

**ОБ УЧАСТИИ L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ В МЕХАНИЗМАХ  
АНТИПИРЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ВАЛИНА В УСЛОВИЯХ  
ЭНДОТОКСИНОВОЙ ЛИХОРАДКИ**

**Ф.И. Висмонт, В.В. Лобанова**

*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*

**Введение.** В последнее время в нашей стране и за рубежом наблюдается повышение интереса к физиологии и биохимии, фармакологии и вопросам клинического применения аминокислот и их производных. Однако, по проблеме влияния аминокислот на температуру тела, механизмов реализации их воздействия на терморегуляцию при лихорадке имеются лишь единичные разрозненные данные [1,2].

Ранее нами было показано, что как центральное так и системное введение в организм аминокислоты L-аргинина – субстрата L-аргиназы [5] и ее ингибитора L-валина оказывает выраженный антипиретический эффект [1,2] и что повышение функциональной активности L-аргиназы печени, что сказывается на процессах образования NO, имеет важное значение в патогенезе эндотоксиновой лихорадки [3]. Однако, механизмы антипиретического действия аминокислоты L-валина в условиях лихорадки, как и роль в них аргиназы печени остаются невыясненными.

Цель исследования – выяснить механизмы антипиретического действия L-валина в условиях эндотоксиновой лихорадки.

**Материалы и методы исследования.** Опыты выполнены на 198 взрослых ненаркотизированных белых крысах самцах и 16 кроликах обоего пола. Все наблюдения производили в термонеutralных условиях (20–22°C). Для создания общепринятой модели эндотоксиновой лихорадки использовали эндотоксин E. Coli (серотип 0111:B4 Sigma, США), который вводили однократно: крысам – внутрибрюшинно в дозе 5 и 50 мкг/кг, кроликам – в краевую вену уха в дозе 0,5 мкг/кг. Для выяснения значимости аргиназы печени и монооксида азота (NO) в регуляции температуры тела использовали ингибитор аргиназы L-валин (Roth GmbH+Co.KG, Германия) и неселективный блокатор NO-синтазы – метиловый эфир N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США). L-валин вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 100 мг/кг через день в течение недели, L-NAME в дозе 25 мг/кг вводили однократно: кроликам – внутривенно, крысам – внутрибрюшинно.

Содержание свободных аминокислот в плазме крови крыс определяли методом обращено-фазной жидкостной хроматографии на аналитической колонке Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub>.

Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитрат/нитритов ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ) в плазме крови с помощью реактива Грисса. Концентрацию мочевины определяли колориметрически, а активность аргиназы в печени – спектрофотометрически. У крыс и кроликов ректальную температуру (в прямой кишке на глубине 3,0 и 5,0 см соответственно) измеряли с помощью электротермометров ТПЭМ-1 и Microlife (Швейцария). В ряде опытов регистрацию глубокой температуры тела у бодрствующих крыс осуществляли при помощи телеметрической установки Mini Mitter (модель 4000, США). Все полученные цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной биологической статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** В опытах установлено, что внутрибрюшинное введение крысам (n=12) бактериального эндотоксина (ЛПС) в дозе 5,0 мкг/кг приводит к повышению температуры тела на 1,3°C, 1,2°C, 1,8°C 1,2°C и 0,7°C ( $p<0,001$ ) через 120, 180, 240, 300 и 330 мин. после инъекции эндотоксина и которая составляла  $38,9\pm 0,11$ ;  $38,8\pm 0,12$ ;  $39,4\pm 0,10$ ;  $38,8\pm 0,13$  и  $38,3\pm 0,12$ °C соответственно. После введения ЛПС в дозе 50 мкг/кг имело место более выраженное и длительное повышение температуры тела. Введение в кровотоки ЛПС (0,5 мкг/кг) кроликам (n=9) приводило к повышению температуры тела у животных через 30, 60, 120 и 180 мин. после введения ЛПС, на 0,6°C, 1,3°C, 1,6°C и 1,2°C ( $p<0,001$ ) и которая составляла соответственно  $39,2\pm 0,12$ ;  $39,9\pm 0,10$ ;  $40,2\pm 0,11$  и  $39,8\pm 0,12$ °C.

