

В.В. Лобанова, Ф.И. Висмонт

ОБ УЧАСТИИ МОНООКСИДА АЗОТА В МЕХАНИЗМЕ АНТИПИРЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ВАЛИНА В УСЛОВИЯХ ЭНДОТОКСИНОВОЙ ЛИХОРАДКИ

Белорусский государственный медицинский университет,
кафедра патологической физиологии

Введение. В последнее время в нашей стране и за рубежом наблюдается повышение интереса к физиологии, биохимии, фармакологии и вопросам клинического применения аминокислот и их производных.

Ранее нами было показано, что как центральное так и системное введение в организм аминокислоты L-аргинина, как и L-валина оказывает выраженный антипиретический эффект [1, 3] и что повышение функциональной активности аргиназы печени имеет важное значение в патогенезе эндотоксиновой лихорадки [2]. Учитывая, что содержание валина в крови, который является ингибитором аргиназы печени [4], будет сказываться на активности L-аргинин-NO-системы, системы определяющей уровень NO [8] и имеющей важное значение в механизмах терморегуляции и патогенезе лихорадки [5], были основания полагать, что NO может иметь значение в механизме антипиретического действия L-валина в условиях эндотоксиновой лихорадки.

Цель исследования: выяснить значимость NO в механизмах реализации антипиретического действия L-валина в условиях эндотоксиновой лихорадки.

Материалы и методы исследования. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах самцах массой 160-220г и кроликах обоих полов массой 2,5-3,0кг. Для создания общепринятой модели эндотоксиновой лихорадки использовали бактериальный липополисахарид (ЛПС) эндотоксин E. Coli (серотип 0111:B4 Sigma, США), который вводили однократно: крысам – внутривентриально в дозе 5 и 50 мкг/кг, кроликам – в краевую вену уха в дозе 0,5 мкг/кг.

С целью выяснения значимости аргиназы печени и L-аргинин-NO системы в регуляции температуры тела использовали L-аргинин моногидрохлорид (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) – субстрат как для NO-синтазы, так и для аргиназы [8], ингибиторы аргиназы N^ω-гидрокси-нор-L-аргинин (nor NOHA) фирмы BACHEM (Германия) и L-валин фирмы Carl Roth GmbH+Co.KG (Германия), а также неселективный блокатор NO-синтазы – метиловый эфир N^G-нитро L-аргинина (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (США). Nor-NOHA в дозе 10 мг/кг вводили животным внутривентриально ежедневно в

течение недели, а L-валин (100 мг/кг) однократно за 30 мин до начала опыта. Раствор L-аргинина моногидрохлорида (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) в дозе 100 мг/кг вводили крысам внутривенно, кроликам внутривенно.

Взятие для исследований крови у животных проводилось сразу после декапитации. Содержание свободных аминокислот в плазме крови крыс определяли методом жидкостной хроматографии на аналитической колонке Zorbax Eclipse XDB-C₈. Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически [6]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитрат/нитритов ($\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$) в плазме крови [7]. 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.

