

ЗУБОВСКИЙ Дмитрий Константинович, канд. мед. наукБелорусский государственный университет физической культуры,
Минск, Республика Беларусь**КУВАЕВА Зоя Ивановна, д-р хим. наук, профессор****КАЧЕРСКАЯ Светлана Петровна**Институт физико-органической химии НАН Беларуси,
Минск, Республика Беларусь

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ОБОСНОВАНИЯ РАЗРАБОТКИ МЕТОДИКИ ТЕРМОМАГНИТОФОРЕЗА L-АРГИНИНА

Представлены результаты исследований о поступлении аминокислоты L-аргинина в кожу и мышцы экспериментальных животных под влиянием сочетанного воздействия импульсного магнитного поля и теплового фактора. Показано, что термомагнитофорез 10 % раствора аргинина приводит к достоверному повышению количественного содержания L-аргинина в коже и в мышцах.

Ключевые слова: термомагнитотерапия, термомагнитофорез, L-аргинин, цитруллин, высокоеффективная жидкостная хроматография.

EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF THE DEVELOPMENT L-ARGININE THERMAL MAGNETOPHORESIS METHODOLOGY

Investigation results on L-arginine amino acid entry into the skin and muscles of experimental animals under the influence of combined action of pulse magnetic field and thermal factor are presented. It has been shown that thermal magnetophoresis of 10 % arginine solution leads to a significant increase in the quantitative content of L-arginine in the skin and muscles.

Keywords: thermal magnetotherapy; thermal magnetophoresis; L-arginine; citrulline; high-performance liquid chromatography.

Важнейшей задачей современного тренера является обеспечение планомерного роста работоспособности и специальной подготовленности спортсмена, т. е. расширение адаптационных возможностей его организма. С другой стороны, никак нельзя допустить истощения его энергоресурсов в ходе тренировочного процесса. И крайне желательно сохранить психологическое и физическое здоровье спортсмена для достижения высокого спортивного результата в заранее заданные сроки. Среди внетренировочных методов функциональной реабилитации спортсменов значительное место продолжают занимать всевозможные специализированные пищевые добавки (далее – СПД), среди которых заметное место занимают композиции, содержащие аминокислоту L-аргинин (далее – L-A). Эффективность L-A связывают с действием важного модулятора кровообращения

и дыхания митохондрий – монооксида азота (далее – NO), способствующего улучшению процессов восстановления активно работающих тканей. Основными предшественниками синтеза NO являются L-аргинин и цитруллин.

Данные, полученные в ходе анализа исследований о влиянии L-A и цитруллина на физическую работоспособность, противоречивы вплоть до указаний на отрицательное влияние на работоспособность СПД с L-A или цитруллином [1].

Следует отметить, что во многом эти противоречия связаны со сложностью обоснованного применения любых средств восстановления в различных видах спорта, значительно отличающихся биоэнергетическими характеристиками. Поэтому одной из основных задач при разработке технологий медицинского сопровождения спортсменов является их научная обоснованность.

В настоящее время на базе учебно-исследовательской лаборатории функциональной диагностики и восстановительных технологий (далее – ЛФДиВТ) Белорусского государственного университета физической культуры совместно с Центром изучения боли Института физиологии и отдела лекарственных веществ Института физико-органической химии Национальной академии наук Беларусь проводится комплексное исследование биологических и восстановительных эффектов применения нового метода – термомагнитофореза аминокислоты L-аргинина (далее – ТМФ L-A). Метод основан на доставке L-A через кожу к мышцам путем одновременного воздействия физических факторов с разнообразным физиологическим и лечебным действием – импульсного магнитного поля (далее – ИМП) и теплового фактора. Впервые для этих целей ООО «Технология и медицина 2030» разработан аппарат для локальной термомагнитотерапии (далее – ТМТ). Впервые будет разработано и основано содержание методики проведения ТМФ L-A как управляющей технологии для восстановления и повышения работоспособности спортсменов. По итогам выполнения предлагаемого проекта будет проведена комплексная оценка эффективности ТМФ L-A и сформулированы показания к его применению с учетом специфики вида спорта.

