

# АРГИНИН: БИОЛОГИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ, ВЛИЯНИЕ НА СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТА

*Н.П. Дмитренко, Т.О. Кишко, С.Г. Шандренко*

*Институт экологии и токсикологии им. Л.И.Медведя МОЗ Украины*

**Резюме.** Проведен обзор механизмов биологического действия аргинина. Исследовано влияние препарата Тивортин, содержащего L-аргинин, на эндогенный синтез NO. Установлено, что перитонеальная инъекция крысам раствора препарата приводит к усилению образования NO в организме, что сопровождается увеличением содержания нитритов и нитратов в моче и крови. По данным ЭПР-спектроскопии увеличивается содержание NO в ткани печени, усиливается функциональная активность митохондрий.

**Ключевые слова:** Тивортин, L-аргинин, NO.

## АРГІНІН: БІОЛОГІЧНА ДІЯ, ВПЛИВ НА СИНТЕЗ ОКСИДА АЗОТУ

*М.П. Дмитренко, Т.О. Кішко, С.Г. Шандренко*

**Резюме.** Проведено огляд механізмів біологічної дії аргініну. Досліджено вплив препарату Тивортин, який містить L-аргінин, на ендогенний синтез NO. Встановлено, що перитонеальна ін'єкція шурам розчину препарату призводить до підсилення утворення NO в організмі, що супроводжується підвищенням рівня нітритів та нітратів в сечі та крові. За даними ЕПР-спектроскопії збільшується вміст NO в тканині печінки, підсилюється функціональна активність мітохондрій.

**Ключові слова:** Тивортин, L-аргінин, NO.

## ARGININE: BIOLOGICAL EFFECT, INFLUENCE ON NITRIC OXIDE SYNTHESIS

*M.P. Dmitrenko, T.O. Kishko, S.G. Shandrenko*

**Summary.** Arginine biological effect was reviewed. «Tivortine» medication influence on endogenous NO synthesis has been investigated on the rats experiment. Peritoneal injection of the medication leads to NO synthesis intensification, that was determined with the increasing level of nitrite and nitrate in urine and blood samples. The increasing NO level in liver tissues and the mitochondrial functional activity intensification have been revealed by EPR investigation.

**Key words:** Tivortine, L-arginine, NO.

Для людей аргинин считается условно незаменимой аминокислотой. Его эндогенный синтез осуществляется главным образом из цитруллина, который синтезируется в слизистой тонкого кишечника как конечный продукт глутаминового/глутаматного метаболизма и током крови почти весь доставляется в почки, где при участии аспартата в цикле мочевой кислоты превращается в аргинин. Последний через почечные вены поступает в циркуляцию и разносится к различным клеткам и тканям организма. Синтез аргинина также возможен из цитруллина, орнитина и пролина, но он выражен слабо [3, 22].

Количество аргинина, синтезируемого у взрослого человека (примерно 2 грамма в день), достаточно, чтобы обеспечить его физиологические потребности в нормальных условиях. Значительные количества аргинина расходуются на синтез креатина, который является субстратом креатинкиназной ферментативной системы, ответственной в клетке за депонирование и транспорт энергии в виде КрФ от источников ее образования к местам использования. Взрослый организм в результате спонтанного, без участия ферментов, расщепления ежедневно теряет 1–2 г креатина, на синтез которого требуется 1,75–3,5 г аргинина [3, 22]. Поэтому для восполнения клеточного фонда креатина, необходимо дополнительное поступление его или аргинина из экзогенных источников.

Аргинин участвует также в синтезе полиаминов (путресцина, спермина, спермидина, агматина и др.), присутствующих во всех клетках в относи-

тельно больших, зачастую миллимолярных концентрациях. Особенно много полиаминов синтезируется клетками предстательной железы и выделяется с семенной жидкостью. В настоящее время считается, что полиамины содействуют пролиферации и дифференцировке, ингибируют апоптоз клеток, что, возможно, связано со способностью этих соединений активировать растворимую гуанилатциклазу и повышать уровень цГМФ. Показано влияние полиаминов на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы организма. С одной стороны полиамины проявляют антиоксидантную активность, перехватывая радикалы и способствуя экспрессии соответствующих протекторных белков за счет взаимодействия с ДНК, а с другой — окисление полиаминов приводит к образованию избытка перекиси водорода, который приводит к развитию оксидативного стресса [10].

