

# ОБ УЧАСТИИ ВАЛИНА ПЛАЗМЫ КРОВИ В ПРОЦЕССАХ ДЕТОКСИКАЦИИ, ФОРМИРОВАНИЯ ТИРЕОИДНОГО СТАТУСА И РЕГУЛЯЦИИ ТЕМПЕРАТУРЫ ТЕЛА ПРИ ЭНДОТОКСИНОВОЙ ЛИХОРАДКЕ

*Лобанова В.В., Висмонт А.Ф., Висмонт Ф.И.*

*Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь*

**Реферат.** Общеизвестна значимость свободных аминокислот в процессах жизнедеятельности в норме и при патологии. В то же время данные о роли валина плазмы крови в процессах теплообмена и детоксикации при эндотоксической лихорадке отсутствуют, хотя его участие в этих процессах вполне закономерно, поскольку валин является ингибитором аргиназы, активность которой сказывается на уровне монооксида азота, играющего важную роль в механизмах регуляции температуры тела и детоксикации.

В экспериментах на крысах и кроликах установлено, что при действии в организме бактериального эндотоксина имеет место снижение уровня валина в плазме крови, сопровождающееся повышением активности аргиназы печени, изменениями тиреоидного статуса, процессов детоксикации и теплообмена. Развитие эндотоксической лихорадки у крыс в условиях действия в организме L-валина (100 мг/кг внутривенно за 30 мин до инъекции бактериального эндотоксина) сопровождается снижением детоксикационной функции печени, со-

держания трийодтиронина, повышением уровня  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови и не столь значительным подъемом температуры тела.

**Ключевые слова:** эндотоксиновая лихорадка, температура тела, детоксикация, валин плазмы крови, тиреоидный статус организма, L-аргинин-NO система.

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

Ранее нами было показано, что введение в организм аминокислоты L-аргинина, как и L-валина, оказывает выраженный антипиретический эффект [1, 2] 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 [3], будет сказываться на активности L-аргинин-NO-системы, системы определяющей уровень монооксида азота (NO) [7] и имеющей важное значение в процессах детоксикации, теплообмена и формирования тиреоидного статуса организма [2, 4], были основания полагать, что уровень валина в плазме крови может иметь значение в процессах детоксикации и механизме антипиретического действия L-валина в условиях эндотоксиновой лихорадки.

**Цель работы** — выяснение значимости валина плазмы крови в процессах детоксикации, формирования тиреоидного статуса и регуляции температуры тела при эндотоксиновой лихорадке.

**Материалы и методы.** Опыты выполнены на взрослых ненаркотизированных белых крысах-самцах массой 160–220 г и кроликах обоего пола массой 2,5–3,0 кг. Все наблюдения производили в термонейтральных условиях (20–22°C). 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 мкг/кг, кроликам — в краевую вену уха в дозе 0,5 мкг/кг. Для выяснения значимости валина плазмы крови в процессах детоксикации и регуляции температуры тела использовали L-валин (Carl 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 в дозе 100 мг/кг вводили крысам внутривентриально за 30 мин до начала опыта. L-NAME в дозе 25 мг/кг вводили однократно: кроликам — внутривенно, крысам — внутривентриально.

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 в печени определяли спектрофотометрически [5]. Продукцию NO оценивали по суммарному уровню нитрат/нитритов ( $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ ) в плазме крови [6].

О детоксикационной функции печени, степени эндогенной интоксикации судили по продолжительности наркотического сна (ПНС), степени токсичности крови (СТК) и содержанию в плазме крови «средних молекул» (СМ). ПНС (гексенал 100 мг/кг, внутривентриально) оценивали по времени нахождения животных на боку (Парк Д.В., 1973). Определение содержания в крови СМ проводили методом, разработанным В.М. Моиным с соавт. (1987), СТК — способом, предложенным О.А. Радьковой и соавт. (1985). Уровень в плазме крови трийодтиронина (Т<sub>3</sub>) и тетрайодтиронина (Т<sub>4</sub>) определяли радиоиммунным методом с помощью тест-наборов ХОП ИБОХ НАН Беларуси. 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).