Теоретические предпосылки для ТМФ L-A состоят в том, что молекула L-A имеет небольшую молекулярную массу (174,2 г/моль), как алифатическая аминокислота, является гидрофобной, а как биполярный ион катионной и анионной формы [2] достаточно растворима в полярных растворителях (воде) [3] и, в силу всего этого, обладает сродством и к гидрофобному роговому слою, и к гидрофильной дерме. Также известно, что переменные и ИМП в силу высокой электропроводности жидких сред и тканей организма вызывают наведение в них электрических токов (поля),

и, как следствие – перемещение заряженных частиц через мембрану и активизацию биохимических и биофизических процессов. Несмотря на то, что механизм влияния ИМП на проницаемость кожи и улучшения доставки лекарств досконально неизвестен, рассматривается возможность изменения механического напряжения кожи и образования в ней временных пор или каналов [4]. Экспериментальными исследованиями установлено, что под воздействием ИМП улучшается микротемо- и лимфоциркуляция кожи за счет взаимодействия ИМП с волокнами коллагена и эластина и, как следствие, увеличивается транспорт веществ через нее [5]. ГУО

В данной публикации отображены некоторые результаты экспериментальных исследований, где методом высокоеффективной жидкостной хроматографии (далее – ВЭЖХ) оценивались содержание L-A и цитруллина в биоматериале до и после сочетанного воздействия МП и теплового фактора (ТМТ) и ТМФ L-A.

Материалы и методы исследования

Все экспериментальные животные были разделены на 7 групп по 6 животных в каждой: № 1. Интактные животные (контроль). № 2. ТМТ (индукция МП – 1,0 мТл, t – 40°C). № 3. ТМТ (2,0 мТл, 42°C). № 4. ТМФ 5 %-го раствора L-A (1,0 мТл, 40°C). № 5. ТМФ 10 %-го раствора L-A (1,0 мТл, 40°C). № 6. ТМФ 5 %-го раствора L-A (2,0 мТл, 42°C). № 7. ТМФ 10 %-го раствора L-A (2,0 мТл, 42°C). ТМТ и ТМФ L-A осуществляли на задние конечности экспериментальных животных в течение 20 мин с использованием аппарата АТМТ-01.

Методика определения L-аргинина методом ВЭЖХ в водных растворах и растворах биоматериалов.

Хроматограф жидкостной «Agilent 1100», оборудованный дегазатором, четырехканальным градиентным насосом, термостатом колонок, автосamplerом, термостатом образцов, диодноматричным детектором, системой регистрации,

обработки и хранения информации с программным обеспечением ChemStation Rev.B. 04.03. Колонка Zorbax Eclipse Plus C18, заполненная пористыми микрочастицами силикагеля октадецилсилильного для хроматографии Р с размером частиц 3,5 мкм, длина колонки 150 мм, диаметр 3,0 мм. Материалы: динатрия гидрофосфат безводный Р; динатрия тетраборат декагидрат Р; хлористоводородная кислота Р; ацетонитрил Р; метанол Р; фосфорная кислота Р; натрия гидроксид Р; ОФА-реагент; калия дигидрофосфат Р; L-аргинин – стандартный образец; L-цируллин – стандартный образец; 5 %-й раствор L-аргинина (Институт физиологии НАН Беларуси); 10 %-й раствор L-аргинина (Институт физиологии НАН Беларуси); пробы биоматериала (Институт физиологии НАН Беларуси).

Приготовление растворов:

Раствор сравнения (0,2 мг/мл). В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 10,0 мг стандартного образца L-аргинина. Растворяют в воде для хроматографии Р и доводят этим же растворителем до метки.

Испытуемый раствор (5 %) 200 мкл испытуемого образца помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, доводят водой для хроматографии Р до метки, перемешивают.

