

В.Ф. Сагач, О.Д. Присяжна, М.М. Ткаченко, А.В. Коцюруба

## Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету

*На моделі стрептозотоциніндуцированого сахарного діабета показано изменение соотношения окислительного и неокислительного путей метаболизма L-аргинина в направлении активизации неокислительного (аргиназного). Об этом свидетельствуют увеличение соотношений как активности аргиназы к NO-синтазе, так и соответствующих метаболитов. Содержания свободного L-аргинина в тканях животных с экспериментальным сахарным диабетом снижено. Показано, что длительное введение L-аргинина восстанавливает функции эндотелия, однако отмена препарата приводит к постепенному снижению такого эффекта.*

### ВСТУП

Відомо, що саме ендотеліальна дисфункція є основним патогенетичним механізмом розвитку діабетичних ангіопатій. Деякі сучасні дослідження вказують на надзвичайно важливу роль порушень системи оксиду азоту (NO) у розвитку даної дисфункції [5, 7, 12]. Одним із можливих механізмів зниження синтезу NO є зменшення клітинного пулу субстрату NO-синтази – L-аргініну. Це може бути наслідком порушення надходження цієї амінокислоти в клітину або активації аргінази – конкурента NO-синтази за L-аргінін. Дослідження, в яких вивчали вміст аргініну в тканинах за умов цукрового діабету, а також вплив застосування L-аргініну на ендотеліальну дисфункцію в експериментальній і клінічній практиці не дозволяють зробити однозначних висновків про участь аргінази в розвитку порушень синтезу оксиду азоту [10, 11, 13, 14, 18]. Виходячи з вищенаведеного, метою нашої роботи було дослідити особливості метаболізму L-аргініну в ендотелії за умов експериментального цукрового діабету,

а також оцінити вплив введення екзогенного L-аргініну на функцію ендотелію.

### МЕТОДИКА

Дослідження були проведені на моделі стрептозотоциніндукованого цукрового діабету. Для цього щурам-самцям лінії Вістар – Кіото віком 4 міс і масою 200–250 г був введений внутрішньоочеревинно стрептозотин (“Sigma”, США) з розрахунку 50 мг/кг. У дослід брали тварин через 8–10 тиж після введення препарату. Контроль вмісту глюкози крові здійснювали за допомогою глюкометра “Медісенс” (“Abbott”, США).

Судинні реакції досліджували на ізольованих препаратах грудного відділу аорти. Аорту нарізали на сегменти шириною 1,5–2 мм і масою 2–2,5 мг з урахуванням циркулярної орієнтації гладеньком’язового шару. Кільцевий препарат для дослідження поміщали в проточну термостатовану (36–36,5° С) камеру об’ємом 1 см<sup>3</sup>, у якій препарат піддавали пасивному розтягненню силою 8–10 мН і витримували протягом 30–60

хв у модифікованому розчині Кребса наступного складу (ммоль/л): NaCl – 133,0, KCl – 4,7, NaHCO<sub>3</sub> – 16,3, Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 1,38, CaCl<sub>2</sub> – 2,5, MgCl<sub>2</sub> – 1,05, глюкоза – 7,8 (рН 7,4).

Активності гладеньких м'язів досягали додаванням до буферного розчину норадреналіну ("Sigma", США) у концентрації 10<sup>-5</sup> моль/л. Скорочувальну активність аорти реєстрували в режимі, наближеному до ізометричного, за допомогою механоелектричного перетворювача 6MX1C. Для дослідження ендотеліязалежного розслаблення судинного препарату реєстрували зміни тонічної напруги гладеньких м'язів на агоніст мускаринових рецепторів ацетилхоліну гідрохлорид ("Fluka", Швеція) у концентрації 10<sup>-6</sup> моль/л. Рівень скорочення гладеньких м'язів на норадреналін приймали за 100%. Амплітуду зміни тонічної напруги судинного препарату при додаванні до розчину ацетилхоліну розраховували у відсотках від рівня їхнього стійкого скорочення ("плато").

У плазмі крові, еритроцитах, гомогенатах серця й аорті щурів визначали вміст вільного L-аргініну, активність аргінази та NO-синтази, а також вміст їх метаболітів. Розраховували такі величини, як відношення активності аргінази до активності NO-синтази і відношення вмісту метаболітів аргінази (карбамід і поліаміни) до вмісту метаболітів NO-синтази (сума нітрат-, нітрит-аніонів і нітрозотіолів).

