

Насонов И.В., доктор ветеринарных наук
Волчек Л.Т., научный сотрудник
Якубовский С.М., научный сотрудник
Зинина Н.В., старший научный сотрудник
Кныш Н.В., старший научный сотрудник

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск

ФАРМАКОКИНЕТИКА L-АРГИНИНА У ЦЫПЛЯТ ПРИ ПЕРОРАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Резюме

В статье представлены результаты изучения фармакокинетических параметров распределения L-аргинина в организме цыплят после выпаивания. Приведены данные по содержанию аминокислоты в плазме крови и образцах тканей печени, почек, легких, сердца, фабрициевой сумки, грудной мышцы.

Summary

The article presents the results of a study of the pharmacokinetic parameters of the distribution of L-arginine on the organism of chickens after feeding. The data on the content of amino acids in the blood plasma and tissue samples of the liver, kidneys, lungs, heart, fabric pouch, pectoral muscle were given.

Поступила в редакцию 03.05.2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

L-аргинин является незаменимой для птиц аминокислотой, особенно необходимой в стартовый период роста. Так как биохимический цикл мочевины у птиц не функционирует, в их организме L-аргинин синтезироваться не может, и, как следствие, его количество зависит от поступления с комбикормом. Симптомы экспериментальной аргининовой недостаточности выражаются в нарушении роста оперения, особенно маховых перьев, возникает атаксия, наблюдается деформация костей и суставов. При гистологических исследованиях находят увеличение нуклеол ядра клеток печени, в клетках мозжечка отчетливо выражена гипертрофия и измельчение. У птиц L-аргинин также участвует в синтезе креатина мускулатуры [1, 2, 5, 6, 7].

Kwak Н. с соавторами в ходе опыта получили достоверное увеличение массы фабрициевой сумки, тимуса и селезенки у цыплят, которым скармливали комбикорм с повышенным содержанием аргинина. Их исследования также показали, что аминокислота

заметно влияет на развитие лимфоидных органов, наиболее выражено – на развитие тимуса и селезенки, в меньшей степени – бursy [7].

Азотный обмен у млекопитающих и птиц связан с экскрецией различных форм азотистых метаболитических соединений. Выделение азота у птиц происходит посредством мочевой кислоты, в то время как млекопитающие выделяют мочевину [6]. Мочевина образуется в печени при отщеплении гуанидиновой группы от аргинина с помощью гидролитического фермента аргиназы, попутно образуя орнитин – аминокислоту, входящую в состав белков [3].

Кребс и Хенселейт обнаружили, что если к клеткам печени добавить аргинин, то количество образовавшейся после этого мочевины существенно превышает количество использованной аминокислоты. То же самое происходит при добавлении орнитина. Ученые сделали вывод, что превращение обеих аминокислот – процесс циклический, и в него вовлечены как аргинин, так и орнитин [3].

Признанная физиологическая нефункциональность цикла мочевины (цикл Кребса-Хенселейта) у птиц частично объясняется отсутствием фермента карбамоил-фосфатсинтетазы, который катализирует первый шаг механизма детоксикации аммиака и приводит к синтезу мочевины и L-аргинина. Урикотелические виды животных имеют митохондриальный фермент, который проявляет параллельную функцию и представляет собой глютаминсинтетазу. Однако в конце цикла образуется только мочева кислота, которая не зависит от L-аргинина [6].

Птицы ферментативно катаболизируют L-аргинин путем аргиназной активности. В отличие от млекопитающих, активность аргиназы в почках в 30 раз больше, чем в печени. Активность почечной аргиназы и выделение мочевины увеличивается как при потреблении L-аргинина, так и белка [1, 2, 6, 8].

Следует отметить, что в литературных источниках отсутствуют данные по фармакокинетическим характеристикам распределения L-аргинина на цыплятах яйценоских пород кур после введения различных доз.

Фармакокинетика – это количественная оценка присутствия лекарства в организме. Для математического описания фармакокинетики используют три основных подхода: 1) исследование линейных процессов первого порядка; 2) исследование нелинейных процессов нулевого порядка; 3) исследование процессов, связанных с насыщением, при использовании модификации уравнения Михаэлиса-Ментена [3].