Испытуемый раствор (10 %) 200 мкл испытуемого образца помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят водой для хроматографии Р до метки, перемешивают.

Подвижная фаза А: 1,4 г динатрия гидрофосфата безводного Р и 3,8 г динатрия тетрабората декагидрата Р помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, добавляют 900 мл воды для хроматографии Р, растворяют, доводят до метки тем же растворителем и перемешивают. Доводят pH раствора до $8,2 \pm 0,05$ добавлением кислоты хлористоводородной Р. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Подвижная фаза В: смешивают ацетонитрил Р, метанол Р и воду для хроматографии Р в объемных соотношениях 45:45:10. Раствор дегазируют.

Растворитель 1: к 100,0 мл подвижной фазы А добавляют 0,4 мл кислоты фосфорной Р.

Боратный буферный раствор: 3,8 г динатрия тетрабората декагидрата Р растворяют в 80 мл воды для хроматографии Р, доводят pH раствора до $10,2 \pm 0,05$ добавлением 2 М раствора натрия гидроксида. Раствор количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят до метки водой для хроматографии Р.

2 М раствор гидроксида натрия: в мерную колбу объемом 25 мл помещают 15 мл воды для хроматографии Р и 2,0 г натрия гидроксида Р, перемешивают. После того, как раствор охладится до комнатной температуры, доводят объем раствора до метки водой для хроматографии Р.

Условия хроматографирования: температура термостата колонки – 40 °С; температура автосамплера – 8 °С; скорость потока подвижной фазы – 0,64 мл/мин; длина волны детектирования – 338 нм (диноматричный детектор); объем вводимой пробы – 1 мкл; подвижная фаза: ПФ А и ПФ В в соответствии с таблицей 1; время хроматографирования: 27 мин.

Используется автосамплер со следующей программой ввода образца:

Отбор (Draw) 2,5 мкл из виалы 1 (бортный буферный раствор). *Отбор* 1,0 мкл образца. *Перемешивание (Mix)* на воздухе при максимальной скорости 5 раз. *Пауза (Wait)* 0,2 мин. Отбор 0 мкл из виалы 2 (промывание иглы водой из виалы без крышки). *Отбор* 0,5 мкл из виалы 3 (ОФА-реагент). *Отбор* 0 мкл из виалы 4 (промывание иглы водой из виалы без крышки). *Перемешивание* на воздухе 10 раз. *Отбор* 0 мкл из виалы 6 (ацетонитрил). *Отбор* 32 мкл из виалы 5 (растворитель 1). *Перемешивание* на воздухе 8 раз. *Ввод образца (Inject)*. *Дополнительные параметры (Auxiliary):* скон

скорость забора (Draw speed): 200 мкл/мин; **скорость ввода образца (Eject speed):** 600 мкл/мин; **положение при отборе (Draw position):** 0,0 мм.

На хроматограмме раствора сравнения время удерживания пика L-аргинина около 9 мин.

Расчет содержания L-аргинина (X, %) проводят по формуле:

$$X = \frac{S_i \cdot C_0 \cdot P}{S_0 \cdot C_i \cdot 100} \cdot 100\%$$

Где:

S_i – среднее значение площади пика L-аргинина на хроматограммах испытуемого раствора;

Таблица 1 – Условия градиентного элюирования

| Время, мин | Подвижная фаза А, % | Подвижная фаза В, % |
|------------|---------------------|---------------------|
| 0,0 | 98,0 | 2,0 |
| 0,5 | 98,0 | 2,0 |
| 20,0 | 43,0 | 57,0 |
| 20,1 | 0 | 100,0 |
| 23,5 | 0 | 100,0 |
| 23,6 | 98,0 | 2,0 |
| 25,0 | 98,0 | 2,0 |
| 27,0 | 98,0 | 2,0 |

S_0 – среднее значение площади пика L-аргинина на хроматограммах раствора сравнения;

C_i – концентрация L-аргинина в испытуемом растворе, мг/мл;

C_0 – концентрация L-аргинина в растворе сравнения, мг/мл;

P – содержание L-аргинина в стандартном образце, %.

