

Актуальные проблемы медицины. Сборник научных статей Республиканской научно-практической конференции и 22 итоговой научной сессии Гомельского государственного медицинского университета, Гомель, 14-15 ноября 2013 года. В 4-х томах, Гомель, 2014. – Т.1. – С.133-136.

УДК 612.57:576.8.097.29:612.111.19-092.4

ОБ УЧАСТИИ ВАЛИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ И L-АРГИНИН-НО СИСТЕМЫ В МЕХАНИЗМЕ АНТИПИРЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ МОЧЕВИНЫ У КРЫС И КРОЛИКОВ В УСЛОВИЯХ ЭНДОТОКСИНОВОЙ ЛИХОРАДКИ

А.Ф. Висмонт, А.Н. Глебов, Л.М. Лобанок, Ф.И. Висмонт

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, в частности, на терморегуляцию при лихорадке, имеются лишь единичные разрозненные данные [1, 2].

К настоящему времени накопилось достаточное количество фактов, свидетельствующих о значении мочевины в процессах жизнедеятельности в норме и патологии и, в частности, в процессах терморегуляции и адаптации к холоду [2, 3]. Ранее нами было показано, что введение в организм аминокислоты L-аргинина, как и L-валина оказывают выраженный антипиретический эффект [1, 2] и что повышение функциональной активности аргиназы печени имеет важное значение в патогенезе эндотоксिनновой лихорадки [2]. В то же время, значимость аминокислоты валина крови в механизмах эндогенного антипиреза при лихорадочных состояниях не изучалась, хотя его участие в этих процессах вполне закономерно, учитывая, что L-валин является ингибитором аргиназы печени [5], которая является важным ферментом цикла мочевины [3, 5], уровень которой будет сказываться на активности L-аргинин-НО-системы, системы, имеющей важное значение в механизмах терморегуляции и патогенезе лихорадки [4].

Цель исследования – выяснить механизмы антипиретического действия L-валина и мочевины крови в условиях эндотоксिनновой лихорадки.

Методы. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых 117 крысах и 9 кроликах самцах. Для создания общепринятой модели эндотоксिनновой лихорадки использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) – эндотоксин E. Coli (серотип 0111:B4

Sigma, США), который вводили однократно: крысам – внутривенно 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 N^ω-гидрокси-нор-L-аргинин (nor NOHA) фирмы BACHEM (Германия), а также L-валин (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) и блокатор NO-синтазы – метиловый эфир N^G-нитро-L-аргинин (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (Sigma, США). Nor NOHA (10 мг/кг) вводили крысам внутривенно ежедневно, а L-валин (100 мг/кг) внутривенно через день, в течение недели, а кроликам – однократно, внутривенно на высоте лихорадки. L-NAME (25 мг/кг) вводили однократно: кроликам внутривенно, крысам внутривенно. При изучении влияния мочевины и L-аргинина на показатели терморегуляции кроликам вводили внутривенно, а крысам внутривенно раствор мочевины (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия в дозе 0,3 и 3,0 г/кг) или L-аргинина гидрохлорида (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) в дозе 100 мг/кг. Концентрацию мочевины в плазме крови определяли фотометрически, а содержание в ней свободных аминокислот – методом обращено-фазной жидкостной хроматографии на аналитической колонке Zorbax Eclipse XDB-C₈. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню в плазме нитратов/нитритов (NO₃⁻/NO₂⁻). У крыс и кроликов ректальную температуру (в прямой кишке на глубине 3,0 и 5,0 см соответственно) измеряли с помощью электротермометра ТПЭМ-1. 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 обсуждение. Установлено, что внутривенное введение крысам (n=12) ЛПС в дозе 5 мкг/кг приводит к медленному повышению температуры тела и слабо выраженной гипертермии. Температура тела повышалась 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 составляла 38,9±0,11, 38,8±0,12, 39,4±0,10, 38,8±0,13 и 38,3±0,12°C соответственно. После введения ЛПС в дозе 50 мкг/кг имело место более выраженное и длительное повышение температуры тела. Введение в кровяной ток ЛПС (0,5 мкг/кг) кроликам (n=9) приводило к быстрому и значительному повышению ректальной температуры. Температура тела у животных через 30, 60, 120 и 180 мин после введения ЛПС возрастала на 0,6°C, 1,3°C, 1,6°C и 1,2°C (p<0,001) и составляла соответственно 39,2±0,12°C; 39,9±0,10°C; 40,2±0,11°C и 39,8±0,12°C.

