

СДВИГИ В СОДЕРЖАНИИ АРГИНИНА И АРГИНИНЗАВИСИМЫХ ГОРМОНОВ В ОРГАНИЗМЕ КРЫС, ЗАРАЖЕННЫХ M. ARTHRITIDIS

Р. С. Овсепян, С. А. Авакян

*/НИЦ Ереванского государственного медицинского университета
им. М. Гераци/
375025 Ереван, ул. Корюна, 2*

Ключевые слова: микоплазмы, аргинин, инсулин, соматотропин

Несмотря на то, что микоплазмология является сравнительно новой областью медицины, в настоящее время установлена важная роль многих видов микоплазм в генезе различных заболеваний человека и животных как в качестве самостоятельного этиологического фактора, так и котолерогена или коканцерогена [1]. Высок удельный вес микоплазменных инфекций среди ОРЗ, острых пневмоний, воспалительных заболеваний урогенитального тракта, внутриутробной и перинатальной патологии. Не вызывает сомнений роль микоплазм при вторичном бесплодии мужчин и женщин [23, 36, 38], а также в развитии ревматоидного артрита [6, 13, 15, 16]. В то же время патогенные потенции этих микоплазм, а также патогенетические механизмы развития микоплазменного инфекционного процесса до настоящего времени недостаточно изучены.

Литературные данные [4, 5, 10], а также многолетние исследования, проводимые в НИЦ Ереванского государственного медицинского университета, достаточно убедительно показали, что, несмотря на определенную тропность различных видов микоплазм к тем или иным органам и системам, инфекционный процесс не ограничивается лишь поражением органов-мишеней, а носит генерализованный характер. Гематогенное распространение микоплазм в организме инфицированных животных и длительная персистенция их в различных органах и тканях приводит к существенным изменениям на всех уровнях интеграции организма. Начиная с первых же суток после инокуляции микоплазм происходят сдвиги в состоянии периферической крови и костного мозга [20] зараженных крыс, сопровождающиеся расстройствами путей микрогемокрикуляции [11, 12] и иммунопатологическими реакциями [7, 8, 22, 24, 32, 33], а также выраженными дистрофическими изменениями и обменными нарушениями в ряде внутренних органов [2, 3, 14, 19, 26, 29]. Причем установлена определенная корреляционная зависимость между локализацией, длительностью персистенции микоплазм и тяжестью течения висцеральных поражений [3, 14, 19]. Анализ собственных и литературных данных позволил нам предположить, что в инициации микоплазменного патологического процесса заинтересованы в первую очередь метаболические и связанные с ними эндокринные расстройства, которые, в свою

очередь, накладывают отпечаток на характер и течение реакций клеточного и гуморального иммунитета. С этой точки зрения особый интерес представляют аргининзависимые микоплазмы, чьи патогенные потенции связываются с конкурентным потреблением аргинина — важного компонента метаболизма клетки хозяина — и выделением значительных количеств токсичного для клетки аммиака [1, 35]. По данным ряда авторов [30, 34, 40], заражение животных аргининзависимой микоплазмой *arthritis* вызывает нарушение индукции иммунного ответа, обусловленное способностью *M. arthritis* утилизировать аргинин и подавлять активность аргининдеиминидазной системы. В опытах *in vitro* показана способность *M. arthritis* разлагать аргинин и накапливать орнитин [39, 41], а также синтезировать специфический белок, избирательно сорбируя из среды культивирования аргинин [21]. Однако в доступной нам литературе не удалось найти каких-либо сведений о сдвигах в содержании аргинина в организме животных, зараженных аргининзависимыми микоплазмами вообще и *M. arthritis*, в частности, хотя и накопилось достаточно данных о возникновении дефицита аргинина и накоплении продуктов его утилизации в культурах тканей, инфицированных аргининзависимыми микоплазмами [39, 41]. Между тем не исключено, что возникающие в организме метаболические расстройства могут модулировать эндокринные нарушения, особенно со стороны аргининзависимых гормонов.

Все вышеизложенное и послужило основой для проведения исследований по определению количества аргинина в крови и печени (орган-мишень) крыс в динамике развития инфекционного процесса, индуцированного *M. arthritis*, а также изучения сдвигов в содержании типичных аргининзависимых гормонов — соматотропина и инсулина.

