

© С.Х.Аль-Шукри, Н.И.Чалисова, А.Н.Закуцкий, С.Ю.Боровец, А.И.Анискина, 2007
УДК 616.688:612.398.192]-092.4

*С.Х. Аль-Шукри, Н.И. Чалисова, А.Н. Закуцкий, С.Ю. Боровец,
А.И. Анискина*

ВЛИЯНИЕ АМИНОКИСЛОТ И ИХ МЕТАБОЛИТОВ НА РАЗВИТИЕ ОРГАНОТИПИЧЕСКОЙ КУЛЬТУРЫ ТКАНИ СЕМЕННИКОВ У КРЫС

S.Kh. Al-Shukri, N.I. Chalisova, A.N. Zakutsky, S.Yu. Borovets, A.I. Aniskina

EFFECTS OF AMINO ACIDS AND THEIR METABOLITES ON THE DEVELOPMENT OF ORGANOTYPICAL TISSUE CULTURE OF TESTES IN RATS

Кафедра урологии Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Институт физиологии имени академика И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербургский Институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН, Россия

РЕФЕРАТ

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Изучить влияние сверхмалых доз (10^{-10} – 10^{-14} моль/л) 20 кодируемых аминокислот и их метаболитов на развитие органотипической культуры семенников крысы. **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ.** Семенники трехмесячных крыс линии Вистар разделяли на эксплантаты (фрагменты величиной 1 мм³). Эксплантаты помещали в чашку Петри на коллаген и культивировали в CO₂-инкубаторе в питательной среде. Через трое суток вокруг эксплантата формируется зона роста, состоящая из клеток Лейдига, клеток Сертолли и сперматозоидов. Для количественной оценки определяли индекс площади – отношение общей площади эксплантата к площади центральной зоны. **РЕЗУЛЬТАТЫ.** Из 20 кодируемых аминокислот достоверное влияние на индекс площади более чем в одной концентрации было отмечено у шести L-аминокислот: изолейцина (31±6%), лизина (25±4%), аргинина (26±5%). Ни один из структурных аналогов изолейцина (лейцин, норлейцин, валин) не оказался аналогично эффективным. Из всех метаболитов L-аргинина стимулируют рост семенников: L-орнитин (26±4%), мочевины (31±4%), креатин (20±3%) и L-цитруллин (22±3%), угнетает – оксид азота (нитроглицерин, –100%). Глутатион устраняет антипролиферативные эффекты оксида азота (25±7% vs –13±3% в концентрации 10^{-13} моль/л), за счёт чего увеличивает эффективность L-аргинина. При формировании смеси из наиболее активных аминокислот концентрация аргинина должна быть в 10 раз больше концентрации L-орнитина и креатина, но в 10 раз меньше концентрации L-лизина, L-изолейцина и L-цитруллина. **ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Наиболее перспективными аминокислотами при использовании в клинической практике лечения мужского бесплодия являются L-изолейцин, L-аргинин и L-лизин. Впервые доказано, что максимальная активность в отношении роста семенников принадлежит L-изолейцину. Оксид азота – единственный метаболит L-аргинина с антипролиферативным эффектом. Комбинация L-аргинина с глутатионом устраняет токсичный эффект оксида азота. Определено долевое соотношение аминокислот, необходимое для максимальной стимуляции семенников.

Ключевые слова: органотипическая культура семенников, аминокислоты, сверхмалые дозы, L-изолейцин, L-аргинин, L-лизин.

ABSTRACT

THE AIM of the investigation was to study effects of extra low doses (10^{-10} – 10^{-14} mol/l) of 20 coded amino acids and their metabolites on the development of organotypical culture of rat testes. **MATERIAL AND METHODS.** The testes of 3 months old Wistar rats were divided into explants (1 mm³ fragments). The explants were placed in a Petri dish onto collagen and cultured in a CO₂ -incubator in nutrient medium. Three days later the growth zone consisting of Leydig cells, Sertoli cells and spermatozoa was formed. For a quantitative assessment the area index was determined as the ratio of the total explant area to the central zone area. **RESULTS.** Reliable effects on the area index more than in one concentration was noted in 6 out of 20 coded amino acids: isoleucine (31±6%), lysine (25±4%), arginine (26±5%). None of the structural analogues of isoleucine (leucine, norleucine, valine) proved to be similarly effective. From all metabolites of L-arginine the testes growth is stimulated by L-ornithine (26±4%), urea (31±4%), creatine (20±3%); and L-citrulline (22±3%); and inhibited by nitric oxide (nitroglycerine – 100%). Glutathione eliminates antiproliferative effects of nitric oxide (25±7% vs 13±3% in concentration 10^{-13} mol/l) and thus increases effectiveness of L-arginine. In forming the mixture of the most active amino acids the arginine concentration must be 10 times more than the concentration of L-ornithine and creatine, but 10 times less than the concentration of L-lysine, L-isoleucine and L-citrulline. **CONCLUSION.** L-isoleucine, L- arginine and L-lysine are the most perspective amino acids for treatment of male infertility in clinical practice. It was first proved that L-isoleucine is maximally active for growth of testes. Nitric oxide is the only L-arginine metabolite with antiproliferative effect. A combination of L-arginine with glutathione eliminates the toxic effect of nitric oxide. A share correlation of amino acids necessary for maximal stimulation of the testes is established.