Действие ЛПС (5,0 мкг/кг) у крыс через 120, 180, 240, 300 и 330 мин после введения экзопирогена приводило к повышению активности аргиназы в печени на 53,1% (n=8), 39,2% (n=7), 31,3% (n=8), 27,8% (n=7) и 23,3% (n=8) ( $p<0,05$ ) соответственно, по сравнению с контролем. Активность аргиназы в печени у крыс контрольной группы через 120, 180, 240, 300 и 330 мин после внутрибрюшинного введения физраствора составляла  $5,63\pm 0,27$  (n=8),  $5,04\pm 0,22$  (n=7),  $5,26\pm 0,31$  (n=7),  $5,47\pm 0,33$  (n=7) и  $5,38\pm 0,29$  (n=7) мкмоль мочевины/г. сырой ткани·ч. Содержание  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови у крыс (n=7) в этих условиях по сравнению с контролем возрастало на 20,8%, 21,5%, 53,1%, 62,5% и 81,2% ( $p<0,05$ ) и составляло соответственно  $8,7\pm 0,25$ ;  $9,0\pm 0,36$ ;  $10,6\pm 0,41$ ,  $12,0\pm 0,58$  и  $13,1\pm 0,52$  мкмоль/л.

В условиях лихорадки, через 120 мин. после внутрибрюшинной инъекции ЛПС в дозе 50 мкг/кг, в плазме крови у крыс (n=7) снижалось содержание аминокислот L-аргинина и L-валина на 35,8% и 21,1% ( $p<0,01$ ) и которое составляло  $163,5\pm 12,96$  мкмоль/л и  $133,6\pm 8,12$  мкмоль/л соответственно.

Через 120, 180, 240, 300 и 330 мин после внутрибрюшинного введения экзопирогена в плазме крови крыс (n=7) повышался (по сравнению с контролем) уровень мочевины на 26,0%, 30,7%, 44,7%, 51,4% и 39,8% ( $p<0,01$ ) и составлял  $4,4\pm 0,50$ ,  $5,1\pm 0,60$ ,  $5,6\pm 0,57$ ,  $6,9\pm 0,57$  и  $5,2\pm 0,43$  ммоль/л.

Известно, что аргиназа печени является важным ферментом цикла мочевины, участвующей в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии [5]. Исследования, выполненные на кроликах (n=7) и крысах (n=8) показали, что однократное введение, соответственно в кровоток или внутривентриально, интактным животным 30%-ного раствора мочевины (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) в дозе 300 мг/кг не влияет на температуру тела. Установлено, что действие ЛПС (5 мкг/кг) у крыс в условиях предварительного введения животным мочевины в дозе 300 мг/кг (внутрибрюшинно один раз в сутки в течение трех дней) сопровождается ослаблением лихорадочной реакции. Так, через 120 и 180 мин после инъекции, ректальная температура у крыс (n=8), получивших только ЛПС, повышалась на 1,2 и 1,1°C, 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 эндотоксина всего лишь на 0,6 и 0,4°C. В опытах на кроликах (n=7) показано, что введение в кровоток мочевины (0,3 г/кг) на высоте подъема температуры тела при эндотоксиновой лихорадке (через 60 и 90 мин от момента инъекции ЛПС) приводит к значительному понижению температуры тела и ослаблению лихорадки. Так, через 15 и 30 мин после введения мочевины ректальная температура на высоте лихорадки (60 мин) снижалась по сравнению с контролем на  $0,9 \pm 0,08$  ( $p < 0,05$ ) и  $0,8 \pm 0,10$  °C ( $p < 0,01$ ). Показано, что лихорадочная реакция у кроликов (n=6), вызванная введением ЛПС, также ослабляется в условиях предварительного введения (за 30 мин до инъекции экзопирогена) в кровоток животных мочевины (0,3 г/кг).

Учитывая данные литературы о том, что активность аргиназы печени сказывается на процессах образования NO и тонусе сосудов, а действие в организме ЛПС вызывает экспрессию индуцибельной NO-синтазы и приводит к образованию больших количеств NO [4,5], представляло интерес выяснить, как будет изменяться температура тела животных при действии ЛПС в условиях предварительного введения в их организм веществ, угнетающих активность L-аргинин-NO-системы.

В экспериментах на крысах установлено, что действие ЛПС в условиях предварительного введения в организм лабораторных животных L-NAME сопровождалось ослаблением лихорадочной реакции.

Обнаружено, что предварительное введение в организм животных ингибитора синтеза NO не только ослабляет лихорадочную реакцию на действие эндотоксина, но и способствует значительному повышению уровня мочевины в крови в этих условиях.

Установлено, что внутрибрюшинное введение крысам L-валина в дозе 100 мг/кг через день в течение недели достоверно не сказывается на ректальной температуре и приводит к

снижению активности аргиназы печени на 83,5% ( $p < 0,05$ ,  $n=8$ ), а также уровня мочевины в крови на 61,4% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ). У животных ( $n=7$ ) контрольной группы, получавших ежедневно внутривнутрибрюшинно физраствор в течение недели, активность аргиназы печени и концентрация мочевины в крови составляла соответственно  $5,7 \pm 0,51$  мкмоль мочевины/г. сырой ткани и  $3,6 \pm 0,21$  ммоль/л.