В процессе декарбоксилирования аргинина образуется агматин. Недавние исследования показали, что агматин может быть нейромедиатором: он синтезируется в мозгу, сохраняется в синаптических везикулах определенных нейронов, высвобождается при деполяризации, связывается  $\alpha$ -2-адренорецепторами, блокирует NMDA рецепторные и связывающие другие лиганды катионные каналы, инактивируется агматиназой. Кроме того, агматин ингибирует NO-синтазы и индуцирует высвобождение некоторых пептидных гормонов [24]. Постоянный и довольно значительный расход аргинина в организме идет на синтез NO [9, 22], который усиливается в условиях индукции

соответствующей NO-синтазы при воспалительных процессах, сепсисе и др. патологиях.

При стрессовых состояниях, связанных с интенсификацией белкового и креатинового обмена, например, при больших физических нагрузках, инфекционных заболеваниях (в том числе септических состояниях), восстановлении после травм, заживлении ран при хирургических вмешательствах, ожогах, а также у детей в период интенсивного роста и некоторых наследственных заболеваниях, сопровождающихся дефицитом ферментов синтеза аргинина, аргинин становится незаменимым и обязательно должен в необходимых количествах поступать в организм извне с пищей, напитками, биодобавками или в виде инфузий. Здесь уместно отметить, что пероральный путь поступления аргинина является менее эффективным в сравнении с инфузиями, так как эта высокополярная аминокислота плохо всасывается в кишечнике, ее значительная часть легко метаболизируется микрофлорой кишечника и не поступает в кровяное русло. Всасывание аргинина из пищеварительной системы особенно снижается при различных дисбактериозах, сопровождающихся уменьшением pH. Поэтому в последнее время для перорального потребления аргинина предлагаются различные его производные (L-Arginine Alpha-Ketoglutarate, Arginine Ethyl Ester и др.), которые почти полностью всасываются в кровяное русло [6, 8], однако инфузия аргинина по-прежнему остается наиболее эффективным путем доставки его в организм.

L-аргинин используется в организме как строительный и энергетический материал, а также функционирует как сигнальная молекула. Он содержит положительно заряженную R-группу и в больших количествах входит в состав основных белков. Среди них ядерные белки протамины и гистоны, играющие исключительную роль в формировании структуры и регуляции функции генов, а также пептиды, такие как тафцин — тетрапептид с выраженным иммуномодуляторным действием. Поэтому при дефиците аргинина в первую очередь снижается синтез и уменьшается содержание этих белков, пептидов и полиаминов, например, в богатой ими сперме. Из аргинина, как глюкогенной аминокислоты, образуется D-глюкоза и гликоген. Аргинин стимулирует образование ряда цитокинов, а также высвобождение из гипофиза гормона роста и пролактина, а из поджелудочной железы глюкагона и инсулина; активирует углеводный и липидный обмен [13, 19, 20, 25].

Разностороннее участие аргинина в метаболизме, определяет широкий спектр его терапевтического действия и эффективность использования в составе диетических добавок. Он увеличивает мышечную массу, уменьшает объем жировой ткани, способствует нормализации состояния соединительной ткани. Аргинин, а также богатые им пептиды и белки, снижают рост патогенной микрофлоры, что связано с высоким положитель-

ным зарядом его боковой цепи и отрицательным зарядом внешней стенки бактерий, который значительно превышает подобный заряд в мембранах теплокровных. Являясь предшественником важных компонентов соединительной ткани: пролина и оксипролина, аргинин способствует заживлению ран, в том числе гнойных. Регулируя тонус гладкой мускулатуры, проницаемость и микроциркуляцию сосудов, аргинин снижает кровяное давление и ускоряет кровоток, что облегчает доставку кислорода к миокарду, головному мозгу, конечностям и др. органам. Аргинин противодействует тромбообразованию, снижает уровень холестерина в крови и предупреждает развитие атеросклероза. У людей с гиперхолестеринемией, атеросклерозом и различными сердечно-сосудистыми заболеваниями, включая ишемический инсульт, а также животных, у которых моделировались эти состояния, длительное пероральное поступление или периодические инфузии L-аргинина существенно улучшают функцию эндотелия и клиническую симптоматику. Аргинин участвует в коммуникации между нервными клетками и улучшает память, увеличивает бодрость и снижает депрессию, укрепляет иммунитет, повышает резистентность к инфекционным заболеваниям и ранним стадиям канцерогенеза, скорость заживления ран, а также повышает потенцию и стимулирует сперматогонез. Положительный эффект инфузии аргинина отмечается при сепсисе. Через превращение в орнитин в цикле аргинин участвует в обезвреживании аммиака в организме. Он снижает частоту апоптоза у клеток, подвергнутых повреждающим воздействиям. Потребности в аргинине возрастают при старении и физических нагрузках [1, 7, 11, 14, 17, 18, 21, 23, 25].