Материал и методы

Опыты ставились на белых беспородных крысах-самцах массой 120–140 г, которым однократно внутрибрюшинно вводилась ресуспендированная в физиологическом растворе бульонная культура *M. arthritis* в дозе 5×10^7 – 1×10^8 колониеобразующих единиц. Животные забивались путем декапитации через 4, 7, 21 и 45 дней после заражения микоплазмами. Контролем служили интактные крысы.

Количество аргинина в печеночной ткани интактных и инфицированных животных определяли по методу Speckman et al. [42]. Экстракцию печени производили в холодных условиях сразу после декапитации крыс. Печень гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком в 0,5 н растворе хлорной кислоты (200 г ткани на 5 мл HCl). Гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об/мин. Из надосадочной жидкости отбирали 1 мл раствора и к нему добавляли 300 мкл 2М KHCO_3 для нейтрализации надосадочной жидкости. Смесь после встряхивания ставили на инкубацию в течение 15 мин в ледяной бане. После инкубации пробы центрифугировали в течение 10 мин при 6000 об/мин и выделяли супернатант. Для определения аргинина брали 100 мкл супернатанта.

Для определения аргинина в сыворотке пользовались методом, описанным Девени [9]. Сыворотку смешивали с сульфосалициловой кислотой (20:1) и центрифугировали в течение 15 мин при 4000 об/мин. Надосадок отделяли, осадок дважды промывали 0,2 М раствором NaCl в 0,01 н HCl и объем объединенной надосадочной жидкости доводили до 5 мл тем же буфером. Для определения аргинина брали 100 мкл пробы.

Анализируемый материал (печеночный и сывороточный) фракционировался на колонке 1×10 см, заполненной ионообменной смолой типа даукс 50×8 с подачей $0,35M$ цитратного буфера со скоростью 60 мл/ч при 50°C и $\text{pH}=5,0$. Собранные фракции окрашивали нингидриновым раствором по методу Кравченко и соавт. [18]. Интенсивность окрашивания оценивали спектрофотометрически при 540 нм .

Определение содержания соматотропина и инсулина в крови производилось радиоиммунологическим методом с помощью специальных наборов с радиоактивной меткой J^{127} . Активность проб измерялась в импульсах в течение 1 мин. Вычисление концентрации гормонов производилось методом Log-Logit с использованием персонального компьютера "Apple 2" с программным обеспечением "Elwards".

Результаты и обсуждение

Результаты исследований, обобщенные в таблице, показали, что в ранние сроки развития микоплазменного инфекционного процесса количество аргинина в организме заметно повышается. Через 4 дня после заражения *M. arthritidis* уровень аргинина в печени и крови превышает контроль в 1,7 и 1,5 раза соответственно. Повышенное содержание аргинина в крови сохраняется и на седьмые сутки наблюдений, в то время как в печени оно нормализуется. В крови же нормализация уровня аргинина несколько отстает, и через 21 день после инокуляции микоплазм количество этой аминокислоты практически не отличается от контрольных цифр. На данном этапе развития патологического процесса (21-е сутки) в печени уже наблюдается дефицит аргинина, который имеет место и через 45 дней. К этому времени и в крови подопытных животных уровень аргинина достоверно снижается. Повышенное содержание аргинина на начальных этапах развития микоплазменного инфекционного процесса, по-видимому, связано с резким усилением в этот период катаболических реакций в организме инфицированных *M. arthritidis* крыс, морфологическим проявлением которых служат тяжелые дистрофические изменения в ряде внутренних органов и, в первую очередь, в печени [2, 3, 14, 19]. В последующий период (21-45 дней после заражения) течение микоплазменного инфекционного процесса характеризуется завершением диссеминации, персистенцией и размножением микоплазм во внутренних органах (органы иммуногенеза, опорно-двигательный аппарат, печень, костный мозг, почки и др.) [4, 10, 16]. Усиленная утилизация аргинина микоплазмами в этот период и служит, на наш взгляд, причиной его дефицита в организме.

Способность *M. arthritidis* утилизировать аргинин создает конкурентные взаимоотношения с клетками организма-хозяина, и с этой точки зрения представляет большой интерес изучение функции тех внутренних органов, секреторные процессы которых зависят от концентрации аргинина в крови, в частности аргининзависимых желез внутренней секреции. В наших исследованиях мы остановились на изучении сдвигов таких типичных аргининзависимых гормонов, как соматотропин (гормон роста) и инсулин, результаты исследования которых в динамике развития микоплазменного процесса также обобщены в таблице.

