

В.Ф. Сагач, М.М. Ткаченко, О.Д. Присяжна, А.В. Коцюрuba, О.Ф. Мегедь

Зміни вазодилататорних реакцій судинних гладеньких м'язів та системи оксиду азоту за умов експериментального цукрового діабету

Приведены экспериментальные данные об эндотелийзависимых и эндотелийнезависимых реакциях сосудистых гладких мышц изолированных препаратов грудного отдела аорты крыс с экспериментальным сахарным диабетом (стрептозотоцининдуцированный диабет) и контрольной группы животных. Показано, что при сахарном диабете нарушается, в основном, эндотелийзависимая вазодилатация, что обусловлено развитием эндотелиальной дисфункции вследствие снижения биосинтеза NO. Об этом свидетельствуют данные о содержании стабильных метаболитов оксида азота (NO_2^- и NO_3^-), а также активности индуцибельной и конститутивной NO-синтаз (NOS) в аорте, сердце, эритроцитах и плазме крови животных с диабетом.

ВСТУП

Однією з найбільш актуальних проблем сучасної ендокринології є цукровий діабет, який широко розповсюджений і призводить до ранньої інвалідності та високої летальності. Основною причиною смерті хворих на цукровий діабет є ураження судин (мікро- та макроангіопатії) [1, 18, 22]. Сучасні дослідження вказують на те, що в основі ураження судин при цукровому діабеті лежить ендотеліальна дисфункція, котра визначається як зміна концентрації хімічних посередників, синтезованих ендотеліальними клітинами та зменшення NO-залежної вазодилататорної відповіді на ацетилхолін [10, 17, 24, 32]. Фактори, що пов'язані з ендотеліальною дисфункцією при цукровому діабеті включають активацію протейнінази С, надмірну експресію факторів росту та/або цитокінів та оксидативний стрес [13]. Ендотеліальну дисфункцію було зареєстровано

но клінічно у хворих на цукровий діабет, а також у пацієнтів з інсулінорезистентністю (наприклад особи з ожирінням) та в тих, що відносяться до групи високого ризику розвитку цукрового діабету другого типу (тобто із зниженою толерантністю до глюкози) [10, 13]. Відомий взаємозв'язок дії оксиду азоту та інсуліну: з одного боку, активація індуцибельної NO-синтази (наприклад у разі впливу стрептозоточину, запальних процесів тощо) з надмірним виділенням оксиду азоту призводить до токсичної дії на β -клітини островців Лангерганса та їх апоптозу [16, 28], з іншого ж боку, NO вважають посередником дії інсуліну на вуглеводний обмін та судинний тонус (за допомогою активації систем фосфатидилінозитол-3-кінази й тирозинкінази та ендотеліальної NO-синтази відповідно) [21, 25, 29]. Раніше нами було показано зміни ендотеліальних скорочувальних реакцій судинних гладеньких м'язів і вмісту вільних радикалів

© В.Ф. Сагач, М.М. Ткаченко, О.Д. Присяжна, А.В. Коцюрuba, О.Ф. Мегедь

кисню, а також електричних реакцій ендотелію аорти за умов старіння [6, 9].

Мета цієї роботи – дослідження ендотелійзалежного механізму судинної реактивності та вмісту метаболітів оксиду азоту й активності індукційної та конститутивної NO-синтази (NOS) у клітинах серцево-судинної системи у щурів з експериментальним цукровим діабетом.

МЕТОДИКА

Для відтворення стрептозотоциніндукованого цукрового діабету щурам-самцям лінії Вістар – Кіото віком 4 міс та масою 200 – 250 г було введено внутрішньочеревино стрептозотозин (“Sigma”, США) з розрахунку 50 мг/кг. Для дослідів використовували тварин через 8 – 10 тиж після введення препарату [26]. Контроль глюкози крові здійснювали за допомогою глюкометра “Медісенс” (“Abbott”, США). Вміст глюкози в крові щурів з діабетом становив $21,1 \text{ ммоль/л} \pm 6,7 \text{ ммоль/л}$ (контрольна група – $6,4 \text{ ммоль/л} \pm 0,6 \text{ ммоль/л}$).

Досліди проводили на ізольованих препаратах грудного відділу аорти, які було отримано від двох груп щурів: з експериментальним діабетом ($n=20$) і інтактних (контроль; $n=15$). Судини виділяли після декапітації щурів та розтину грудної порожнини.