Key words: organotypical culture of testes, amino acids, extra low doses, L-isoleucine, L-arginine, L-lysine.

ВВЕДЕНИЕ

Аминокислоты являются строительным материалом для создания белковых молекул. Поэтому

многих исследователей интересует возможность использования аминокислот в терапии заболеваний, обусловленных недостаточным синтезом белка.

Необходимо учитывать, что аминокислоты представляют собой неоднородную группу химических соединений, которые не только входят в состав белка, но и используются многочисленными ферментами с образованием биологически активных метаболитов. Этим объясняется различие клинических эффектов разных аминокислот [1].

При секреторной форме мужского бесплодия всегда имеет место недостаточный синтез белка. Однако до сих пор не проводилось систематизированных исследований по оценке эффективности использования разных аминокислот в лечении мужского бесплодия. Из всех известных аминокислот с этой целью использовался только L-аргинин. Мета-анализ клинических исследований показал, что терапия L-аргинином в дозе 4–8 г/сутки на протяжении от 1 до 6 месяцев приводит к существенному увеличению числа прогрессивно-подвижных форм сперматозоидов у 2/3 мужчин с бесплодием секреторной этиологии [2].

Моделирование секреторного бесплодия является важной проблемой современной экспериментальной урологии. В большинстве моделей, предложенных к настоящему времени, не удавалось воспроизвести этапы развития мужского бесплодия секреторной этиологии [3, 4]. Для достижения этой задачи мы использовали метод органотипического культивирования ткани семенников крыс. Данная модель имеет целый ряд преимуществ. Во-первых, этот метод позволяет исследовать местное воздействием биологически активных веществ, то есть исключаются системные эффекты нервной и эндокринной систем. Во-вторых, в органотипической культуре сохраняются нормальные тканевые взаимодействия между отдельными клетками (в отличие от диссоциированной культуры клеток Лейдига или Сертолли). И наконец, экономические затраты на органотипическое культивирование тканей значительно меньше, чем в случае проведения экспериментов на интактных животных [5, 6].

Органотипическое культивирование ткани семенников впервые описано С. Champey в 1920 году, но практически не применялось в научных исследованиях. В 2006 году две группы французских лабораторий независимо друг от друга подробно охарактеризовали данный метод. Ими было доказано, что органотипическая культура на протяжении двух недель с момента начала культивирования сохраняет основные функции интактных семенников: стероидогенез (синтез тестостерона) и гаметогенез (образование сперматозоидов) [3, 4].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Методика органотипического культивирования семенников характеризуется высокой воспроизво-

димостью результатов при точном соблюдении всех его этапов. Семенники половозрелых 3-месячных крыс линии Вистар разделяли на мелкие фрагменты величиной около 1 мм³ – эксплантаты. Последние помещали в чашку Петри с коллагеновым покрытием (20 эксплантатов в каждой чашке Петри) и культивировали в 3 мл питательной среды. Использовали среду с pH 7,2 следующего состава из расчета на 100 мл: раствор Хенкса – 41 мл, среда Игла – 30 мл, фетальная сыворотка теленка – 25 мл, глюкоза 40% – 1 мл, инсулин – 2,5 мл (100 ЕД) и гентамицин – 0,5 мл (20 мг). В опытной группе в чашки Петри дополнительно добавляли 15 мкл раствора тестируемых веществ фирмы «Sigma» в различной концентрации (от 10⁻¹⁰ моль/л до 10⁻¹⁴ моль/л). В контрольной группе добавляли 15 мкл питательной среды. Для строгого соблюдения температурного режима и состава газовой среды эксплантаты культивировались в CO₂-инкубаторе в среде с 5% содержанием CO₂ при температуре 36,7 °C в течение трех суток [5, 6].