Содержание аргинина, соматотропина и инсулина в организме крыс, зараженных *M. arthritidis*

Сроки в днях	Аргинин, мкг/мл		Соматотропин, нг/мл	Инсулин, мкЕ/мл
	печень	кровь		
Контроль	36.2±2.4	28.6±1.8	15.4±4.1	32.4±3.8
4	60.3± 5.7 t=3.9	42.2±2.4 t=4.5	35.8±3.3 t=3.4	16.3±3.3 t=4.1
7	40.2±4.2 t=0.8	35.2±2.1 t=5.9	30.1±2.6 t=3.0	13.3±2.6 t=4.2
21	20.3±3.7 t=3.6	21.3±4.3 t=1.6	24.5±2.4 t=1.4	47.5±11.0 t=1.3
45	24.7±4.8 t=2.1	15.4±3.2 t=3.8	18.1±2.1 t=0.6	18.4±4.4 t=2.4

Примечание. Во всех изучаемых группах $p=9$

Как видно из таблицы, в относительно ранний период развития инфекционного процесса, индуцированного *M. arthritidis* (4- и 7-е сутки наблюдений), имеет место существенное повышение уровня соматотропного гормона по сравнению с контролем (в 2.3 и 1.9 раза соответственно). Именно в эти сроки нами выявлено резкое увеличение содержания аргинина в организме подопытных крыс. В последующие дни четко прослеживается тенденция к нормализации уровня соматотропина в крови инфицированных *M. arthritidis* крыс, и через 45 дней его показатели практически не отличаются от таковых в контроле.

Сдвиги в содержании инсулина в организме подопытных животных носили волнообразный характер: резкое падение уровня гормона более чем в 2 раза в течение первой недели развития патологического процесса сменяется нормализацией его количества к концу третьей недели, а затем вновь имеет место заметное понижение его содержания.

Таким образом, полученные данные явно свидетельствуют о состоянии дисгормоноза в организме инфицированных *M. arthritidis* животных, однако сдвиги в содержании двух аргининзависимых гормонов носят разнонаправленный характер. Увеличение концентрации аргинина в крови в течение первой недели после инокуляции *M. arthritidis* приводит к резкому повышению уровня соматотропина, в то время как содержание инсулина существенно уменьшается. В более поздние сроки, когда несмотря на развившийся дефицит аргинина содержание соматотропина в организме нормализуется, количество инсулина к 21-м суткам эксперимента также не отличается от контроля, но затем снова падает ниже нормы. Создается впечатление, что инсулин и соматотропин по-разному

проявляют свою зависимость от количества аргинина: на дефицит аргинина более чутко реагирует поджелудочная железа, а на избыток — гипофиз. Выявленное нами повышенное содержание гормона роста в ранние сроки развития микоплазменного инфекционного процесса четко коррелирует с избытком аргинина в организме подопытных крыс в этот период. В более поздние сроки наблюдения (21 и 45 дней после заражения *M. arthritidis*) уровень соматотропина нормализуется несмотря на явный дефицит аргинина в организме. Объяснение этого факта, на наш взгляд, кроется в том, что регуляция секреции соматотропина аргинином осуществляется не прямым действием этого метаболита на гипофиз, а опосредуется через центральную нервную систему. Известно [25], что освобождения гормона роста под воздействием аргинина не происходит в случае поражений гипоталамуса. Возможно, что при бурном размножении микоплазм в организме-хозяине в условиях конкуренции за аргинин как защитно-приспособительный механизм срабатывает усиленное освобождение гипоталамусом биологически активных веществ, стимулирующих секрецию соматотропина, например, такого опиоида мозга, как β -эндорфин. В то же время, по нашему мнению, не исключается и периферический механизм регуляции синтеза соматотропина, так как установлено, что опиоиды могут образовываться и за пределами мозга. Так, стимулированные различными агентами лимфоциты и макрофаги продуцируют β -эндорфин [31]. В нашем случае таким стимулятором являются микоплазмы, которые, с одной стороны, утилизируя аргинин, создают его дефицит в организме-хозяине, а с другой — через активацию лимфоцитов "помогают" ему справиться с этим дефицитом. Подобная трактовка не лишена оснований, ибо в литературе имеется ряд фактов позитивной роли микоплазм млекопитающих для организма-хозяина, связанных как с их митогенной активностью [11], так и со способностью индуцировать у лейкоцитов продукцию α -интерферона [28] или макрофагальную активность [37].