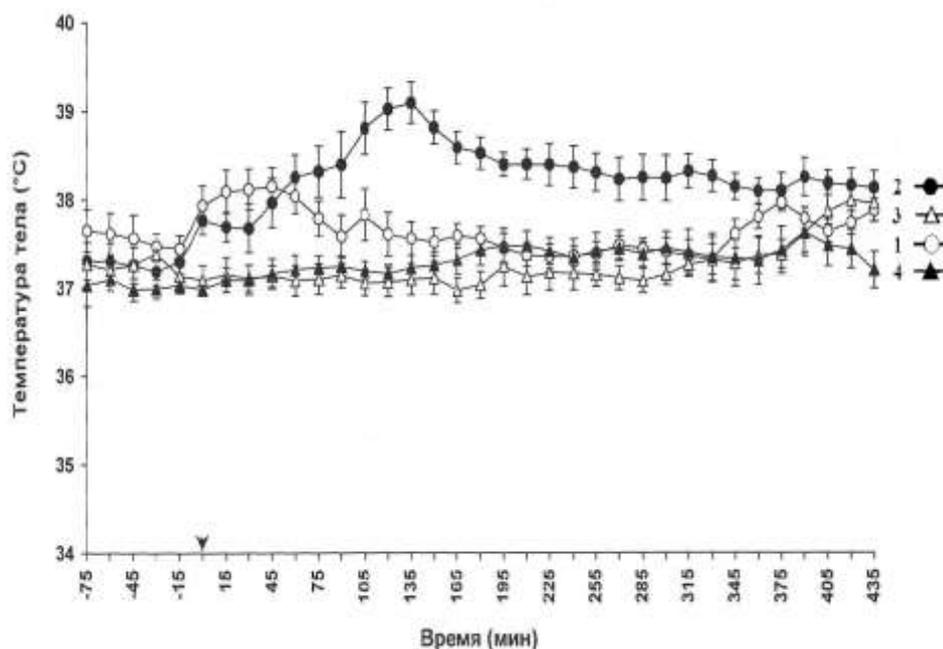
Результаты и их обсуждение. Установлено, что внутрибрюшинное введение крысам (n=12) ЛПС (5,0 мкг/кг) приводит к медленному повышению температуры тела и слабо выраженной гипертермии. Температура тела повышалась на 1,3°C, 1,2°C, 1,8°C, 1,2°C и 0,7°C ($p < 0,001$) через 120, 180, 240, 300 и 330 мин. после инъекции эндотоксина и составляла $38,9 \pm 0,11$; $38,8 \pm 0,12$; $39,4 \pm 0,10$; $38,8 \pm 0,13$ и $38,3 \pm 0,12$ °C соответственно. Введение в кровотоки ЛПС (0,5 мкг/кг) кроликам (n=9) приводило к быстрому и значительному повышению ректальной температуры. Температура тела у животных через 30, 60 и 120 мин после введения ЛПС возрастала на 0,6°C, 1,3°C и 1,6°C ($p < 0,001$) и составляла, соответственно, $39,2 \pm 0,12$; $39,9 \pm 0,10$ и $40,2 \pm 0,11$ °C.

Действие ЛПС у крыс через 120 и 240 мин после введения экзопирогена приводило к повышению активности аргиназы печени на 53,1% ($p < 0,05$, n=8) и 31,3% ($p < 0,05$, n=7), соответственно, по сравнению с контролем. Активность аргиназы печени у крыс контрольной группы через 120 и 240 мин после внутрибрюшинного введения физраствора составляла $5,63 \pm 0,27$ (n=8) и $5,26 \pm 0,31$ (n=7) мкмоль мочевины/г сырой ткани·час. В условиях эндотоксиновой лихорадки, через 120 мин. после инъекции ЛПС, в плазме крови у крыс (n=7) снижалось содержание аргинина (на 32,4%, $p < 0,02$) и валина (на 21%, $p < 0,001$). Концентрация аргинина и валина в плазме крови крыс в этих условиях составляла соответственно $163,5 \pm 12,96$ и $133,6 \pm 8,12$ мкмоль/л.

В опытах на крысах установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение *por*-НОНА в дозе 10 мг/кг в течение недели, как и однократная внутрибрюшинная инъекция L-валина в дозе 100 мг/кг достоверно не сказывались на ректальной температуре и приводили к

снижению активности аргиназы печени, соответственно, на 71,2% ($p < 0,05$, $n=8$) и 83,5% ($p < 0,05$, $n=8$).

Лихорадочная реакция на ЛПС у крыс ослаблялась предварительным ежедневным внутривентральным введением в течение 7 дней раствора *пог*-НОНА (10 мг/кг), и полностью устранялась предварительной (за 30 мин до начала опыта) внутривентральной инъекцией L-валина (100 мг/кг). Так, температура тела у крыс в контроле (через 7 дней после ежедневного внутривентрального введения 1,0 мл физраствора) под влиянием ЛПС (5,0 мкг/кг) через 120 и 180 мин от начала инъекции эндотоксина, повышалась на $1,2 \pm 0,14^\circ\text{C}$ ($p < 0,001$, $n=10$) и $1,1 \pm 0,11^\circ\text{C}$ ($p < 0,01$, $n=10$) соответственно, а в условиях действия *пог*-НОНА через 2 и 3 часа после введения ЛПС – на $0,4 \pm 0,06$ ($n=8$) и $0,3 \pm 0,02^\circ\text{C}$ ($n=8$). В условиях действия в организме L-валина, лихорадочная реакция у крыс не развивалась, даже если экзопироген вводили в дозе 50 мкг/кг (рис.1).