Полученные данные обработаны статистически с использованием пакетов прикладного программного обеспечения «Statsoft (USA) Statistica 8.0», «Microsoft Office Excell 2000», «Graph Pad Prism4», «Rv.2.15.1». Анализ различий между двумя независимыми группами по количественным показателям, распределение которых статистически значимо не отличалось от нормального, проводили с использованием t-критерия Стьюдента в модификации Уэлча (Welch's test). Данные для количественных показателей представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ( $\bar{X} \pm S_x$ ); для качественных показателей — в виде процентов. Различия между экспериментальными группами считались достоверными при  $p < 0,05$ .

Все эксперименты выполнены с учетом принципов биоэтики и положений, которые предусмотрены «Европейской конвенцией по защите экспериментальных животных» (Страсбург, 1986).

**Результаты и их обсуждение.** В опытах установлено, что внутривентриальное введение крысам ( $n = 12$ ) бактериального эндотоксина (ЛПС) в дозе 5,0 мкг/кг приводит к медленному повышению температуры тела и слабо выраженной гипертермии. Температура тела повышалась на 1,3; 1,2; 1,8; 1,2 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; 120 и 180 мин после введения ЛПС возрастала на 0,6; 1,3; 1,6 и 1,2°C ( $p < 0,001$ ) и 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 у крыс ( $n = 8$ ) через 120; 180; 240; 300 и 330 мин после введения экзопирогена приводило к повышению активности аргиназы печени на 53,1; 39,2; 31,3; 27,8 и 23,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с контролем. Активность аргиназы печени у крыс контрольной группы через 120; 180; 240; 300 и 330 мин после внутривентриального 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 ткани•ч.

Выявлено, что на высоте эндотоксической лихорадки в плазме крови у крыс ( $n = 7$ ) через 180; 240; 300 и 330 мин после инъекции ЛПС уровень СМ повышается на 17,0; 23,1; 20,5 и 19,8% ( $p < 0,05$ ). Токсичность плазмы при этом достоверно не изменялась. ПНС у крыс (через 120; 180; 240 и 330 мин после внутрибрюшинного введения ЛПС) уменьшалась (по сравнению с животными контрольной группы — внутрибрюшинное введение физраствора) на 23,0; 25,2; 28,7 и 20,8% ( $p < 0,05$ ) и составляла соответственно  $22,0 \pm 3,4$ ;  $21,1 \pm 3,0$ ;  $20,0 \pm 3,2$  и  $22,5 \pm 3,5$  мин. Содержание СМ в плазме крови, СТК и ПНС у животных в контроле (через 180 мин после внутрибрюшинного введения физраствора,  $n = 7$ ) составили соответственно  $0,70 \pm 0,012$  г/л,  $1,3 \pm 0,11$  ед. и  $27,9 \pm 3,12$  мин.

Обнаружено, что в условиях эндотоксической лихорадки через 120; 180; 240 и 330 мин после инъекции ЛПС в плазме крови крыс ( $n = 7$ ) снижается уровень  $T_3$  на 28,2; 31,2; 35,3 и 26,6% ( $p < 0,05$ ) и повышается содержание  $T_4$  на 23,8; 25,2; 31,3 и 22,1% ( $p < 0,05$ ). Концентрация  $T_3$  и  $T_4$  в плазме крови у животных контрольной группы ( $n = 7$ ) через 120; 180; 240 и 330 мин после внутрибрюшинного введения физраствора составляла  $1,4 \pm 0,15$  и  $56,7 \pm 3,22$ ;  $1,3 \pm 0,14$  и  $54,3 \pm 3,11$ ;  $1,5 \pm 0,11$  и  $55,1 \pm 3,25$ ;  $1,4 \pm 0,12$  и  $51,8 \pm 2,98$  нМоль/л соответственно.

При эндотоксической лихорадке (через 120 мин после инъекции ЛПС) снижалось в плазме крови у крыс ( $n = 7$ ) содержание глутамина (на 12,7%,  $p < 0,05$ ), аргинина (на 32,4%,  $p < 0,02$ ), тирозина (на 26,4%,  $p < 0,01$ ) и валина (на 21,1%,  $p < 0,001$ ).

Действие ЛПС у крыс ( $n = 7$ ), через 120 и 180 мин после введения экзопирогена приводило к повышению уровня  $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$  в плазме крови животных на 29,6 ( $p < 0,05$ ) и 60,7% ( $p < 0,05$ ) и составляло соответственно  $7,0 \pm 0,40$  и  $9,8 \pm 1,30$  мкМоль/л.

