*, 1975; *W. Cranston*, 1979; *W. G. Clark*, 1983; *S. A. Dinarello*, 2004; *E. A. Tansey*, 2015; *N. Prajitha [et al.]*, 2018) Высказано предположение, что эндогенные пирогены реализуют свой эффект путем высвобождения эндотелиоцитами простагландинов группы E, которые оказывают непосредственное действие на терморегуляторные нейроны гипоталамуса (*A. S. Milton*, 1972; *S. A. Dinarello*, 2004; *P. I. Anochi*, 2013). Эта идея была подкреплена тем, что во время лихорадки в спинномозговой жидкости увеличивается количество простагландинов группы E, а также демонстрацией того, что жаропонижающие препараты, такие как аспирин, проявляют свое действие путем ингибирования процессов образования простагландинов (*A. S. Milton*, 1972; *A. Blomqvist*, 2018). Однако роль простагландинов группы E в механизмах лихорадки до конца еще не выяснена. Оказалось, что блокада простагландиновых рецепторов в центрах терморегуляции не устраняет эндотоксиновую лихорадку (*W. Cranston*, 1979). Таким образом, имеющиеся сведения не раскрывают в достаточной мере значение нейромедиаторных систем мозга и модуляторов их активности в регуляции температуры тела.

И хотя накоплен большой экспериментальный материал, раскрывающий участие в центральных механизмах терморегуляции целого ряда физиологически активных веществ, в частности регуляторов нейрoхимических процессов в центрах терморегуляции [2, 3, 4, 5, 6], однако до сих пор мы еще далеки от полного понимания нейрoхимических механизмов формирования «установочной точки» терморегуляции при лихорадке.

Результаты многочисленных исследований последних лет свидетельствуют о значимости монооксида азота (NO), основным субстратом для образования которого является аминокислота L-аргинин (*D. Scibior*, *H. Czezcot*, 2004; Н. П. Дмитриенко и др., 2008), в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии, и в механизмах регуляции температуры тела, в частности (*R. Gerstberger*, 1999). Установлено, что агентами, ответственными за индукцию синтеза NO в ге-

паточитах, являются ИЛ-1 β , ИЛ-6 и ФНО- α — предполагаемые на сегодняшний день основные «медиаторы» воспаления и лихорадки [2, 3, 4, 5, 7], во многом определяющие резистентность организма к факторам внешней и внутренней среды и поддержание температурного гомеостаза. Имеются сведения, что изменения уровня тиреоидных гормонов в крови, процессов детоксикации и теплообразования при гипертермии и эндотоксической лихорадке тесно связаны с продукцией NO в организме [1, 6]. Остается открытым вопрос о значимости L-аргинина в этих процессах.

Цель работы — выяснение значимости L-аргинина в центральных нейромедиаторных механизмах терморегуляции и в формировании «установочного» уровня 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. Рацион крыс состоял из комбикорма КК-92/ПХЧ-5, количество которого определялось нормами кормления 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 общепринятой модели эндотоксической лихорадки использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) — эндотоксин *E. Coli* (серия 0111: B4 Sigma, США), который вводили однократно: крысам — внутривентриально, кроликам — в краевую вену уха.

Для оценки вегетативных показателей в процессе развития лихорадки проводили, наряду с определением частоты дыхания (ЧД), регистрацию частоты сердечных сокращений (ЧСС). Частоту дыхания фиксировали с помощью угольной манжетки и регистрировали на 4-канальном чернильнопишущем электрокардиографе в определенные интервалы времени. ЧСС контролировали по ЭКГ.

Взятие для исследований крови и ткани гипоталамуса у животных проводилось за возможно минимальное время после декапитации. Ткань гипоталамуса замораживали в жидком азоте и хранили до использования при температуре минус 15 °C. Выделение гипоталамуса при температуре 0...+4 °C проводили по методу *J. Glowinsky [et al.]* (1966).

Содержание катехоламинов норадреналина и дофамина в гипоталамической области мозга определяли спектрофлуориметрическим методом *R. Lawerty* (1968). Для изучения скорости оборота норадреналина в ткани гипоталамуса применяли ингибитор тирозингидроксилазы α -метил-п-тирозин (250 мг/кг) и ингибитор моноаминоксидазы паргалин (внутрибрюшинные инъекции, 75 мг/кг).

