

**ОБ УЧАСТИИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ В ИЗМЕНЕНИЯХ АКТИВНОСТИ
L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ, ПРОЦЕССОВ ДЕТОКСИКАЦИИ И ТЕМПЕРАТУРЫ
ТЕЛА ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭНДОТОКСИНЕМИИ**

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Общеизвестно, что ведущим универсальным звеном в патогенезе нарушений жизнедеятельности при экстремальных состояниях организма и различных заболеваниях, как инфекционной, так и неинфекционной природы является токсинемия, выраженность которой, во многом предопределяется активности детоксикационной функции печени.

Показано, что аргиназа печени имеет значение в процессах образования монооксида азота (NO), детоксикации и жизнедеятельности организма в норме и при патологии [1,6,10]. Выявлена значимость аргиназы печени в процессах терморезистентности и акклимации животных к холоду [1,6]. Учитывая, что аминокислота аргинин может использоваться в печени как для процессов мочевинообразования, так и биосинтеза NO [10], имеющего важное значение в процессах жизнедеятельности и регуляции температуры тела [7], можно было предположить, что активность аргиназы печени будет сказываться на активности L-аргинин-NO системы печени, а соответственно на процессах детоксикации и теплообмена при бактериальной эндотоксинемии.

Цель исследования – выяснить значимость аргиназы печени в изменениях активности L-аргинин-NO системы, детоксикационной функции печени и температуры тела при лихорадке, вызываемой бактериальным эндотоксином.

Материал и методы. Опыты выполнены на взрослых беспородных ненаркотизированных крысах и кроликах обоего пола. Животные до постановки эксперимента в течение недели адаптировались к условиям вивария. Температура воздуха в

виварии поддерживалась на уровне 20-24°C, что находится в пределах термонейтральной зоны крыс и кроликов. Соблюдался световой и шумовой режим. Животные получали полноценный пищевой рацион в соответствии с нормами содержания лабораторных животных. Для создания модели эндотоксиновой лихорадки использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) – эндотоксин E. Coli (серотип 0111:B4 Sigma, США), который вводили однократно: крысам – внутривентрально в дозе 5 мкг/кг, кроликам – в краевую вену уха в дозе 0,5 мкг/кг. С целью выяснения значимости аргиназы печени и NO в регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела использовали L-аргинин моногидрохлорид (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия), ингибитор аргиназы N^ω-гидроксинор-L-аргинин (nor NOHA) фирмы WACHEM (Германия), а также L-валин фирмы Carl Roth GmbH+Co.KG (Германия). Для изучения влияния мочевины и L-аргинина на показатели детоксикации и терморегуляции проводилось введение кроликам внутривенно, а крысам внутривентрально раствора мочевины (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) или L-аргинина моногидрохлорида (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия).

Взятие для исследований крови у животных проводилось сразу после декапитации. Кровь после декапитации собирали в охлажденные центрифужные пробирки с добавлением гепарина и центрифугировали 10 мин (5000 g при +4°C). Полученную плазму отбирали пипеткой и использовали в дальнейшей работе. Содержание свободных аминокислот в плазме крови крыс определяли методом жидкостной хроматографии на аналитической колонке Zorbax Eclipse XDB-C₈ [2]. Уровень мочевины определяли колориметрически, а активность L-аргиназы в печени – спектрофотометрически [8]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитрат/нитритов (NO₃⁻/NO₂⁻) в плазме крови [9]. О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), содержанию в плазме крови фракции «средних молекул» (СМ) и степени токсичности крови (СТК). Определение содержания СМ производили методом

кислотно-этанольного осаждения, разработанным В.М. Мойным с соавт. [4], СТК-способом, предложенным О.А. Радьковой с соавт. [5]. О ПНС у крыс (гексенал 100,0 мг/кг, внутривентриально) судили по времени нахождения животных в боковом положении [3]. Температуру кожи, как и ректальную температуру, измеряли у крыс и кроликов с помощью электротермометра ТПЭМ-1. В ряде опытов регистрацию температуры тела у крыс осуществляли при помощи телеметрической установки Mini Mitter (модель 4000, США).

Полученные цифровые данные обработаны при помощи общепринятых методов вариационной биологической статистики с использованием критерия Стьюдента. Все данные представлены в виде среднего арифметического и средней ошибки среднего арифметического ($\bar{X} \pm S_x$). Достоверность результатов учитывали при «р» менее 0,05.