В эксплантатах после трех суток культивирования при световой микроскопии отчетливо определялись две зоны: центральная (более плотная) и периферическая. Центральная зона была представлена клетками, исходно размещенными на коллагеновой подстилке. Периферическая зона (или зона роста) образована клетками, которые мигрировали из исходной ткани и пролиферировали на коллагеновой подложке. По данным литературы, периферическая зона эксплантата состоит из клеток Лейдига, клеток Сертолли и сперматозоидов на различных этапах созревания [3, 4]. Для количественной оценки роста эксплантатов определялся индекс площади (ИП), который рассчитывался в условных единицах как отношение площади всего эксплантата к площади его центральной зоны. Для визуализации эксплантатов применяли микротелескоп для микроскопа (МТН-13 «Альфа-Телеком», Россия). При тестировании каждого вещества использовали 10 крыс, получая по 20 эксплантатов из семенников каждого животного. ИП выражался в процентах относительно контроля. Достоверность различий ИП оценивали с помощью t-критерия Стьюдента.

Аминокислоты и их метаболиты тестировали в сверхмалых дозах (ультрамалых концентрациях). Под термином «сверхмалая доза» подразумевают такую дозу вещества, которая создает концентрацию на несколько порядков ниже равновесной константы взаимодействия вещества со своим эффектором. По данным разных авторов, сверхмалая доза составляет меньше 10⁻¹⁰–10⁻¹² моль/л [7]. Эффективность сверхмалых доз биологичес-

Таблица 1

**Аминокислоты, достоверно влияющие на индекс
площади органотипической культуры семенников
через 3 суток культивирования**

Компоненты	10 ⁻¹⁰ моль/л	10 ⁻¹¹ моль/л	10 ⁻¹² моль/л	10 ⁻¹³ моль/л	10 ⁻¹⁴ моль/л
L-изолейцин	22±7%*	26±4%*	31±6%*	19±3%*	25±7%*
L-лизин	25±5%*	-4±3%	25±4%*	19±6%*	13±7%
L-аргинин	8±2%	19±2%*	26±5%*	12±4%	-5±3%
L-лейцин	4±7%	8±3%	21±3%*	9±6%	3±2%
L-пролин	7±4%	-2±5%	16±4%*	6±2%	8±3%
L-гистидин	0±4%	2±6%	-15±4%*	-4±6%	3±1%

* – значения достоверны при $p < 0,05$.

Таблица 2

**Влияние на развитие органотипической культуры
семенников структурных аналогов L-изолейцина**

Компоненты	10 ⁻¹⁰ моль/л	10 ⁻¹¹ моль/л	10 ⁻¹² моль/л	10 ⁻¹³ моль/л	10 ⁻¹⁴ моль/л
L-изолейцин	22±7%*	26±4%*	31±6%*	19±3%*	25±7%*
L-лейцин	4±7%	8±3%	21±3%*	9±6%	3±2%
L-норлейцин	4±6%	9±3	25±3%*	10±1	-4±5
L-валин	-5±4	-11±3	13±3%**	-2±3	-8±4

* – значения индекса площади достоверны при $p < 0,05$, ** – значения индекса площади достоверны при $p < 0,1$.

ки активных веществ продемонстрирована в опытах на разных биологических моделях (изолированные ферменты, клетки животного растительного происхождения, ткани, лабораторные животные), а также в клинических исследованиях. Многочисленными экспериментами доказана двухфазность эффекта биологически активного вещества.

Последнее активно в диапазоне обычных концентраций, затем по мере уменьшения концентрации эффект пропадает и появляется вновь лишь в диапазоне сверхмалых доз. Диапазон концентраций между двумя пиками активности получил название «мертвой зоны» [7]. «Знак эффекта» чаще всего остается прежним, но в некоторых случаях меняется на прямо противоположный. Например, известный антикоагулянт аспирин в ультрамалых концентрациях (10⁻³⁰ мг/кг) обладает мощным протромботическим эффектом [8]. Важная особенность сверхмалых доз заключается в том, что их эффект развивается на фоне наличия того же вещества в многократно превышающих концентрациях. Например, при одновременном введении крысам двух доз аспирина: классической и сверхмалой – свертывание крови увеличилось, то есть эффект сверхмалой дозы оказался сильнее [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ

В первой серии опытов мы исследовали влияние всех 20 кодируемых аминокислот в концентрации от 10⁻¹⁰ до 10⁻¹⁴ моль/л. Оказалось, что достоверно влияют на развитие органотипической культуры семенников только шесть L-аминокислот: изолейцин, аргинин, лизин, лейцин, пролин, гистидин. Остальные 14 L-аминокислот (глицин, аланин, валин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, цистеин, серин, метионин, фенилаланин, триптофан, треонин, тирозин) не оказали достоверного влияния на развитие органотипической культуры семенников. Выяснилось, что концентрационная ширина пика активности у разных аминокислот имеет существенные отличия. L-изолейцин, L-аргинин и L-лизин характеризуются широким пиком активности, в то время как L-лейцин, L-пролин и L-гистидин были эффективны только в концентрации 10⁻¹² моль/л. Причем, L-гистидин оказалась единственной аминокислотой, которая угнетает развитие органотипической культуры ткани семенников (табл. 1).

Во второй серии опытов мы исследовали структурные аналоги L-изолейцина: L-лейцин, L-норлейцин, L-валин. Все они относятся к группе аминокислот с алифатическим радикалом и отличаются от L-изолейцина только числом аминокислотных групп или их расположением. Результаты наших исследований показали, что L-изолейцин является уникальной аминокислотой, так как все три ее структурных аналога эффективны только при одной концентрации. Необходимо также отметить, что пик активности всех четырех аминокислот приходится на 10⁻¹² моль/л (табл. 2).

В третьей серии опытов были изучены эффекты метаболитов L-аргинина. В отличие от большинства других аминокислот, L-аргинин метаболизируется большим числом ферментов. Причем до сих пор не выяснено, действием какого метаболита этой аминокислоты обусловлен наибольший клинический эффект. В научной литературе все положительные эффекты L-аргинина связывают только с одним его метаболитом – оксидом азота (NO). Тем не менее, доноры NO (например, нитраты) не могут воспроизвести большинство биологических эффектов L-аргинина. Поэтому нами были подробно исследованы метаболиты L-аргинина, локально синтезирующиеся в семенниках [3]. NO, как высоко реакционноспособное соединение, не мог быть использован в органотипической культуре, поэтому в качестве независимого от L-аргинина донора NO нами был исследован эффект нитроглицерина (табл. 3).

Известно, что фермент аргиназа гидролизует L-аргинин до L-орнитина и мочевины. По нашим

Таблица 3

Влияние метаболитов L-аргинина на индекс площади органотипической культуры семенников через трое суток культивирования. Ферменты биосинтеза креатина: аргинин-глицин-амидинотрансфераза, гуанидиноацетат-N-метилтрансфераза

Фермент	Метаболит L-аргинина	10^{-10} моль/л	10^{-11} моль/л	10^{-12} моль/л	10^{-13} моль/л	10^{-14} моль/л
аргиназа	орнитин мочевина	$4 \pm 3\%$ $10 \pm 5\%$	$6 \pm 2\%$ $14 \pm 4\%^{**}$	$3 \pm 4\%$ $20 \pm 3\%^*$	$-15 \pm 2\%^*$ $31 \pm 4\%^*$	$26 \pm 4\%^*$ $9 \pm 3\%$
синтаза оксида азота	цитруллин оксид азота (нитроглицерин)	$12 \pm 5\%$ $-100\%^*$	$22 \pm 3\%^*$ $-100\%^*$	$-4 \pm 3\%$ $-29 \pm 7\%^*$	$3 \pm 4\%$ $-13 \pm 3\%^{**}$	$6 \pm 2\%$ $4 \pm 4\%$
два фермента	креатин	$9 \pm 2\%$	$6 \pm 4\%$	$4 \pm 2\%$	$20 \pm 3\%^*$	$0 \pm 2\%$

данным, орнитин обладает характерным двойным пиком активности: в концентрации 10^{-13} моль/л он незначительно угнетает рост эксплантатов семенников ($-15 \pm 2\%$), а в концентрации 10^{-14} моль/л существенно стимулирует их рост ($26 \pm 4\%$). Выяснилось также, что мочевина достоверно стимулирует развитие органотипической культуры семенников в трех концентрациях (10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13}). Это создает предпосылки для ее использования в качестве самостоятельного препарата.

Фермент NO синтаза окисляет L-аргинин до L-цитруллина и NO. По результатам наших исследований, L-цитруллин стимулирует пролиферацию клеток органотипической культуры семенников в концентрации 10^{-11} моль/л ($22 \pm 3\%$). В качестве независимого от аргинина донора NO мы использовали нитроглицерин. Выяснилось, что нитроглицерин значительно угнетает развитие семенников в четырех концентрациях: от 10^{-10} до 10^{-14} моль/л (до -100% в концентрации 10^{-10} – 10^{-11} моль/л).