В опытах на крысах установлено, что через 20 дней после ежедневного интрагастрального введения на 1%-м крахмальном растворе синтетического гормона трийодтиронина гидрохлорида (Lyothyronine «Berlin-Chemie», Германия), в дозе 30 мкг/кг концентрация в плазме крови  $T_3$  у животных увеличивалась с  $1,3 \pm 0,15$  до  $2,0 \pm 0,27$  нМоль/л (на 53,8%;  $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ), а  $T_4$  снижалась с  $52,4 \pm 4,11$  до  $40,8 \pm 3,51$  нМоль/л (на 12,2%;  $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ). У гипертиреозидных крыс ( $n = 7$ ) повышалась температура тела (на 0,7°C;  $p < 0,05$ ) и детоксикационная функция печени. Так, ПНС снижалась на 26,4% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ) и составляла  $20,6 \pm 2,4$  мин. Содержание СМ в плазме крови снижалось на 22,8% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ), а СТК уменьшалась на 19,8% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ). При этом активность аргиназы печени повышалась на 41,3% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ) и составляла  $7,4 \pm 0,33$  мкМоль мочевины/г ткани•ч.

У гипотиреозидных крыс наблюдалось снижение температуры тела, концентрации йодсодержащих гормонов щитовидной железы в плазме крови, активности аргиназы и детоксикационной функции печени. Так, до начала введения на 1%-м растворе крахмала тиреостатика мерказолила (НПО «Укрмедпрепараты», Украина) в дозе 25 мг/кг ректальная температура у крыс опытной группы составляла  $37,6 \pm 0,11$ °C ( $n = 8$ ), а через 20 дней его применения снижалась на 0,8°C ( $p < 0,05$ ). У животных контрольной группы, получавших интрагастрально 1% раствор крахмала, ректальная температура была равной  $37,5 \pm 0,12$ °C ( $n = 7$ ). Понижение температуры тела у животных с экспериментальным гипотиреозом сопровождалось снижением активности детоксикационной функции печени. Так, ПНС у крыс увеличивалась на 28,1% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ) и составляла  $31,6 \pm 2,85$  мин. Содержание в плазме крови СМ возрастало на 19,1% ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ), а СТК в этих условиях увеличивалась на 17,4% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ). Наряду со снижением температуры тела у гипотиреозидных крыс имело место снижение активности аргиназы печени на 26,6% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ). У крыс ( $n = 7$ ) контрольной группы (через 20 дней ежедневного интрагастрального введения 1% раствора крахмала) она составляла  $3,9 \pm 0,31$  мкМоль мочевины/г ткани•ч.

Учитывая данные литературы [7] о том, что активность аргиназы печени сказывается на процессах образования монооксида азота (NO), а действие в организме ЛПС вызывает экспрессию индуцибельной NO-синтазы и приводит к образованию больших количеств NO, представляло интерес выяснить, как будет изменяться детоксикационная функция печени, тиреозидный статус и температура тела животных при действии ЛПС в условиях предварительного введения в их организм веществ, угнетающих активность L-аргинин-NO-системы.

