

**Висмонт А.Ф., Висмонт Ф.И., Глебов А.Н.**

**ОБ УЧАСТИИ L-ВАЛИНА И МОЧЕВИНЫ КРОВИ В ИЗМЕНЕНИЯХ АКТИВНОСТИ  
L-АРГИНИН-NO СИСТЕМЫ И ФОРМИРОВАНИИ СОСУДИСТЫХ  
ТЕРМОРЕГУЛЯТОРНЫХ РЕАКЦИЙ ПРИ ПЕРЕГРЕВАНИИ**

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

**Введение.** Известно, что мочевины и аргиназы печени, которая является важным ферментом цикла мочевины, имеют важное значение в процессах образования монооксида азота (NO) и жизнедеятельности организма в норме и при патологии [4, 5]. Показана значимость аргиназы печени в процессах терморезистентности и акклимации животных к холоду [1, 2]. В то же время, данные о значимости аргиназы печени и мочевины крови в терморегуляции при перегревании отсутствуют, хотя их участие в патогенезе гипертермии вполне закономерно.

Цель работы – выяснить значимость L-валина и мочевины крови в изменениях активности L-аргинин-NO системы и формировании сосудистых терморегуляторных реакций при перегревании.

**Материалы и методы исследований.** Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных крысах и кроликах обоего пола. Перегревание животных проводили в суховоздушной термокамере (40-42°C). С целью выяснения значимости NO и аргиназы печени в регуляции температуры тела использовали L-аргинин моногидрохлорид (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) и ингибитор аргиназы L-валин (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) соответственно. Для изучения влияния мочевины и на показатели терморегуляции проводилось введение кроликам внутривенно, а крысам внутрибрюшинно раствора мочевины (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия). Содержание свободных аминокислот в плазме крови крыс определяли методом жидкостной хроматографии на аналитической колонке Zorbax Eclipse XDB-C<sub>8</sub>. Уровень мочевины определяли колориметрически, а активность L-аргиназы в печени – спектрофотометрически (J. W. Geyer, D. Dabich, 1971). Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитрат/нитритов (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) в плазме крови (H. Moshage и соавт., 1995). О процессах физической терморегуляции, сосудистых терморегуляторных реакциях судили по изменениям температуры кожи уха у кроликов и основания хвоста у крыс. Ректальную температуру и температуру кожи у животных измеряли электротермометром ТПЭМ-1. Все цифровые данные обработаны общепринятыми методами вариационной биологической статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**Результаты и их обсуждение.** Установлено, что пребывание крыс (n=10) и кроликов (n=8) в термокамере (40-42°C) приводит к повышению ректальной температуры на 1,5, 2,6 и

3,0°C ( $p < 0,001$ ) у крыс и на 0,8, 1,6 и 2,0°C ( $p < 0,001$ ) у кроликов через 15, 30 и 60 мин температурного воздействия соответственно.

Обнаружено, что перегревание крыс приводит к снижению активности аргиназы печени и повышению уровня мочевины в крови. Так, через 30 и 60 мин температурного воздействия, активность аргиназы печени у крыс ( $n=7$ ) в опыте по сравнению с контролем, снижалась на 38,1% ( $p < 0,05$ ) и 43,4% ( $p < 0,05$ ), и составляла соответственно  $4,3 \pm 0,28$  и  $4,0 \pm 0,35$  мкМоль мочевины/г. сырой ткани.ч. Уровень мочевины в плазме крови у животных в этих условиях повышался на 16,1% ( $p < 0,05$ ) и составлял  $4,5 \pm 0,39$  ( $n=8$ ) мМоль/л уже через 15 мин и оставался повышенным в течение всего периода исследования.

Выявлено, что перегревание животных в течение 60 мин приводит к увеличению концентрации ряда свободных аминокислот в плазме крови. В условиях гипертермии в плазме крови крыс ( $n=7$ ) возрастало содержание глутамата (на 24,9%,  $p < 0,01$ ), таурина (на 49,7%,  $p < 0,05$ ), тирозина (на 77,0%,  $p < 0,02$ ), валина (на 51,2%,  $p < 0,001$ ), изолейцина (на 66,8%,  $p < 0,001$ ), фенилаланина (на 47,7%,  $p < 0,01$ ), лейцина (на 45,2%,  $p < 0,05$ ), лизина (на 60,9%,  $p < 0,001$ ) и понижался уровень серина (на 10,7%,  $p < 0,02$ ), аргинина (на 27,9%,  $p < 0,02$ ) и аланина (на 29,7%,  $p < 0,001$ ).

