

ORIGINALNI NAUČNI RADOVİ

UTICAJ AZOTEMIJE NA AKTIVNOST ARGINAZE JETRE  
U AKUTNOM OŠTEĆENJU BUBREGA

Jelenka NIKOLIĆ, Tatjana CVETKOVIĆ, Dušan SOKOLOVIĆ,  
Tatjana JEVTIĆ, Gordana BJELAKOVIĆ i Jelena ĐORĐEVIĆ

*Biohemijski instiiut Mcdicinskog fakuheta u Nišu*

Akutno oštećenje bubrežne funkcije dovodi do izrazitog disbalansa mnogih homeostatskih mehanizama u organizmu koji nastaju kao posledica redukovane glomerularne filtracije i prateće oligurije. To uslovljava pojavu azotemije, stanja koje se karakteriše povećanjem nivoa uree, kreatinina i drugih uremičnih toksina u krvi. Rezultati ranijih istraživanja pokazuju da je akutna bubrežna insuficijencija poremećaj koji je praćen ubrzanim katabolizmom proteina. Urea je terminalni produkt katabolizma proteina čija se sinteza uglavnom odigrava u jetri zbog čegaje cilj ispitivanja bio ispitivanje aktivnosti arginaze jetre, terminalnog enzima u ciklusu sinteze uree, u različitim eksperimentalnim modelima akutne bubrežne insuficijencije. Akutna azotemija izazivana je eksperimentalno namuškim Sprague Dawly p covima pomoću dva modela: 1- model bilateralnog podvezivanja uretera (BPU) i 2- glicerolski model. Aktivnost arginaze u homogenatu jetrinog tkiva merena je prema metodi Poremske i Kedre na bazi količine oslobođenog ornitina. U plazmi eksperimentalnih životinja meren je nivo uree i kreatinina u cilju procene bubrežne funkcije.

U oba modela akutnog oštećenja bubrega dolazi do značajnog porasta koncentracije uree i kreatinina u plazmi ( $p < 0.001$ ), što je praćeno signifikantnim porastom aktivnosti hepatične arginaze u odnosu na kontrolne grupe životinja. Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da je azotemija u akutnoj bubrežnoj insuficijenciji praćena porastom aktivnosti arginaze jetre.

*Ključne reči:* azotemija, arginaza, jetra, akutna bubrežna insuficijencija

**Uvod**

Akutna bubrežno insuficijencija (ABI) je dramatičan poremećaj funkcije bubrega koji nastaje kao rezultat delovanja različitih faktora kao što su: ishemija bubrega, bilateralna opstrukcija uretera, delovanje toksina, post-traumatskih nekroza, delovanje nefrotoksičnih lekova, upotreba nekih dijagnostičkih kontrastnih sredstava, kao i akcidentalna trovanja nekom vrstom

hrane (*Abuelo*, 1990; *Schwarz*, 1987; *Wanner* i sar., 1986). Redukovana glomerulama filtracija i prateća oligurija u akutnoj insuficijenciji bubrega dovode do stanja azotemije koje se karakteriše povećanjem koncentracije uree, kreatinina i drugih uremičnih toksina, pojavom elektrolitnog disbalansa i poremećaja elektrohemijske reakcije krvi, uz narušenu ravnotežu hormona i mnogih drugih sastojaka krvi. U proceni bubrežne funkcije u kliničkoj dijagnozi ovakvog poremećaja najčešće se koristi određivanje koncentracije uree i kreatinina u plazmi.

Nivo uree u plazmi zavisi ne samo od funkcije bubrega, tj. njene eliminacije, već i od sinteze koja se uglavnom odvija u jetri. Arginaza je enzim koji je direktno uključen u proces sinteze uree u jetri gde, kao terminalni enzim ciklusa sinteze razlaže arginin na ureu i ornitin. Na ovaj način enzim učestvuje u detoksikaciji amonijaka u organizmu koji se oslobađa katabolizmom aminokiselina. Prema rezultatima ranijih istraživanja, ABI dovodi do porasta nivoa glukagona i kateholamina, oslobađanja tkivnih proteaza i drugih faktora što može biti uzrok pojave kataboličkog stresa (*Giordano* i sar., 1978; *Horl* i sar., 1980).

