

ТЕРМОМАГНИТОФОРЭЗ L-АРГИНИНА

КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ СПОСОБ ДОСТАВКИ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ МОЛЕКУЛ В ТКАНИ ЖИВОГО ОРГАНИЗМА

Зубовский Д.К.

канд. мед. наук,
Белорусский
государственный
университет
физической культуры

**Жаворонок И.П.**

канд. биол. наук, доцент,
Институт физиологии
НАН Беларусь

**Федорова Е.В.**

Институт физиологии
НАН Беларусь



Представлены некоторые результаты экспериментальных исследований по влиянию термомагнитотерапии, накожных аппликаций и термомагнитофореза растворов L-аргинина на морфофункциональное состояние кожи и мышц и активность в них ферментов энергетического обмена.

Установлено, что наиболее значимые изменения активности сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы отмечены в мышечных волокнах мягких тканей задней конечности экспериментальных животных после термомагнитофореза L-аргинина, что является косвенным подтверждением усиления метаболических функций мышц.

Ключевые слова: лактатдегидрогеназа; лечебные физические факторы; сукцинатдегидрогеназа; термомагнитотерапия; термомагнитофорез; L-аргинин; энергетический обмен.

L-ARGININE THERMOMAGNETOPHORESIS AS A PERSPECTIVE METHOD FOR BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULE PRECURSORS DELIVERY TO THE TISSUE OF A LIVING ORGANISM

Some results of experimental studies on the effect of thermomagnetic therapy, cutaneous applications, and thermomagnetophoresis of L-arginine solutions on the morphofunctional state of the skin and muscles, and the activity of energy metabolism enzymes in them are presented.

It has been established that the most significant changes in the activity of succinate dehydrogenase and lactate dehydrogenase are recorded in the muscle fibers of the soft tissues of the hind limb of experimental animals after L-arginine thermal magnetophoresis, which is an indirect confirmation of increase in metabolic muscle functions.

Keywords: lactate dehydrogenase; therapeutic physical factors; succinate dehydrogenase; thermomagnetic therapy; thermomagnetophoresis; L-arginine; energy metabolism.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из путей расширения физиологических возможностей и границ адаптации организма спортсменов к нагрузкам является применение в качестве эргогенных средств биологически активных добавок (далее – БАД), среди которых заметную роль играет L-аргинин (далее – L-А). Аргументом в пользу его приема является синтезирующийся из L-А в организме монооксид азота (далее – NO) и им вызываемые активизация кровотока в тканях и повышение доставки к ним кислорода, что приводит к усилиению энергопроизводительности мышц, улучшению их сократительной способности и отсрочке наступления утомления. Отмечается также антиоксидантное, противовоспалительное и антитромботическое действие NO [1, 2].

В клинической медицине эффективность применения L-А достигается при его внутривенном введении,

что для функциональной реабилитации спортсменов неприемлемо, а традиционный, как правило, высокодозный пероральный путь доставки L-А в организм опасен для здоровья спортсменов и юридически небезупречен [3, 4].

В медицине используются методики фореза – введение через кожу нанесенных на нее лекарственных веществ с помощью лечебных физических факторов (далее – ЛФФ). Давно применяются импульсные магнитные поля (далее – ИМП), обладающие максимальным для ЛФФ числом регулируемых физико-технических характеристик. Эффективным ЛФФ является тепло в силу выраженной активизации микрогемо- и лимфоциркуляции.

Для расширения возможностей недопинговых восстановительных технологий в спорте нами разрабы-

вается метод термомагнитофореза (далее – ТМФ) L-A – чрескожного введения раствора L-A в анатомические мышечные группы конечностей спортсменов путем сочетанного (одновременного) регулируемого воздействия низкоинтенсивного ИМП и теплового фактора. Состояние вопроса, определение задач, технология решения отображены в публикации [5].

Рядом исследований показано, что термомагнитотерапия (далее – ТМТ) сочетает гемостимулирующий, иммуномодулирующий и реокорригирующий эффект низкоинтенсивной импульсной магнитотерапии с общеукрепляющим и трофико-регенераторным действием тепла [6]. Кроме того, согласно классическому принципу физиотерапии, при сочетанном (одновременном) воздействии двух ЛФФ всегда будет иметь место эффект взаимопотенцирования [7].