Количественное содержание свободных аминокислот в плазме крови крыс и спинномозговой жидкости у кроликов определяли методом обращено-фазной жидкостной хроматографии на аналитической колонке *Zorbax Eclipse XDB-C₈*.

Для изменения активности центральных нейромедиаторных систем использовали холино- и адреномиметики, а также аминокислоту L-аргинин, водные растворы которых вводили однократно: крысам под местной анестезией (5%-ный новокаин, подкожно) в правый боковой желудочек мозга в объеме 20 мкл или в боковую вену хвоста — 0,2 мл; кроликам — в полость правого бокового желудочка через вживленные химиотроды в объеме, не превышающем 50 мкл, или в краевую вену уха — 1,0 мл. При изучении влияния L-аргинина на показатели терморегуляции кроликам вводили внутривенно, а крысам внутривентриально раствор L-аргинина гидрохлорида (*Carl Roth GmbH+ Co. KG*, Германия).

Опыты с регистрацией импульсной активности нейронов мозга выполняли на кроликах под хлоралозо-уретановым наркозом (60/600 мг/кг, внутривентриально). Нейронную активность регистрировали внеклеточно, применяя вольфрамовые микроэлектроды с диаметром кончика 1–3 мкм. Отведения осуществляли от нейронов переднего гипоталамуса по координатам $A_3L_{1,5}H_{14}$ (*C. H. Sawyer*, 1954). Эффекты веществ оценивали по изменению текущей частоты разрядов нейрона, которые регистрировали каждые 4 с с помощью анализатора АМГ-1.

Для изучения распределения ^{14}C -аргинина солянокислого между кровью, ликвором и структурами головного мозга меченую аминокислоту вводили в краевую вену уха кроликам (25 мкКи/кг) на высоте лихорадки, вызываемой ЛПС. Через 30 мин после введения меченого по углероду арги-

нина животных декапитировали. Определение величины радиоактивности в пробах проводили при помощи сцинтилляционного счетчика LS-1801 фирмы Vekman (США).

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. 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 ($\bar{X} \pm S_x$). Достоверность результатов учитывали при «р» менее 0,05.

Результаты и их обсуждение. В опытах установлено, что внутрибрюшинное введение крысам ($n = 12$) бактериального эндотоксина (ЛПС) в дозе 5,0 мкг/кг приводит к медленному повышению температуры тела и слабо выраженной гипертермии. Температура тела повышалась на 1,3 °С, 1,2 °С, 1,8 °С, 1,2 °С и 0,7 °С ($p < 0,001$) через 120, 180, 240, 300 и 330 мин после инъекции эндотоксина и составляла $38,9 \pm 0,11$; $38,8 \pm 0,12$; $39,4 \pm 0,10$; $38,8 \pm 0,13$ и $38,3 \pm 0,12$ °С соответственно. Введение в кровоток ЛПС (0,5 мкг/кг) кроликам ($n = 9$) приводило к быстрому и значительному повышению ректальной температуры. Температура тела у животных через 30, 60, 120 и 180 мин после введения ЛПС возрастала на 0,6 °С, 1,3 °С, 1,6 °С и 1,2 °С ($p < 0,001$) и составляла, соответственно, $39,2 \pm 0,12$; $39,9 \pm 0,10$; $40,2 \pm 0,11$ и $39,8 \pm 0,12$ °С.

Выявлено, что в развитии сдвигов в эффекторных процессах, гуморальных и гормональных механизмах регуляции теплообмена при эндотоксикозной лихорадке значительная роль принадлежит снижению активности центральных адренореактивных систем и, в частности, α -адренореактивных систем гипоталамической области мозга [1].

Обнаружено, что характер изменений в процессах теплообмена, их нейромедиаторной, гормональной и гуморальной регуляции в условиях развития эндотоксинемии во многом обусловлены снижением уровня аргинина в плазме крови и ликворе. В условиях эндотоксикозной лихорадки, через 120 мин после инъекции ЛПС, в плазме крови у крыс ($n = 7$) снижалось содержание аминокислоты аргинина на 32,4 % ($p < 0,02$) и составляло $163,5 \pm 12,96$ мкМоль/л. Опыты, выполненные на ненаркотизированных кроликах, показали, что введение в кровоток ЛПС приводит к снижению (через 60 мин после инъекции) содержания свободной аминокислоты аргинина как в плазме крови (с $264 \pm 16,4$ до $115 \pm 23,5$ мкМоль/л; $p < 0,05$), так и в спинномозговой жидкости (с $44,7 \pm 4,5$ до $11,2 \pm 6,3$ мкМоль/л, $p < 0,05$).

