

Ю.П. Коркач, А.В. Коцюруба, О.Д. Присяжна, Л.Д. Могильницька, В.Ф. Сагач

## **NO-залежні шляхи реалізації протекторної дії екдистерону на серце та судини при стрептозотоциніндукованому діабеті у щурів**

*На моделі стрептозотоциніндукованого інсулінзалежного діабета досліджували біохімічні механізми вазо- і кардіопротекторного дії екдистерона. Установлено, що застосування екдистерона в дозі 100 нг/100 г в сутки per os впродовж 2 міс після введення стрептозоточина нормалізує вміст глюкози в крові і підвищує, але не відновлює ендотеліальну реактивність судин. Вазо- і кардіопротекторне дії екдистерона досягається за рахунок інгібування надлишкового кальційнезалежного індукційного та реутилізаційного синтезу NO і, навпаки, стимулювання його кальційзалежного конститутивного de novo синтезу в серці та аорті щурів, а також обмеження деградації L-аргініну аргіназой.*

### **ВСТУП**

Нині вже не викликає сумнівів наявність тісного взаємозв'язку порушень обміну вуглеводів і кардіоваскулярних хвороб. Однією з найбільш нагальних проблем сучасної ендокринології є цукровий діабет, який супроводжується гіперглікемією та ураженням судин із розвитком ендотеліальної дисфункції, яка відіграє ключову роль у патогенезі цілої низки системних патологій (атеросклерозу, гіпертонії, інсульту тощо) [15, 17] і є наслідком дефіциту інсуліну чи інсулінової резистентності. Сучасні дослідження вказують на те, що дефіцит інсуліну, ендотеліальна дисфункція та порушення продукції оксиду азоту (NO) тісно пов'язані між собою. Відомо, що NO – унікальний медіатор міжклітинної взаємодії, бере участь у формуванні базального тону судин, стабілізує проникність судинної стінки, є одним із найпотужніших вазодилататорів [3, 15]. Інсулін, у свою чергу, регулює синтез NO за рахунок активації фосфатидилінозитол-3-кінази і

протеїнкінази B у всіх клітинах, де наявні його рецептори, в т.ч. і в ендотеліальних клітинах судин [3], що призводить до кальційнезалежної активації в них ендотеліальної NO-синтази (NOS) внаслідок її фосфорилування протеїнкіназою B [14, 12]. Тому при лікуванні цукрового діабету саме ендотелій є важливою терапевтичною мішенню для корекції ендотеліальної дисфункції через стимуляцію ендотеліальної залежного звільнення NO. Рослинний аналог активного метаболіту вітаміну D<sub>3</sub> кальцитриолу – екдистерон, здатний активувати в клітинах різних органів, у тому числі в кардіоміоцитах, синтез NO [1], підвищувати активність протеїнкінази B, а також чинити антирадикальну дію [12]. Гіпоглікемічна дія C<sub>27</sub>-стероїдних гормонів кальцитриолу та його аналога екдистерону відома вже давно [12], але молекулярні механізми її досі не встановлені.

Метою нашої роботи було дослідити NO-залежні механізми реалізації протекторної дії екдистерону на серце та судини щурів з експериментальним цукровим діабетом.

© Ю.П. Коркач, А.В. Коцюруба, О.Д. Присяжна, Л.Д. Могильницька, В.Ф. Сагач

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на трьох групах щурів-самців лінії Вістар – Кіото віком 6 міс і масою 200–250 г. До I групи (15 тварин) увійшли інтактні щури, до II – щури (20 тварин) із модельованим діабетом, яким вводили стрептозотоцин (5мг/100г, “Sigma”, США), до III – увійшли щури (15 тварин) з діабетом, яким із питною водою протягом 2 міс після введення стрептозоточину давали екдистерон (100 нг/100 г). Контроль вмісту глюкози у крові здійснювали за допомогою глюкометра “Медісенс” (“Abbott”, США).