Теоретическая предпосылка для ТМФ L-A состоит в том, что молекула L-A (молекулярная масса 174,2 г/моль) как алифатическая аминокислота является гидрофобной, а из-за присутствия в молекуле функциональных групп кислотного (COOH) и основного (NH_2) свойств (цвиттер-ион) обладает хорошей растворимостью в полярных растворителях (воде). Известно, что для эффективного чрескожного проникновения молекула лекарства должна быть нейтральной, обладать достаточной растворимостью в гидрофобной и гидрофильной среде, а молекулярный вес не должен превышать 500 Да [8, 9].

Согласно результатам экспериментальных исследований, воздействие ИМП улучшает микроциркуляцию кожи за счет взаимодействия с волокнами коллагена и эластина, повышая кровоснабжение кожи и увеличивая через нее транспорт веществ [10]. Также в эксперименте показано, что увеличение проникновения частиц через кожу связано с изменениями мембранныго потенциала в магнитном поле [11].

Согласно вышеизложенному, конечной целью комплексного исследования является улучшение функционального состояния систем обеспечения работоспособности спортсменов различных видов спорта за счет разработанного метода термомагнитофореза L-аргинина.

В данной публикации отображены некоторые результаты экспериментальных исследований влияния низкоинтенсивного ИМП, сочетанного (одновременного) воздействия МП и теплового фактора (ТМТ), а также накожных аппликаций и ТМФ растворов L-A на морффункциональное состояние кожи и мышц и активность в них ферментов энергетического обмена.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования выполнены на 54 крысах-самцах Wistar массой 250–280 г, содержавшихся в условиях конвенционального вивария Института физиологии НАН Беларусь. В соответствии с нормами содержания лабораторных животных все животные находились на одинаковом рационе, при свободном доступе к воде и пище. Эксперименты проводили в соответствии с республиканскими и международны-

ми стандартами качества планирования и проведения исследований на животных. На протяжении периода мониторинга у животных всех групп оценивали состояние шерстяного покрова и слизистых оболочек, наличие патологических выделений, общую активность, проводили мониторинг массы тела. Эксперименты одобрены комиссией по биоэтике при Институте физиологии НАН Беларусь (протокол № 2 от 31.01.2024 г.).

Все экспериментальные животные были разделены на 6 групп по 6 животных в каждой: Группа 1. Интактные животные (контроль). Группа 2. Накожные аппликации 5 % раствора L-A. Группа 3. Накожные аппликации 10 % раствора L-A. Группа 4. ТМТ (режим индукции: 2,0 мТл, 42°C). Группа 5. ТМФ 5 % раствора L-A (режим индукции: 2,0 мТл, 42°C). Группа 6. ТМФ 10 % раствора L-A (режим индукции: 2,0 мТл, 42°C).

Накожные аппликации L-A, ТМТ и ТМФ на задние конечности экспериментальных животных осуществляли в течение 20 мин. ТМТ и ТМФ растворов L-A соответствующих концентраций проводился с использованием аппарата ATMT-01, работающего от однофазной сети переменного тока с номинальным напряжением 220 В, частотой 50 Гц и потребляемой мощностью не более 200 Вт. Значение магнитной индукции в центре рабочей поверхности индуктора для общей ТМТ составляет от 5 до 25 мТл (в зависимости от количества одновременно работающих катушек-индукторов). Температура внутри индуктора общей ТМТ устанавливается в диапазоне от 20° до 45°C с шагом 1°C. Сразу после завершения воздействия осуществлена эвтаназия животных с забором биопсийного материала тканей после воздействий для последующего гистологического исследования.