Учитывая, что при эндотоксикозной лихорадке имеет место значительное снижение содержания аргинина в крови и ликворе у кроликов и в плазме крови у крыс можно было предположить, что аргинин плазмы крови и ликвора участвуют в центральных механизмах терморегуляции при бактериальной эндотоксинемии, сопровождающейся лихорадкой. Для уточнения такой возможности нами было изучено влияние на температуру тела, некоторые эффективные процессы и механизмы терморегуляции аминокислоты аргинина как при центральном, так и системном введении.

Как видно из графических данных, представленных на рисунке 1, введение L-аргинина солянокислого в желудочки мозга в дозе 100 мкг на животное или в кровоток в дозе 20 мг/кг в условиях развивающейся лихорадки (через 60 мин после внутривенного введения ЛПС в дозе 0,5 мкг/кг) оказывает выраженный антипиретический эффект. Антипиретический эффект L-аргинина солянокислого сопровождался угнетением теплопродукции (снижение частоты сердечных сокращений, угнетение липолиза и т. д.) и усилением теплоотдачи (полипное, вазодилатация поверхностных сосудов). После инъекции L-аргинина солянокислого крысам и кроликам в желудочки мозга в дозе 50 и 100 мкг на животное температура тела интактных животных в термонеutralных условиях (20–24 °С) не изменялась.

В серии исследований, проведенных с целью выяснения центральных механизмов антипиретического действия аминокислоты аргинина, установлено, что хотя содержание и скорость оборота норадреналина в гипоталамусе после введения в желудочки мозга крыс аргинина солянокислого в дозе 100 мкг достоверно не изменяется по сравнению с животными в контроле, однако хемореактивные свойства терморегуляторных структур мозга меняются, что проявляется в изменении выраженности и длительности терморегуляторных эффектов центрального действия норадреналина и ацетилхолина. В опытах

на крысах выявлено, что центральное действие 1-норадреналина в дозе 10 мкг в условиях предварительного введения в желудочки мозга L-аргинина солянокислого в дозе 100 мкг на животное (за 15 мин) оказывает более выраженное и более продолжительное понижение температуры тела по сравнению с контролем, в то время как длительность и выраженность гипотермического эффекта от введения в желудочки мозга ацетилхолина в дозе 2,5 мкг с эзерином (5 мкг) уменьшались (рисунок 2).

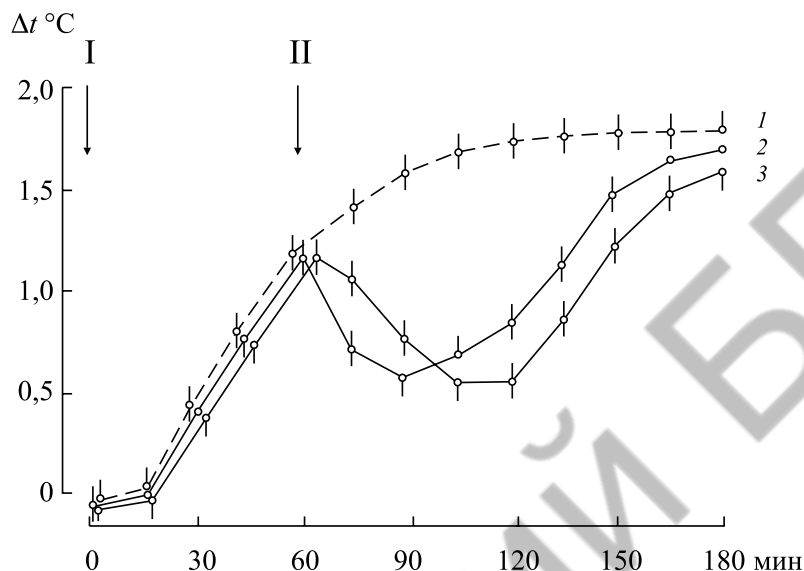


Рисунок 1 — Изменение температуры тела у кроликов под влиянием аргинина солянокислого в условиях эндотоксиновой лихорадки:
1 — ЛПС + бидист. вода ($n = 20$); 2 — ЛПС + аргинин-HCl (100 мкг в желудочки мозга, $n = 10$);
3 — ЛПС + аргинин-HCl (20 мг/кг внутривенно, $n = 16$), где n — число опытов.
 I (стрелка) — момент внутривенного введения ЛПС (0,5 мкг/кг);
 II (стрелка) — момент введения в желудочки мозга или в кровотоки препарата или бидист. воды (в контроле)