L-аргинин превращается в креатин с помощью двух ферментов (аргинин-глицин-амидинотрансфераза и гуанидиноацетат-N-метилтрансфераза). Мы выяснили, что креатин увеличивает индекс площади органотипической культуры семенников в одном диапазоне концентраций ($20 \pm 3\%$ в концентрации 10^{-13} моль/л), причем пик его активности на порядок отстает от аргинина.

Таким образом, из всех метаболитов аргинина антипролиферативным эффектом обладает только NO, поэтому в четвертой серии опытов нами были изучены научно-обоснованные пути устранения вредных эффектов данного метаболита. Известно, что эффект NO реализуется либо через нитрозирование тиоловых групп, либо через активацию растворимой гуанилатциклазы. Активация растворимой гуанилатциклазы приводит к увеличению уровня цГМФ, изменению уровня кальция и функционирования ряда Ca^{2+} -зависимых белков. В дальнейшем цГМФ расщепляется фосфодиэстеразами [9, 10].

Для изучения нитрозотиольного пути реализа-

ции эффектов NO нами был использован тиол-содержащий трипептид – глутатион. При совместном применении субпороговых концентраций глутатиона и нитроглицерина (10^{-13} моль/л) получен стимулирующий эффект ($25 \pm 7\%$), превышающий таковой у изолированного глутатиона ($16 \pm 5\%$). Аналогичные результаты были получены и при использовании смеси из субпороговых концентраций глутатиона и L-аргинина (рис. 1). Таким образом, глутатион эффективно устраняет антипролиферативные эффекты NO и за счет этого увеличивает эффективность L-аргинина.

Для изучения метаболического пути NO, связанного с активацией растворимой гуанилатциклазы нами был использован силденафил (Виагра®) – селективный ингибитор фосфодиэстеразы V – фермента, который расщепляет цГМФ и прерывает эффекты растворимой гуанилатциклазы. Мы исследовали две концентрации виагры: 2 нг (средняя сывороточная концентрация при приеме 50 мг виагры) и 20 нг (средняя тканевая концентрация при приеме 50 мг виагры) [11]. Выяснилось, что вне зависимости от концентрации, виагра умеренно стимулирует рост эксплантатов семенников: $18 \pm 4\%$

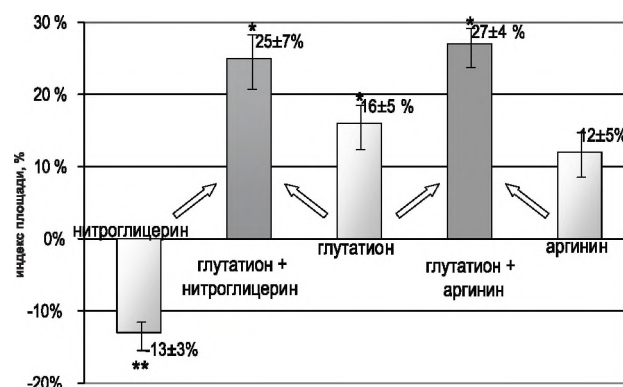


Рис. 1. Влияние глутатиона на эффекты нитроглицерина и L-аргинина. Столбики светло-серого цвета отражают индекс площади при изолированном применении субпороговых концентраций нитроглицерина, глутатиона или L-аргинина. Столбики темного цвета демонстрируют индекс площади, полученный при совместном инкубировании глутатиона с нитроглицерином и глутатиона с L-аргином.

Индекс площади при использовании смеси, состоящей из разных концентраций виагры и L-аргинина

Доза салденафила	L-аргинин				
	10 ⁻¹¹ моль/л (8±2%)	10 ⁻¹¹ моль/л (19±2%)	10 ⁻¹² моль/л (26±5%)	10 ⁻¹³ моль/л (12±4%)	10 ⁻¹⁴ моль/л (-5±3%)
виагра 2 нг (18±4%)	21±4%	25±3%	17±5%	21±3%	21±4%
виагра 20 нг (19±6%)	15±3%	10±4%	17±3%	15±6%	23±3%

(для 2 нг) или 19±6% (для 20 нг). Тем не менее, использование смеси L-аргинина с виагрой не оказывало более выраженного влияния на пролиферацию клеток органотипической культуры ткани семенников (табл. 4).