Cilj istraživanja bio je da se ispituju efekti akutnog oštećenja bubrega i nastale azotemije na aktivnost hepatične arginaze.

## Materijal i metode

Eksperimentalna ABI indukovana je na muškim Sprague Dawley pacovima telesne mase oko 200 g pomoću dva modela:

1. model bilateralne opstrukcije uretera (BOU-ABI). Nakon anestezije katarom u dozi 35 mg/kg, vršena je laparatomija i podvezivanje uretera oba bubrega, i

2. toksični model, delovanjem glicerola (G-ABI). Nakon perioda dehidracije od 18 sati u mišiće obe noge data je jedna doza glicerola (50%, 8 ml/kg telesne mase).

Nakon 48 sati životinje su žrtvovane. Heparinizovana krv uzimana je iz aorte abdominalis, a u izdvojenoj plazmi određivana je koncentracija uree i kreatinina. Uzorci jetre su homogenizovani i zamrzavani do upotrebe.

Aktivnost arginaze u homogenatu jetrinog tkiva određivana je prema metodi opisanoj od strane *Poremske* i *Kedre* (1975) na bazi količine oslobođenog ornitina. Proteini u homogenatu određivani su prema metodi *Lowry-a.* i sar. (1951). Enzimska aktivnost izražavana je u mikromolima ornitina na mg proteina. Koncentracija uree i kreatinina u uzorcima plazme merena je standardnim biohemijskim metodama. Statistička obrada rezultata vršena je Student-ovim t testom.

## Rezultati istraživanja

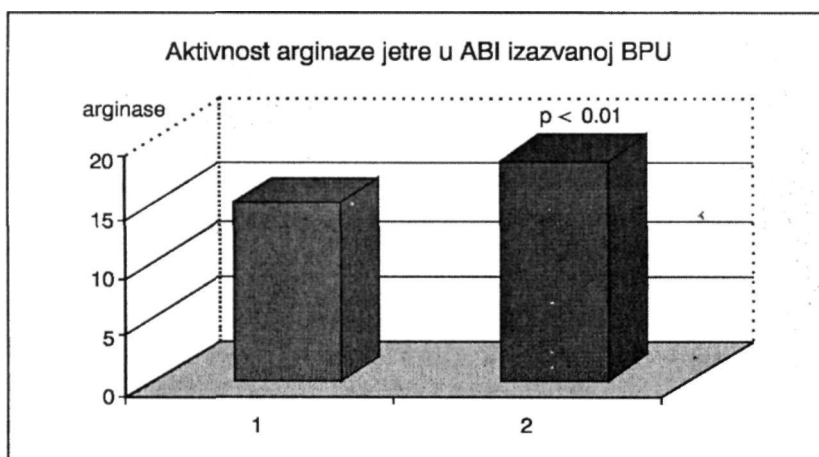
Na tabeli 1 prikazani su rezultati efekta ABI indukovane bilateralnim podvezivanjem uretera na nivo uree i kreatinina u plazmi. Rezultati pokazuju signifikantni porast koncentracije ispitivanih parametara u odnosu na kontrolnu grupu životinja ( $p < 0.001$ ).

*Tabela 1.* Uticaj bilateralnog podvezivanja uretera (BPU) na nivo uree i kreatinina u plazmi (srednja vrednost  $\pm$  SD)

	Urea (mmol/l)	Kreatinin (fimol/l)
kontrola	8.68 $\pm$ 1.15	57.87 $\pm$ 6.89
BPU	84.2 $\pm$ 8.83 ***	619.44 $\pm$ 54.76***

\*\*\* $p < 0.001$

Istovremeno u BPU-ABI dolazi do signifikantnog porasta aktivnosti arginaze u jetrinom parenhimu ( $p < 0.01$ ) (grafikon 1).