Для гистологического исследования проводили забор кожи и мышц бедра экспериментальных животных. Фрагменты тканей фиксировали в 10 %-ном нейтральном забуференном растворе формалина в течение не менее 24 ч. Проводка и формирование парафиновых блоков выполнены полуавтоматическим путем с помощью автомата для гистологической проводки карусельного типа KD-TS6B (Kedee, Китай) и модуля для подогрева и дозирования парафина KD-BMIII (Kedee, Китай). Из каждого объекта с помощью ротационного микротома CUT 5062 (SLEE medical, Германия) изготавливали серийные гистологические срезы толщиной 4 мкм, которые наносили на стекла с адгезивным покрытием. После депарафинизации в ксиоле и гидратации в растворах этилового спирта нисходящей концентрации гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование гистологических микропрепараторов и изготовление микрофотографий проводили на световом микроскопе Optec BK 5000, оснащенного цифровой фотокамерой (Optec, Китай) при увеличении микроскопа $\times 100$.

Для гистохимического исследования срезы образцов кожи и скелетных мышц бедра толщиной 14 мкм изготавливали с помощью микротома-криостата Microm HM 525 (Германия) и обрабатывали общепринятыми гистохимическими методами на выявление

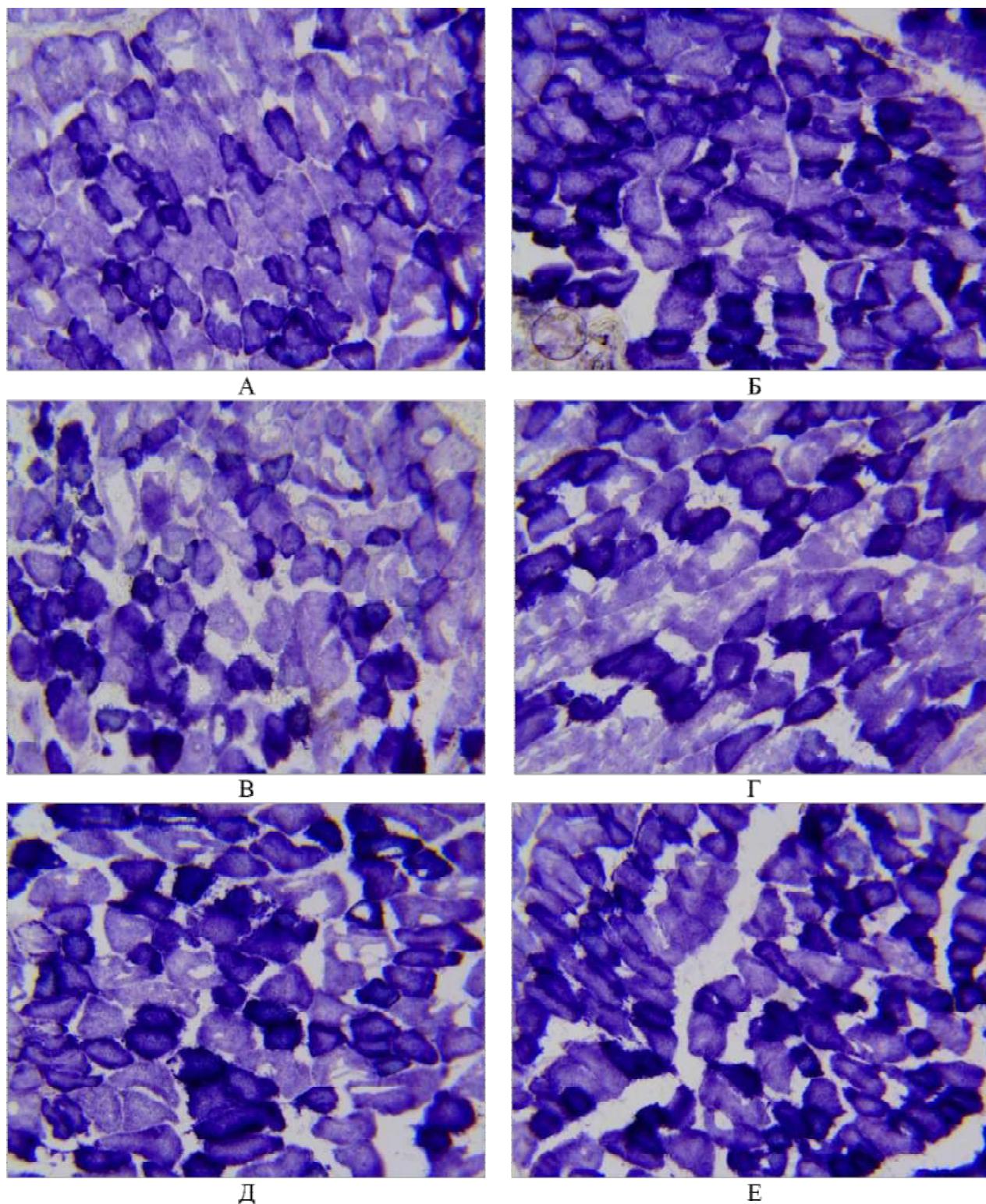


Рисунок 1 – Активность сукцинатдегидрогеназы в скелетной мышечной ткани у крыс экспериментальных групп (Метод СДГ (Лойда), увеличение $\times 200$)

А – интактная группа;

Б – ТМТ (2,0 мТл, 42°C);

В – накожные аппликации 5 %-го раствора L-A;

Г – накожные аппликации 10 %-го раствора L-A;

Д – ТМФ (2,0 мТл, 42°C) 5 %-го раствора L-A;