В пятой серии опытов были исследованы эффекты смеси из наиболее активных аминокислот и их метаболитов. При использовании одинаковых эффективных концентраций L-аргинина и L-лизина индекс площади не отличался от контроля. При этом, если концентрация L-лизина была на порядок больше концентрации L-аргинина, то отмечалось существенное увеличение зоны роста. И наоборот, при концентрации L-аргинина в 10 раз большей концентрации L-лизина мы наблюдали угнетение роста эксплантатов органотипической культуры семенников (табл. 5). Аналогичные опыты были проведены и с другими смесями аминокислот. Выяснилось, что для максимальной стимуляции семенников концентрация L-аргинина должна быть в 10 раз больше концентрации L-орнитина и креатина, но в 10 раз меньше, чем концентрация L-изолейцина, L-лизина и L-цитруллина. Единственным метаболитом, который

«выбивается» из описанной закономерности оказалась мочевины, которая стимулирует пролиферацию клеток в органотипической культуре семенников вне зависимости от долевого соотношения с L-аргинином (табл. 6).

Нерешенным остается вопрос практического применения L-аргинина в связи с отсутствием его адекватной лекарственной формы. В настоящее время L-аргинин выпускается в форме биологически активных добавок, содержащих чистый L-аргинин. Длительный прием подобных биодобавок приводит к развитию щелочного гастрита, так как pH чистого раствора L-аргинина равен 13. Другой лекарственной формой L-аргинина является «Гепасол» – фармакологический препарат, предназначенный для лечения печеночной энцефалопатии. «Гепасол» достоверно стимулирует развитие органотипической культуры семенников в трех из пяти исследованных нами концентраций: $18\pm4\% \times (10^{-10} \text{ моль/л})$, $28\pm7\% \times (10^{-11} \text{ моль/л})$, $32\pm4\% \times (10^{-12} \text{ моль/л})$, $15\pm6\% (10^{-13} \text{ моль/л})$, $10\pm6\% (10^{-14} \text{ моль/л})$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Лечение секреторной формы мужского бесплодия представляет собой актуальную проблему современной урологии. Общим признаком данной неоднородной группы заболеваний является снижение интенсивности белкового синтеза. В нашем

исследовании мы изучили эффекты 20 кодируемых аминокислот на развитие органотипической культуры ткани семенников. Установлено, что на ее развитие достоверно влияют только шесть аминокислот (L-изолейцин, L-аргинин, L-лизин, L-лейцин, L-пролин и L-гистидин). В результате экспериментов выяснилось, что ширина пика активности у разных аминокислот имеет существенные отличия. L-лейцин, L-пролин и L-гистидин оказались эффективны только в концентрации 10⁻¹² моль/л, тогда как L-изолейцин, L-аргинин и L-лизин характеризуются широким пиком активности. Результаты наших экспериментов по

Влияние на развитие органотипической культуры семенников смеси, состоящей из разных концентраций L-аргинина и L-лизина

Долевое соотношение аминокислот в смеси	Концентрация аминокислот, моль/л		Индекс площади, %
	L-аргинин	L-лизин	
Одинаковая концентрация	10 ⁻¹² 10 ⁻¹³	10 ⁻¹² 10 ⁻¹³	1±3% 5±4%
Концентрация L-лизина в 10 раз больше	10 ⁻¹² 10 ⁻¹³	10 ⁻¹¹ 10 ⁻¹²	27±4%* 36±3%*
Концентрация L-аргинина в 10 раз больше	10 ⁻¹¹ 10 ⁻¹²	10 ⁻¹² 10 ⁻¹³	-12±4% -32±6%*

Влияние на развитие органотипической культуры семенников смеси, состоящей из разных концентраций L-аргинина и мочевины

Долевое соотношение в смеси	Концентрация, моль/л		Индекс площади, %
	L-аргинин	мочевина	
Одинаковая концентрация	10 ⁻¹² 10 ⁻¹³	10 ⁻¹² 10 ⁻¹³	26±5%* 32±7%*
Концентрация L-аргинина в 10 раз больше	10 ⁻¹²	10 ⁻¹³	18±3%*
Концентрация L-аргинина в 10 раз больше	10 ⁻¹³	10 ⁻¹²	16±4%*

применению органотипической культуры позволяют предположить, что клинической эффективностью обладают только те вещества, у которых активность проявляется как минимум в двух концентрациях. Причем, чем более широкий спектр этой активности, тем больше вероятность достижения значимого клинического эффекта [5]. Таким образом, в клинической практике наиболее перспективными аминокислотами для лечения мужского бесплодия являются L-изолейцин, L-аргинин и L-лизин.