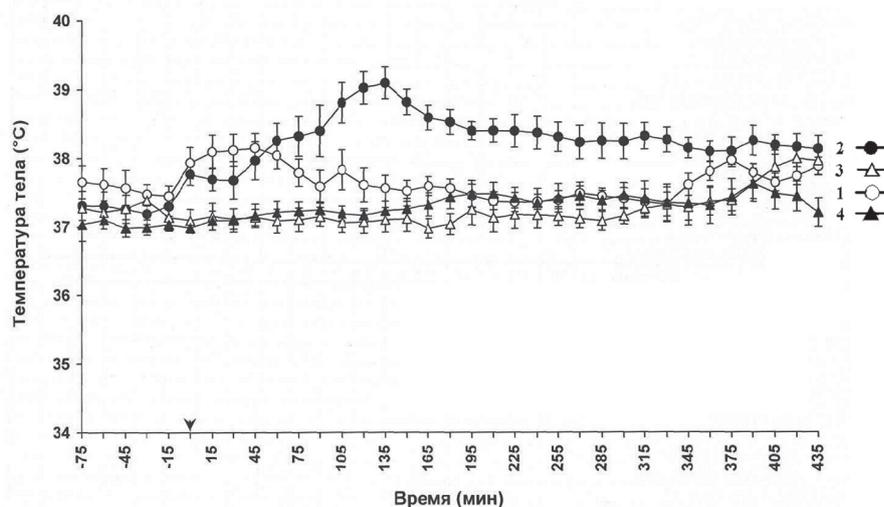
Установлено, что лихорадочная реакция, вызываемая ЛПС, ослабляется предварительным введением в организм животных L-NAME (25 мг/кг), ингибитора NO-синтазы, не влияющего в указанной дозе на температуру тела в норме. Так, ректальная температура у крыс ( $n = 12$ ), получивших только ЛПС, повышалась на 1,2 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 тела в указанные промежутки времени после введения эндотоксина на 0,8 и 0,6°C. В опытах на кроликах ( $n = 8$ ) показано, что через 120 мин после инъекции ЛПС в условиях предварительного (за 30 мин до инъекции эндотоксина) введения в кровотоки L-NAME ректальная температура повышалась с  $38,8 \pm 0,12$  до  $39,9 \pm 0,13$ °C ( $p < 0,05$ ), в то время как у животных контрольной группы ( $n = 7$ ) с  $38,7 \pm 0,10$  до  $40,3 \pm 0,20$ °C.

Предварительное введение в организм животных L-NAME не только ослабляло лихорадочную реакцию на действие ЛПС, но и препятствовало активации детоксикационной функции печени и системы «гипофиз–щитовидная железа» в этих условиях. Так, ПНС через 120 мин после внутрибрюшинного введения ЛПС у крыс, предварительно получивших L-NAME за 30 мин перед введением эндотоксина, по сравнению с животными контрольной группы (действие только ЛПС) увеличивалась на 22,5% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ) и составляла  $27,7 \pm 2,45$  мин. Концентрация СМ в плазме крови в этих условиях повышалась на 18,6% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ), а показатель токсичности крови был выше у опытных крыс по сравнению с таковыми в контроле (действие только ЛПС) на 13,9% ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ) через 120 мин после инъекции бактериального эндотоксина. Обнаружено, что действие ЛПС через 120 мин после инъекции в условиях угнетения активности NO-синтазы сопровождается более выраженным снижением уровня  $T_3$  (на 20,1%;  $p < 0,05$ ) и снижением, а не повышением, как при действии ЛПС, уровня

$T_4$  в плазме крови на 35,3% ( $p < 0,05$ ) соответственно по сравнению с действием ЛПС. 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 снижением в плазме крови уровня  $NO_3^-/NO_2^-$  на 48,7% ( $p < 0,05$ ).

Однократная внутрибрюшинная инъекция крысам ингибитора аргиназы L-валина в дозе 100 мг/кг статистически значимо не сказывалась на ректальной температуре тела и приводила к снижению активности аргиназы печени на 83,5% ( $p < 0,05$ ;  $n = 8$ ). У животных контрольной группы ( $n = 7$ ), получавших ежедневно внутрибрюшинно физраствор в течение недели, активность аргиназы печени составляла  $5,7 \pm 0,51$  мкмоль мочевины/г ткани•ч.

Выявлено, что в условиях депрессии аргиназы печени L-валином (100 мг/кг за 30 мин до инъекции эндотоксина) действие ЛПС не сопровождается активацией детоксикационной функции печени и развитием лихорадки. Температура тела у крыс ( $n = 7$ ) под влиянием ЛПС (5,0 мкг/кг) через 120 и 180 мин от начала инъекции эндотоксина повышалась на  $1,2 \pm 0,14$  ( $p < 0,01$ ) и  $1,1 \pm 0,11^\circ C$  ( $p < 0,01$ ) соответственно, а в условиях действия L-валина через 2 и 3 ч после введения ЛПС — на  $0,5 \pm 0,06$  и  $0,4 \pm 0,02^\circ C$  ( $n = 8$ ). В условиях действия в организме L-валина лихорадочная реакция на ЛПС не развивалась даже если экзопироген вводили в дозе 50,0 мкг/кг (рисунок).