Вміст вільного аргініну в попередньо підготовлених пробах вимірювали за допомогою автоматичного амінокислотного аналізатора Т-339 (Чехія). Проби готували таким чином: до відібраних тканин (тканини серця й аорти попередньо гомогенізували) додавали рівний об'єм 3 %-ї сульфосаліцилової кислоти для осадження білка, після чого суміш центрифугували при 3500 хв<sup>-1</sup> протягом 10 хв. Надосадову рідину використовували для визначення вмісту вільних амінокислот. Вміст L-аргініну виражали в мікрограмах на грам проби.

Активність аргінази вимірювали за утворенням карбаміду, а вміст карбаміду визначали за допомогою діагностичного набору фірми "Lahema" (Чехія).

Для визначення активності NO-синтаз використовували комбінацію класичного метода [16] та сучасну його модифікацію [6], пристосовану до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – нітрит-аніона [17].

Для визначення активності сумарної NO-синтази (сNOS+iNOS) аліквоти грубих гомогенатів тканин, що містили 500–1000 мкг білка інкубували в загальному об'ємі 1 мл субстратної суміші наступного складу (ммоль/мл): KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 50, MgCl<sub>2</sub> – 1, CaCl<sub>2</sub> – 2, НАДФН – 1, L-аргінін – 2, рН 7,0 протягом 60 хв при 37 °С. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2 N HClO<sub>4</sub>. Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш і попередньо денатурований 2 N HClO<sub>4</sub> білок. Суміш центрифугували при 3500 хв<sup>-1</sup> протягом 10 хв і в надосадовій суміші визначали вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> високоспецифічним спектрофотометричним методом у нашій модифікації за кольоровою реакцією з реактивом Гріса. Цей метод тепер широко використовується для дослідження активності NO-синтаз як iNOS [17], так і сNOS [4]. Методика визначення iNOS аналогічна попередній за деякими відмінностями: для визначення активності кальційнезалежної NOS в інкубаційну суміш замість CaCl<sub>2</sub> додавали 2 мкмоль ЕДТА. Сумарну активність сNOS (eNOS+nNOS) вираховували, віднімаючи від сумарної активності NOS активність iNOS.

Активність ферментів виражали в пікомолях новоутвореного NO<sub>2</sub><sup>-</sup> за 1 хв в розрахунку на 1 мг загального білка в пробі.

Вміст нітрит-аніона (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) визначали в безбілкових аліквотах надосадових 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 за модифікованим нами [3] методом Гріна [8].

Вміст нітрат-аніона (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) визначали в гомогенатах тканин спектрофотометричним методом у нашій модифікації, де замість стрихніну використовували його гідрок-

сильоване похідне – бруцин, що дало змогу підвищити чутливість методу [9] у 100 разів.

Вміст загального білка в пробах досліджували загальноновживаним методом Бредфорда, використовуючи барвник *Cumassi G-250*.

Амінокислоту L-аргінін (“Sigma”, США) застосовували *in vitro* (додаванням до перфузуючого розчину в концентрації  $10^{-4}$  моль/л) ( $n=5$ ), внутрішньоочеревинним введенням 25 мг/кг за 1 год до початку експерименту ( $n=5$ ) і додаванням до питної води з розрахунку 25 мг/кг щодобово ( $n=18$ ). Щодобове введення препарату здійснювали протягом 2 тиж, після чого частину ( $n=7$ ) тварин взяли у дослід, а іншим ( $n=11$ ) введення препарату припиняли для оцінки стійкості можливих ефектів. Тварин, що залишилися, розділили на дві групи та брали їх в експеримент через 1 ( $n=6$ ) і 2 ( $n=5$ ) тиж після припинення введення препарату.

Результати обробляли методом варіаційної статистики, використовуючи програмне забезпечення Origin 6.1 фірми “Microcal Software, Inc” (США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вміст глюкози у крові щурів з цукровим діабетом становив  $21,1 \text{ ммоль/л} \pm 6,7 \text{ ммоль/л}$ , у контрольній групі –  $6,4 \text{ ммоль/л} \pm 0,6 \text{ ммоль/л}$ .