Grafikon 1. Aktivnost arginaze jetre u ABI izazvanoj bilateralnim podvezivanjem uretera  
 1= kontrola (15,05  $\pm$  0,58)  
 2 = BUP-ARF(18,90  $\pm$  1,5)

Na tabeli 2 prikazane su vrednosti uree i kreatinina u plazmi životinja kod kojih je akutna bubrežna insuficijencija izazvana glicerolom. Uočava se signifikantan porast uree i kreatinina ( $p < 0.001$ ).

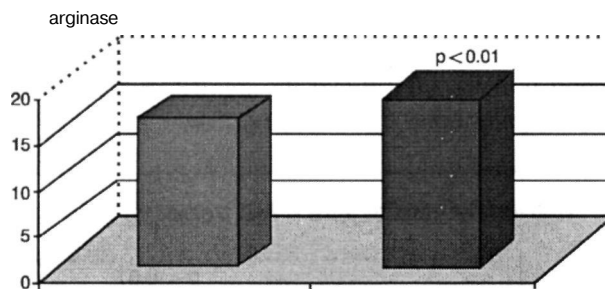
Tabela 2. Koncentracija uree i kreatinina u plazmi pacova kod glicerolskog modela ABI (G-ABI) (srednja vrednost  $\pm$  SD).

	Urea (mmol/l)	Kreatinin ( $\mu$ mol/l)
kontrola	8.1 $\pm$ 1.0	47.38 $\pm$ 8.09
G-ABI	79.68 $\pm$ 5,10***	641.52 $\pm$ 84.56***

\*\*\*p < 0.001

Rezultati prikazani na grafikonu 2 pokazuju da i u ovom modelu dolazi do signifikantnog porasta enzimske aktivnosti u jetrinom homogenatu kod azotemičnih pacova (p < 0.01).

Uticaj ABI izazvane glicerolom na aktivnost arginaze



Grafikon 2. Aktivnost arginaze jetre u ABI izazvanoj glicerolom

1 = kontrola (16,08  $\pm$  1,53)

2 = G-ABI (18,12  $\pm$  1,42)

## Diskusija

Ekskrecija terminalnih produkata metabolizma je glavna homeostatska funkcija bubrega pri čemu se u oštećenjima bubrega javlja klinički sindrom koji se označava kao uremija ili azotemija. Pored akumulacije terminalnih produkata metabolizma u ABI se javljaju promene u elektrolitnoj i acidobaznoj homeostazi kao i u endokrinom statusu. ABI je klinički poremećaj sa kompleksnim metaboličkim poremećajima koji se javljaju na nivou različitih organa i tkiva (mišića, mozga, jetre) kao posledica narušene homeostaze organizma.

Rezultati istraživanja pokazuju da se aktivnost arginaze povećava u oba modela ABI. Povećana aktivnost enzima može da nastane kao posledica

nastalog hormonskog disbalansa i kataboličkog stresa ili uticajem nekih drugih faktora u uremičnoj plazmi koji bi mogli da deluju kao aktivatori enzima.

Regulacija sinteze uree ostvaruje se delovanjem hormona, dijetarnih faktora, kao i uticajem aktivatora i inhibitora (*Graetz, 1977; Husson i Vailant, 1982; Mimic-Oka i sar., 1971; Nikolić, 1996*). Nastali hormonski disbalans i pojava azotemije sa uvećanjem koncentracije raznih terminalnih produkata metabolizma može uticati na nivo sinteze uree u jetri i aktivnost enzima tog ciklusa (*Merrill i Hampers, 1970; Wills, 1985*). Povećanje aktivnosti arginaze jetre može se tumačiti pojavom hiperkataboličkog stanja. Ubrzana proteoliza u skeletnim mišićima može nastati kao posledica nastalog hormonskog disbalansa. Povećanje nivoa glukagona i kateholamina deluje stimulativno na proteolizu u mišićima (*Horl i sar., 1980; Graetz, 1977; Husson i Vailant, 1982*). Povećanje nivoa kateholamina delom nastaje inhibicijom aktivnosti monoamino oksidaze visokim koncentracijama uree što je važan momenat u patogenezi nekih kliničkih poremećaja koji se javljaju u uremiji (*Wills, 1985*).