Выявлено, что лихорадочная реакция на внутривнутрибрюшинное введение ЛПС у крыс полностью устраняется введением аминокислоты L-валина в дозе 100 мг/кг.

Так, температура тела у крыс ( $n=7$ ) в контроле (через 7 дней после ежедневного внутривнутрибрюшинного введения 1,0 мл физраствора) под влиянием внутривнутрибрюшинного введения 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. В условиях действия в организме L-валина, лихорадочная реакция у крыс на ЛПС не развивалась, даже если экзопироген вводили в дозе 50 мкг/кг.

В опытах на крысах ( $n=7$ ) установлено, что через 120 и 180 мин после инъекции ЛПС в условиях действия в организме животных L-валина содержание  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови повышается по сравнению с контролем (действие только одного эндотоксина) на 71,1% и 102,5% ( $p < 0,01$ ,  $n=7$ ) соответственно.

В опытах на кроликах ( $n=7$ ) показано, что введение в кровоток L-валина (100мг/кг) на высоте подъема температуры тела при эндотоксиновой лихорадке (через 60 мин от момента инъекции ЛПС) приводит к понижению температуры тела и ослаблению лихорадки. Так, через 15 и 30 мин после введения L-валина ректальная температура на высоте лихорадки снижалась по сравнению с контролем на  $0,5 \pm 0,08$  ( $p < 0,05$ ) и  $0,7 \pm 0,10$  °C ( $p < 0,05$ ). Через 60 мин после инъекции L-валина антипиретический эффект препарата уже отсутствовал.

Следовательно, формирование терморегуляторных реакций при действии ЛПС у крыс и кроликов зависит от содержания аминокислоты L-валина в плазме крови и активности аргиназы печени, состояния L-аргинин-NO-системы и уровня мочевины в крови. Есть основания полагать, что при эндотоксиновой лихорадке на ранних этапах ее развития, когда имеет место выраженное снижение содержания эндогенного ингибитора аргиназы печени аминокислоты L-валина в крови и повышение активности L-аргиназы печени, происходит усиленное использование L-аргинина – субстрата L-аргиназы печени, в цикле мочевины. Это вносит существенный вклад в пул эндогенного аргинина [5], имеющегося в гепатоцитах и в крови, приводя к значительному снижению его уровня, а соответственно, к снижению активности L-аргинин-NO-системы, возникновению вазоконстрикции и снижению теплоотдачи. Очевидно, аргиназу печени, L-валин, мочевину плазмы

крови и NO можно рассматривать как важнейшие взаимосвязанные факторы, участвующие в регуляции теплообмена при бактериальной эндотоксинемии, сопровождающейся лихорадкой.

По-видимому, снижение активности L-аргиназы печени в условиях повышения уровня аминокислоты L-валина в крови, и как следствие, утечка L-аргинина в цикл NO при бактериальной эндотоксинемии имеют важное значение в механизмах теплообмена и эндогенного антипиреза.

**Заключение.** Аргиназа печени участвует в процессах формирования тиреоидного статуса, регуляции активности L-аргинин-NO-системы и температуры тела при действии в организме бактериального эндотоксина. Действие в организме у крыс ингибитора аргиназы L-валина или *nor-NOHA*, сопровождается более выраженным повышением активности L-аргинин-NO-системы и препятствует развитию эндотоксиновой лихорадки.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Висмонт, Ф.И. Эндотоксинемия и дизрегуляторная патология / Ф.И. Висмонт, А.Ф. Висмонт // *Новости медико-биологических наук*, 2008. - №1-2. – С. 41-46.
2. Висмонт, А.Ф. Антипиретический эффект L-валина у крыс и кроликов в условиях эндотоксиновой лихорадки / А.Ф. Висмонт, Ф.И. Висмонт // *Доклады НАН Беларуси* 2011. – Т. 55, № 4. – С. 76-78.
3. Висмонт, А.Ф. Об участии аргиназы печени в процессах детоксикации и терморегуляции при эндотоксиновой лихорадке / А.Ф. Висмонт, Л.М. Лобанок // *Военная медицина*. – 2011. – № 1 (18). – С. 105-109.
4. Тэйлор, Б.С. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции / Б.С. Тэйлор, Л.Х. Аларсон, Т.Р. Биллиар // *Биохимия*. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 905-923.
5. Getz, G.S. Arginine/Arginase NO NO NO / G.S. Gets, C.A. Reardon // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biology*. – 2006. – Vol. 26, № 2. – P. 237-240.