Е – ТМФ (2,0 мТл, 42°C) 10 %-го раствора L-A

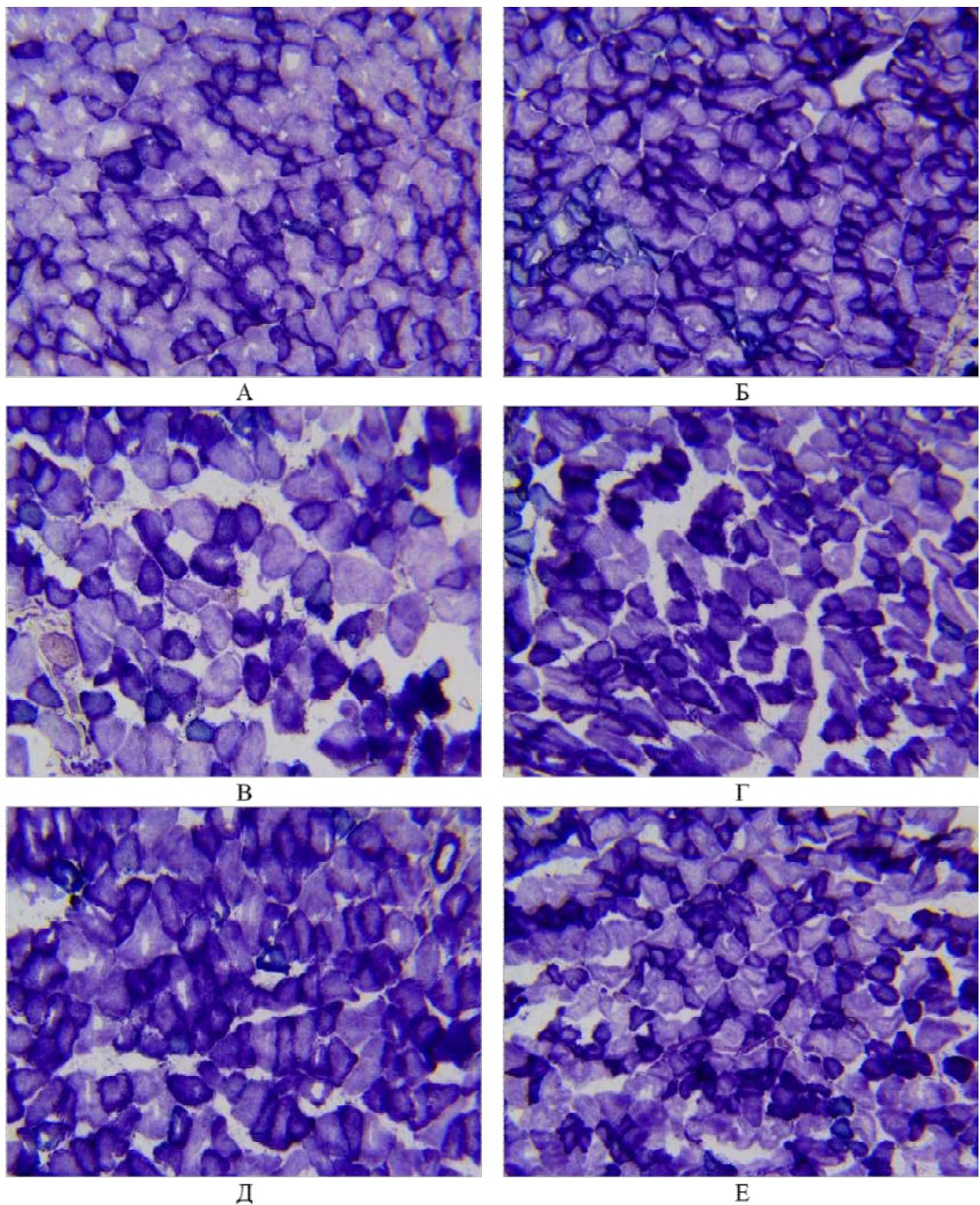


Рисунок 2 – Активность лактатдегидрогеназы в скелетной мышечной ткани у крыс экспериментальных групп (Метод ЛДГ (Лойда), увеличение $\times 200$)

А – интактная группа;
Б – ТМТ (2,0 мТл, 42°C);
В – накожные аппликации 5 %-го раствора L-A;
Г – накожные аппликации 10 %-го раствора L-A;
Д – ТМФ (2,0 мТл, 42°C) 5 %-го раствора L-A;

активности ферментов энергетического обмена: сукцинатдегидрогеназы (СДГ, КФ 1.3.99.1) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ, КФ 1.1.1.27). Активность ферментов оценивали на основании определения оптической плотности конечного продукта реакции в цитоплазме клеток с помощью компьютерной программы обработки данных Image J (1.49k, США), выражая результаты в условных единицах (у.е.) оптической плотности. Исследование гистохимических микропрепараторов и изготовление микрофотографий проводили с помощью светового микроскопа Альтами LUM-1, оснащенного цифровой фотокамерой при увеличении $\times 200$.

СТАТИСТИЧЕСКАЯ ОБРАБОТКА РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты обрабатывали методами непараметрической статистики с помощью прикладных программ Statistica 6.0. Достоверными считали различия между контрольной (интактной) и опытной группами при значениях $p \leq 0,05$ (Mann–Whitney U-test). Данные представлены в виде $Me [Q1; Q3]$, где Me – медиана, $Q1$ – первый квартиль или 25-й процентиль, $Q3$ – третий квартиль или 75-й процентиль.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