Для дослідження аорту нарізали на сегменти завширшки 1,5 – 2 мм і масою 2 – 2,5 мг з урахуванням циркулярної орієнтації гладеньком’язового шару. Кільцевий препарат поміщали в проточну термостатовану ($36 - 36,5^\circ \text{C}$) камеру місткістю 1 мл³, в якій його піддавали пасивному розтягуванню силою 5 – 10 мН і витримували протягом 30 – 60 хв у модифікованому розчині Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl – 133,0; KCl – 4,7; NaHCO₃ – 16,3; NaH₂PO₄ – 1,38; CaCl₂ – 2,5; MgCl₂ – 1,05; глюкоза – 7,8 (pH 7,4).

Активзації гладеньких м’язів (ГМ) досягали додаванням до буферного роз-

чину норадреналіну (НА, “Sigma”, США). Скорочувальну активність ГМ аорти реєстрували у режимі, що наближався до ізометричного, за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1C.

Для дослідження ендотелійзалежних та ендотелійнезалежних реакцій ГМ аорти реєстрували зміни їх тонічного напруження на ендотелійзалежний агоніст мускаринових рецепторів ацетилхолін гідрохлорид (“Flüka”, Швеція) та ендотелійнезалежний агоніст нітропрусид натрію (“Sigma”, США). Рівень скорочення ГМ на НА приймали за 100 %. Амплітуду змін тонічного напруження ГМ при додаванні до розчину ацетилхоліну чи нітропрусиду натрію розраховували у відсотках від рівня їх сталого скорочення (“плато”).

У гомогенатах серця, аорти а також у плазмі крові та еритроцитах тварин з діабетом та контрольних щурів визначали вміст стабільних метаболітів NO: нітрит- (NO_2^-) і нітрат-аніонів (NO_3^-) та активність Ca²⁺-незалежної індукційної (iNOS) та Ca²⁺-залежної конститутивної (cNOS) NO-синтази.

Визначення активності NO-синтази. Для визначення активності NO-синтази (Ca²⁺-залежної та Ca²⁺-незалежної) використовували комбінацію класичного методу [27] та сучасну його модифікацію [14], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – нітрит-аніона [30]. Об’єм субстратної суміші збільшили у 10 разів. Активність ферменту визначали з мінімальною кількістю кофакторів для наближення активності NO-синтази до існуючого (базального) рівня активності в досліджуваних тканинах. L-аргінін добавляли з надлишком, враховуючи його можливу утилізацію в аргіназній реакції.

1. Визначення активності сумарної NO-синтази (cNOS та iNOS). Аліквоти грубих гомогенатів тканин (фракціонування гомогенатів не проводили з метою

визначення величини сумарної активності NO-синтази), що містили 500 – 1000 мкг білка, інкубували в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші наступного складу (мкмоль/мл): KH_2PO_4 – 50, MgCl_2 – 1, CaCl_2 – 2, НАДФН-1, L-аргінін-2 (рН 7,0) протягом 60 хв при 37°C. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2 моль/л HClO_4 . Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш і попередньо денатурований 2 моль/л HClO_4 білок. Суміш центрифугували при 3500 хв^{-1} протягом 10 хв і в надосадковій суміші. Визначали вміст NO_2^- високоспецифічним спектрофотометричним методом у нашій модифікації за кольоровою реакцією з реактивом Гріса. Чутливість методу – 0,2 NO_2^- у 1 мл, завдяки чому він тепер широко використовується для дослідження як iNOS [30], так і cNOS [12].

2. *Визначення активності iNOS.* Методика визначення аналогічна попередній за деякими відмінностями: для визначення активності Ca^{2+} -незалежної NOS в інкубаційну суміш замість CaCl_2 добавляли 2 мкмоль ЕДТА.

3. *Розрахунок активності cNOS.* Сумарну активність cNOS (eNOS та nNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS.

Активність ферментів виражали в пікомолях новоутвореного NO_2^- за 1 хв у розрахунку на 1 мг загального білка в пробі.

Визначення вмісту NO_2^- . Вміст нітрит-аніона (NO_2^-) визначали в безбілкових аліквотах надосадкових розчинів після визначення активності NO-синтази або в безбілкових розчинах гомогенатів тканин клітин (вміст білка 20 – 40 мг/мл) у колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [19] у нашій модифікації [2].

Визначення вмісту NO_3^- . Вміст нітрат-аніона (NO_3^-) визначали в гомогенатах тканин спектрофотометричним методом у нашій модифікації, де замість стрихніну

використовували його гідроксильоване похідне – бруцин, що дозволило підвищити чутливість методу [20] у 100 разів.

Визначення вмісту білка. Вміст загального білка в пробах визначали загальноживаним методом Бредфорда, використовуючи барвник Cумассі G-250.

Результати обробляли методом варіаційної статистики використовуючи програмне забезпечення Origin 6.0 фірми “Microcal Software, Inc” (США).

