

## **ОБ УЧАСТИИ АРГИНАЗЫ ПЕЧЕНИ В ИЗМЕНЕНИЯХ АКТИВНОСТИ L-АРГИНИН-НО СИСТЕМЫ, ПРОЦЕССОВ ДЕТОКСИКАЦИИ И ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА ПРИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ЭНДОТОКСИНЕМИИ**

*УО «Белорусский государственный медицинский университет»*

---

*В опытах на крысах и кроликах установлено, что состояние детоксикационной функции печени и температуры тела при действии в организме животных бактериального эндотоксина зависят от активности L-аргиназы печени, L-аргинин-НО системы и уровня мочевины в крови. Выявлено, что депрессия аргиназы печени, вызываемая введением в организм N<sup>o</sup>-гидрокси-нор-L-аргинина или L-валина препятствует повышению температуры тела и развитию характерных изменений в процессах детоксикации и активности L-аргинин-НО системы на действие бактериального эндотоксина. 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-НО системы и аргиназы печени, определяет их характер и выраженность.*

**Ключевые слова:** *аргиназа печени, L-аргинин-НО система, детоксикация, температура тела, эндотоксиновая лихорадка.*

V. V. Lobanova, F. I. Vismont

**TO THE PARTICIPATION OF LIVER ARGINASE  
IN L-ARGININE-NO SYSTEM ACTIVITY CHANGES,  
DETOXICATION PROCESSES AND BODY TEMPERATURE  
DURING BACTERIAL ENDO TOXINEMIA**

*In studies on rats and rabbits was established that liver detoxication function and body temperature during bacterial endotoxin action depends on liver arginase activity, L-arginin-NO system and blood urea level. Decrease of liver arginase activity by nor-NONA and L-valine injection prevents an increase body temperature and development of typical changes in the detoxication processes on bacterial endotoxin effect. Apparently, leakage of L-arginine to urea cycle and its increased use in urea formation processes are important in the regulation mechanisms of liver detoxication function, and body temperature during bacterial endotoxemia, and the level of urea in the blood, regulating the activity of L-arginine-NO system and liver arginase, determines their character and expression.*

**Key words:** liver arginase, L-arginin-NO system, detoxication, body temperature, endotoxin fiver.

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 °С, 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 эндотоксической лихорадки использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) – эндотоксин E. Coli (серотип O111: B4 Sigma, США), который вводили однократно: крысам – внутрибрюшинно 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<sup>o</sup>-гидрокси-нор-L-аргинин (nor NOHA) фирмы BACHEM (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 внутрибрюшинно 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 °С). 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-C<sub>8</sub> [2]. Уровень мочевины определяли колориметрически, а активность L-аргиназы в печени – спектрофотометрически [8]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитрат/нитритов (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) 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, внутрибрюшинно) 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 обсуждение.** Установлено, что внутрибрюшинное введение крысам ( $n = 12$ ) ЛПС приводит к слабо выраженной гипертермии. Температура тела повышалась на  $1,3^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) и  $1,2^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) через 120 и 180 мин после инъекции экзопирогена и составляла  $38,9 \pm 0,11^\circ\text{C}$  и  $38,8 \pm 0,12^\circ\text{C}$ . Введение в кровоток ЛПС кроликам ( $n = 9$ ) приводило к повышению температуры тела на  $0,6^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ),  $1,3^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) и  $1,6^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ) 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 внутрибрюшинного введения физ. раствора, составляла  $5,63 \pm 0,27$  ( $n = 8$ ) и  $5,24 \pm 0,29$  ( $n = 7$ ) 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 эндотоксиновой 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%,  $p < 0,001$ ).