При гистологическом исследовании кожи и мышц конечности крысы отмечено, что курсы процедур ТМТ, накожных аппликаций и ТМФ L-A 5 % и 10 % растворов не вызывали воспалительной реакции, а гистологическая структура кожи и мышечных волокон была аналогичной животным контрольной группы. В отдельных полях зрения наблюдали увеличение количества расширенных артериальных сосудов микроциркуляторного русла, что может свидетельствовать об усилении гемодинамики при ТМТ и ТМФ.

Гистохимические исследования активности ферментов энергетического обмена в коже крыс показали ста-

тистически незначимую активизацию СДГ и ЛДГ. Следует отметить снижение активности СДГ в группах 4 и 5, соответственно, на 4,0 % и на 12,1 % относительно 1-й группы крыс ($p=0,001$), а также снижение на 4,2 % ($p=0,001$) по сравнению с контролем активности ЛДГ в группе 6.

Активность ферментов энергетического обмена в мышцах

Результат приведенной ниже цифровой оценки динамики активности ферментов СДГ и ЛДГ имел прямую взаимосвязь с данными визуальной оценки. Во всех исследуемых образцах мышц лабораторных животных выявлена положительная реакция в виде гранул синего осадка красителя диформазана. Интенсивность гистохимической реакции, демонстрирующей уровень энергетического обмена в мышечных клетках, варьировалась от слабой и умеренной до выраженной.