Результаты исследований

При определении устойчивости различных концентраций раствора L-аргинина к термомагнитному воздействию установлено, что воздействие сочетаний ИМП (1 мТл и 1,6 мТл) и теплового фактора (40° и 42°C) в течение 20 мин, влияния на структуру 5 %-го и 10 %-го растворов L-аргинина влияния не оказывали.

Для оценки влияния термомагнитного воздействия на количественное содержание L-A и цитруллина в экстрактах биоматериала в качестве анализируемых образцов использовались по 4 пробы гомогенатов кожи и мышц крыс. Из гомогенатов были приготовлены испытуемые растворы и проанализированы в соответствии с условиями, описанными в методиках определения L-A и цитруллина методом ВЭЖХ. Результаты отображены на рисунках 1–4.

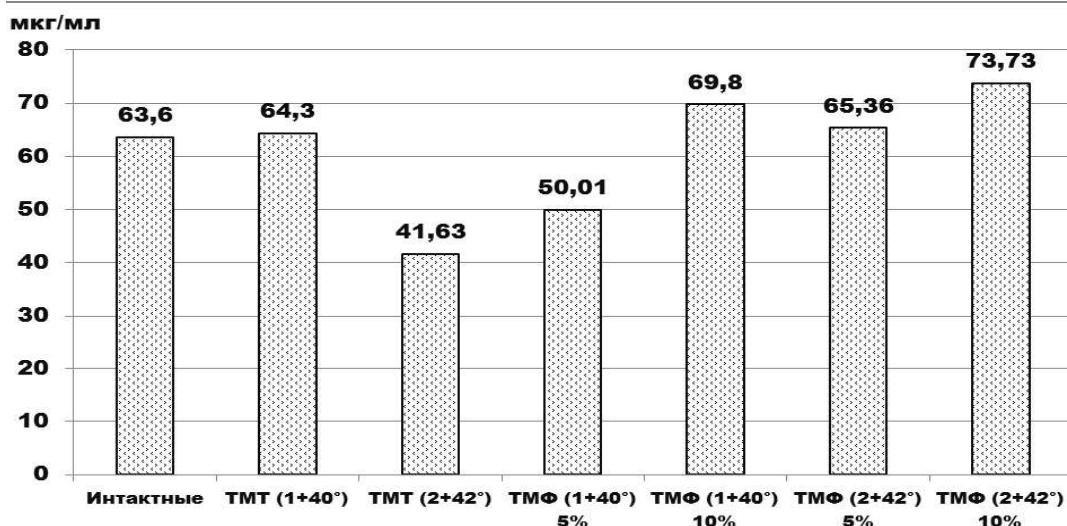


Рисунок 1 – Динамика количественного содержания L-A в экстрактах биоматериала (кожа)

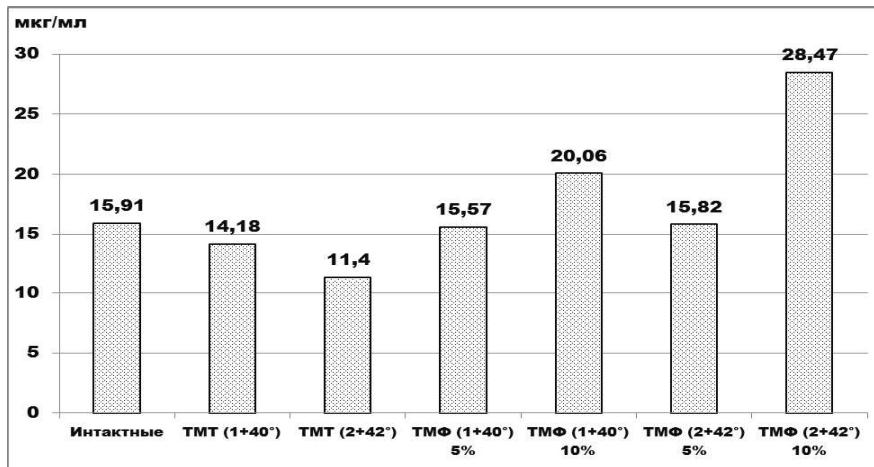


Рисунок 2 – Динамика количественного содержания L-A в экстрактах биоматериала (мышицы)