Таким образом, при гипертермии имело место снижение концентрации в плазме крови аргинина, аминокислоты которая является субстратом как для аргиназы, так и NO-синтазы [5]. В то же время уровень валина – ингибитора аргиназы [3], при воздействии внешнего тепла повышался.

Выявлено, что при гипертермии изменяется концентрация в плазме крови  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  – конечных продуктов деградации NO. Содержание  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови у крыс, через 30 мин от начала перегревания, по сравнению с контролем (пребывание крыс в термокамере при 20-22°C в течение 30 мин) возрастало на 27,8% ( $n=7$ ,  $p < 0,05$ ), а к 60 мин воздействия возвращалось к исходному значению.

Установлено, что однократная внутрибрюшинная инъекция ингибитора аргиназы L-валина [3] в дозе 100 мг/кг достоверно не сказывалась на ректальной температуре тела и приводила к снижению активности аргиназы печени на 83,5% ( $p < 0,05$ ,  $n=8$ ), а также уровня мочевины в крови на 56,4% ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ). Обнаружено, что у крыс, которым в течение 7 дней ежедневно внутрибрюшинно, а затем, за 30 мин до перегревания, вводили физ. раствор, воздействие внешнего тепла (40-42°C) в течении 60 и 120 мин приводит к повышению ректальной температуры на 2,7°C ( $p < 0,001$ ) и 3,3°C ( $p < 0,001$ ), которая достигала  $40,5 \pm 0,10$ °C и  $41,1 \pm 0,12$ °C ( $n=8$ ), а у животных в условиях действия L-валина температура возрастала с  $38,1 \pm 0,06$ °C до  $40,1 \pm 0,09$ °C и  $40,4 \pm 0,14$ °C ( $n=12$ ) соответственно и повышение составляло 2,0°C и 2,3°C ( $p < 0,05$ ).

У крыс, предварительно (за 30 мин до начала перегревания) получавших L-валин (100 мг/кг) имело место при 60 мин перегревания понижение, по сравнению с животными в контроле, концентрации мочевины в плазме крови на 28,9% ( $p < 0,05$ ,  $n=8$ ) и повышение уровня  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  на 50,0% ( $p < 0,01$ ,  $n=7$ ). Концентрация мочевины и  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови у крыс ( $n=7$ ) контрольной группы составили  $3,8 \pm 0,23$  мМоль/л и  $5,7 \pm 0,41$  мкМоль/л соответственно.

Установлено, что выживаемость крыс, предварительно (за 30 мин до воздействия внешнего тепла) получивших L-валин (100 мг/кг) в условиях перегревания была значительно выше. Так, 50% животных опытной группы ( $n=20$ ), в условиях воздействия высокой внешней температуры (40-42°C), погибли через 255 мин, а 50% животных контрольной группы погибли через 225 мин, т.е. жили на 30 мин меньше.

Учитывая, что мочевина, через инактивацию протеолитических ферментов, пептидгидролаз, может играть важную роль в процессах образования и деградации целого ряда пептидных гормонов, цитокинов и простагландинов, участвующих в регуляции температуры тела, были основания предположить, что мочевина крови имеет значение в выявленных особенностях процессов терморегуляции при перегревании.

Как показали опыты, внутрибрюшинное введение крысам и введение в кровотоки кроликам раствора мочевины в дозе 0,1, 0,3 и 1,0 г/кг не влияет на температуру тела и только лишь в дозе 3,0 г/кг приводит к значительному снижению температуры тела через 15 и 30 мин после инъекции. В условиях гипотермии, вызванной внутрибрюшинным введением мочевины (через 60 мин после инъекции препарата), в плазме крови крыс имело место значительное снижение целого ряда свободных аминокислот и особенно аргинина (на 95,5%,  $p < 0,001$ ). Однако, в этих условиях уровень валина в плазме достоверно не изменялся, а содержание  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  резко возрастало (на 69,5%,  $p < 0,01$ ).