Дослідження скорочувальної активності аорти проводили на ізольованих препаратах її грудного відділу [5]. Судини виділяли після декапітації та розтину грудної порожнини тварин. У гомогенатах серця й аорти визначали показники (активність нітратредуктази, аргінази, різних ізоферментів NOS – індукцйбельної та конститутивної – та стабільні пули NO: нітрит- і нітрат-аніони), що характеризують обмін оксиду азоту. Використовували кристалічний препарат екдистерону, який виділяли в Інституті біохімії НАН України із рослин *Serratula coronata* [7]. Активність різних ізоформ NOS: кальційзалежної (ендотеліальної та нейрональної) та кальційнезалежної (індукцйбельної) визначали за методом, пристосованим до спектрофотометричного вимірювання вмісту нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) [16], у безбілкових гомогенатах серця та аорти за допомогою реактиву Гріса методом Гріна [10]. Вміст нітрат-аніона ( $\text{NO}_3^-$ ) вивчали в безбілкових гомогенатах та при визначенні активності нітратредуктази за допомогою бруцинового реактиву колориметричним методом [8]. Сумарну аргіназну активність (цитозольна аргіназа I і мітохондріальна аргіназа II) досліджували за утворенням сечовини [11], сумарну НАДН-залежну нітратредуктазну активність – за зменшенням вмісту нітрат-аніона ( $\text{NaNO}_3$ ) при наявності надлишку НАДН (“Sigma”,

США) [18]. Вміст загального білка в пробах визначали із використанням барвника Cumassi G-250 (“FERAK”, Німеччина). Результати обробляли методом варіаційної статистики, використовуючи програмне забезпечення Origin 6.0 фірми “Microcal Software, Inc” (США).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Вміст глюкози у контрольних щурів становив  $6,4 \text{ ммоль/л} \pm 0,6 \text{ ммоль/л}$ , у щурів дослідних груп (I і II) –  $21,1 \pm 6,7$  і  $9,1 \text{ ммоль/л} \pm 0,7 \text{ ммоль/л}$  відповідно. Раніше нами було показано, що у щурів з діабетом істотно порушується реакція судин на ендотелійзалежний вазодилататор ацетилхолін при збереженні за цих умов реакцій на ендотелійнезалежний вазодилататор нітропрусид натрію, що свідчить про розвиток ендотеліальної дисфункції, як ускладнення цукрового діабету, при збереженні функціональної здатності гладеньких м’язів судин [6]. Ми спостерігали достовірне зниження ендотелійзалежної скоротливості аорти у щурів II групи ( $23,12\% \pm 6,18\%$ ,  $P < 0,05$ ) відносно контрольних значень ( $104,33\% \pm 4,55\%$ ,  $P < 0,05$ ), причому в III групі тварин відмічалось лише незначне підвищення ендотелійзалежної скоротливості аорти. ( $30,39\% \pm 5,74\%$ ,  $P > 0,05$ ) Отже, введення екдистерону нормалізувало вміст глюкози в крові, але не впливало на ендотелійзалежну скорочувальну функцію аорти.

Для підтвердження взаємозв’язку динаміки вазодилатації та вмісту глюкози в крові з порушенням обміну NO ми дослідили дію екдистерону на зміни, що відбуваються в обміні оксиду азоту через 60 діб після введення стрептозоточину і розвитку діабету I типу (у щурів II групи). Для цього було досліджено дію екдистерону на конститутивний, індукцйбельний і реутилізаційний синтез NO та на активність неокисного аргіназного метаболізму L-аргініну,

що конкурує за спільний субстрат з окисним NO-синтазним його метаболізмом, а також дію екдистерону на вміст  $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$  в серці та аорті щурів III групи через 2 міс після введення їм стрептозоточину. Паралельно досліджували ці самі показники в серці й аорті тварин I та II груп (таблиця, рисунок).

Як показали наші дослідження, за стрептозоточинового діабету (II група) спостерігали значне зниження конститутивного синтезу NO, про що свідчить зниження сумарної активності кальційзалежної NOS у серці та аорті щурів, і навпаки, реципрокне підвищення індукційного кальційнезалежного та реутилізаційного синтезу NO, при цьому також значно підвищується неокисний метаболізм аргініну.

Основною причиною високої активності аргінази й індукційної NOS в органах серцево-судинної системи щурів з діабетом може бути їх підвищена коекспресія (разом з індукційною NOS індукційного мітохондріального ізоферменту аргінази II),

що може призводити до інгібування конститутивного синтезу NO. У такому разі дія екдистерону полягатиме в інгібуванні експресії як індукційної NOS, так і аргінази II, що і зумовлює зниження деградації аргініну аргіназою та підвищення кальційзалежного конститутивного синтезу NO.

Інтенсифікація нітратредуктазного (діє лише в умовах гіпоксії) реутилізаційного синтезу NO із його стабільних метаболітів ( $\text{NO}_2^-$  та  $\text{NO}_3^-$ ) за умов діабету вказує на порушення оксигенації органів кардіоваскулярної системи при дії стрептозоточину. Високий вміст NO, що утворюється в цих умовах, може бути причиною не лише зниження конститутивного синтезу NO, але також і значного підвищення вмісту пероксинітриду ( $\text{ONOO}^-$ ) [4]. Це також підтверджується нашими результатами щодо зміни активностей досліджених ферментів у серці й аорті щурів II групи.