Стрелка - момент введения ЛПС (50,0 мкг/кг), n - количество животных в группе

Рисунок 1 - Изменения ректальной температуры у крыс после внутривентрального введения:
1- физраствора (n=8); 2 - ЛПС (50,0 мкг/кг, n=8); 3 - L-валина (100,0 мг/кг, n=6); 4 - ЛПС (50,0 мкг/кг) в
условиях действия L-валина (100,0 мг/кг, n=7)

Введение L-аргинина моногидрохлорида (100 мг/кг) кроликам ($n=7$) в условиях действия ЛПС оказывало выраженный антипиретический эффект и приводило к повышению

содержания $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в крови. Снижение ректальной температуры на высоте лихорадки через 15 и 30 мин. после введения аминокислоты составляло $0,7^\circ\text{C}$ ($p<0,05$) и $0,8^\circ\text{C}$ ($p<0,05$). Уровень $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в плазме крови, через 30 мин. после инъекции L-аргинина гидрохлорида повышался на 27,1% ($p<0,05$, $n=7$) и составлял $10,3\pm 1,20$ мкмоль/л соответственно.

Выявлено, что в условиях предварительного (за 30 мин до инъекции эндотоксина) введения в организм L-NAME (25 мг/кг), действие ЛПС у крыс ($n=7$), через 120 мин. после инъекции, сопровождается менее значимым повышением температуры тела, а также снижением в плазме крови уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ на 48,7% ($p<0,05$).

Заключение. Результаты проведенных исследований дают основания заключить, что активность образования монооксида азота в организме имеет важное значение для температурного гомеостаза, а L-аргинин-NO система, определяя уровень NO в крови, играет важную роль в механизме антипиретического действия L-валина в условиях эндотоксиновой лихорадки.

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. Висмонт, А.Ф. Антипиретическое действие L-валина в условиях эндотоксиновой лихорадки в эксперименте / А.Ф. Висмонт, Ф.И. Висмонт // Вес. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. мед. навук. 2011. № 3. С. 62–68.
4. Carvajal, N. Kinetics of inhibition of rat liver and kidney arginases by proline and branched-chain amino acids / N. Carvajal, S.D. Cederbaum // Biochim. Biophys. Acta. 1986. Vol. 870, N 2. P. 181-184.
5. Gerstberger, R. Nitric oxide and body temperature control / R.Gerstberger // News Physiol. Sci. 1999. Vol. 14, N 2. P. 30-36.
6. Geyer, J.W. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates / J. W. Geyer, D. Dabich // Anal. Biochem. – 1971. – Vol. 39, № 2. – P. 412-417.
7. Moshage, H. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et al.] // Clin. Chem. – 1995. – Vol. 41, № 6. – P. 892-896.
8. Scibior, D. Arginine - metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czeżot // Postepy Hig. Med. Dosw. – 2004. – Vol 58. – P. 321-332.

В.В. Лобанова, Ф.И. Висмонт

**ОБ УЧАСТИИ МОНООКСИДА АЗОТА В МЕХАНИЗМЕ АНТИПИРЕТИЧЕСКОГО
ДЕЙСТВИЯ L-ВАЛИНА В УСЛОВИЯХ ЭНДОТОКСИНОВОЙ ЛИХОРАДКИ**

В опытах на крысах и кроликах установлено, что L-аргинин-NO система, активность которой определяя уровень NO в крови, играет важную роль в механизмах антипиретического действия L-валина в условиях эндотоксиновой лихорадки. Выявлено, что депрессия аргиназы печени, вызываемая введением в организм L-валина, приводит к повышению активности L-аргинин-NO системы, уровня $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ в крови и препятствует развитию эндотоксиновой лихорадки. Очевидно, уровень валина в плазме крови и активность синтеза монооксида азота имеют значимость для процессов терморегуляции при эндотоксиновой лихорадке.

Ключевые слова: L-аргинин-NO система, аргиназа печени, L-валин, температура тела, эндотоксиновая лихорадка.

V.V. Lobanova, F.I. Vismont

**ABOUT NITRIC OXIDE PARTISIPATION IN THE MECHANISMS OF L-VALINE
ANTIPYRETIC ACTION DURING ENDOTOXINE FEVER**

It has been established in the experiments on rats and rabbits that L-arginine-NO system activity, determining the level of NO in blood, has an important role in the mechanisms of L-valine antipyretic action during endotoxine fever. I was revealed that depression of liver arginase by L-valine injection induced L-arginine-NO system activity, increase $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ blood level and prevents an increase of body temperature. Obviously, valine level in blood plasma and nitric oxide syntese activity has a great value for thermoregulation processes during endotoxine fever.

Key words: nitric oxide, L-arginine-NO system, liver arginase, L-valine, body temperature, endotoxine fever.