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

За результатами досліджень, ГМ грудного відділу аорти контрольної групи щурів, преактивовані НА (10^{-5} моль/л), завжди відповідають розслабленням на добавлення до розчину ацетилхоліну (10^{-6} моль/л). Амплітуда цього розслаблення становить в середньому $101,5 \pm 12,3 \%$ від величини скорочення на НА. У щурів з діабетом реакція аортальних препаратів на ацетилхолін суттєво відрізнялася від реакції тварин контрольної групи. Ми спостерігали такі типи реакцій: в 20 % експериментів дилататорної реакції не відбувалося взагалі, в 15 % – спостерігалася спотворена констрикторна реакція препаратів з підвищенням тонічного напруження ГМ у відповідь на ацетилхолін з амплітудою $16,6 \pm 3,4 \%$, в 15 % випадків реєструвалася двофазна реакція, при якій розслаблення ГМ на $38,6 \pm 7,4 \%$ передувало скороченню приблизно до вихідного рівня. У 50 % дослідів спостерігалася розслаблення ГМ аорти, але його амплітуда виявилася достовірно меншою, ніж у контрольних тварин і становила $16,8 \pm 3,1 \%$ (рис. 1).

Попередньо активовані норадреналіном ГМ грудної аорти контрольної групи щурів завжди відповідали розслабленням на добавлення до розчину нітропрусиду натрію у концентрації 10^{-4} моль/л. Амплітуда його становила $149,3 \pm 16,7 \%$. У

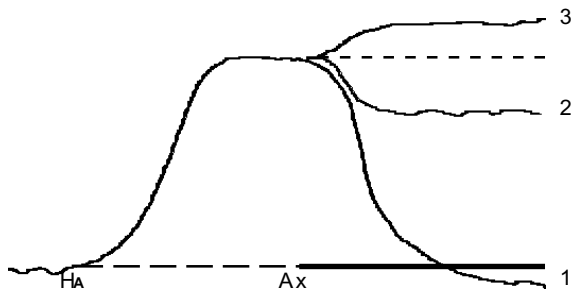


Рис. 1. Вплив ацетилхоліну гідрохлориду на скорочувальні реакції гладеньких м'язів (ГМ) ізольованих препаратів грудної аорти щурів контрольної групи (1) та щурів з діабетом (2, 3). НА - початок активації ГМ. Темна лінія під кривими відповідає тривалості дії ацетилхоліну гідрохлориду

щурів з діабетом реакція ГМ аорти виявилася подібною. Препарати грудної аорти на додавання до буферного розчину нітропрусиду натрію відповідали дилатацією з амплітудою $134,2 \% \pm 18,6 \%$. Таким чином, зниження тонічного напруження ГМ грудної аорти контрольних і дослідних щурів суттєво не відрізняється.

Отримані результати вказують на те, що у щурів з діабетом істотно порушується реакція на ендотелійзалежний вазодилататор ацетилхолін при збереженні за цих умов реакцій на ендотелійнезалежний

вазодилататор нітропрусид натрію (рис. 2). Це свідчить про розвиток ендотеліальної дисфункції, як ускладнення цукрового діабету, при збереженні функціональної здатності ГМ судин.

Подібні порушення ендотелійзалежних реакцій ГМ судин спостерігалися також за умов старіння, експериментальної гіперхолестеринемії та гіпертензії [3, 6, 7, 31].

Виявлена при цукровому діабеті дисфункція ендотелію відіграє надзвичайно важливу роль у розвитку за цих умов вазопатій. Існує кілька можливих клітинних і молекулярних передумов ендотеліальної дисфункції при цукровому діабеті [11, 23].

По-перше, це ураження при оксидативному стресі, до якого, як відомо, дуже чутливі ендотеліальні клітини. Діабетичний стан характеризується підвищеною схильністю до розвитку оксидативного стресу та високим вмістом окиснених ліпопротеїнів, що індукує надмірне окиснення фосfolіпідів і білків. Це є одним з етіологічних факторів розвитку ендотеліальної дисфункції при діабеті [5, 15].

Хронічна гіперглікемія спричинює неферментне глікозування білків і макромолекул (в тому числі ДНК), що також