В специальной серии исследований установлено, что аргинин солянокислый в дозе 100 мкг при введении в желудочки мозга стимулирует повышение импульсной активности теплочувствительных нейронов переднего гипоталамуса у кроликов, вызываемое повышением температуры мозга при нагревании тела животного. Введение в желудочки мозга кроликам L-аргинина солянокислого (100 мкг) при температуре мозга 35 °C вызывало значительное повышение (до 186,2 %) частоты импульсации всех 8 изученных нейронов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в основе одного из механизмов жаропонижающего действия аргинина лежит изменение адreno- и холинореактивных свойств церебральных нейронов и, в частности, повышение чувствительности адренорецепторов мозга к норадреналину. Учитывая, что в самих нейронах преоптической области переднего гипоталамуса прямая тепловая рецепция преобладает над холодной и что активность теплочувствительных нейронов переднего гипоталамуса играет ведущую роль в центральных механизмах теплоотдачи и, как следствие, в пусковых механизмах, обеспечивающих понижение температуры тела, представляло интерес изучить влияние L-аргинина на активность теплочувствительных нейронов медиальной преоптической области переднего гипоталамуса у кроликов.

С целью выяснения вопроса обусловлен ли антипиретический эффект L-аргинина солянокислого при его центральном введении на высоте эндотоксиновой лихорадки действием аминокислоты на терморегуляторные центры, мы исследовали, как распределяется радиоактивность между кровью, ликвором и тканями терморегуляторных структур мозга в условиях эндотоксиновой лихорадки после введения в кровотоки меченого по углероду аргинина солянокислого. Опыты показали, что через 30 мин после внутривенного введения кроликам ^{14}C -аргинина солянокислого (25 мкКи/кг) на высоте эндотоксиновой лихорадки (через 60 мин после инъекции ЛПС) происходит понижение (по сравнению с животными контрольной группы) уровня радиоактивности (на 28,9 %, $n = 8$,

$p < 0,05$) в плазме крови, повышение (до 253 %, $n = 7$, $p < 0,02$) в спинномозговой жидкости и ее увеличение (до 150 %, $n = 8$, $p < 0,05$) в ткани гипоталамуса.

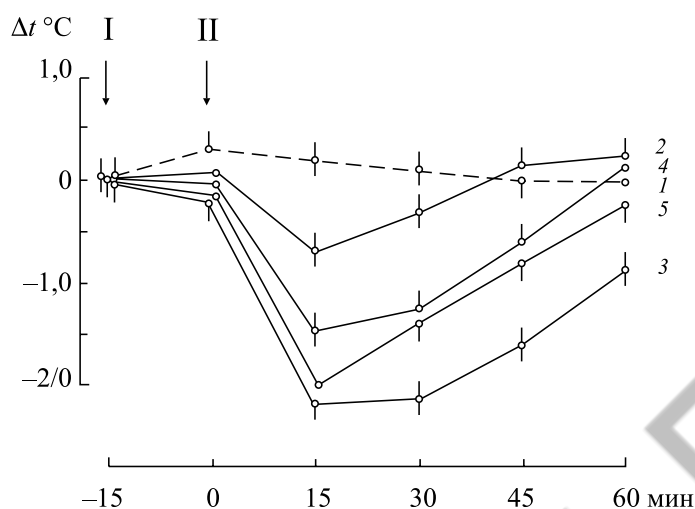


Рисунок 2 — Изменение температуры тела у крыс под влиянием центрального действия нейромедиаторов в условиях предварительного введения в желудочки мозга аргинина солянокислого:

1 — аргинин-HCl + бидист. вода, $n = 8$; 2 — бидист. вода + норадреналин (10 мкг), $n = 9$; 3 — бидист. вода + ацетилхолин (2,5 мкг) с эзерином (5 мкг), $n = 8$; 4 — аргинин-HCl + норадреналин (10 мкг), $n = 9$; 5 — аргинин-HCl + ацетилхолин (2,5 мкг) с эзерином (5 мкг), $n = 9$, где n — число животных в опыте.