Екдистерон значно знижував індукційний окисний і аргіназний неокисний метаболізм аргініну, а також реутилі-

Дія екдистерону на активність ферментів у серці та аорті щурів за умов стрептозоточиніндукованого діабету ( $M \pm m$ )

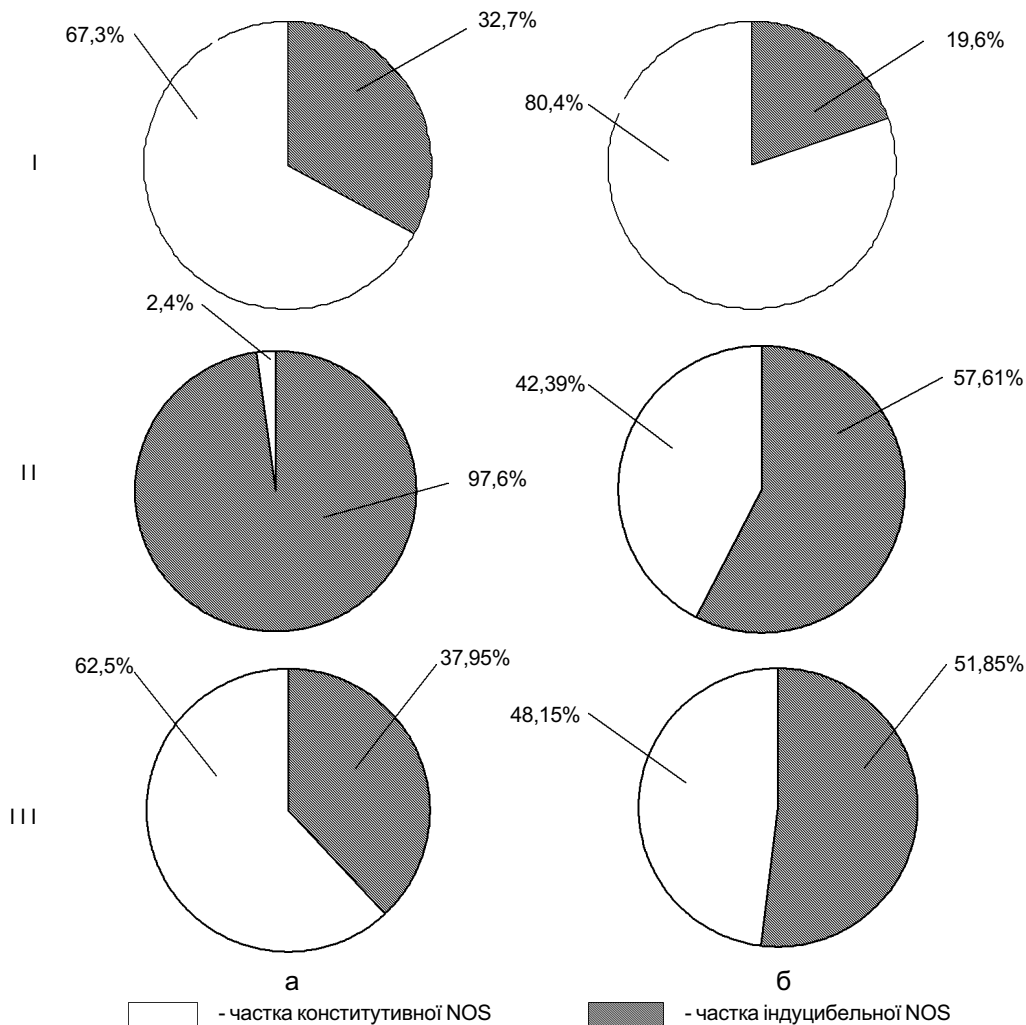
Показник	Контроль (I група; n = 15)	Діабет (II група; n = 10)	Діабет і введення екдистерону (III група; n = 10)
Серце			
NO-синтаза, $\text{пмоль/хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$			
індукційна	$2,72 \pm 0,39$	$18,32 \pm 4,29^*$	$1,78 \pm 0,14^{*,**}$
конститутивна	$5,60 \pm 0,62$	$0,44 \pm 0,15^*$	$2,19 \pm 0,26^{*,**}$
Нітратредуктаза $\text{нмоль/ хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	$2,26 \pm 0,30$	$5,93 \pm 1,29^*$	$3,41 \pm 0,67^*$
Аргіназа, $\text{нмоль/хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	$1,18 \pm 0,1$	$1,30 \pm 0,36$	$0,50 \pm 0,16^{*,**}$
$\text{NO}_2^-$ , $\text{пмоль/мг}$	$454,44 \pm 41,5$	$43,28 \pm 10,64^*$	$418,97 \pm 14,85^{*,**}$
$\text{NO}_3^-$ , $\text{нмоль/мг}$	$88,13 \pm 7,08$	$79,94 \pm 6,23$	$41,06 \pm 6,6^{*,**}$
Аорта			
NO-синтаза, $\text{пмоль/хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$			
індукційна	$8,04 \pm 1,10$	$13,02 \pm 2,10$	$14,15 \pm 0,75^*$
конститутивна	$32,99 \pm 3,41$	$9,58 \pm 1,25^*$	$13,14 \pm 2,17^*$
Нітратредуктаза, $\text{нмоль/ хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	$5,85 \pm 0,71$	$91,15 \pm 7,61^*$	$19,56 \pm 2,17^{*,**}$
Аргіназа, $\text{нмоль/ хв}^{-1} \cdot \text{мг}^{-1}$	$3,52 \pm 0,46$	$9,67 \pm 1,95^*$	$3,39 \pm 0,50^{*,**}$
$\text{NO}_2^-$ , $\text{пмоль/мг}$	$341,4 \pm 53,61$	$235,88 \pm 40,09$	$452,76 \pm 72,21^{**}$
$\text{NO}_3^-$ , $\text{нмоль/мг}$	$57,17 \pm 9,67^*$	$130,6 \pm 15,17$	$57,35 \pm 9,40^*$