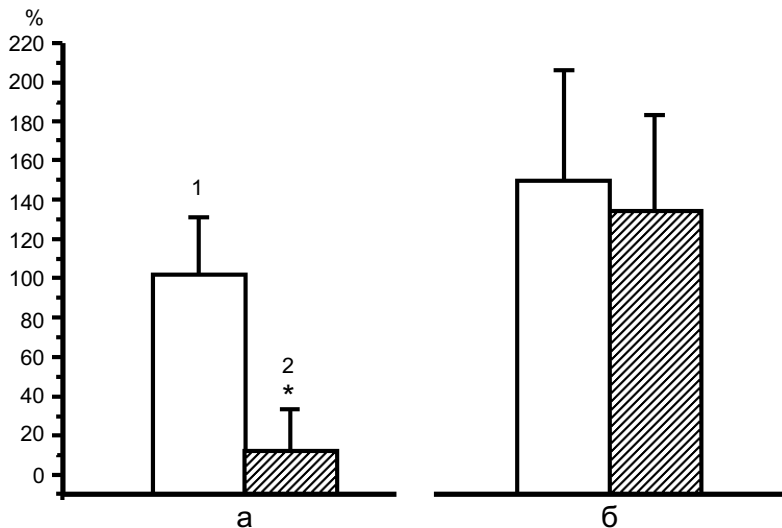


Рис. 2. Реакція препаратів грудного відділу аорти контрольних (1) щурів та щурів з діабетом (2) на ацетилхоліну гідрохлорид (а) та натрію нітропрусид (б)

призводить до порушення функції ендотелію.

Гіперглікемія може призводити до внутрішньоклітинних змін окисно-відновного стану з активацією протеїнкінази С, що веде до виснаження клітинного пулу NADPH, який, у свою чергу, необхідний для генерації NO [11]. Гіперглікемія також збільшує потік глюкози гліколітичним шляхом, збільшуючи синтез діацилгліцеролу *de novo*. Підвищення вмісту діацилгліцеролу, що відбувається як в ендотеліюцитах, так і в ГМ, призводить до збільшення

активності протеїнкінази С. Як протеїнкіназа С, так і діацилгліцерол є важливими внутрішньоклітинними посередниками, що беруть участь у великій кількості клітинних відповідей, в тому числі у модулюванні вазоконстрикції.

Було описано наявність рецепторів до інсуліну та інсуліноподібних факторів росту на клітинах, отриманих з судин. Причому фізіологічні концентрації інсуліну збільшують удвічі рівні mRNA eNOS та її активність після 2 – 8 год інкубації ендотеліоцитів.

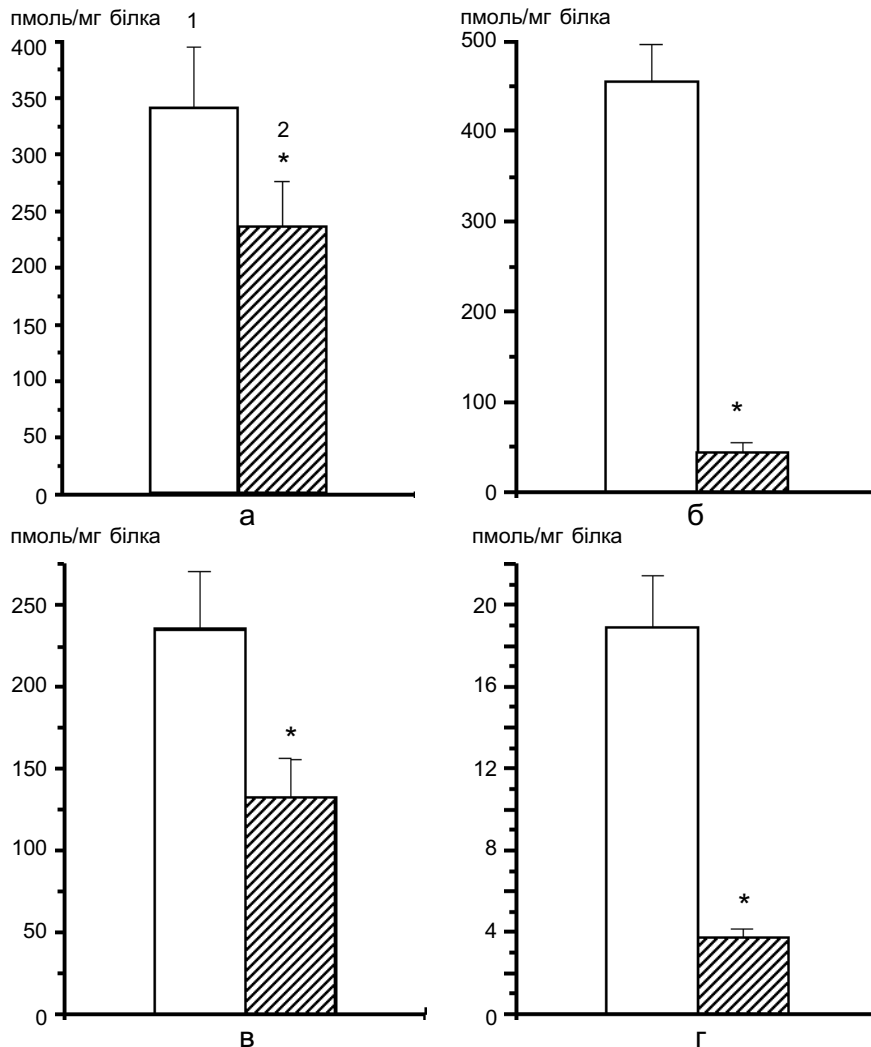


Рис. 3. Вміст нітрит-аніона в аорті (а), серці (б), плазмі (в) та еритроцитах (г) контрольних щурів (1) та щурів з діабетом (2)

На наступному етапі було доцільно підтвердити даними біохімічних досліджень те, що знайдені порушення ендотеліальної вазодилатації пов'язані саме зі змінами в системі NO. Для цього було досліджено вміст стабільних окиснених форм NO: нітрит- та нітрат-аніонів.