Kao posledica hiperkataboličkog stanja javlja se povećano oslobađanje aminokiselina iz mišića i njihovo preuzimanje od strane jetre gde se koriste za glikoneogenezu i ureogenezu. Dobijeni rezultati pokazuju da se u akutnoj bubrežnoj insuficijenciji povećava proces ureogeneze u jetri. Rezultati objavljeni od strane drugih autora potvrđuju da u akutnoj azotemiji dolazi do promena funkcionalne i metaboličke aktivnosti jetre (*Cvetković sar., 2000; Fleckisar., 1992; Nagase i sar., 1996; Gulaevi sar., 1992; Gw/aevisar., 1993; da Costa e Silva i Albuquerque, 1978*).

Povećanje aktivnosti arginaze može nastati i kao odgovor na prisustvo drugih faktora u uremičnoj plazmi kao što je interleukin I, prostaglandin E 2, neki polipeptidi, prisustvo proteaza i raznih uremičnih toksina koji mogu da stimulišu proteolizu ili nekim drugim mehanizmom da utiču na aktivnost arginaze (*Ketteler i sar., 1994; Horl i sar., 1981; Barakos i sar., 1983; Clowes i sar., 1983; Wanner i sar., 1986; Zager, 1996*).

### **Zaključak**

Na osnovu dobijenih rezultata može se zaključiti da u akutnom oštećenju bubrega i azotemije dolazi do povećanja aktivnosti hepatične arginaze. Ovo povećanje ide u prilog pretpostavci da nastalo hiperkataboličko stanje aktivira proces ureogeneze u jetri.

## Literatura

*Abuelo, J. G.* (1990). Renal failure caused by chemicals, foods, plants, animal venoms, and misuse of drugs. *Arch. Intern. Med.*, *150*, 505-510.

*Baracos, V., Rodemann, H. P., Dinarello, C. A. and Goldberg, A. L.* (1983). Simulations of muscle protein degradation and prostaglandin E2 release by leukocytic pyroxene (interleukin-1). *N. Eng. J. Med.*, *308*, 553-558.

*Clowes, GHA. Jr., George, B. C., Ville, Jr. C. A. and Saravis, C. A.* (1983). Muscle proteolysis induced by circulating peptide in patients with sepsis or trauma. *N. Eng. J. Med.*, *308*, 545-552.

*Cvetković, T., Vlahović, P., Savić, V., Pavlović, D., Kocić, G. and Đorđević, V. B.* (2000). Quarcetine protects liver from oxidative stress induced by glycerol. *J. Hepatology*, *32*, 214-214.

*Giordano, G., de Santo, N. G. and Senatore, R.* (1978). Effects of catabolic stress in acute and chronic renal failure. *Am. J. Clin. Nutr.*, *312*, 1561-1578.

*Da Costa e Silva, A. and Albuquerque, Z. P.* (1978). Effect of experimental chronic renal failure upon the production of urea, as measured by the liver arginase activity in rats. *Experientia*, *34*, 1465-1466.

*Fleck, C., Borner, A., Kretzschmar, M., Machnik, G., Sprott, H., Zimmermann, T., Kell, E. and Braunlich, H.* (1992). Liver function after bilateral nephrectomy. *Liver*, *12*, 319-325.

*Gulaev, V. G., Ivanov Iul. and Gulaeva, S. F.* (1993). The hypoazotemic and diuretic action of lespeflan in acute kidney failure. *Urol. Nefrol. (Mosk)*, *4*, 32-34.