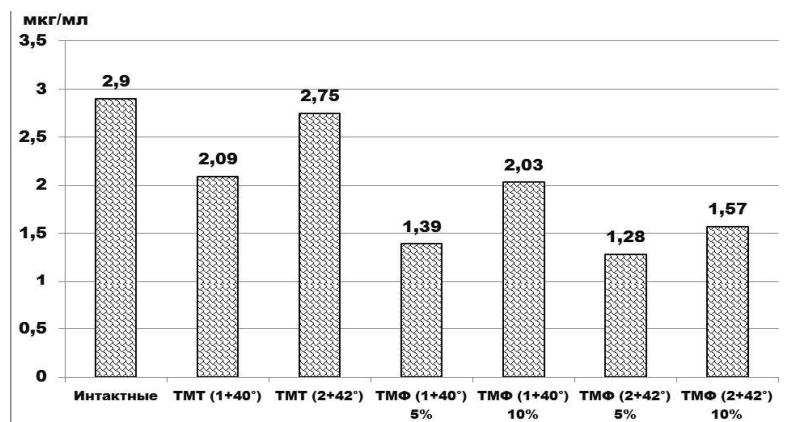


Рисунок 3 – Динамика количественного содержания цитруллина в экстрактах биоматериала (кожа)

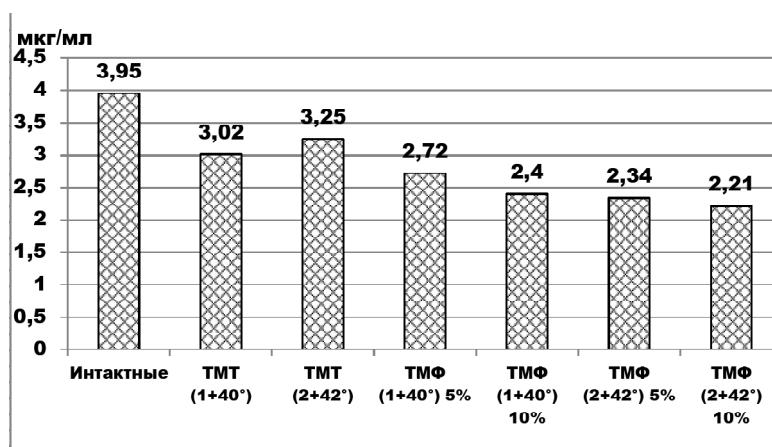


Рисунок 4 – Динамика количественного содержания цитруллина в экстрактах биоматериала (мышицы)

Результаты и обсуждение

Динамика количественного содержания L-A и цитруллина в экстрактах биоматериала (кожа) после ТМТ

Аргинин. ТМТ в группе № 2 (режим 1,0 мТл + 40 °C) приводила к статистически незначимому повышению уровня L-A. В группе № 3 (режим 2,0 мТл + 42 °C) – к снижению содержания L-A на 34,6 % (с 63,6 мкг/мл до 41,63 мкг/мл) ($p = 0,035$) (рисунок 1). $p = 0$

Цитруллин. ТМТ, наоборот, в группе № 2, приводила к значимому снижению его содержания на 27,9 % (с 2,9 мкг/мл до 2,09 мкг/мл) ($p = 0,035$) и практически не изменила его уровень в группе № 3 (режим 2,0 мТл + 42 °C) (рисунок 3).