Каковы же возможные механизмы дисфункции эндокринного аппарата поджелудочной железы? Почему в ранний период развития микоплазменного инфекционного процесса, когда имеется избыток аргинина в организме, содержание инсулина в крови в 2 раза меньше, чем в контроле? По-видимому, определенную роль здесь играет наблюдаемая в эти сроки гиперсекреция гормона роста, поскольку установлено, что высокие концентрации соматотропина оказывают ингибирующее влияние на секреторные процессы в поджелудочной железе [27]. Подтверждением этого является нормализация уровня инсулина в крови на 21-е сутки эксперимента, когда имеет место и нормализация содержания соматотропина. Повторное же подавление функциональной активности поджелудочной железы через 45 дней после заражения *M. arthritidis* обусловлено, на наш взгляд, по крайней мере двумя факторами. Во-первых, это развившийся к этому времени дефицит аргинина в крови, во-вторых, цитотоксический эффект персистирующих в поджелудочной железе микоплазм на β -клетки островкового аппарата.

Поступила 23.10.95

Ռ.Ս.Հովսեփյան, Ս.Ա.Ավագյան

Միկոպլազմա arthritidis-ով հարուցված ինֆեկցիոն պրոցեսի զարգացման տարբեր ժամկետներում ուսումնասիրվել են արգինինի և արգինինկախյալ հորմոնների ինսուլինի և սոմատոտրոպինի քանակական տեղաշարժերը առնետների օրգանիզմում:

Հաստատվել է, որ միկոպլազմային պրոցեսի զարգացման վաղ շրջանում, երբ օրգանիզմում գերակշռում են կատարյալի ռեակցիաները, արգինինի քանակը լյարդում և այրան մեջ կտրուկ մեծանում է: Հետագայում, երբ տեղի է ունենում միկոպլազմաների տարածումը և պերսիստենցիան տարբեր օրգաններում, տիրոջ օրգանիզմում առաջանում է արգինինի դեֆիցիտ:

Ուսումնասիրությունները ի հայտ են բերել նաև արտահայտված դիսհարմոնիկ վիճակ, ընդ որում արգինինկախյալ սոմատոտրոպինի և ինսուլինի պարունակության փոփոխությունները կրում են հակառակ բնույթ: Հետազոտման առաջին շաբաթվա ընթացքում արգինինի քանակի ավելացմանը զուգահեռ խիստ բարձրանում է սոմատոտրոպինի մակարդակը, սակայն ինսուլինի պարունակությունը նվազում է: Միկոպլազմային ախտահարման ավելի ուշ շրջանում, չնայած արգինինի քանակի անկմանը, սոմատոտրոպինի պարունակությունը արյան մեջ վերականգնվում է, իսկ ինսուլինի մակարդակը կարճատև նորմալացումից հետո նորից իջնում:

Բննարկվում են հայտնաբերված փոփոխությունների հավանական պատճառները:

SHIFTS IN THE CONTENT OF ARGININ AND ARGININ-DEPENDENT HORMONES IN THE ORGANISM OF RATS INFECTED BY M. ARTHRITIDIS

R. S. Hovsepien, S. A. Avakian

In different stages (4, 7, 21, 25 days) of M. arthritidis induced infection quantitative changes of arginin and arginin — dependent hormones (insulin, somatotropin) in the organisms of rats have been studied.

We have determined, that in the early stages of mycoplasmic infection, when catabolic reactions are activated, arginin level in the liver and blood is very high. In the following stages, when mycoplasmas dissemination and persistence in organs occur, the arginin deficiency is developing.

Simultaneously, the increase of arginin level in the blood after M. arthritidis inoculation leads to the increase of somatotropin and decrease of insulin levels.

Although arginin deficiency is developing in the later stages, the somatotropin and insulin levels by the 21st day of the experiment are normalizing.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борхсениус С. Н., Чернова О. А. Микоплазмы. Л., 1989.
2. Вартанян А. В., Авакян Л. А. В кн.: Актуальные вопросы микоплазматологии. Ереван, 1983, с.53.
3. Вартанян А. В., Овсепян Р. С., Зильфян А. В. Биол. ж. Армении, 1982, 35, 1, с.63.
4. Вульфович Ю. В., Гамова Н. А. В кн.: Актуальные вопросы микоплазматологии. Ереван, 1983, с.30.
5. Вульфович Ю. В., Зильфян А. В. и др. ЖМЭИ, 1981, 1, с.14.
6. Вульфович Ю. В., Каган Г. Я., Зильфян А. В. В кн.: Микоплазмы в патологии человека. М., 1981, с.42.
7. Горина Л. Г., Гончарова С. А., Ланге А., Каган Г. Я. Лаб. дело, 1983, 1, с.8.