Результаты и их обсуждение. Установлено, что внутривентриальное введение крысам (n=12) ЛПС приводит к слабо выраженной гипертермии. Температура тела повышалась на 1,3°C (p<0,05) и 1,2 °C (p<0,05) через 120 и 180 мин. после инъекции экзопирогена и составляла 38,9±0,11 °C и 38,8±0,12°C. Введение в кровоток ЛПС кроликам (n=9) приводило к повышению температуры тела на 0,6°C (p<0,05), 1,3°C (p<0,05) и 1,6°C (p<0,05) через 30, 60 и 120 мин. после инъекции эндотоксина.

Выявлено, что действие ЛПС у крыс (n=7), через 120 и 180 мин после инъекции, приводило к повышению активности аргиназы печени на 53,1% (p<0,05) и 39,2% (p<0,05) и уровня мочевины в плазме крови на 26,0% (p<0,05) и 30,7% (p<0,05) соответственно. Активность аргиназы печени у крыс контрольной группы, через 120 и 180 мин. после внутривентриального введения физ. раствора, составляла 5,63±0,27 (n=8) и 5,24±0,29 (n=7) мкМоль мочевины/г.ткани. Через 120 мин после введения экзопирогена имело место повышение в крови у крыс (n=7) уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ на 29,6% (p<0,05).

При эндотоксической лихорадке (через 120 мин после инъекции ЛПС) снижалось в плазме крови у крыс (n=7) содержание глутамин (на 12,7%, $p<0,05$), аргинина (на 32,4%, $p<0,02$), тирозина (на 26,4%, $p<0,01$) и валина (на 21,1%, $p<0,001$).

Системное действие ЛПС у крыс сопровождалось активацией детоксикационной функции печени. Так ПНС у крыс в условиях лихорадки (через 120 и 180 мин после инъекции ЛПС) уменьшалось соответственно на 21,2% ($p<0,05$, n=8) и 23,5% ($p<0,05$, n=7).

Установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение в течение недели крысам ингибитора аргиназы *nor*-НОНА в дозе 10 мг/кг, как и однократная внутрибрюшинная инъекция ингибитора аргиназы L-валина в дозе 100 мг/кг статистически значимо не сказывались на ректальной температуре тела и приводили к снижению активности аргиназы печени на 71,2% ($p<0,05$, n=7) и 83,5% ($p<0,05$, n=8), а также уровня мочевины в крови на 50,3% ($p<0,05$, n=6) и 56,4% ($p<0,05$, n=7), соответственно. Выявлено, что в условиях депрессии аргиназы печени *nor*-НОНА или L-валином действие ЛПС не сопровождается активацией детоксикационной функции печени и развитием лихорадки. Температура тела у крыс (n=7) под влиянием 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*-НОНА, через 2 и 3 часа 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 (рис. 1).

Установлено, что лихорадочная реакция у крыс, вызываемая ЛПС ослабляется предварительным введением в организм животных, за 30 мин до инъекции экзопирогена, мочевины в дозе 0,3 мг/кг. Так, ректальная температура у крыс (n=8), получавших 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 мочевины, наблюдалось повышение температуры тела в указанные промежутки времени после введения экзотоксина

всего лишь на $0,6 \pm 0,07$ и $0,4 \pm 0,06^\circ\text{C}$. Внутривенное введение мочевины в дозе $3,0$ г/кг за 30 мин до инъекции ЛПС ($5,0$ мкг/кг) полностью устраняло у крыс развитие лихорадочной реакции (рис. 2). Введение в кровоток мочевины ($0,3$ г/кг) кроликам ($n=7$) на высоте подъема температуры тела при эндотоксиновой лихорадке (через 60 и 90 мин от момента инъекции ЛПС) приводило к ослаблению лихорадки. В частности, через 15 и 30 мин от момента введения мочевины ректальная температура снижалась по сравнению с контролем на $0,9 \pm 0,08^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$) и $0,8 \pm 0,10^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$).

Известно, что последним этапом образования мочевины является гидролитическое расщепление аминокислоты аргинина, являющейся основным субстратом для NO-синтазы и источником образования NO, который играет важную роль в протекании различных физиологических функций печени и механизмах их регуляции [10].

Учитывая, что L-аргинин может использоваться в печени как для процессов мочевинообразования, так и биосинтеза NO, были основания полагать, что выявленные эффекты мочевины могут быть связаны с изменением активности L-аргинин-NO системы, а соответственно уровня NO. Подтверждение было получено в опытах с использованием субстрата NO-синтазы – аминокислоты L-аргинина, а также хорошо известного и широко применяемого в экспериментальной практике ингибитора NO-синтазы метилового эфира N^G-нитро-L-аргинина (L-NAME).