Действие ЛПС (5 мкг/кг) у крыс (n=8) через 120, 240 и 330 мин после введения

экзопирогена приводило к повышению активности аргиназы в печени на 53,1%, 31,3% и 23,3% ($p < 0,05$) и уровня мочевины в плазме крови на 26,0% ($n=8$), 44,7% ($n=7$) и 39,8% ($n=7$) ($p < 0,05$) у опытных животных соответственно, по сравнению с контролем. Активность аргиназы в печени у крыс контрольной группы через 120, 240 и 330 мин после внутрибрюшинного введения физ. раствора составляла $5,63 \pm 0,27$ ($n=8$), $5,26 \pm 0,31$ ($n=7$) и $5,38 \pm 0,29$ ($n=7$) мкМоль мочевины/г сырой ткани·час. Концентрация мочевины в плазме крови у опытных животных по сравнению с контролем (введение физ.раствора) составляла соответственно $4,4 \pm 0,50$; $5,4 \pm 0,47$ и $5,2 \pm 0,43$ мМоль/л. В условиях лихорадки, через 120 мин после инъекции ЛПС (50 мкг/кг), в плазме крови у крыс ($n=7$) снижалось содержание валина на 21,1% ($p < 0,05$) и аргинина на 32,4% ($p < 0,002$).

В опытах на крысах ($n=8$) установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение *por*-НОНА (10 мг/кг) в течение недели, как и L-валина (100 мг/кг) через день в течение недели достоверно не сказывается на ректальной температуре и приводит к снижению активности аргиназы печени на 71,2% ($p < 0,05$) и 83,5% ($p < 0,05$), по сравнению с животными ($n=7$) в контроле (внутрибрюшинное введение физ. раствора). Выявлено, что лихорадочная реакция у крыс ослабляется предварительным ежедневным внутрибрюшинным введением в течение 7 дней раствора *por*-НОНА (10 мг/кг) и полностью устраняется предварительным внутрибрюшинным введением L-валина (100 мг/кг). Так, температура тела у крыс в контроле (через 7 дней после ежедневного внутрибрюшинного введения 1,0 мл физ. раствора) под влиянием внутрибрюшинного введения ЛПС (5 мкг/кг) через 120 и 180 мин от начала инъекции эндотоксина, повышалась на $1,2 \pm 0,14^\circ\text{C}$ ($n=10$) и $1,1 \pm 0,11^\circ\text{C}$ ($n=10$) соответственно, а в условиях действия *por*-НОНА через 2 и 3 ч после введения ЛПС – на $0,4 \pm 0,06$ и $0,3 \pm 0,02^\circ\text{C}$ ($n=8$). В условиях действия в организме L-валина, лихорадочная реакция у крыс на ЛПС не развивалась, даже если экзопироген вводили в дозе 50 мкг/кг.

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 инъекции L-валина ректальная температура на высоте лихорадки снижалась по сравнению с контролем на $0,5 \pm 0,08^\circ\text{C}$ ($p < 0,01$) и $0,7 \pm 0,10^\circ\text{C}$ ($p < 0,01$). Через 60 мин после инъекции L-валина антипиретический эффект препарата уже отсутствовал.

Введение в кровоток мочевины (0,3г/кг) кроликам на высоте подъема температуры тела (через 60 и 90 мин от момента инъекции ЛПС) не только предотвращало дальнейшее повышение температуры тела, но даже приводило к значительному её понижению и

ослаблению лихорадки. Так, через 60 мин после введения в краевую вену уха ЛПС (0,5мкг/кг) ректальная температура повышалась на $1,1 \pm 0,11^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$), а через 90 мин это повышение составляло $1,5 \pm 0,09^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$, $n=8$). Введение мочевины (0,3г/кг) на высоте эндотоксиновой лихорадки (спустя 60 мин после инъекции ЛПС) оказывало отчетливый антипиретический эффект. 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 $0,8 \pm 0,10^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$). Эффект мочевины, по-видимому, был обусловлен усилением процессов теплоотдачи, косвенным признаком чего было повышение у кроликов, через 30 мин после инъекции мочевины, температуры кожи ушной раковины на $3,3 \pm 0,31^\circ\text{C}$ ($p < 0,01$, $n=7$).

Следовательно, уровень мочевины в крови влияет на высоту подъема температуры тела у животных в условиях бактериальной эндотоксинемии, а повышение уровня мочевины в крови, по-видимому, является одним из факторов эндогенного антипиреза.