Такую многоплановость действия аргинина многие исследователи относят к его способности при введении в организм усиливать синтез оксида азота [4, 11, 14, 16]. Физиологические и токсические функции NO реализуются в результате сложных химических превращений, основными участниками которых являются переходные металлы, тиолы, кислород, супероксид и другие радикалы. При этом реализуются прямые (через образование нитрозотиолов, нитрозильных комплексов гемового и негемового железа) и опосредованные другими активными формами азота пути действия NO; через реакции S- и N-нитрозирования, нитрования, окисления, дезаминирования и другие осуществляется регуляция метаболических процессов или реализуются токсические эффекты [2]. Однако очевидность усиления синтеза NO при поступлении в организм аргинина представляется довольно спорной и не всегда подтверждается экспериментально [12, 26].

Трудно представить, что NO-синтазы, имеющие высокое сродство к аргинину ( $K_m$  у них находится в пределах микромолярных величин) испытывают в нем недостаток, поскольку его внутриклеточные концентрации исчисляются в миллимо-

лях. Однако, в последнее время показано, что введение аргинина может приводить к усилению синтеза NO в организме. Этот феномен, известный как «аргининовый парадокс», осуществляется при наличии в клетках определенных концентраций свободного асимметричного диметиларгинина (ADMA), который в условиях *in vivo* конкурирует с аргинином на уровне транспортера Y<sup>+</sup> и/или NO-синтаз. При высоких уровнях ADMA, угнетающих эндотелиальную NO-синтазу, введение L-аргинина восстанавливает ее активность, нормализует функцию эндотелия и сосудистый тонус [4, 15]. С другой стороны, направленность действия аргинина, опосредуемая через ускорение эндогенного синтеза NO, может быть различной в зависимости от состояния организма. Так, при выраженных воспалительных процессах, которые сопутствуют тяжело протекающим заболеваниям, таким как синдром системной воспалительной реакции и органной недостаточности, сепсис, атеросклероз, а также сопровождаются индукцией соответствующей формы NO-синтазы и развитием оксидативного стресса, введение аргинина может не только не оказать терапевтического действия на больного, но даже ухудшить его состояние за счет гиперпродукции пероксинитрита и других токсичных реактивных форм азота [5, 26]

В большинстве работ, в которых исследовали *in vivo* влияние аргинина, о синтезе NO судили по косвенным показателям. В настоящей работе нами с помощью метода ЭПР проведено прямое количественное определение интенсивности образования NO в печени крыс, а также исследовано количество стабильных метаболитов оксида азота (NO<sup>2</sup>-и NO<sup>3</sup>-) в сыворотке крови и моче.

### ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проводили на 36 крысах линии Вистар массой 230–250 г. За неделю до начала экспериментов из рациона питания животных были исключены овощи для уменьшения нитритно-нитратной нагрузки. Проведено 3 серии экспериментов (в каждой группе — по 6 крыс).

В качестве экзогенного источника аргинина использовали 4,2% раствор аргинина гидрохлорида, предоставленный фармацевтическим предприятием «ЮРИЯ ФАРМ» (Украина).

Эксперимент №1: контрольная группа — крысам внутрибрюшинно вводили 2 мл физ. раствора, опытная группа — внутрибрюшинно вводили 4,2% раствор аргинина гидрохлорида из расчета 8 мл/кг массы тела (L-аргинин — 336 мг/кг). Сразу после введения животные были посажены в мочесборные камеры на 1 сут. В суточной моче определяли диурез, содержание нитритов, нитратов и креатина.