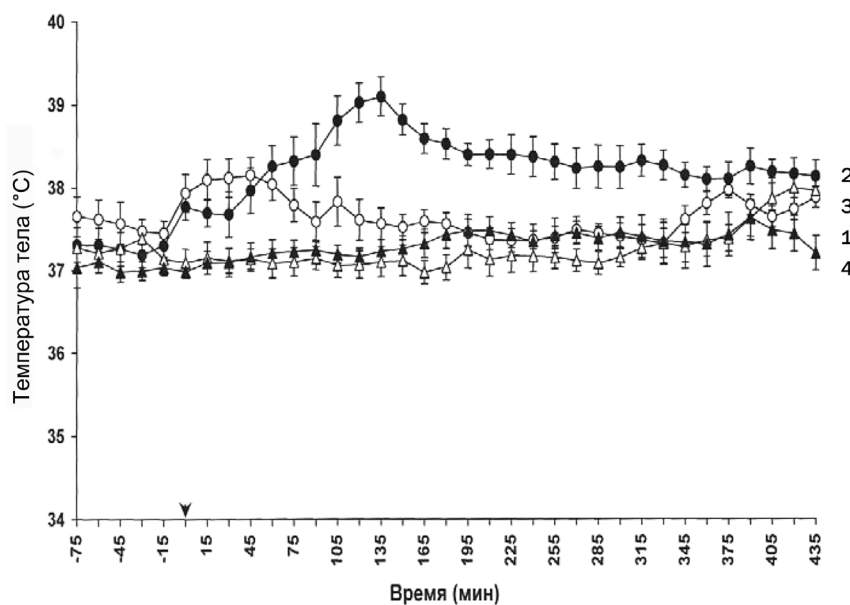
Системное действие ЛПС у крыс сопровождалось активацией детоксикационной функции печени. Так ПНС у крыс в условиях лихорадки (через 120 и 180 мин после инъекции ЛПС) уменьшалось соответственно на 21,2% ( $p < 0,05$ ,  $n = 8$ ) и 23,5% ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ).

Установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение в течение недели крысам ингибитора аргиназы *nor*-NOHA 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*-NOHA 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*-NOHA, 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  $0,4 \pm 0,06^\circ\text{C}$ . Внутрибрюшинное 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  $0,8 \pm 0,10^\circ\text{C}$  ( $p < 0,05$ ).

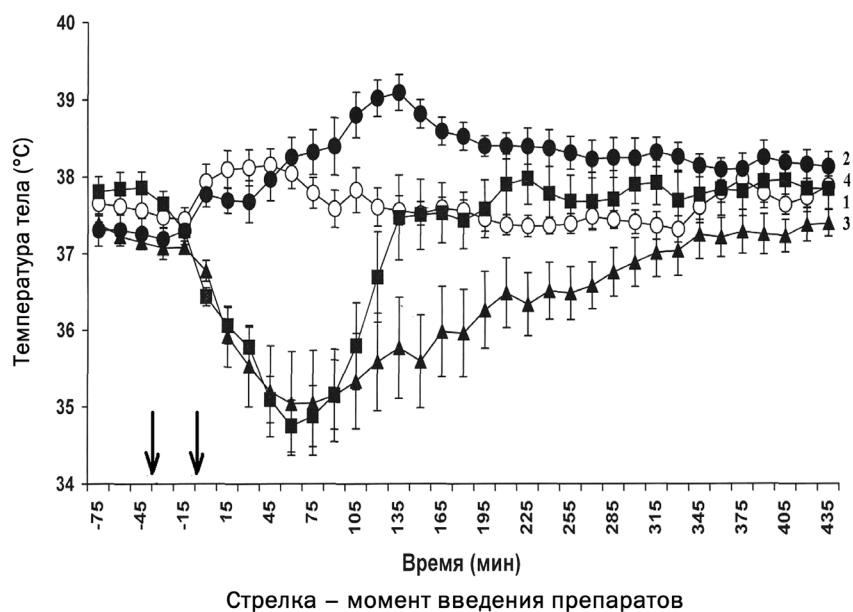
Известно, что последним этапом образования мочевины является гидролитическое расщепление аминокислоты аргинина, являющейся основным субстратом для NO-синтазы и источником образования NO, который играет важную роль в протекании различных физиологических функций печени и механизмах их регуляции [10].

Учитывая, что L-аргинин может использоваться в печени как для процессов мочевинообразования,



Стрелка – момент введения ЛПС (50 мкг/кг), n – количество животных в группе

Рис. 1. Изменения ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения: 1 – физраствора (n = 8); 2 – ЛПС (50 мкг/кг, n = 8); 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 препаратов

Рис. 2. Изменение ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения: 1 – физ. раствор + физ. раствор (n = 8), 2 – физ. раствор + ЛПС (50 мкг/кг, n = 7), 3 – мочевины (3,0 г/кг) + физ. раствор (n = 7), 4 – мочевины (3,0 г/кг) + ЛПС (50 мкг/кг, n = 8)

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<sup>6</sup>-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 °C и 0,8 °C (p < 0,05), а уровень мочевины и NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 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-аргинаина связан не только с возможностью использования его для синтеза NO, но и с участием L-аргинаина 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.

Таким образом, 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-аргинаина в цикл мочевины и усиленное его использование в процессах мочевинообразования имеют важное значение в механизмах регуляции детоксикационной функции печени и тем-

пературы тела при бактериальной эндотоксинеми, 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. Э. 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 6 01 № 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.