В опытах на крысах выявлено, что предварительное (за 30 мин до воздействия внешнего тепла) внутрибрюшинное введение раствора мочевины (300 мг/кг) приводит к снижению тепловой устойчивости и выживаемости животных в условиях перегревания. Так, если в контрольной группе животных ( $n=12$ ) в условиях перегревания (40-42°C), крысы начали погибать после 2,5 часа пребывания в термокамере и через 4 часа уже никто из животных не выжил. В опытной группе животных, получивших за 30 мин до перегревания внутрибрюшинно мочевину в дозе 300 мг/кг, крысы ( $n=12$ ) начинали погибать через 1,5 часа и к 3 часам погибли все животные, т.е. летальность составила 100%.

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.

Учитывая, что L-аргинин может использоваться в печени как для процессов мочевинообразования, так и биосинтеза NO [3], 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 известных и широко применяемых в экспериментальной практике ингибиторов NO-синтазы N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина (L-NNA) и метилового эфира N<sup>G</sup>-нитро-L-аргинина (L-NAME).

Опыты, выполненные на кроликах (n=7) показали, что предварительное (до температурного воздействия), введение в кровоток L-аргинина гидрохлорида ослабляет прирост температуры тела на действие внешнего тепла по сравнению с животными, подвергнутыми только перегреванию.

Установлено, что перегревание животных, в условиях действия в их организме веществ, ингибирующих активность NO-синтазы, приводит к более значительному подъёму температуры тела. Так, у крыс, предварительно (за 30 мин до перегревания) получавших внутрибрюшинно физ. раствор, воздействие внешнего тепла (40-42°C) в течение 60 мин приводило к повышению у животных ректальной температуры на 2,5°C (p<0,001), которая достигала 40,1±0,13°C (n=7), а в условиях действия L-NAME (25 мг/кг) или L-NNA (20 мг/кг) температура возрастала с 37,5±0,11°C до 41,1±0,10°C (n=8) и с 37,4±0,10°C до 40,8±0,11°C (n=7) и повышение составило уже 3,6°C (p<0,001) и 3,4°C (p<0,001) соответственно. 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 NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в плазме крови.

Следовательно, на основании результатов проведенных 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 гипертермии.

**Выводы.** Очевидно, уровень L-валина в крови, определяя активность аргиназы печени и L-аргинин-NO системы, имеет важное значение для формирования процессов теплообмена у крыс при перегревании. Развитие гипертермии сопровождается снижением активности аргиназы печени, повышением концентрации валина, аргинина, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> и мочевины в крови. Внутрибрюшинное введение мочевины в дозе 3,0 г/кг приводит к снижению температуры тела, активности аргиназы печени, содержания аргинина и повышению уровня NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/NO<sub>2</sub><sup>-</sup> в плазме крови. Предварительное введение в организм

мочевины (3,0 г/кг) снижало тепловую устойчивость и выживаемость животных при перегревании.

По-видимому, утечка L-аргинина в цикл мочевины и усиленное его использование в процессах мочевинообразования имеют важное значение в механизмах формирования сосудистых терморегуляторных реакций при перегревании, а уровень мочевины в крови, регулируя активность L-аргинин-NO системы и L-аргиназы печени, определяет их характер и выраженность.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Абдуллаев Р.А., Эмирбеков Э.З. Активность аргиназы мозга и печени при гипотермии // Укр. биохим. журн. 1991. Т. 63, № 2. С. 108-111.
2. Шугалей В.С., Козина Л.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклимации к холоду // Физиол. ж. СССР им. И.М. Сеченова. 1977. Т. 63, № 8. С. 1199-1202.
3. Carvajal N., Cederbaum S.D. Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginase by proline and branched chain amino acids // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 870, № 2. P. 181–184.
4. Durante W., Johnson F.K., Johnson R.A. Arginase: A critical regulator of nitric oxide synthesis and vascular function // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. 2007. Vol. 34, № 9. P. 906-911.
5. Scibior D., Czczot H. Arginine - metabolism and functions in the human organism // Postepy Hig. Med. Dosw. 2004. Vol 58. P. 321-332.