Выявлено, что введение в кровоток L-аргинина моногидрохлорида в дозе 50 мг/кг (не влияющей на температуру тела интактных животных) в условиях действия в организме ЛПС, через 60 мин после инъекции, приводит к ослаблению лихорадки. Снижение ректальной температуры на высоте лихорадки (через 15 и 30 мин после введения аминокислоты) составляло $0,7^\circ\text{C}$ и $0,8^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$), а уровень мочевины и $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови, через 30 мин. после инъекции, повышался (по сравнению с контролем) на $29,8\%$ ($p < 0,05$) и $27,1\%$ ($p < 0,05$) и составлял $5,4 \pm 0,60$ ммоль/л и $10,3 \pm 1,20$ мкмоль/л соответственно. А так как L-

аргинин может использоваться в печени как для процессов мочевинообразования, так и биосинтеза NO [10], были основания полагать, что выявленные эффекты мочевины могут быть связаны с изменением активности L-аргинин-NO системы, а соответственно уровня NO. Результаты исследования также дали основание полагать, что антипиретический эффект L-аргинина связан не только с возможностью использования его для синтеза NO, но и с участием L-аргинина в процессах мочевинообразования.

У крыс (n=7) в опыте, предварительно получивших L-NAME (25 мг/кг), отмечалось повышение по сравнению с животными контрольной группы мочевины на 27,5% (p<0,05) и снижение на 31,1% (p<0,05) концентрации $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови. Выявлено, что в условиях предварительного введения в организм L-NAME, действие ЛПС у крыс, через 120 мин после инъекции, сопровождается менее значимым повышением температуры тела по сравнению с контролем (внутрибрюшинное введение физ. раствора и ЛПС), а также снижением в плазме крови уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ на 48,7% (p<0,05, n=7) и повышением концентрации мочевины 26,8% (p<0,05, n=7).

Следовательно, на основании результатов исследований, есть основания заключить, что взаимодействие L-аргинин-NO системы с циклом мочевины в печени, определяя уровни мочевины и NO в крови, играет важную роль в патогенезе эндотоксиновой лихорадки.

Выводы. Состояние детоксикационной функции печени и температура тела у крыс и кроликов при действии в организме животных бактериального эндотоксина зависят от активности аргиназы печени, L-аргинин-NO системы и уровня мочевины в крови. По-видимому, утечка L-аргинина в цикл мочевины и усиленное его использование в процессах мочевинообразования имеют важное значение в механизмах регуляции детоксикационной функции печени и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии, а уровень мочевины в крови, регулируя активность L-аргинин-NO системы и аргиназы печени, определяет их характер и выраженность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев, Р.А. Активность аргиназы мозга и печени при гипотермии / Р.А. Абдуллаев, Э.З. Эмирбеков // Укр. биохим. журн. - 1991. - Т. 63, № 2. - С. 108-111.
2. Дорошенко, Е.М. Методические аспекты и трудности анализа свободных (физиологических) аминокислот и родственных соединений в биологических жидкостях и тканях / Е.М. Дорошенко // Аналитика РБ – 2010 : тез. Респ. науч. конф. по аналит. химии с междунар. участием, Минск, 14–15 мая 2010 г. – Минск, 2010. – С. 126.
3. Парк, Д.В. Биохимия чужеродных соединений / М. : Медицина, 1973.
4. Способ определения веществ группы средних молекул в биологических жидкостях : а.с. 1520445 СССР, VRB F 01 № 33/50. / В.М. Моин [и др.] – №4323421/28-14 ; заявлено 02.11.87; опубл. 07.11.89 // Открытия. Изобретения. 1989. № 41. С. 415.
5. Способ определения токсичности биологических жидкостей : а.с. 1146570 СССР, МКИ б О1 № 1/28. / О.А. Радькова [и др.] – № 3458007/28-13 ; заявлено 18.06.84 ; опубл. 23.03.85 // Открытия. Изобретения. 1985. №11. С. 2.
6. Шугалей, В.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклимации к холоду / В.С. Шугалей, Л.С. Козина // Физиол. ж. СССР им. И.М. Сеченова. - 1977. - Т. 63, № 8. - С. 1199-1202.
7. Gerstberger, R. Nitric Oxide and Body Temperature Control / R. Gerstberger // News Physiol. Sci. – 1999. – Vol. 14, № 2. – P. 30–36.
8. 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.
9. Moshage, H. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / Moshage H., Kok B., Huizenga J.R., Jansen P.L. // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, № 6. – P. 892–896.
10. Scibior, D. Arginine - metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czeczot // Postepy Hig. Med. Dosw. - 2004. - Vol 58. - p. 321-332.

1. Висмонт Франтишек Иванович, 220033, г. Минск, ул. Рыбалко д. 8, кв. 81, дом. тел. 298-23-66, моб. тел. 8029-6195006;
2. Лобанова Валерия Валерьевна, г. Минск, ул. Романовская Слобода, д. 13, кв. 28.