В мышечных волокнах мягких тканей задней конечности экспериментальных животных после ТМФ L-A установлена выраженная положительная динамика исследуемых показателей (рисунки 1 и 2). У животных всех групп, включенных в исследование, регистрировали достоверное увеличение СДГ: на 9,8 % – в группе 2 (аппликация 5 % раствора L-A); на 9,6 % – в группе 3 (аппликация 10 % раствора L-A); на 10,7 % – в группе 4 (ТМТ); на 13,9 % – в группе 5 (ТМФ 5 % раствора L-A) и на 14,5 % – в группе 6 (ТМФ 10 % раствора L-A) в сравнении с показателями у интактной группы крыс ($p=0,001$) (рисунок 3).

Активность ЛДГ в скелетной мышечной ткани крыс после проводимых воздействий также достоверно повышалась: отмечено возрастание активности фермента на 6,9 % – в группе 2 (аппликация 5 % раствора L-A); на 7,9 % – в группе 3 (аппликация 10 % раствора L-A); на 6,6 % – в группе 4 (ТМТ); на 10,2 % – в группе 5 (ТМФ 5 % раствора L-A) и на 9,7 % – в группе 6 (ТМФ 10 % раствора L-A) относительно значений у интактных животных ($p=0,001$) (рисунок 4).

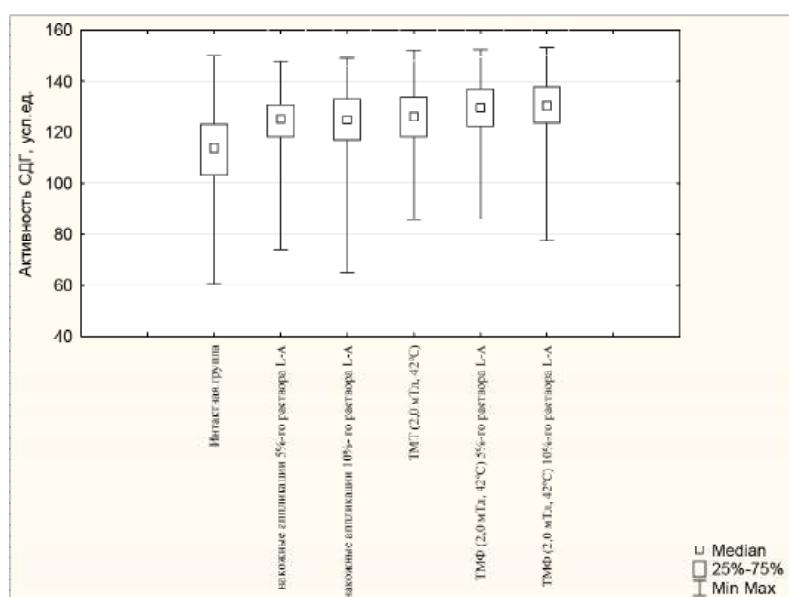


Рисунок 3 – Активность сукцинатдегидрогеназы в скелетной мышечной ткани у крыс после накожных аппликаций L-A, ТМТ и ТМФ L-A.

* – $p < 0,05$ по отношению к показателям интактной группы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- Применение ТМТ, накожных аппликаций и ТМФ 5 % и 10 % растворов L-A не оказывали раздражающего действия на кожу и скелетную мышечную ткань.
- Гистологическая картина исследуемых тканей была аналогична таковой у животных контрольной группы. Патологических изменений структуры скелетной мышечной ткани и кожи не установлено.
- Полученные экспериментальные данные позволяют заключить, что более выраженное изменение активности сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы после накожных аппликаций L-A, ТМТ и ТМФ L-A было отмечено в мышечных волокнах мягких тканей по сравнению с кератиноцитами базального слоя эпидермиса (кожа) задних конечностей экспериментальных животных.
- Терромагнитофорез раствора L-A различной концентрации оказывал стимулирующее влияние на метаболические показатели в скелетной мышечной ткани экспериментальных животных. Наиболее значимое повышение активности сукцинатдегидрогеназы (на 14,5 % – в мышцах, на 6,0 % – в коже) и лактатдегидрогеназы (на 9,7 % – в мышцах) отмечено при ТМФ 10 % раствора L-A.
- Повышение активности митохондриальных ферментов сукцинатдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы на данном этапе работ является косвенным подтверждением усиления метаболических (энергетических) функций мышц под влиянием ТМФ L-A.
- Полученные результаты указывают на правильность разработанного плана экспериментальных работ, результаты которых будут отражены в последующих публикациях.