8. Горина Л. Г., Саламова Р. Э., Цветков В. С., Прозоровский С. В. ЖМЭИ, 1985, 6, с. 48.
9. Девени Т., Гергей Я. В кн.: Аминокислоты, пептиды и белки. Л., 1976.
10. Жевержеева И. В. В кн.: Актуальные вопросы микоплазматологии. Ереван, 1983.
11. Зильфян А. В. В кн.: Актуальные вопросы микоплазматологии. Ереван, 1983.
12. Зильфян А. В. В кн.: Микоплазмы и микоплазмозы. М., 1985.
13. Зильфян А. В. Патогенез и иммуноморфологическая характеристика экспериментальных артритов, индуцированных микоплазмами *arthritis* and *fermentans*. Докт. дис. Ереван, 1987.
14. Зильфян А. В., Вартанян А. В., Овсепян Р. С. В кн.: III Закавказская конф. морфологов. Ереван, 1982.
15. Зильфян А. В., Вульфвич Ю. В., Жевержеева И. В., Каган Г. Я. Журн. микробиол., 1981, 3, с. 42.
16. Каган Г. Я., Вульфвич Ю. В., Зильфян А. В. и др. Журн. микробиол., 1982, 3, с. 107.
17. Каулен Д. Р., Санин А. В. Иммунология, 1982, с. 54.
18. Кравченко Н. А., Клеопина Г. В., Каверзнева Е. Д. ДАН СССР, 1962, 144, с. 118.
19. Овсепян Р. С., Вартанян А. В. В кн.: Актуальные вопросы микоплазматологии. Ереван, 1983.
20. Овсепян Р. С., Назарян Л. Р. В кн.: Микоплазмы в патологии человека и животных. Ереван, 1989.
21. Пронин А. В. Функциональная активность иммунокомпетентных клеток у крыс при экспериментальной инфекции *M. arthritis*. Автореф. канд. дисс. М., 1981.
22. Санин А. В., Пронин А. В., Хоробрых В. В. и др. Иммунология, 1983, 4, с. 21.
23. Суходальская А. Е. и др. Урол. нефрол., 1977, 2, с. 35.
24. Тимаков В. Д., Каган Г. Я. L-формы бактерий и семейство *Mycoplasmataceae*. М., 1973.
25. Уайт-А., Хендлер Ф. и др. Основы биохимии, т. 3. М., 1981.
26. Цинзерлинг А. В. Труды Ленинградского педиатрич. мед. института, т. 64, 1973.
27. Albertik G., Christensen N. J. et al. Lancet, 1973, 2, 7841, 1299.
28. Birke C., Peter H. et al. J. Immunol., 1981, 127, 94.
29. Boatman E., Cartwright F., Kenny G. Cell Tissue Res., 1976, 170, 1.
30. Cahill J. F., Cole B. C. et al. Infect. and Immunol., 1971, 3, 1, 24.
31. Carr D. J., Blelock J. E. Int. Rev. Immunol., 1989, 4, 3, 213.
32. Cole B. C. J. Immunol., 1986, 136, 2364.
33. Cole B. C., Golightly-Rowland L., Ward J. R. Infect. and Immunol., 1975, 12, 5, 1083.
34. Eckner R. J., Han T., Kumor V. Fed. Proc., 1974, 33, 3, part 1, 769.
35. Ibrahim A. A., Yamamoto R. Infect. Immunol., 1977, 18, 226.
36. Klotz P. G. In: Progress in reproductive biology, N. Y., 1978.
37. Loewenstein J., Gallily R. Isr. J. Med. Sci., 1984, 20, 895.
38. Mesequer M. A. J. Infect. Dis., 1984, 149, 4, 657.
39. Shink R. T., Barile M. F. J. Bacteriol., 1963, 86, 195.
40. Simberkoff M. S., Thorbacke G. J., Tomas L. J. Exp. Med., 1969, 129, 6, 1163.
41. Smith P. F. Bact. Rev., 1968, 28, 97.
42. Speckman D. H., Stein W. H., Moore S. Anal. Chem., 1958, 30, 1180.