Эксперимент №2: контрольная группа: внутрибрюшинно вводили 2 мл физ. раствора; опытная группа — внутрибрюшинно вводили 4,2% раствор аргинина гидрохлорида из расчета 8 мл/кг массы тела (L-аргинин — 336 мг/кг). Через 2 час после введения животных декапитировали, отби-

рали образцы крови и ткани печени. В сыворотке крови определяли содержание нитритов, нитратов и креатина. Образцы ткани печени замораживали в жидком азоте и проводили ЭПР-спектроскопическое исследование для определения концентрации NO в нитрозильных комплексах.

Эксперимент №3: для прямого количественного определения интенсивности образования NO в тканях органов использовали ловушку NO: за 30 мин до забоя внутрибрюшинно вводили 2,5 мл водного раствора диэтилдитиокарбомата натрия (ДТК) из расчета 500 мг/кг массы тела и подкожно — раствор цитрата двухвалентного железа (сульфат железа 37,5 мг/кг + цитрат натрия 187,5 мг/кг); контрольная группа — вводили ловушку NO (как описано выше), опытная группа: внутрибрюшинно вводили 4,2% раствор аргинина гидрохлорида из расчета 8 мл/кг массы тела (L-аргинин — 336 мг/кг). Через 1,5 час животным опытной группы вводили ловушку NO и через 30 мин декапитировали. Образцы ткани печени замораживали в жидком азоте и проводили ЭПР-спектроскопическое исследование для определения NO, захваченного ловушкой.

Спектр ЭПР регистрировали на радиоспектрометре «Varian E 109» (США) при температуре жидкого азота. Осаждение белка в сыворотке крови и моче проводили путем добавления к 2 мл образца 0,5 мл насыщенного Ba(OH)<sub>2</sub> и 0,2 мл 20% ZnSO<sub>4</sub> и удаления сформировавшегося осадка центрифугированием.

При определении нитрита к 200 мкл исследуемого образца добавляли 20 мкл конц. HCL и 20 мкл 37,5 мМ водного раствора сульфаниловой кислоты. Через 3 мин добавляли 20 мкл 0,1%-ного водного раствора *n*-1-нафтилэтилендиаминдигидрохлорида (NED). Через 40 мин измеряли оптическую плотность при 540 нм.

Для определения нитрата его восстанавливали в нитрит путем пропускания проб через кадмиевые колонки (0,5 X 2,5–3,0 см). Скорость элюирования не превышала 3–5 см<sup>3</sup>/мин. Восстановительная способность кадмиевых колонок, определяемая с использованием стандартного раствора нитрата, составляла более 90% и учитывалась при рас-

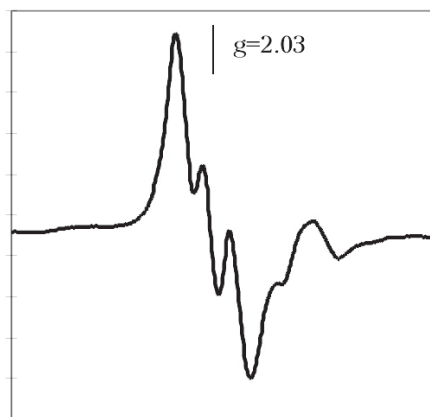


Рис.1. Сигнал ЭПР мононитрозильного комплекса ДТК-Fe<sup>2+</sup>-NO в ткани печени крыс.

Содержание нитритов и нитратов (суммарно), креатина в моче и сыворотке крови крыс при действии препарата «Тивортин»

Группа животных	Сыворотка крови			Суточная моча		
	(NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> ) мкг/мл	Креатинин мг/мл	(NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> )/креатин · 10 <sup>-3</sup>	(NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> )-диурез, мкг	Креатинин мг/мл	(NO <sub>2</sub> +NO <sub>3</sub> )/креатин · 10 <sup>-3</sup> , 1/мл
Контроль (группа 1)	3,13±,18	9,22±0,37	0,34±0,02	80,3±4,0	1,31±0,11	62±5
L-Аргинин (группа 2)	<b>5,00±0,63*</b>	8,77±0,40	<b>0,57±0,03*</b>	<b>157±32*</b>	1,30±0,12	121±11*

Примечание. \* – статистически достоверные различия в сравнении с контрольной группой, p<0,05.