Нітрит-аніон утворюється при окисненні NO в окисгенованих водних розчинах. У всіх досліджуваних тканинах вміст NO₂⁻ при цукровому діабеті достовірно знижувався (рис. 3), що може свідчити про недостатній синтез NO *de novo* та під-

тверджує дані щодо порушень при діабеті ендотеліальної дилатації судин внаслідок ендотеліальної дисфункції, викликаній нестачею ендогенного NO.

Для підтвердження цього припущення було досліджено активність сумарної конститутивної (Ca²⁺-залежної) та індукбельної (Ca²⁺-незалежної) NO-синтази. В серці, аорті та еритроцитах активність сумарної cNOS достовірно знижувалась, а в плазмі крові достовірно не змінювалася (рис. 4), що беззаперечно вказує на NO-залежну природу ендотеліальної дис-

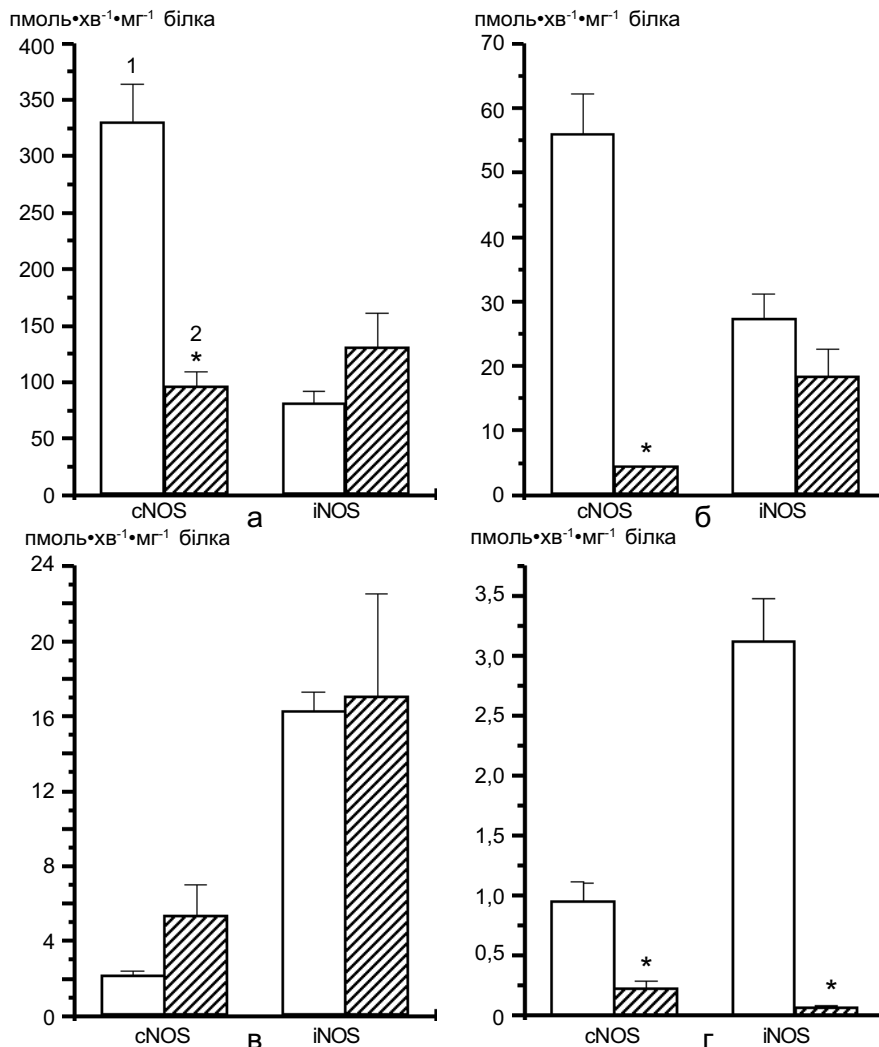


Рис. 4. Активність різних ізоформ NO-синтази в аорті (а), серці (б), плазмі (в) та еритроцитах (г) контрольних щурів (1) та щурів з діабетом (2)

функції при цукровому діабеті. Раніше це було показано в роботі [7].