Динамика количественного содержания L-A и цитруллина в экстрактах биоматериала (мышцы) после ТМТ

Аргинин. Уровень L-A в обоих режимах ТМТ снижался: в группе № 2 (режим 1,0 мТл + 40 °C) – на 10,9 % (с 15,91 мкг/мл до 14,18 мкг/мл); в группе № 3 (режим 2,0 мТл + 42 °C) – на 28,35 % (с 15,91 мкг/мл до 11,4 мкг/мл) ($p = 0,035$) (рисунок 2).

Цитруллин. Содержание цитруллина после ТМТ в группе № 2 (режим 1,0 мТл + 40 °C) практически не изменилось, но имело тенденцию к повышению на 4,1 % (с 2,9 мкг/мл до 3,02 мкг/мл); в группе № 3 (режим 2,0 мТл + 42 °C) повышение содержания цитруллина носило статистически значимый характер: – на 12,1 % (с 2,9 мкг/мл до 3,25 мкг/мл) ($p = 0,035$) (рисунок 4).

Динамика количественного содержания L-A и цитруллина в экстрактах биоматериала (кожа) после термомагнитофореза L-A

Аргинин. Уровень L-A повышался в группах 5, 6 и 7, причем, статистически достоверно при использовании 10 %-го раствора L-A (группы 5 и 7). В группе № 4 (режим 1,0 мТл + 40 °C) уровень L-A снижался на 21,3 % ($p = 0,035$) (рисунок 1).

Цитруллин. Уровень цитруллина во всех образцах гомогенатов кожи при использовании всех 4 режимов ТМФ был ниже, чем в образцах от интактных животных (рисунок 3).

Динамика количественного содержания L-A и цитруллина в экстрактах биоматериала (мышцы) после термомагнитофореза L-A

Аргинин. Отмечено значимое повышение (на 26,1 %) содержания L-A в группе № 5 (с 15,91 мкг/мл до 20,06 мкг/мл) ($p = 0,035$) и в группе № 7 (на 78,9 %) – с 15,91 мкг/мл до 28,47 мкг/мл) при использовании ТМФ 10 % раствора L-A в режим 2,0 мТл + 42 °C ($p = 0,001$).

Цитруллин Уровень цитруллина во всех образцах гомогенатов мышц при использовании всех 4-х режимов ТМФ был ниже, чем в образцах от интактных животных; причем, в группе № 7 (ТМФ 10 % раствора L-A в режим 2,0 мТл + 42 °C) уровень цитруллина снизился на 44,1 % (с 3,95 мкг/мл до 2,21 мкг/мл) ($p = 0,035$) (рисунок 4).

Обсуждение результатов

Средний суточный уровень потребления L-A удовлетворяется его эндогенным синтезом и поступлением с пищей, однако, при стрессе, физических нагрузках L-A становится эссенциальной аминокислотой, и организм нуждается в его экзогенном поступлении. L-A важен для синтеза белков и многих биологически активных молекул, но главная роль L-A в организме человека – синтез NO.

Синтез L-A в организме происходит, в основном, в почках из цитруллина, который, в свою очередь, образуется в слизистой тонкого кишечника из глутамина, поступающего с пищей. Кроме того, местами биосинтеза L-A из цитруллина являются клетки легких, эндотелий сосудов, скелетные мышцы. В свою очередь, в печени цитруллин, наоборот, может синтезироваться из аргинина и, поступая в кровь, вновь быть источником для ресинтеза L-аргинина в почках, сосудистом эндотелии, макрофагах и др. [6].

Результатом этих и других многоэтапных метаболических каскадов L-A и цитруллина является биосинтез NO [+], который вырабатывается непрерывно в эндотелии, нейронах, миоцитах, тромбоцитах, фибробластах, иммунных клетках, а также в клетках кожи, включая меланоциты, клет-

ки Лангерганса, и эндотелиальные клетки сосудов кожи [7, 8] и, что важно, кератиноциты, составляющие основную часть эпидермиса и экспрессирующие нейрональную изоформу синтазы оксида азота (NOS1) [9]. Фибробласты, которые находятся в дерме под слоем эпидермиса, экспрессируют как конститутивные, так и индуцируемые изоформы NOS [10]. Кроме того, существенное влияние на правильное формирование клеток рогового слоя оказывает структурный белок кожи филагрин, молекулы которого содержат L-А и цитруллин.