\* зміни достовірні ( $P < 0,05$ ) відносно контролю; \*\* зміни достовірні ( $P < 0,05$ ) щодо значень у тварин з діабетом.

заційний синтез NO внаслідок пригнічення активності нітратредуктази в серці й аорті шурів III групи, що свідчить про можливе інгібування утворення ONOO<sup>-</sup> за його дії, а отже, і про його антигіпоксичний вплив. Про таку дію екдистерону свідчать також зміни вмісту стабільних метаболітів NO. Вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, який утворюється при окисненні NO лише у окисгенованих водних розчинах у серці шурів із цукровим діабетом достовірно знижувався, тоді як вміст NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, який утворюється в основному при розпаді ONOO<sup>-</sup>, навпаки, достовірно збільшувався в аорті шурів із діабетом. У шурів, які одержували екдистерон достовірно підви-

щувався вміст NO<sub>2</sub><sup>-</sup> як у серці, так і в аорті та знижувався вміст NO<sub>3</sub><sup>-</sup> у серці шурів.

Слід відмітити, що інтенсивність реутилізаційного синтезу NO через послідовне відновлення нітрату та нітриту відповідно нітрат- і нітрит-редуктазами (наномоль за 1 хв) значно перевищує інтенсивність його синтезу de novo внаслідок окиснення аргініну (пікомоль за 1 хв). Гіперпродукція NO за умов сумісної дії індукцйбельної NOS і редуктаз може інгібувати конститутивний синтез NO, і як наслідок, розвиватиметься ендотеліальна дисфункція, яку ми і спостерігали. Нещодавно було встановлено [9], що за умов гіпоксії ендотеліальна NOS починає



Зміни розподілу активності ферментів NO-синтази в серці (а) та аорті (б) шурів за умов стрептозотоциніндукованого діабету під впливом екдистерону: I – контроль, II – діабет, III – діабет і введення екдистерону

працювати як нітритредуктаза, генеруючи NO з великою інтенсивністю, при цьому її NO-синтазна активність знижується, а тому відновлення останньої за дії екдистерону в серці можна розглядати також, як прояв антигіпоксичної дії екдистерону. При діабеті, в умовах гіперпродукції NO та можливої нестачі субстрату L-аргініну (за високої активності його деградації аргіназою), кальційзалежні NOS замість NO можуть інтенсивно генерувати супероксид-радикал, тим самим підсилюючи утворення ONOO<sup>-</sup>. Саме тому, на нашу думку, важливе значення для реалізації гіпоглікемічної дії екдистерону має інгібування як активності аргінази, так і надлишкового синтезу NO.

Отримані результати, а саме відсутність відновлення ендотелійзалежної реактивності грудної аорти через 60 діб після введення стрептозоцину за дії C<sub>27</sub>-стероїдного гормону екдистерону, незважаючи на майже цілковиту нормалізацію вмісту глюкози в крові, передбачають декілька можливих причин, наприклад, що екдистерон лише частково нормалізував баланс між різними кальційзалежними ізоферментами (ендотеліальним і нейрональним) конститутивного синтезу оксиду азоту в аорті щурів з діабетом. Враховуючи той факт, що нейрональна NOS у серці та аорті зосереджена переважно в мітохондріях, можна припустити, що екдистерон не відновлює повністю активність конститутивного синтезу NO в цих органелах, порушений за тривалої дії гіперглікемії, хоч і нормалізує його в мітохондріях серця у старих тварин [2].