Відношення активності аргінази до активності NO-синтази за умов експериментального цукрового діабету в тканинах серця збільшувалося більш ніж у 4 рази, аорти – майже у 5 разів, а в еритроцитах – у 25 разів порівняно з контрольними тканинами (рис. 1).

Відношення вмісту метаболітів аргінази (карбамід і поліаміни) до вмісту метаболітів NO-синтази (сума нітрат-, нітрит-аніонів і нітрозотіолів) також змінилось: збільшилося при діабеті в тканинах серця у 2 рази (з  $2,8 \cdot 10^{-3}$  у контрольних тварин до  $6,2 \cdot 10^{-3}$  за умов цукрового діабету), у плазмі в 4,8 рази (з  $7,8 \cdot 10^{-3}$  у контрольних тварин до  $37,4 \cdot 10^{-3}$  за умов цукрового діабету), а в еритроцитах в 2,2 рази (з  $3,4 \cdot 10^{-3}$  у контрольних тварин до  $7,7 \cdot 10^{-3}$  за умов цукрового діабету).

Вміст вільного L-аргініну знижувався в аорті у 2,7 рази, у плазмі у 1,7 рази і в еритроцитах удвічі при незначних змінах у тканині серця (рис. 2).

Таким чином, у тварин з експериментальним цукровим діабетом спостерігається зниження вмісту L-аргініну в тканинах і плазмі крові при посиленні його метаболізму по неокисному шляху. Це може зумовити порушення ендотеліозалежного розслаблення судинних препаратів грудного відділу аорти [2, 5]. Подібні порушення спостерігаються також при артеріальній гіпертензії [1].

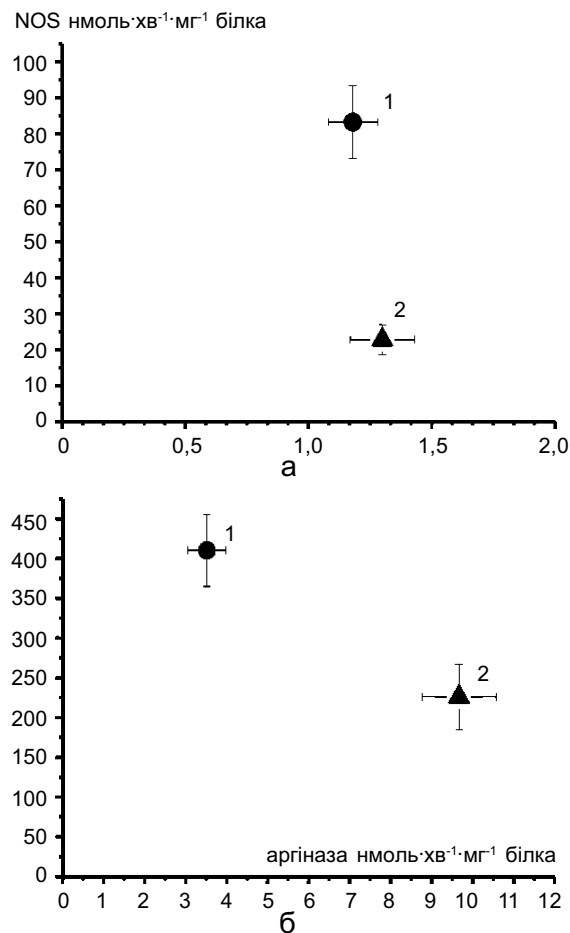


Рис.1 Зміни активності аргінази та NO-синтази в тканинах серця (а) та аорти (б) за умов експериментального цукрового діабету: 1 – контроль, 2 – діабет

Отримані результати вказують на можливість терапевтичного ефекту введення L-аргініну. Додавання останнього до перфузуючого розчину не призводило до достовірних змін амплітуди ендотеліозалежного розслаблення як у контрольних тварин ( $129,5 \% \pm 16,7 \%$ ), так і у щурів з експериментальним діабетом ( $26,8 \% \pm 8,7 \%$ ). Внутрішньоочеревинне введення розчину L-аргініну за 1 год до початку експерименту також не відновлювало ендотеліозалежного розслаблення гладеньком'язових судинних препаратів у тварин з цукровим діабетом ( $23,8 \% \pm 9,4 \%$ ).