Все больше данных свидетельствует о существенной роли NO в механизме действия физических факторов (лазерное излучение, электростимуляция гладкой мускулатуры, физические факторы, вызывающие местное повышение температуры, магнитные поля.

В совокупности эти данные позволяют предположить, что «игра уровней» L-А и цитруллина в коже и мышцах экспериментальных животных в ходе ТМФ L-Аносит обоснованный, легитимный характер, так как метаболизм, а также функция L-А, L-цитруллина, а также L-орнитина, тесно переплетены и связаны с гомеостазом NO на тканевом и клеточном уровнях [11].

Заключение

1. Использованные варианты сочетаний импульсного магнитного поля и теплового фактора влияния на структуру 5 %-го и 10 %-го растворов L-аргинина влияния не оказывает.

2. Однократное 20-минутное локальное термомагнитное воздействие приводит к снижению количественного содержания L-аргинина и цитруллина в экстрактах из гомогенатов кожи и мышц крыс.

3. Однократная процедура термомагнитофореза 10 %-го раствора аргинина в обоих режимах приводит к достоверному повышению его количественного содержания и снижению количественного содержания цитруллина в коже и в мышцах

4. В тесте предельного плавания установлено (И.П. Жаворонок) достоверное увеличение выносливости экспериментальных животных, которое выражалось в увеличении плавания, после термомагнитного воздействия и термомагнитофореза 10 %-го раствора аргинина

6. Полученные результаты указывают на перспективность экспериментальных исследований в этом направлении.

1. Citrulline in elite sports: is there a point? / E.N. Bezuglov [et al.] // *Science and sport: current trends* – 2022. – Vol. 10, № 4. – P. 25–35.
2. Karle, I. L. An application of the symbolic addition method to the structure of L-arginine dehydrate // I. L. Karle, J. Karle // *Acta Cryst.* – 1964 – Vol. 17. – 835–841
3. Arginine Zwitterion is More Stable than the Canonical Form when Solvated by a Water Molecule // S. Im [et al.] // *J. Phys. Chem.* – 2008. – Vol. 112, № 40. – P. 9767–9770.
4. Улащик, В. С. Трансдермальное введение лекарственных веществ и физические факторы: традиции и инновации / В. С. Улащик. – Минск : Бел. наука, 2017. – 266 с.
5. Guo, Ch. Flow and magnetic field induced collagen alignment / Ch. Guo, L. J. Kaufman // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28(6). – P. 1105–1114..
6. Brosnan, M. E. Renal Arginine Metabolism / M. E. Brosnan, J., T. Brosnan // *The Journal of Nutrition*. – 2004. – Vol. 134, Issue 10. – P. 2791–2795.
7. Bruch-Gerharz, D. Nitric Oxide in Human Skin: Current Status and Future Prospects / D. Bruch-Gerharz, Th. Ruzicka, V. Kolb-Bachofen // *Journal of Investigative Dermatology*. – 1998. – Vol. 110, Iss.1. – P. 1–7.
8. Kubilus, J. The presence of citrulline in epidermal proteins / J. Kubilus, R. W. Waitkus, H. P. Baden // *Biochim Biophys Acta*. – 1979. – Vol. 581(1). – P. 114–121.
9. Cals-Grierson, M. M. Nitric oxide function in the skin / M. M. Cals-Grierson, A. D. Ormerod // *Nitric oxide*. – 2004. – № 10. – P. 179–193.
10. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms / R. Wang [et al.] // *J Invest Dermatol*. – 1996. – Vol. 106 (3). – P. 419–427.
11. Wiesinger, H. Arginine metabolism and the synthesis of nitric oxide in the nervous system / H. Wiesinger // *Prog. Neurobiol.* – 2001. – Vol. 64 (4). – P. 365–391.