четах. Подготовка колонок к работе включала последовательную промывку (по 3 мл) водой и аммиачным буфером pH 9,8 (указать молярность). Затем в колонки последовательно вносили 1 мл исследуемого р-ра образца, 0,25 мл аммиачного буфера pH 9,8 (такой же молярности) и 0,75 мл дист. воды. В элюате определяли содержание нитрита.

Креатинин в образцах сыворотки и мочи определяли по реакции с пикриновой кислотой с использованием набора реактивов «Фелисит».

Статистический анализ данных проводили по t-критерию Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

После введения крысам раствора аргинина суммарное содержание нитритов и нитратов в сыворотке крови и моче увеличилось соответственно в 1,6 и 2 раза (табл. 1). Содержание нитратов и нитритов в исследуемых образцах контрольных животных связано в большей степени с поступлением этих соединений с едой, однако значительное увеличение их количества после введения аргинина свидетельствует об интенсификации эндогенного синтеза NO.

Для прямого количественного определения скорости образования NO в организме была введена ловушка NO – комплекс ДТК-Fe<sup>2+</sup>. Ловушка способна накапливаться в тканях и связывать как свободный NO, так и перехватывать его с эндогенных нитрозильных комплексов. При этом образуется моонитрозильный комплекс ДТК-Fe<sup>2+</sup>-NO с ха-

рактерным триплетным сигналом ЭПР (gII=2,04; g+= 2,02; gcp=2,03; рис. 1). В отличие от эндогенных комплексов NO, комплекс «ловушка-NO» стабильный в биологической среде при действии кислорода и других окислителей. Поэтому интенсивность соответствующего сигнала ЭПР характеризует интенсивность синтеза NO в тканях. Под действием препарата Тивортин количество NO, зафиксированного ловушкой в ткани печени за 1 час, увеличилось на 26% (табл. 2). При количественной оценке интенсивность образования NO составил 0,87 и 1,1 мкмоль/(г·час) соответственно у контрольных и опытных животных. Полагается, что концентрация NO в тканях контрольных животных находится на уровне сотни нмоль. Сравнительно большое количество NO, зарегистрированное в ткани печени интактных животных, объясняется действием значительного количества введенного двухвалентного железа, необходимого для достижения требуемой концентрации ловушки в тканях. Если учесть это влияние, то скорость образования NO в печени крыс под действием препарата Тивортин оценивается как 0,3 мкмоль/(г·час), что приблизительно в 2 раза больше, чем у интактных животных.

Введение препарата, содержащего L-аргинин, на 13% усиливается сигнал ЭПР митохондриальных свободных радикалов и на 60% сигнал Mn<sup>2+</sup>-центров в печени, что указывает на усиление электроннотранспортных процессов. Увеличивается на 30% интенсивность сигнала Cu<sup>2+</sup>-центров (каталитические центры фермента супероксид-дизмутазы), что свидетельствует об усилении антирадикальных процессов.

Таблица 2  
Результаты ЭПР-исследования образцов ткани печени крыс

Параметр, отн.ед.	Группа животных	
	Контроль	L-Аргинин
Ловушка-NO	1+0,18	<b>1,26+0,18*</b>
Цитохром P-450	1+0,07	0,97+0,13
Mn <sup>2+</sup> -центры	1+0,08	<b>1,6+0,29*</b>
Cu <sup>2+</sup> -центры	1+0,17	<b>1,31+0,11*</b>
Митох. Q-своб.радикалы	1+0,08	<b>1,13+0,04*</b>
Mo <sup>7+</sup> -центры	1+0,26	1,12+0,19
Митох. ЖСЦ	1+0,04	0,93+0,09

Примечание. \* – статистически достоверные различия в сравнении с контрольной группой, p<0,05.

## ВЫВОДЫ

1. Введение крысам препарата Тивортин, содержащего L-аргинин, приводит к усилению образования оксида азота в организме, что сопровождается увеличением образования NO в ткани печени, а также суммарного содержания его стабильных метаболитов (NO<sup>2-</sup> и NO<sup>3-</sup>) в плазме крови и моче.

2. По данным ЭПР-спектроскопии введение крысам препарата Тивортин усиливает функциональную активность митохондрий.

## ЛИТЕРАТУРА

(в редакции)