Фармакокинетика орального введения водного раствора аминокислоты является более сложной, чем внутривенного введения, поскольку регулируется не только кишечной абсорбцией, но и за счет катаболизма в тканях желудочно-кишечного тракта [9].

Целью нашей работы являлось исследование фармакокинетических параметров водного раствора L-аргинина у цыплят при оральном введении.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные исследования проводились в отделе болезней птиц, пчел и физико-химических исследований РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в рамках задания 5.05 «Изучение роли аргининнитрооксид синтазной системы в иммунитете и возможности применения L-аргинина в качестве метаболического регулятора для развития поствакцинального иммунитета у птиц промышленного разведения» государственной программы «Инновационные технологии в АПК» (2016–2018 гг.)

Объектом исследования являлись цыплята яйценоских пород кур «Хайсекс» белые в возрасте 21 дня массой от 80 до 123 г. Цыплятам однократно вводили L-аргинин в водном растворе орально. Доза L-аргинина составила 150 мг/кг массы тела. Для определения фармакокинетических и фармакодинамических параметров у птиц отбирали пробы крови, образцы тканей сердца, печени, почек, фабрициевой сумки, легких и грудной мышцы до введения L-аргинина (фон) и через различные интервалы времени (16, 30, 50, 66, 240, 300, 380 минут). Образцы крови немедленно центрифугировали (8000 об/мин). Отбρανную плазму крови депротеинизировали добавлением хлорной кислоты. Денатурированные белки осаждали центрифугированием, затем супернатант переносили в чистые пробирки и нейтрализовали с помощью гидрокарбоната калия.

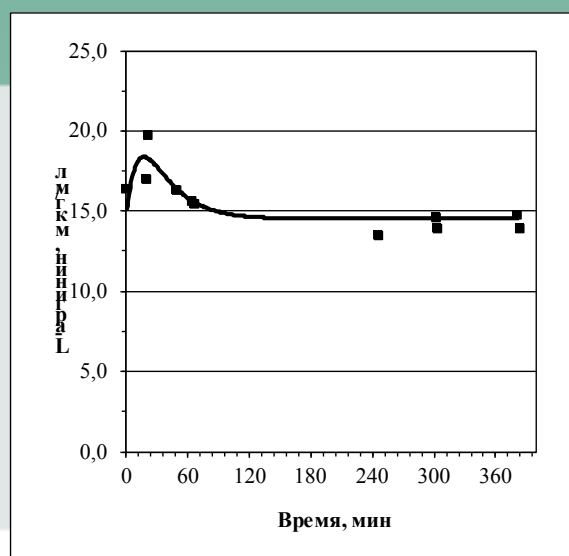
Содержание аминокислоты в плазме крови измеряли с помощью колориметрического определения L-аргинина, основанного на реакции Сакагучи для обнаружения гуанидиновых оснований в белках [4]. Для определения содержания L-аргинина в образцах тканей различных органов использовали 10%-ный гомогенат тканей. Образцы тканей растирали в фарфоровой ступке в присутствии HClO_4 до гомогенного состояния. Кислоту добавляли из расчета 1,5 мл 3.3 н хлорной кислоты на 500 мг ткани.

Обработку данных и графические по-

строения выполняли с помощью приложения Microsoft Office Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты динамики L-аргинина в плазме крови птиц после перорального вве-



дения L-аргинина в дозе 150 мг/кг массы тела показаны на рисунке 1.

На каждую точку на кривой «концентрация–время» было взято не менее 3 голов цыплят.

Рисунок 1. – Динамика концентрации L-аргинина в плазме крови цыплят после перорального введения в дозе 150 мг/кг массы тела

На основании этого графика рассчитаны параметры, приведенные в таблице 1.