Щодобове введення досліджуваної амінокислоти протягом двох тижнів призвело до майже повного відновлення ендотеліозалежного розслаблення ( $96,6 \% \pm 5,6 \%$ ). Після тижневої перерви реакції продовжували зберігатися на рівні розслаблення гладеньком'язових препаратів контрольних тварин і  $92,1 \% \pm 8,4 \%$ , а через 14 діб знову знизилися до  $35,7 \% \pm 5,6 \%$  (рис. 3).

Отримані результати свідчать про тимчасовий ефект тривалого введення L-аргініну при відсутності швидкої дії безпосередньо після введення.

Існує кілька можливих шляхів сприятливого впливу екзогенного L-аргініну на функцію ендотелію при цукровому діабеті.

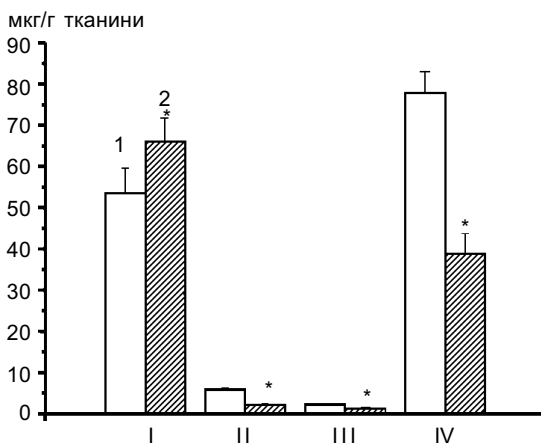


Рис.2 Зміни вмісту вільного L-аргініну в тканинах щурів з експериментальним цукровим діабетом: 1 – контроль, 2 – діабет; I – серце, II – аорта, III – плазма, IV – еритроцити

Одним з основних, імовірно, є збільшення клітинного пулу L-аргініну і його доступності для окисного шляху метаболізму. У дослідженнях Lubec із співавт. [10] показано зниження показників перекисного окиснення ліпідів у пацієнтів з цукровим діабетом під впливом тривалого прийому L-аргініну. Відомо також, що останній активує синтез інсуліну  $\beta$ -клітинами острівців Лангерганса [15]. Судинні ефекти L-аргініну не зводяться тільки до функції субстрату NO-синтази, а зумовлені також зниженням перекисного окиснення ліпідів і виділення супероксиданіона і його здатністю зв'язувати активні форми кисню [18].

Таким чином, завдяки багатогранному впливу, тривале введення екзогенного L-аргініну сприяє відновленню функції судинного ендотелію при експериментальному цукровому діабеті.

## ВИСНОВКИ

1. При експериментальному цукровому діабеті порушується співвідношення окисного і неокисного шляхів метаболізму L-аргініну в напрямку активізації неокислювального шляху.

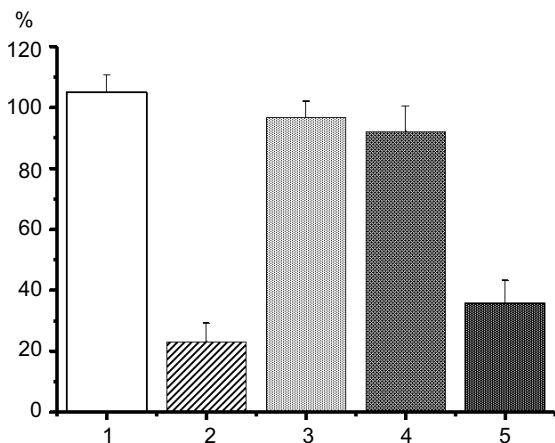


Рис.3 Ендотеліозалежне розслаблення гладеньком'язових препаратів аорти контрольних тварин (1), щурів з експериментальним цукровим діабетом (2), щурів з експериментальним цукровим діабетом після 2 тиж прийому L-аргініну (3) і після 1-тижневої (4) і 2-тижневої перерви

2. За умов цукрового діабету знижується вміст вільного L-аргініну в тканинах і плазмі крові.

3. Тривале введення L-аргініну тваринам з експериментальним діабетом призводить до відновлення функції ендотелію, а відміна його – до поступового зниження такого ефекту.