Учитывая, что в цикле мочевины гидролитическое расщепление аминокислоты L-аргинина является последним этапом ее образования, нами в экспериментах на крысах и кроликах было изучено влияние введения в кровоток L-аргинина на температуру тела животных при перегревании, а также действию в организме бактериального эндотоксина.

Внутривенное введение кроликам ($n=7$) L-аргинина в условиях действия ЛПС оказывает выраженный антипиретический эффект и приводит к повышению содержания в плазме крови $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ – конечных продуктов деградации NO. Снижение ректальной температуры на высоте лихорадки (через 15 и 30 мин после введения аминокислоты) составили $0,7^\circ\text{C}$ и $0,8^\circ\text{C}$ ($p < 0,05$). Уровень $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови через 30 мин после инъекции повышался на 27,1% ($p < 0,05$) и составлял $10,3 \pm 1,20$ мкмоль/л.

Установлено, что лихорадочная реакция, вызываемая введением ЛПС, ослабляется предварительным введением в организм животных L-NAME (25 мг/кг), ингибитора NO-синтазы, существенно не влияющего в указанной дозе на температуру тела в норме. В экспериментах на крысах установлено, что действие ЛПС (5 мкг/кг) в условиях предварительного введения в организм животных L-NAME (25 мг/кг) сопровождалось ослаблением лихорадочной реакции. Так, ректальная температура у крыс ($n=12$), получивших 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 ($n=12$), которые получили ЛПС в условиях действия L-NAME наблюдалось повышение температуры в указанные промежутки времени после введения эндотоксина всего лишь на $0,8^\circ\text{C}$ и $0,6^\circ\text{C}$. У крыс ($n=12$) предварительно получавших L-

NAME отмечалось также снижение по сравнению с животными контрольной группы концентрации $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ на 31,1% ($p < 0,05$) в плазме крови.

Таким образом, есть основание полагать, что при эндотоксиновой лихорадке, на ранних этапах ее развития, сопровождающихся повышением активности аргиназы печени, вероятно в результате снижения уровня в крови L-валина – эндогенного ингибитора ее активности [5], имеет место усиленное использование аминокислоты L-аргинина – субстрата аргиназы печени, в цикле мочевины, что вносит существенный вклад в пул эндогенного аргинина, имеющегося в гепатоцитах и в крови, а именно приводит к значительному снижению его уровня, а соответственно активности L-аргинин-NO-системы и к возникновению вазоконстрикции, снижению теплоотдачи.

Выводы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что снижение содержания валина в крови является важным патогенетическим фактором эндотоксиновой лихорадки, а повышение его уровня в крови является одним из факторов эндогенного антипиреза. По-видимому, особенности изменения температуры тела и характера формирования температурных реакций организма у крыс и кроликов на действие бактериального эндотоксина в условиях депрессии аргиназы печени L-валином связаны с повышением активности L-аргинин-NO-системы. Очевидно, что вмешательство в процессы терморегуляции с помощью аминокислоты L-валина или фармакологических веществ, способных направленно изменять содержание аминокислот в плазме крови, может быть использовано в качестве эффективного средства коррекции процессов теплообмена, эндогенного антипиреза при лихорадочных состояниях и повышения устойчивости организма к действию пирогенных факторов.

Литература

1. Висмонт, Ф.И. Нейрохимические механизмы антипиретического действия L-аргинина // Ф.И. Висмонт, Н.Н. Степаненко / Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 1997. – № 2. – С. 102-106.
2. Висмонт, А.Ф. Об участии мочевины и аргиназы печени в процессах терморегуляции при эндотоксиновой лихорадке // А.Ф. Висмонт, Л.М. Лобанок / Весці НАН Беларусі. – 2010. – № 4. – С. 20-24.
3. Шугалей, В.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду // В.С. Шугалей, Л.С. Козина / Физиол. Журн. СССР им. И.М. Сеченова. – 1977. – Т.63, № 8. – С. 1199-1202.
4. Gerstberger, R. Nitric Oxide and Body Temperature Control // R. Gerstberger / News Physiol. Sci. – 1999. – Vol. 14, N 2. – P. 30-36.

5. Lerzynski, G. In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle // G. Lerzynski, C.V. Suschek, V. Kolb-Bachoten / Nitric Oxide. – 2006. – Vol. 14, N 4. – P. 300-308.