Таблица 1. – Характеристика фармакокинетических параметров в плазме крови цыплят при однократном пероральном введении L-аргинина

Параметры	Урикоателики (птицы)
$C_{\max}$	$14,5 \pm 0,24$
$t_{\max}$	17,5
k_1	$0,081 \pm 0,0059$
$t_{1/2}$ всасывания	8,5
k_2	$0,039 \pm 0,0024$
$t_{1/2}$ выведения	17,9

Фармакокинетическая модель распределения L-аргинина в плазме крови рассчитывали по формуле 1:

$$L\text{-аргинин} = C_{\max} \times [(1 - \exp(-k_1 \times t) + \exp(-k_2 \times t))], \quad (1)$$

где $C_{\max}$ – максимальная концентрация L-аргинина в плазме, мкг/мл;

k_1 – константа скорости всасывания, мин⁻¹;

k_2 – константа скорости выведения, мин⁻¹;

t – время после введения L-аргинина, мин.

Время достижения максимальной концентрации L-аргинина в плазме, мин,

рассчитывали по формуле 2:

$$t_{\max} = \ln(k_1/k_2)/(k_1 - k_2). \quad (2)$$

Полупериод выведения, мин, рассчитывали по формуле 3:

$$t_{1/2} = 0,693/k_2. \quad (3)$$

Полупериод всасывания, мин, рассчитывали по формуле 4:

$$t_{1/2} = 0,693/k_1. \quad (4)$$

Максимальное содержание аминокислоты в почках было отмечено на 66-й минуте и составило 592,2 мкг/г. Через 300 ми-

нут наблюдалось снижение до исходного уровня, что свидетельствует о интенсивном метаболизме L-аргинина в почках (рисунок

2). Также можно отметить, что аминокислота в почках не накапливается.

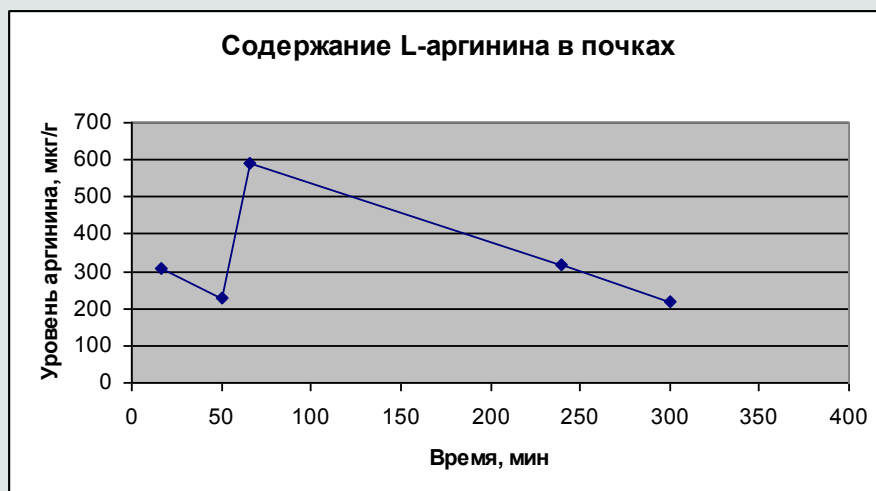


Рисунок 2. – Содержание L-аргинина в образцах почек цыплят после перорального введения в дозе 150 мг/кг массы тела

В легких максимальное значение содержания L-аргинина было отмечено на 50-й минуте после введения и составило

237,5 мкг/г. В дальнейшем произошло резкое снижение аминокислоты до первоначального уровня (рисунок 3).



Рисунок 3. – Содержание L-аргинина в образцах легких цыплят после перорального введения в дозе 150 мг/кг массы тела

Максимальное значение L-аргинина в печени было отмечено на 66-й минуте (155,6 мкг/г) после перорального введения. Дальнейшее резкое снижение указывает на интенсивный метаболизм L-аргинина в печени (рисунок 4). Также можно отметить,

что через 380 минут уровень аминокислоты в печени возвращается к значениям фона. Это свидетельствует о том, что L-аргинин не накапливается в печени в дозе 150 мг/кг массы тела и полностью расходуется в метаболизме.