**V.F. Sagach, O.D. Prisyazhna,  
M.N. Tkachenko, A.V. Kotsuruba**

### THE EFFECT OF L-ARGININE ON THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF ENDOTHELIUM UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

The experimental data about the shift of L-arginine metabolism in the direction of activation of non-oxidizing (arginase) way under experimental diabetes mellitus are presented. This shift was proved by an increase of the ratio of arginase and NO-synthase activity and an increase of the ratio of their metabolites. The decrease of the free L-arginin contents in tissues of animals with experimental diabetes mellitus is shown. The long infusion of L-arginine results in the restoration of the endothelial function, however cessation of infusion results in a gradual reduction of this effect.

*O.O. Bogomolets Institute of Physiology National Academy  
of Sciences of Ukraine, Kyiv  
A.V. Palladin Institute of Biochemistry National Academy of  
Sciences of Ukraine, Kyiv*

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Сагач В.Ф., Базілюк О.В., Коцюруба А.В. і ін. Порушення ендотелійзалежних судинних реакцій, аргіназного та NO-синтазного шляхів обміну L-аргініну при артеріальній гіпертензії // Фізіол. журн. – 2000. – **46**, № 3. – С. 3–13.
2. Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Присяжна О.Д. і ін. Зміни вазодилататорних реакцій судинних гладеньких м'язів і системи оксиду азоту за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2003. – Т. **49**, № 4. – С. 24–32.
3. Коцюруба А.В., Семікопна Т.В., Вікторов О.П. та ін. Спосіб кількісного визначення нітрит-аніону в біологічній рідині. Пат. України № 6 601N33152. Бюл. №7–11 від 15.12.2000 р.
4. 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.
5. Calles-Escandon J., Cipolla M. Diabetes and Endothelial Dysfunction: A Clinical Perspective // Endocrine Reviews. – 2001. – **22**, № 1. – P. 36–52.
6. Chin S.Y., Pandey K.N., Shi S.J. et al. Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats // Amer. J. Physiol. – 1999. – **277**, № 5. – P. 797–804.
7. De Vriese A.S., Verbeuren T.J., Van de Voorde J. et al. Endothelial dysfunction in diabetes // Brit. J. Pharmacol. – 2000. – **130**, № 5. – P. 963–974.
8. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [N<sup>+</sup>] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, № 1. – P. 131–138.
9. 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.
10. Lubec B., Hayn M., Kitzmuller E. et al. L-Arginine reduces lipid peroxidation in patients with diabetes mellitus // Free Radic. Biol. Med. – 1997. – **22**, № 1–2. – P. 355–357.
11. Mullen M.L., Wright D., Donald A.E. et al. Atorvastatin but not -arginine improves endothelial function in type I diabetes mellitus: a double-blind study // J. Amer. College Cardiol. – 2000. – **36**, № 2. – P. 410–416.
12. Pieper G.M. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes: Protective role of arginine on endothelial dysfunction // Hypertension. – 1998. – **31**, № 5. – P. 1047–1060.
13. Pieper G. M., Dondlinger L. A. Plasma and vascular tissue arginine are decreased in diabetes: Acute arginine supplementation restores endothelium-dependent relaxation by augmenting cGMP production // J. Pharmacol. and Exp. Therapeutics. – 1997. – **283**, № 2. – P. 684–691.
14. Rivera-Correa M., Altieri P.I., Escobales N. Parallel regulation of arginine transport and nitric oxide synthesis by angiotensin II in vascular smooth muscle cells: Role of protein kinase C // Amino Acids. – 1996. – **11**. – P. 153–170.
15. Schmidt H.H., Warner T.D., Ishii K. et al. Insulin secretion from pancreatic B cells caused by L-arginine-derived nitrogen oxides // Science. – 1992. – **255**. – P. 721–723.
16. Selter M., Knowles R.G., Moncada S. Widespread tissue distribution, species and changes in activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthases // FEBS Lett. – 1991. – **291**, № 1. – P. 145–149.
17. Vodovotz Y., Know N.S., Popischil M. et al. Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-gamma and bacterial lipopolysaccharide // J. Immunol. – 1994. – **152**, № 8. – P. 4110–4118.
18. Wascher T.C., Posch K., Wallner S. et al. Vascular effects of L-arginine: Anything beyond a substrate for the NO-synthase? // Biochem. and Biophys. Res. Com. – 1997. – **234**, № 1. – P. 36–38.

*Ін-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 10.01.2005*