Максимально эффективным стимулятором роста эксплантатов семенников оказался L-изолейцин, поэтому во второй серии опытов были исследованы структурные аналоги L-изолейцина: L-лейцин, L-норлейцин и L-валин. По данным наших исследований, L-изолейцин является уникальной аминокислотой, так как все три структурных аналога были эффективны только при одной концентрации. Любопытно, что пик активности всех четырех аминокислот приходится на концентрацию 10^{-12} моль/л. Причем данная закономерность отмечена и в экспериментах на других органах и тканях. В доступной нам научной литературе отсутствуют сведения о роли L-изолейцина в отношении функционирования семенников. На модели изолированно перфузируемых яичек крыс доказано, что основной аминокислотой, захватываемой семенниками, является L-лейцин [12]. Транспорт L-изолейцина в этом исследовании не изучался, но так как эти две аминокислоты имеют сходную структуру, можно предположить, что L-изолейцин также эффективно захватывается семенниками.

Известно, что L-аргинин, в отличие от других аминокислот, метаболизируется многочисленными ферментами, и до сих пор не ясно, с каким конкретно метаболитом аминокислоты связан ее существенный клинический эффект в терапии мужского бесплодия секреторной этиологии. По данным литературы, в ткани семенников из L-аргинина образуется 5 основных метаболитов: L-орнитин, мочевина, L-цитруллин, NO и креатин [2]. Доказано, что все перечисленные метаболиты, за исключением NO, стимулируют развитие органотипической культуры ткани семенников. L-орнитин является предшественником полиаминов – хорошо известных стимуляторов пролиферации и дифференцировки клеток. Кроме того, L-орнитин представляет собой основной низкомолекулярный метаболит L-аргинина в организме человека [13]. Мочевина стимулирует развитие семенников в трех концентрациях (10^{-11} , 10^{-12} и 10^{-13} моль/л), что создает предпосылки для ее использования в качестве самостоятельного препарата. Основной механизм действия мочевины связан с защитой белков от

протеолитического разрушения [14]. Другой метаболит L-аргинина – L-цитруллин – также стимулирует развитие органотипической культуры семенников. На сегодняшний день известен только один метаболический путь L-цитруллина – превращение в L-аргинин [15]. Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о возможности и целесообразности применения L-цитруллина в клинической практике в качестве «аргинин-сохраняющего» препарата.

По нашим данным, единственным метаболитом L-аргинина с выраженным антипролиферативным эффектом является NO. Таким образом, устранение цитостатического действия NO является задачей, решение которой позволит значительно повысить клиническую эффективность L-аргинина как стимулятора семенников.

Известно, что для реализации физиологического эффекта NO необходимы органические вещества с тиоловыми группами. Действительно, при совместном использовании тиол-содержащего вещества глутатиона с нитроглицерином получен стимулирующий эффект, превышающий эффект при изолированном применении глутатиона. Аналогичные результаты получены при использовании смеси из L-аргинина и глутатиона. Таким образом, глутатион эффективно устраняет антипролиферативные эффекты NO, за счет чего существенно увеличивает эффективность L-аргинина.

По данным литературы, NO в небольших концентрациях стимулирует пролиферацию клеток [16]. Виагра (силденафил) блокирует фосфодиэстеразу – фермент, нейтрализующий цГМФ, который образуется под действием растворимой гуанилатциклазы, активированной NO [11]. Таким образом, виагра потенцирует полезные эффекты NO. По результатам нашего исследования, виагра умеренно стимулирует рост эксплантатов семенников, однако комбинация L-аргинина с виагрой не приводит к существенному усилению стимулирующего эффекта. Таким образом, маловероятно, чтобы положительный эффект L-аргинина был связан с образованием небольших количеств NO.

Логично было бы предположить, что стимулирующий эффект смеси из наиболее активных аминокислот или метаболитов окажется более выраженным. Полученные нами результаты показали, что для максимальной стимуляции семенников в смеси биологически активных веществ должно соблюдаться их определенное долевое соотношение. Так, концентрация L-аргинина должна быть в 10 раз больше концентрации L-орнитина или креатина, но в 10 раз меньше концентрации L-цитруллина, L-изолейцина и L-лизина.

