

К МЕХАНИЗМУ АНТИПИРЕТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ L-ВАЛИНА
У КРЫС И КРОЛИКОВ В УСЛОВИЯХ ЭНДОТОКСИНОВОЙ ЛИХОРАДКИ

Глебов М.А., Висмонт А.Ф.

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

кафедра патологической физиологии

Актуальность. 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, 3).

Ранее нами было показано, что как центральное так и системное введение в организм аминокислоты L-аргинина, как и L-валина оказывают выраженный антипиретический эффект (2,4,5) и что повышение функциональной активности аргиназы печени имеет важное значение в патогенезе эндотоксिनновой лихорадки (4, 5). В то же время, значимость аминокислоты L-валина крови в процессах теплообмена 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 (8, 11), активность которой будет сказываться на активности L-аргинин-НО-системы, системы имеющей важное значение в регуляции физиологических и патологических процессов (7, 9), в механизмах терморегуляции и патогенезе лихорадки (3, 9).

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

Материалы и методы исследования. Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых 117 крысах и 9 кроликах самцах. Для создания общепринятой модели эндотоксिनновой лихорадки использовали 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. Для выяснения значимости аргиназы печени и монооксида азота (NO) в регуляции температуры тела использовали ингибитор аргиназы N ω -гидроксинор-L-аргинин (nor NOHA) фирмы BACHEM (Германия), а также L-валин (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) и блокатор NO-синтазы – метиловый эфир NG-нитро-L-аргинин (L-NAME) фирмы ACROS ORGANICS (Sigma, США). Nor NOHA в дозе 10 мг/кг вводили крысам внутрибрюшинно ежедневно, а L-валин в дозе 100 мг/кг внутрибрюшинно через день, в течение недели, а кроликам – однократно, внутривенно на высоте эндотоксической лихорадки.

L-NAME в дозе 25 мг/кг вводили однократно: кроликам внутривенно, крысам внутрибрюшинно. При изучении влияния L-аргинина на показатели терморегуляции кроликам вводили внутривенно, а крысам внутрибрюшинно раствор L-аргинина гидрохлорида (Carl Roth GmbH+Co.KG, Германия) в дозе 100 мг/кг. Содержание свободных аминокислот в плазме крови крыс определяли методом обращено-фазной жидкостной хроматографии на аналитической колонке Zorbax Eclipse XDB-C8 (6). Активность аргиназы печени определяли спектрофотометрически (10). Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитратов/нитритов (NO $_3^-$ /NO $_2^-$) (12). 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 исследования и их обсуждение. В опытах установлено, что внутрибрюшинное введение крысам (n=12) бактериального эндотоксина (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 (рис.).

Введение в кровоток 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 печени на 53,1%, 31,3% и 23,3% (p<0,05) соответственно, по сравнению с контролем. Активность аргиназы печени у крыс контрольной группы через 120, 240 и 330 мин после внутрибрюшинного введения физ. раствора составляла 5,63±0,27 (n=8), 5,26±0,31 (n=7) и 5,38±0,29 (n=7) мкМоль мочевины/г сырой ткани·час.

В условиях эндотоксической лихорадки, через 120 мин после инъекции ЛПС (50 мкг/кг), в плазме крови у крыс (n=7) снижалось содержание аминокислоты L-валина на 21,1% (p<0,05) и L-аргинина на 32,4% (p<0,002).

В опытах на крысах (n=8) установлено, что ежедневное внутрибрюшинное введение *pot*-НОНА в дозе 10 мг/кг в течение недели, как и 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 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 на внутрибрюшинное введение ЛПС у крыс ослабляется предварительным ежедневным внутрибрюшинным введением в течение 7 дней раствора *pot*-НОНА (10 мг/кг) и полностью устраняется предварительным внутрибрюшинным введением аминокислоты L-валина в дозе 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±0,14 °С (n=10) и 1,1±0,11 °С (n=10) соответственно, а в условиях действия *pot*-НОНА через 2 и 3 часа после введения ЛПС – на 0,4±0,06 и 0,3±0,02°С (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 (рис.).

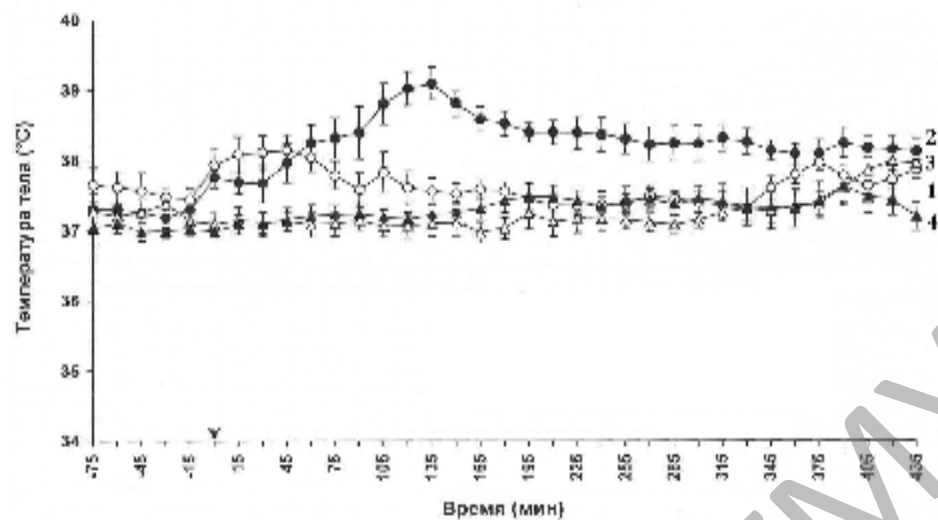


Рисунок – Изменение ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения: 1 – физиологического раствора (n=8); 2 – ЛПС (50 мкг/кг, n=12); 3 – L-валина (100 мг/кг, n=6); 4 – ЛПС (50 мкг/кг) в условиях действия L-валина (100 мг/кг, n=7).