*Gullaev, V. G., Denisenko, P. P., Glyzin, V. I., Ivanov, Iul. and Meshchishen, F.* (1992). The mechanism of action of the bioflavonoid lespeflan and the antihypoxant TB4 on nitrogen metabolism in animals with acute kidney failure. *Exp. Klin. Farmakol.*, *55*, 20-22.

*Graetz, G.* (1977). Glucagon stimulation of citrulline formation in isolated hepatic mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*, *178*, 19-25.

• *Horl, W. H., Stepinski, J., Ganters, C., Horl, M. and Heidland, A.* (1981). Evidence for the participation of proteases on protein catabolism during hypercatabolic renal failure. *Klin. Wochenschr.*, *59*, 751-759.

*Horl, W. H., Stepinski, J. and Heidland, A.* (1980). Carbohydrate metabolism and uremia-mechanisms for glucogenolysis and gluconeogenesis. *Clin. Wochenschr.*, *58*, 1051-1064.

*Husson, A. and Vaillant, R.* (1982). Effects of glucocorticoids and glucagon on argininosuccinate synthetase, argininosuccinase and arginase in fetal rat liver. *Endocrinology*, *110*, 227-232.

*Ketteler, M., Border, W. A. and Noble, N. A.* (1994). Cytokines and arginine in renal injury and repair. *Am. J. Physiol.*, *267*, F197-F207.

*Lowry, H. O., Rosenbrough, J. N., Far, J. A. and Randall, J.* (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, *193*, 265-275.

*Merrill, J. P. and Hampers, C. L.* (1970). Uremia. *N. Engl. J. Med.*, *282*, 953-961.

*Mimic-Oka, J., Cupić, Z. and Japundžić, I.* (1971). Effect of adrenal function on level of hepatic and extrahepatic arginase. *Experientia*, *27*, 1477-1478.

*Nagase, S., Aoyagi, K., Gotoh, M., Hirayama, A., Tomida, C., Shimoza, Y. and Koyama, A.* (1996). Increased lipid peroxidation by rat liver microsomes in experimental renal failure. *Nephron*, *74*, 204-208.

*Nikolic, J.* (1996). Metabolizam proteina i aminokiselina, u: Biohemija: Koraćević, D., Bjelaković, G., Dorđević, V., Nikolić, J., Pavlović, D. Kocić, G. Savremena administracija. Beograd, 410-523.

*Poremska, Z. and Kedra, M.* (1975). Early diagnosis of myocardial infarction by arginase activity determination. *Clin. Chim. Acta*, 60, 355-361.

*Schwarz, A.* (1987). Analgesic-associated nephropathy. *Klin. Wochenschr.*, 65, 1-16.

*Wanner, C, Schollmeyer, F. and Hort, W. H.* (1986). Urinary proteinase activity in patients with multiple traumatic injuries, sepsis or acute renal failure. *J. Lab. Clin. Med.*, 108, 224-229.

*Wills, M.* (1985). Uremic toxins, and their effect on intermediary metabolism. *Clin. Chem.*, 5/5, 5-13.

*Zager, R. A.* (1996). Rhabdomyolysis and myohemoglobinuric acute renal failure. *Kidney Int.*, 49, 314-326.

## INFLUENCE DE L'AZOTHEMIE SUR L'ACTIVITE DE L'ARGINASE DU FOIE DANS L'AIGU ENDOMMAGEMENT DES REINS

Jelenka NIKOLIĆ, Tatjana CVETKOVIĆ, Dušan SOKOLOVIĆ,  
Tatjana JEVTIĆ, Gordana BJELAKOVIĆ et Jelena ĐORĐEVIĆ