Нітрат-аніон утворюється в клітинах неферментативно при розпаді пероксинітриту, а також ферментативно при окисненні NO оксигемоглобіном, оксиміоглобіном, ксантиноксидазою та іншими ферментами. Він є кінцевою формою обміну NO в організмі, та може служити субстратом для синтезу оксиду азоту в редуктазних реакціях [4]. Ми встановили (рис.5), що вміст нітрат-аніона за умов діабету не змінюється в серці, достовірно

знижується в плазмі крові та має тенденцію до зниження в еритроцитах, і, навпаки, достовірно збільшується в аорті. Значне підвищення вмісту нітрат-аніона в аорті може бути наслідком певного підвищення активності індукцибельної NO-синтази в ній (до $130,21 \pm 30,12$ пмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹ білка порівняно з контролем – $80,38$ пмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹ $\pm 11,07$ пмоль \cdot хв⁻¹ \cdot мг⁻¹). Але більш імовірною причиною цього підвищення при діабеті ми вважаємо активацію неферментативного шляху утворення нітрат-аніона при розпаді перокси-

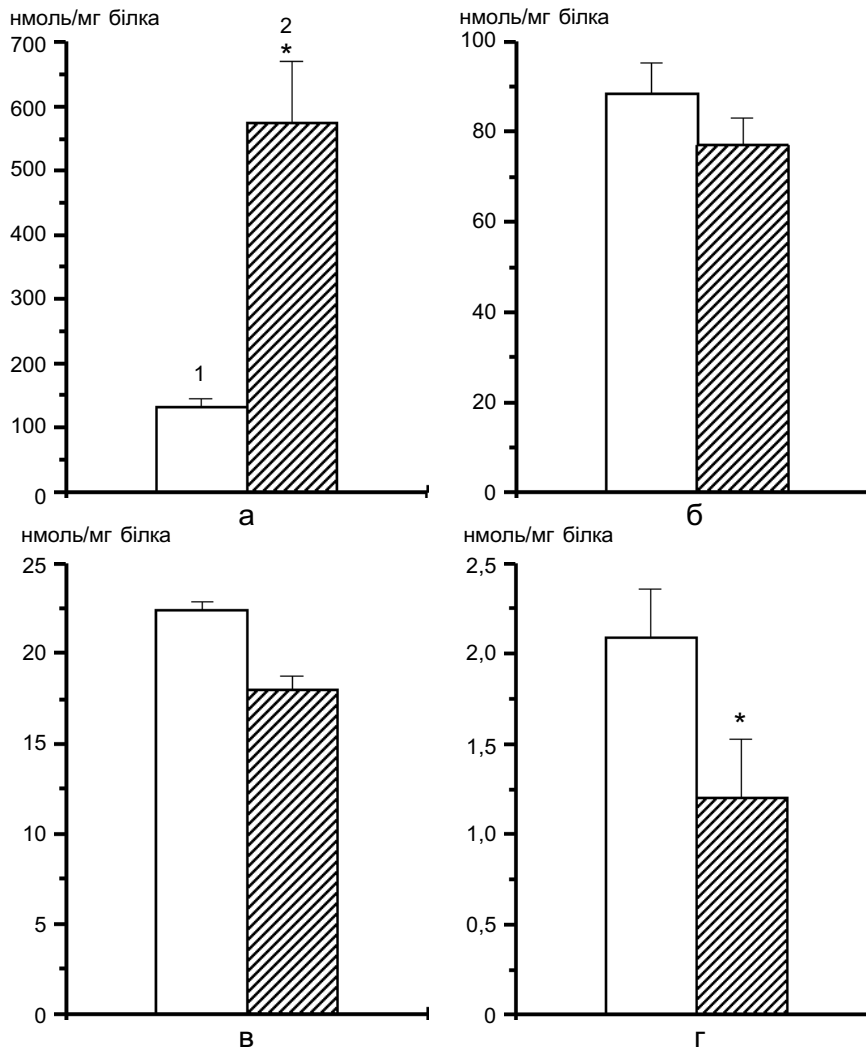


Рис. 5. Вміст нітрат-аніона в аорті (а), серці (б), плазмі (в) та еритроцитах (г) контрольних шурів (1) та шурів з діабетом (2)