Стрелка — момент введения ЛПС (50,0 мкг/кг);  $n$  — количество животных в группе; 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;  $n = 7$ )

**Рисунок — Изменения ректальной температуры у крыс после внутрибрюшинного введения**

Обнаружено, что действие ЛПС у крыс ( $n = 7$ ) через 120 мин после инъекции экзопирогена в условиях угнетения активности аргиназы печени L-валином (100,0 мг/кг) сопровождается повышением уровня  $T_4$  (на 18,2%;  $p < 0,05$ ) в плазме крови. Концентрация  $T_3$  в плазме крови в этих условиях (по отношению к животным в контроле) снижалась на 45,5% ( $p < 0,05$ ), а содержание  $NO_3^-/NO_2^-$  повышалось на 55,7% ( $p < 0,01$ ).

В опытах на крысах ( $n = 7$ ) установлено, что действие ЛПС через 120 мин после инъекции экзопирогена в условиях предварительного угнетения активности аргиназы печени L-валином сопровождается более значительным возрастанием (по сравнению с животными в контрольной группе) СТК, концентрации СМ и  $T_4$  в плазме крови. Содержание  $T_3$  в плазме крови в этих условиях (по отношению к животным в контроле, получавшим физраствор и ЛПС) значительно снижалось (на 43,8%;  $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ), а ПНС повышалась на 24,5% ( $p < 0,05$ ;  $n = 8$ ). Установлено, что через 120 и 180 мин после инъекции ЛПС в условиях действия в организме животных L-валина содержание  $NO_3^-/NO_2^-$  в плазме крови повышается по сравнению с контролем (действие только одного эндотоксина) на 57,4 ( $p < 0,05$ ;  $n = 7$ ) и 91,2% ( $p < 0,05$ ;  $n = 6$ ) соответственно.

#### **Заключение:**

1. Активность детоксикационной функции печени, формирование тиреоидного статуса и терморегуляторных реакций при действии бактериальных эндотоксинов у крыс и кроликов зависят от уровня валина в плазме крови, определяющего активность аргиназы печени и состояние L-аргинин-NO-системы.

2. Развитие лихорадки у крыс в условиях действия в организме L-валина сопровождается менее выраженными изменениями в процессах детоксикации, уровня  $T_3$  в плазме крови и не столь значительным подъемом температуры тела.

3. Валин плазмы крови, аргиназу печени и NO можно рассматривать как важнейшие взаимосвязанные факторы, участвующие в регуляции процессов теплообмена, детоксикации и формирования тиреоидного статуса при эндотоксической лихорадке.

### Літэратура

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. Лобанова, В.В. Об участии аргиназы печени в изменениях активности L-аргинин-NO системы, процессов детоксикации и температуры тела при бактериальной эндотоксинемии / В.В. Лобанова, Ф.И. Висмонт // Мед. журн. — 2014. — № 4 (50). — С. 75–77.
3. 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, № 2. — P. 181–184.
4. Gerstberger, R. Nitric oxide and body temperature control / R. Gerstberger // News Physiol. Sci. — 1999. — Vol. 14, № 2. — P. 30–36.
5. 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.
6. Nitrite and nitrate determinations in plasma: A critical evaluation / H. Moshage [et al.] // Clin. Chem. — 1995. — Vol. 41, № 6. — P. 892–896.
7. Scibior, D. Arginine — metabolism and functions in the human organism / D. Scibior, H. Czczot // Postepy Hig. Med. Dosw. — 2004. — Vol. 58. — P. 321–332.

## TO THE PARTICIPATION OF BLOOD PLASMA VALINE IN DETOXICATION PROCESSES, THYROID STATUS GENERATION AND BODY TEMPERATURE REGULATION DURING ENDOTOXINE FEVER

*Lobanova V.V., Vismont A.F., Vismont F.I.*

*Educational Establishment “The Belarusian State Medical University”, Minsk, Republic of Belarus*

In experiments on rats and rabbits it has been found that plasma valine level, determining liver arginase and L-arginine-NO-system activity has important significance for detoxication processes, thyroid status generation and thermoregulation reactions of organism after bacterial endotoxine introduction. In conditions of liver arginase depression by L-valine (100 mg/kg, i.p., 30 min before endotoxine injection) development of endotoxine fever in rats is accompanied by less pronounced changes in detoxication, concentration of three iodothyronine in blood and less significant rise in body temperature.

**Keywords:** endotoxine fever, body temperature, detoxication, plasma valine, thyroid status, L-arginine-NO-system.