*Institut biochimique de la Faculte de Medecine de Niš*

L'aigu endommagement de la fonction de rein amene a la disbalance expressive de nombreux mecanismes homeostatiques dans l'organisme qui se forment comme consequence de la reduite filtration glomeruleuse et de l'oliguree accompagnante. Cela conditionne l'apparition de l'azothemie etat qui est caracterise par l'augmentation de l'uree, du creatinin et des autres toxiques uriques dans le sang. Resultats des recherches antecedentes montrent que l'aigue insuffisance renale est la perturbation suivie par le catabolisme accelere des protides. L'uree est le produit terminal du catabolisme des protides dont la synthese se passe en general dans le foie et c'est pourquoi le but de la recherche etait l'examen de l'activite de l'arginase du foie, de l'enzyme terminal dans le cycle de synthese de l'uree, dans les divers modeles experimentals de l'aigue insuffisance renale. L'aigue azofhemie est sucitee experimentalement sur les rats males Sprague Dawly a l'aide de deux modele: 1 modele la ligature bilaterale de l'uretore (BPU) 2 modele glycerologique. L'activite de l'arginase dans l'homogenate du tissu de foie est mesuree d'apres la methode Poremska et Kedra a la base de la quantite de l'ornitine libere. Dans le plasma des animaux experimentals on a mesure le niveau de l'uree et du creatinin dans le but de l'evaluation de la fonction renale. Chez les deux modeles de l'aigu endommagement des reins on vient a l'augmentation significative de la concentration de l'uree et du creatinin dans le plasma ( $p < 0,001$ ) et cela est suivi par l'augmentation importante de l'activite de l'arginase hepatiche par rapport au groupe de controle des animaux. A la base des resultats obtenus on peut conclure que l'azothemie dans l'aigue insuffisance renale est suivi par l'accroissement de l'activite de l'arginase du foie.

*Les mots cles:* Azothemie, arginase, aigue insuffisance renale

## ASOTHEMIA EFFECT UPON THE LIVER ARGINASE ACTIVITY IN THE ACUTE KIDNEY DAMAGE

Jelenka NIKOLIĆ, Tatjana CVETKOVIĆ, Dušan SOKOLOVIĆ,  
Tatjana JEVTIČIĆ, Gordana BJELAKOVIĆ and Jelena ĐORĐEVIĆ

*Biochemistry Institute of the Faculty of Medicine, Niš*

The acute damage of the kidney function leads to an outstanding disbalance of many homeostatic mechanisms in the organism that emerges as a consequence of the reduced glomerular filtration and the accompanying oliguria. This conditions the emergence of asothenia, that is, the state characterized by an increase of the level of urea, creatinine and other ureic toxins in the blood. The results of the previous examinations show that the acute renal insufficiency is a disturbance accompanied with accelerated protein catabolism. The urea is a terminal product of the protein catabolism whose synthesis is mainly taking place in the liver; that is why the research aimed at examining the liver arginase activity, terminal enzyme in the urea synthesis cycle in various experimental models of the acute renal insufficiency. The acute asothenia is experimentally caused upon the male Sprague Dawley rats by means of two models, namely, the model of bilateral binding of the urethra (BPU) and the glycerolic model. The arginase activity in the liver tissue homogenate is measured by the Porembsky and Cedra method on the basis of the liberated ornithine liberation. In the plasma of the experimental animals the level of urea and creatinine was measured for the sake of estimating the renal function. In both the models of the acute kidney damage there was a considerable increase of the urea and creatinine concentration in the plasma ( $p < 0,001$ ) which is followed by a significant increase of the hepatic arginase activity with respect to the control group of the animals. On the basis of the obtained results it can be concluded that asothenia in the acute renal insufficiency is followed by an increase in the liver arginase activity.

*Key words:* Asothenia, arginase, acute renal insufficiency

Autor: Prof, dr sci Jelanka Nikolić, specijalista biohemije, Biohemijski institut Medicinskog fakulteta u Nišu; kućna adresa: Niš, Zelengorska 25.

(Rad je Uredništvo primilo 10. januara 2002. godine)