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

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 $0,5 \pm 0,08^\circ\text{C}$ ($p < 0,01$) и $0,7 \pm 0,10^\circ\text{C}$ ($p < 0,01$). Через 60 мин после инъекции L-валина антипиретический эффект препарата уже отсутствовал.

Опыты выполненные на кроликах (n=7) показали, что внутривенное введение L-аргинина в условиях действия ЛПС оказывает выраженный антипиретический эффект и приводит к повышению содержания в плазме крови NO₃-/NO₂- – 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 NO₃-/NO₂- 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 лабораторных 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 ингибитора NO-синтазы L-NAME (25 мг/кг) сопровождалось ослаблением лихорадочной реакции. Так, ректальная температура у крыс (n=12), получивших только ЛПС повышалась на 1,2°C и 1,1°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°C и 0,6°C. У крыс (n=12) предварительно получавших L-NAME отмечалось также снижение по сравнению с животными контрольной группы концентрации NO₃-/NO₂- в плазме крови на 31,1% (p<0,05).

Таким образом, действие бактериального эндотоксина в организме животных приводит к повышению температуры тела, активности аргиназы печени и к снижению уровня аминокислоты L-валина и L-аргинина в плазме крови. 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 (8, 11), имеет место усиленное использование аминокислоты L-аргинина – субстрата аргиназы печени, в цикле мочевины, что вносит существенный вклад в пул эндогенного аргинина (13), 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. По-видимому, депрессия аргиназы печени L-валином, сопровождающаяся повышением уровня L-аргинина и активности L-аргинин-NO-системы, нарушает развитие характерной терморегуляторной реакции организма на бактериальный эндотоксин и препятствует развитию лихорадочной реакции.

Выводы. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что формирование терморегуляторных реакций на действие бактериального эндотоксина у крыс и кроликов зависит от содержания в плазме крови аминокислоты L-валина, активности аргиназы печени и L-аргинин-NO-системы. По-видимому, снижение содержания L-валина в крови является важным патогенетическим фактором эндотоксиновой лихорадки, а повышение его уровня в крови является одним из факторов эндогенного антипиреза. Особенности изменения температуры тела и характера формирования терморегуляторных 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.

Список литературы

1. Висмонт Ф.И., Степаненко Н.Н. Нейрохимические механизмы антипиретического действия L-аргинина // Весці НАН Беларусі. Сер. хім. навук. – 1997. – № 2. – С. 102-106.
2. Висмонт А.Ф. Об участии L-аргинина в центральных механизмах эндогенного антипиреза при бактериальной эндотоксинемии // Актуальные проблемы современной медицины 2006: мат. Междунар. науч. конф. студ. и молодых ученых, посвящ. 85-летию БГМУ: в 2 ч. / под ред. С.Л. Кабака, А.С. Леонтьюка. Минск: БГМУ. – Ч. 1. – 2006. – С. 73-75.
3. Висмонт Ф.И., Висмонт А.Ф. Эндотоксинемия и дизрегуляторная патология // Новости мед.-биол. наук. – 2008. – № 1/2. – С. 41-46.
4. Висмонт А.Ф., Лобанок Л.М. Об участии мочевины и аргиназы печени в процессах терморегуляции при эндотоксиновой лихорадке // Весці НАН Беларусі. – 2010. – № 4. – С. 20-24.
5. Висмонт А.Ф., Лобанок Л.М. Роль аргиназы печени в процессах детоксикации и ее участия в механизмах регуляции температуры тела при бактериальной эндотоксинемии // Доклады НАН Беларусі. – 2011. – Т. 55, № 2. – С. 83-87.
6. Дорошенко Е.М. Методические аспекты и трудности анализа свободных (физиологических) аминокислот и родственных соединений в биологических жидкостях и тканях // Сб. тез. Республ. научн. конф. по аналитической химии с междун. участием «Аналитика РБ – 2010». Минск, 14-15 мая 2010. – Минск, 2010. – С.126.
7. Тейлор Б.С., Аларсон Л.Х., Биллиар Т.Р. Индуцибельная синтаза оксида азота в печени: регуляция и функции // Биохимия. – 1998. – Т. 63, № 7. – С. 905-923.
8. 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, N 2. – P.181-184.
9. Gerstberger R. Nitric Oxide and Body Temperature Control // News Physiol. Sci. – 1999. – Vol. 14, N 2. – P. 30-36.

10. Geyer J.W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates // *Anal. Biochem.* – 1971. – Vol. 39, N 2. – P. 412-417.
11. Lerzynski G., Suschek C.V., Kolb-Bachoten V. In hepatocytes the regulation of NOS-2 activity at physiological L-arginine levels suggests a close link to the urea cycle // *Nitric Oxide.* – 2006. – Vol. 14, N 4. – P. 300-308.
12. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et al.] // *Clin. Chem.* – 1995. – Vol. 41, № 6. – P. 892-896.
13. Scibior D., Czeczot H. Arginine – metabolism and functions in the human organism // *Postepy Hig. Med. Dosw.* – 2004. – Vol. 58. – P. 321-332.