нітриту. Внаслідок оксидативного стресу при діабеті підвищується кількість супероксид-аніона, що може призводити до значного збільшення утворення пероксинітрианіона (ONOO^-). Як відомо, NO є одним з найпотужніших природних антиоксидантів саме завдяки здатності зв'язуватися з супероксид-аніоном ($\text{O}_2^{\bullet-}$) утворюючи пероксинітрит [4]. Таким чином, супероксид-аніон, що утворюється при діабеті, зв'язуючись з NO, призводить, з одного боку, до неферментативного утворення NO_3^- (це підтверджується зменшенням вмісту нітрит-аніона при підвищенні вмісту нітрат-аніона), а з іншого боку - до виснаження пулу вільного NO. Цей механізм може лежати в основі порушень NO-залежної дилататорної реакції при діабеті. Значне зниження активності cNOS і вмісту NO_2^- в серці та еритроцитах щурів, які ми спостерігали за умов експериментального стрептозотоциніндукованого діабету, вказують на ймовірність NO-залежних механізмів розвитку серцевої недостатності з одного боку, а з іншого – розвитку гіпоксичного стану за цієї патології. Такі порушення потребують експериментального підтвердження.

ВИСНОВКИ

1. При експериментальному інсулінзалежному цукровому діабеті порушуються в основному ендотеліозалежні судинні реакції. Така дисфункція ендотелію може бути одним з основних етіологічних факторів розвитку діабетичних ангіопатій.

2. Зміни вмісту стабільних метаболітів оксиду азоту (NO_2^- та NO_3^-) та зміни активностей конститутивної та індукцйбельної NO-синтази в аорті щурів з діабетом свідчать про NO-залежну природу розвитку ендотеліальної дисфункції при діабеті, зумовлену, з одного боку, зниженням біосинтезу NO конститутивною NO-синтазою, а з іншого – збільшенням утилізації

NO для нейтралізації супероксид-аніона.

3. В серці та еритроцитах за умов діабету значно знижується активність cNOS, що супроводжується зменшенням вмісту нітрит-, але не нітрат-аніона.

V.F. Sagach¹, M.N. Tkachenko¹, O.D. Prysyazhna¹,
A.V. Kotsuruba², O.F. Meged²

CHANGES IN VASODILATOR RESPONSES OF VASCULAR SMOOTH MUSCLES AND NITRIC OXIDE SYSTEM IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

The experimental data of endothelium-dependent and endothelium-independent responses of vascular smooth muscles of isolated preparations of the thoracic aorta of rats with experimental diabetes mellitus (streptozotocin-induced diabetes) and a control group of animals are presented in the article. It has been shown that at diabetes mellitus endothelium-dependent vasodilation was deteriorated to the most extent. It resulted from dysfunction of the endothelium due to a reduce in the synthesis of NO. This conclusion was based on the data of the parameters of the contents of steady metabolites of nitric oxide (NO_2^- and NO_3^-), as well as activities of inducible and constitutive NO-synthases (iNOS and cNOS) in heart, aorta, erythrocytes and blood plasma in diabetic and control animals.

¹A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine,

²A.V. Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Кремінская В.М. Патогенез ангиопатий при сахарном диабете // Сахарный диабет. – 1999. – 1(2). – С. 113 – 118.
2. Коцюруба А.В., Семікопна Т.В., Вікторов О.П. та ін. Спосіб кількісного визначення нітрит – аніону в біологічній рідині. Патент України № 6 601N33152. Біол. №7 – 11 від 15.12.2000р.
3. Мойбенко О.О., Сагач В.Ф., Шаповал Л.М. та ін. Роль ендотелію та біологічно активних речовин ендотеліального походження в регуляції кровотоку і діяльності серця // Фізіол. журн. – 1997. – 43, № 1 – 2. – С. 3 – 18.
4. Реутов В.П., Сорокіна Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1997. – 158 с.
5. Старосельцева Л.К., Кошлова Е.С., Смурова Г.Ф. и др. Перекисное окисление липидов у больных сахарным диабетом II типа // Проблемы эндокринологии. – 1986. – 32, № 1. – С. 19 – 22.
6. Ткаченко М.М., Сагач В.Ф., Коцюруба А.В. та ін. Ендотеліозалежні скорочувальні реакції судин-