I (стрелка) — момент введения в желудочки мозга аргинина-HCl (100 мкг) или бидист. воды (в контроле);

II (стрелка) — момент введения в желудочки мозга нейромедиаторов или бидист. воды (в контроле)

Полученные данные дали основания полагать, что в условиях бактериальной эндотоксинеми, сопровождающейся лихорадкой идет усиленная утилизация из крови свободного аргинина тканями гипоталамуса, т. е. ведущей терморегуляторной структурой мозга.

Заключение. Таким образом, результаты проведенных исследований, имеющих целью выяснить значимость аргинина в центральных нейромедиаторных механизмах регуляции температуры тела при эндотоксиновой лихорадке, свидетельствуют о том, что аргинин в центральной нервной системе принимает участие в механизмах регуляции температуры тела при действии в организме эндотоксина и является одним из факторов, ограничивающих выраженность лихорадочной реакции.

Если принять во внимание тот факт, что при действии в организме эндотоксина содержание аргинина в плазме крови и ликворе значительно снижается, а в тканях гипоталамуса повышается и что в этих условиях импульсная активность теплочувствительных нейронов переднего гипоталамуса и хемореактивные свойства терморегуляторных структур гипоталамической области мозга меняются, что проявляется в изменении выраженности и длительности терморегуляторных эффектов центрального действия норадреналина и ацетилхолина, то аргинин, по-видимому, может рассматриваться как важный фактор изменения порогов возбудимости холодо- и теплочувствительных нейронов в гипоталамусе, а соответственно как фактор формирования «установочного» уровня регуляции температуры тела при эндотоксиновой лихорадке.

Вмешательство в центральные нейрхимические процессы с помощью фармакологических веществ, способных направленно изменять содержание аргинина в плазме крови и ликворе, может быть использовано в качестве эффективного средства коррекции процессов теплообмена, эндогенного антипиреза при лихорадке и повышения устойчивости организма к действию пирогенных факторов.

Литература

1. Висмонт, Ф. И. К механизму формирования нейромедиаторной дизрегуляции в центральных структурах регуляции температуры тела при бактериальной эндотоксинеми / Ф. И. Висмонт, А. Ф. Висмонт // Медицинский журнал. — 2011. — № 2 (36). — С. 27–30.

2. Гурин, В. Н. Механизмы лихорадки / В. Н. Гурин. — Минск : Наука и техника, 1993. — 165 с.
3. Anochi, P. I. Mechanisms of fever in humans / P. I. Anochi // International Journal of Microbiology and Immunology Research. — 2013. — Vol. 2 (5). — P. 037–043.
4. Blomqvist, A. Neural mechanisms of inflammation-induced fever / A. Blomqvist, D. Engblom // Neuroscientist. — 2018. — Vol. 24 (4). — P. 381–399.
5. Feldberg, W. Body temperature and fever: changes in our views during last decade / W. Feldberg // Proc. R. Soc. Lond. — 1975. — Vol. 191 (1103). — P. 199–229.
6. Hypothalamic nitric oxide synthase gene expression is regulation by thyroid hormones / Y. Ueta [et al.] // Endocrinology. — 1995. — Vol. 136 (10). — P. 4182–4187.
7. Tansey, E. A. Recent advances in thermoregulation / E. A. Tansey, C. D. Johnson // Adv. Physiol. Educ. — 2015. — Vol. 39 (3). — P. 139–148.
8. The pathophysiological basis and consequences of fever / E. J. Walter [et al.] // Critical Care. — 2016. — Vol. 20:200. — Mode of access : <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1375-5>. — Date of access : 28.08.2019.

Central neurochemical mechanisms antipyretic action of L-arginin in endotoxine fever conditions

Vismont F. I., Vismont A. F.

Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus

In experiments on rats and rabbits using modern physiological, biochemical methods of research and pharmacological approach, it was established that arginine CSF, the level of which in animals with bacterial endotoxemia, accompanied by fever, decreases and, the introduction of which into the ventricles of the brain, manifests itself in a change in the severity and duration of thermoregulatory effects of norepinephrine and acetylcholine central action, is an important factor in changing the thresholds of excitability of cold and heat-sensitive neurons in hypothalamus and form a “set-point” regulation of body temperature during endotoxin fever.

Keywords: endotoxin fever, hypothalamus, chemoreactive properties of neurons, arginine, body temperature.

Поступила 09.09.2019