В завершающей серии опытов были исследованы эффекты «Гепасола» – фармакологического препарата, содержащего большие дозы L-аргинина с примесью важнейших витаминов. Проведенные нами эксперименты показали, что эффективность «Гепасола» не только не уступает, но и превосходит эффективность L-аргинина. Если L-аргинин увеличивает индекс площади в двух из пяти тестируемых концентраций, то «Гепасол» обладает аналогичным эффектом в трех концентрациях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование позволило сделать ряд выводов:

1. В терапии секреторных форм мужского бесплодия наиболее перспективными аминокислотами являются L-изолейцин, L-аргинин и L-лизин. Максимальная активность в отношении стимуляции роста эксплантатов семенников принадлежит L-изолейцину.
2. Эффективность L-изолейцина значительно больше, чем его структурных аналогов.
3. Из всех метаболитов L-аргинина: L-орнитин, мочевины, L-цитруллин и креатин стимулируют рост органотипической культуры ткани семенников крысы. NO – единственный метаболит L-аргинина, оказывающий обратный эффект.
4. Глутатион увеличивает эффективность L-аргинина в отношении стимуляции семенников за счет устранения антипролиферативных эффектов NO. Комбинированное использование L-аргинина с виагрой не приводит к усилению стимулирующего эффекта.
5. «Гепасол» может успешно применяться для стимуляции семенников вместо L-аргинина.
6. Максимальная стимуляция семенников достигается при добавлении L-цитруллина в раствор L-аргинина.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Западнюк ВИ, Купраж ЛП, Заика МУ, Безверхая ИС. Аминокислоты в медицине. «Здоров'я», Киев, 1982: 12-14

2. Боровец СЮ, Закуцкий АН, Субботина ТФ. Биохимические и клинические аспекты влияния L-аргинина на функциональную активность мужской половой системы. *Ученые записки* 2005; XII (3): 12-17
3. Roulet V, Denis H, Staub C. Human testis in organotypic culture: application for basic or clinical research. *Hum Reprod* 2006; 21 (6): 1564-1571
4. Lambrota R, Liveraa G, Coffignya H. A new method for toxicity assays on human and mouse fetal testis. *Biochimie* 2006; 88 (11): 1831-1839
5. Чалисова НИ, Князькин ИВ, Кветной ИМ. Нейроэндокринные механизмы действия пептидов и аминокислот в тканевых культурах. ДЕАН, СПб., 2005: 26-30
6. Чалисова НИ, Пеннийнен ВА, Харитоновна НВ, Ноздрачев АД. Динамика стимулирующих и ингибирующих эффектов в органотипической культуре нервной и лимфоидной ткани. *Доклады Академии наук* 2001; 380 (3): 418-421
7. Шевченко ИИ. Международный симпозиум «Механизмы действия сверхмалых доз». *Радиационная биология. Радиозкология* 2003; 43 (3): 261-384
8. Belougne-Malfatti E, Agejouf O, Doutremepuich F et al. Combination of two doses of acetyl salicylic acid: experimental study of arterial thrombosis. *Thromb Res* 1998; 90 (5): 215-221
9. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000; 52 (3): 375-414
10. Gaston BM, Carver J, Doctor A, Palmer LA. S-Nitrosylation signaling in cell biology. *Mol Intervent* 2003; (3): 253-263
11. Salonia A, Rigatti P, Montorsi F. Sildenafil in erectile dysfunction: a critical review. *Curr Med Res Opin* 2003; 19 (3): 241-262
12. Bustamante JC, Setchell BP. The uptake of amino acids, in particular leucine, by isolated perfused testes of rats. *J Androl* 2000; 21 (3): 452-463
13. Castillo L, Beaumier L, Ajami AM, Young VR. Whole body nitric oxide synthesis in healthy men determined from [15N]arginine-to-[15N]citrulline labeling. *Proc Natl Acad Sci* 1996; (93): 11460-11465
14. Белик ЯВ, Гриненко АГ, Смерчинская ЛС. Определение протеолитической активности тканей с использованием протамин в качестве субстрата. *Укр Биохим Журнал* 1968; 40 (4): 532-536
15. Solomonson LP, Flam BR, Pendleton LC et al. The caveolar nitric oxide synthase/arginine regeneration system for NO production in endothelial cells. *J Exp Biol* 2003; (206): 2083-2087
16. Брюне Б, Сандау К, фонКнетен А. Апоптотическая гибель клеток и оксид азота: механизмы активации и антагонистические пути. *Биохимия* 1998; (63): 966-975

Поступила в редакцию 11.04.2007 г.

Принята в печать 22.06.2007 г.