- них гладеньких м'язів і вміст вільних радикалів кисню у щурів за умов старіння // Фізіол. журн. – 2002. – **48**, № 4. – С. 3 – 13.
7. Токарева Л.В., Сибірна Н.О., Великий М.М. Участь різних ізоформ NO – синтази в регуляції метаболізму оксиду азоту при стрептозотоциновому діабеті // Лаб. діагностика. – 2001. – № 4. – С. 22 – 25.
 8. Фролькис В.В., Базилук О.В., Сыкало Н.В. Роль ендотелія в вікових змінах реакцій судин до дії фізіологічно активних речовин і гіпоксії // Пробл. старіння і довголіття. – 1993. – **3**, № 2. – С. 83 – 90.
 9. Яроцкий В.В., Ткаченко М.Н., Сагач В.Ф. Електричні реакції ендотелія аорти крыс при дії ацетилхоліну і АТФ в умовах старіння. // Бюл. експерим. біології і медицини. – 2003. – **135**, № 3. – С. 257 – 260.
 10. Abdu T.A.M., Elhadd T., Pfeifer M., Clayton R.N. Endothelial dysfunction in endocrine disease // Trends in Endocrinol. and Metabol.. – 2001. – **12**, № 2. – P. 257 – 265.
 11. Albina J.E., Mills C.D., Barbul A. et al. Arginine metabolism in wounds // Amer. J. Physiol. – 1988. – **254**, № 4. – P. 459 – 467.
 12. Aznal J. – F., Yamin J., Dockery S., Harrison D.G. Regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA, protein and activity during cell growth // Amer. J. Physiol. – 1994. – **267**, № 5. – P. 1381 – 1388.
 13. Calles-Escandon J., Cipolla M. Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective // Endocr. Rev. – 2001. – **22**, № 1. – P. 36 – 52.
 14. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. et al. Increased activity and expression of Ca²⁺-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – **277**, № 5. – P. 797 – 804.
 15. Colliner A., Wilson R., Bradley H. et al. Free radical activity in type 2 diabetes // Diabet. Med. – 1990. – **7**, № 1. – P. 27 – 30.
 16. Corbett J.A., Wang J.L., Hughes J.H. et al. Nitric oxide and cyclic GMP formation, induced by interleukin 1 α in islets of Langerhans. Evidence for an effector role of nitric oxide in islet dysfunction // Biochem. J. – 1992. – **287**, № 1. – P. 229 – 235.
 17. Dam B., Demirci C., Reitsma H.J. et al. Arteriolar changes in nitric oxide activity and sensitivity during the course of streptozotocin – induced diabetes // Eur. J. Pharmacol.. – 2002. – **455**, № 1. – P. 43 – 51.
 18. Farkas K., Jermendy G., Somogyi A. Endothelial nitric oxide in diabetes mellitus: too much or not enough? // Diabetes Nutr. Metab. – 2000. – **13**, № 5. – P. 287 – 297.
 19. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131 – 138.
 20. Isukahara H., Miura M., Isuchida S. et al. Effect of NOS inhibitors on bone metabolism in growing rats // Amer. J. Physiol. – 1996. – **271**, № 1 – P. 840 – 845.
 21. Kahn N.N., Acharya K., Bhattacharya S. et al. Nitric Oxide: “Second messenger” of insulin // IUBMB Life. – 2000. – **49**. – P. 441 – 450.
 22. Kirpichnikov D., Sowers J.R.. Diabetes mellitus and diabetes-associated vascular disease // Trends in Endocrinol. and Metabol.. – 2001. – **12**. – P. 225 – 230.
 23. Milsom A.B., Jones C.J., Goodfellow J. et al. Abnormal metabolic fate of nitric oxide in Type I diabetes mellitus // Diabetologia. – 2002. – **45** – P. 1515 – 1522.
 24. Mochizuki S., Miyasaka T., Goto M. et al. Measurement of acetylcholine-induced endothelium-derived nitric oxide in aorta using a newly developed catheter – type nitric oxide sensor // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2003. – **306**, № 2. – P. 505 – 508.
 25. Montagnani M., Chen H., Barr V.A.. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca²⁺ but requires phosphorylation by Akt // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, № 32. – P. 30392 – 30398.
 26. Pieper G.M. Enhanced, unaltered and impaired nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation in experimental diabetes mellitus: importance of disease duration // Diabetologia. – 1999. – **42**, № 10. – P. 204 – 213.
 27. Selter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases // FEBS Lett. – 1991. – **291**, № 1. – P. 145 – 149.
 28. Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas // Physiol. Res. – 2001. – **50**, № 6. – P. 537 – 546.
 29. Vicent D., Ilany J., Kondo Tatsuya et al. The role of endothelial insulin signaling in the regulation of vascular tone and insulin resistance // J. Clin. Invest. – 2003. – **111**, № 9. – P. 1373 – 1380.
 30. Vodovotz Y., Know N.S., Popischil M. et al. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN- γ and bacterial lipopolysaccharide // J. Immunol. – 1994. – **152**, № 8. – P. 4110 – 4118.
 31. Vural P., Canbaz M. Effects of diabetes mellitus and acute hypertension on plasma nitric oxide and endothelin concentrations in rats. // Clin. Chimica Acta. – 2002. – **320**, № 1 – 2. – P. 43 – 47.
 32. Williams S.B., Cusco J.A., Roddy M.A. et al. Impaired nitric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus // J. Amer. Coll. Cardiol. – 1996. – **27**, № 3. – P. 567 – 574.