ЛИТЕРАТУРА

- Bloomer, R. J. Nitric oxide supplements for sports / R. J. Bloomer // Strength and Conditioning Journ. – 2010. – Vol. 32, Iss. 2. – P.14–20.
- Effects of Arginine Supplementation on Athletic Performance Based on Energy Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis / A. Viribay [et al.] // Nutrients. – 2020. – Vol. 12, Iss. 5. – P.1–20.
- Pipe, A. Nutritional Supplements and Doping / A. Pipe, Ch. Ayotte // Clin. J. Sport Medio – 2002. – Vol.12. – P.245–249.
- Grimble, GK. Adverse gastrointestinal effects of arginine and related amino acids /GK. Grimble // The Journal of nutrition. – 2007. – Vol.137, Iss. 6. – P.1693–1701.
- Зубовский, Д. К. Аргинин для спортсменов: состояние вопроса, определение задач, технология решения / Д. К. Зубовский // Прикладная спортивная наука. – 2023. – № 2 (18). – С. 111–119.
- Зубовский, Д. К. Новые возможности функциональной реабилитации спортсменов с помощью общей терромагнитотерапии // Мир спорта. – 2007. – № 4. – С. 75–79
- Улащик, В. С. Общая физиотерапия : учеб. / В. С. Улащик, И. В. Лукомский. – Минск, 2003. – 512 с.
- Бачинский, Р. О. Аргинин // Аминокислоты глазами химиков, фармацевтов, биологов : в 2 т. – «Щедра садиба плюс», 2015. – Т. 2, гл. 13. – С. 139–162.
- Glaser, Jay A. Introduction to Biophysical Methods for Protein and Nucleic Acid Research / Jay A. Glaser, Murray P. Deutscher. – 1995. – USA, San Diego, Academic Press. – 527 P.
- Guo, Ch. Flow and magnetic field induced collagen alignment / Ch. Guo, LJ. Kaufman // Biomaterials. – 2007. – Vol. 28, Iss. 6. – P.1105–1114.
- Increase of ibuprofen penetration through the skin by forming ion pairs with amino acid alkyl esters and exposure to the electromagnetic field / P. Ossowicz-Rupniewska [et al.] // Eur. Journ. of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2023. – Vol. 188. – P. 15–25.

15.10.2024

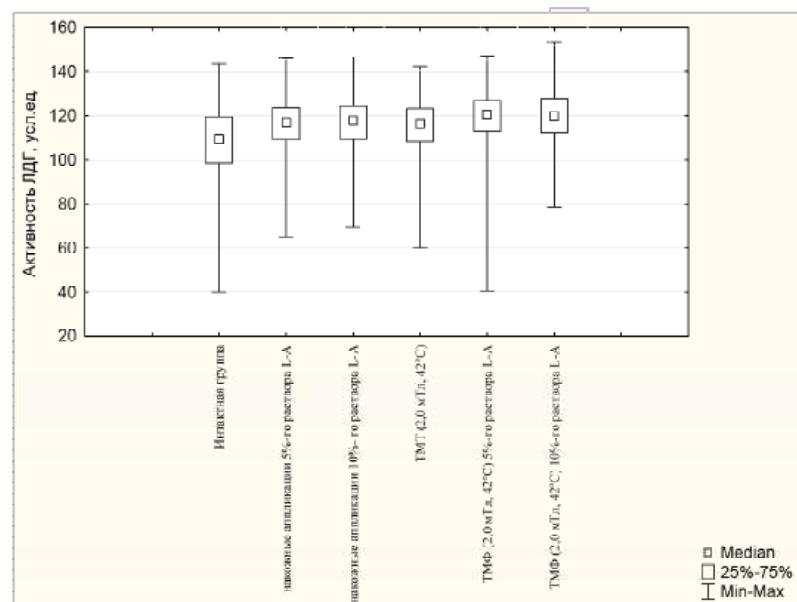


Рисунок 4 – Активность лактатдегидрогеназы в скелетной мышечной ткани у крыс после накожных аппликаций L-A, TMT и ТМФ L-A.

* – $p<0,05$ по отношению к показателям интактной группы