Рисунок 4. – Содержание L-аргинина в образцах печени цыплят после перорального введения в дозе 150 мг/кг массы тела

Как видно из рисунка 5, содержание L-аргинина в фабрициевой сумке на 16-й минуте увеличилось на 45,3 % по сравнению с фоном и оставалось на одном уровне до 50-й минуты. Далее уровень аминокислоты увеличивается и через 380 минут после введения достигает максимального значения 471,2 мкг/г, притом что значение фона равно 178,7 мкг/г. Нами не был зафик-

сирован момент снижения L-аргинина в ткани органа. Из этого следует, что бурса способна накапливать значительное количество L-аргинина. Поскольку фабрициева сумка является иммунокомпетентным органом, это накопление свидетельствует о важной роли L-аргинина в функциональной активности фабрициевой сумки.

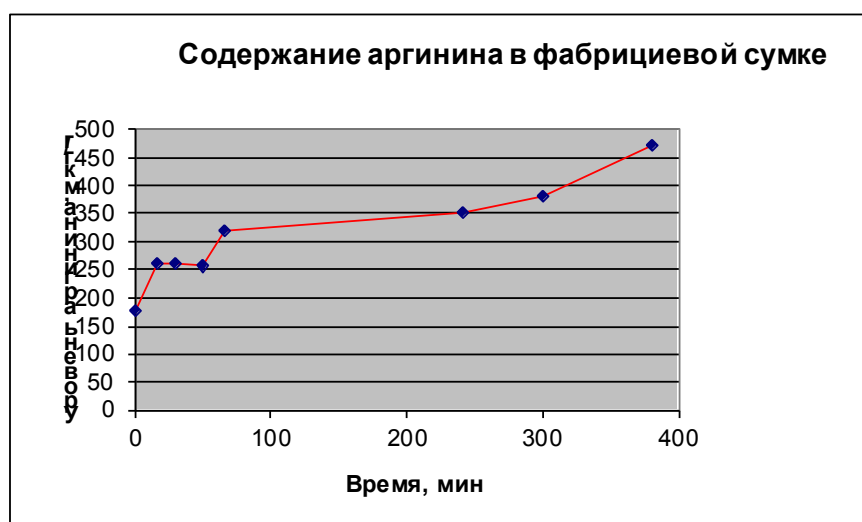


Рисунок 5. – Содержание L-аргинина в образцах фабрициевой сумки после перорального введения в дозе 150 мг/кг массы тела

Максимальное содержание L-аргинина в образцах сердца мы отметили на 66-й минуте после введения. Повышение уровня аминокислоты в образцах тканей незначительное (19,7 %), уже на 240-й минуте пос-

ле введения выходит на плато и достигает значения, превышающего фоновое на 6 %, что свидетельствует о незначительном накоплении L-аргинина в сердце.

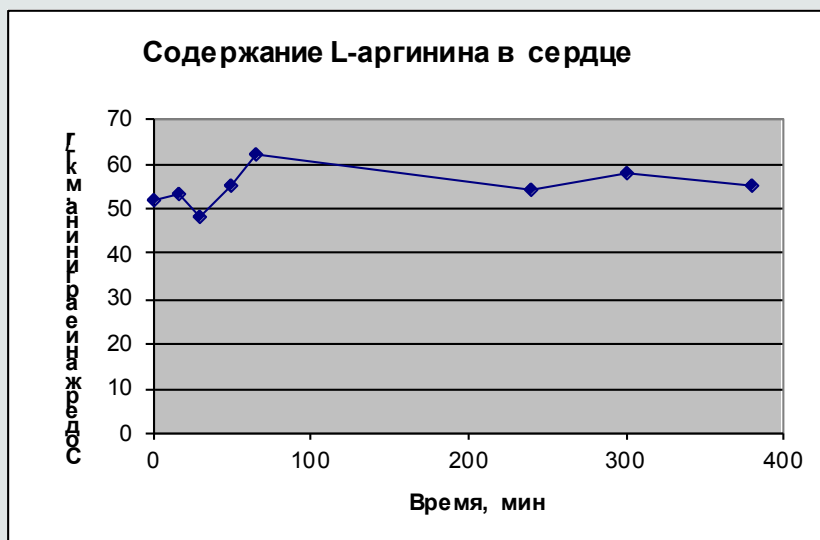


Рисунок 6. – Содержание L-аргинина в сердце после перорального введения в дозе 150 мг/кг массы тела

Как видно из рисунка 7, в пробах ткани грудной мышцы максимальное содержание L-аргинина было достигнуто через 30 минут после введения аминокислоты. Далее мы наблюдаем постепенное сни-

жение, превышающее фоновое значение на 11,9 %, что свидетельствует о незначительном накоплении L-аргинина в ткани грудной мышцы.



Рисунок 7. – Содержание L-аргинина в грудной мышце после перорального введения в дозе 150 мг/кг массы тела

Фармакокинетические исследования показали, что L-аргинин при однократном пероральном введении в водном растворе в первую очередь попадает в кровь,

достигая максимума через 17,5 минут, затем наблюдается постепенное снижение значения и параллельное увеличение в органах (таблица 2).

Таблица 2. – Распределение L-аргинина после перорального однократного введения

Исследованные ткани	Время максимального накопления, мин.	Содержание L-аргинина, мкг/г
Кровь*	17,5	14,5
Почки	66	592,2
Фабрициева сумка	380	471,26
Легкие	50	237,5
Печень	66	155,6
Сердце	66	62,33
Грудная мышца	30	57,5

Примечание – *мкг/мл

Как видно из таблицы 2, по порядку накопления аминокислоты ткани распределились следующим образом: почки, фабрициева сумка, легкие, печень, сердце, грудная мышца. Содержание L-аргинина в почках в 3 раза выше до и после введения L-аргинина по сравнению с содержанием в печени.

У млекопитающих катаболизм L-аргинина происходит в печени и обусловлен высокой аргиназной активностью (превращением аргинина в орнитин). У птиц катаболизм L-аргинина также обусловлен аргиназной активностью. Однако из-за отсутствия у птиц аргиназной активности в печени главным органом, метаболизирующим аргинин, являются почки, где активность аргиназы в 30 раз выше [6], чем в печени,

что подтверждается нашими исследованиями.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучено распределение L-аргинина в крови и образцах тканей органов цыплят после перорального введения водного раствора в дозе 150 мг/кг массы тела. В плазме крови максимальный уровень аминокислоты достигается через 17,5 минут, в печени и почках – через 66 минут. Через 300 минут после введения водного раствора аминокислоты уровень L-аргинина в почках возвращается к фоновым значениям. Уровень L-аргинина в печени возвращается к значениям фона через 380 минут.

В фабрициевой сумке через 380 минут после введения аминокислоты содержание все еще продолжает расти.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ибатуллин, И.И. Рост цыплят-бройлеров при разных уровнях аргинина в рационе / И.И. Ибатуллин, И.И. Ильчук, Н.Я. Кривенок // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2014. – Т. 217, № 1. – С. 102–109.
2. Научные основы кормления сельскохозяйственной птицы / В.И. Фисинин [и др.]. – Сергиев Посад: ВНИТИП, 2009. – 351 с.
3. Чиркин, А.А. Биохимия / А.А. Чиркин, Е.О. Данченко. – М.: Медицинская литература, 2010. – 582 с.
4. Насонов, И.В. Модификация реакции Сакагучи для колориметрического определения L-аргинина при экзотермических условиях / И.В. Насонов, С.М. Якубовский // Эпизоотология. Иммунобиология. Фармакология. Санитария. – Минск, 2015. – № 1. – С. 61–65.
5. Cucag, M. Arginine Requirement of Starting Broiler Chicks / M. Cucag, L.S. Jensen // Poultry Science. – 1990. – № 69. – P. 1377–1382.
6. Fernandes, J.I.M. Arginine metabolism in uricotelic species / J.I.M. Fernandes, A.E. Murakami // Acta Scientiarum. Animal Sciences. – 2010. – Vol. 32, № 4. – P. 357–366.
7. Kwak, H. Influence of Dietary Arginine Concentration on Lymphoid Organ Growth in Chickens / H. Kwak, R.E Austic, R.R. Dietert // Poultry Science. – 1999. – № 78. – P. 1536–1541.
8. Role of Dietary L-Arginine in Poultry Production / A.M. Fouad [et al.] // Poultry Science. – 2012. – № 11. – P. 718–729.
9. Pharmacokinetics and Safety of Arginine Supplementation in Animals / Wu Guoyao [et al.] // The Journal of Nutrition. – 2007. – P. 1673–1680.