**Ju.P. Korkach, A.V.Kotsuruba, O.D. Prisyazhna, L.D. Mogylnytska, V.F.Sagach**

#### **NO-DEPENDENT MECHANISMS OF ECDYSTERONE PROTECTIVE ACTION ON HEART AND VESSELS AT STREPTOZOTOCIN-INDUCED DIABETES MELLITUS IN RATS**

Ecdysterone (100ng/100g) chronic oral administration (2 month) after STZ (5mg/100g) administration) normalized plasma glu-

cose levels in rats. This potent hypoglycemic effect of ecdysterone depend on inhibition of non-constitutive NO synthesis by Ca<sup>2+</sup>-independent iNOS and NADP-dependent nitrate reductase as well as inhibition of L-arginine degradation by arginase result in up-regulation of Ca<sup>2+</sup>-dependent constitutive NO synthesis by eNOS or mitochondrial nNOS in heart and aorta of rats.

*Bogomoletz Institute of Physiology, National Academy of Science of Ukraine, Kyiv;  
O.V. Palladin Institute of Biochemistry National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

#### **СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ**

1. Коцюрба А.В., Буханевич О.Л., Тараканов С.С., Холодова Ю.Д. Модуляція внутрішньоклітинних пулів циклічних пуринових нуклеотидів біологічно активними оксистеринами – екдистероном та вітаміном D3 // Укр. біохім. журн. – 1993. – **65**, № 5. – С. 76–78.
2. Коцюрба А.В., Коркач Ю.П., Рудык Е.В. и др. Эффективность экдистерона как ингибитора МРТ в митохондриях сердца старых крыс; кардиопротекция путем коррекции окислительного (de novo) и восстановительного (salvage) путей синтеза NO в митохондриях: Материалы Международ. симпоз. „Активные формы кислорода, азота и хлора в регуляции клеточных функций в норме и при патологии” (28–29 сент. 2006 г., Гродно). – Ч.1. – С. 157–162.
3. Присяжная О.Д., Ткаченко М.М., Коцюрба А.В., Сагач В.Ф. Система оксиду азоту та експериментальний цукровий діабет // Клін. та експерим. патологія. – 2004 – **3**, № 2, ч. 1. – С. 175–176.
4. Реутов В.П., Сорокина Е.Г., Охотин В.Е., Косицин Н.С. Циклические превращения оксида азота в организме млекопитающих. – М.: Наука, 1997. – 158 с.
5. Сагач В.Ф., Присяжна О.Д., Ткаченко М.М., Коцюрба А.В. Аплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за експериментального діабету // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, №2. – С. 3–7.
6. Сагач В.Ф., Ткаченко М.М., Присяжна О.Д. та ін. Зміни вазодилататорних реакцій судинних гладеньких м'язів та системи оксиду азоту за умов експериментального цукрового діабету // Так само. – 2003. – **49**, №4. – С. 24–32.
7. Холодова Ю.Д. Фитоэкдистероиды // Биохимия животных и человека. – 1987. – №11. – С. 27–41.
8. Шугалей В.С., Козина А.С. Содержание мочевины и активность аргиназы в органах крыс при акклиматизации к холоду // Физиол. журн. СССР. – 1977. – № **8**. – С. 1199–1202.
9. Gautier C., van Fassen F., Mikula I. et al. Endothelial nitric oxide synthase reduces nitrite anions to NO under anoxia // Biochem. and Biophys. Res. Comm. – 2006. – **341**, №3. – P.816 – 821.

10. Green L.L., Wagner D.A., Glogowski J. et al. Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids // Anal. Biochem. – 1982. – **126**, №1. – P.131–138.
11. Jsukahara H. Effect of NOS inhibitions on bone methabolizm in growing rats // Amer. J. Physiol. – 1996. – **270**, №5. – E840–E845.
12. Kahn N.N., Acharya K., Bhattacharya S. et al. Nitric Oxide: “Second messenger” of insulin // IUBMB Life. – 2000. – **49**. – P. 441–450.
13. Lafont R., Dinan L. Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: and update // J. Insect Sci. – 2003. – **3**, №7. – P.1–30.
14. Montagnani M., Chen H., Barr V.A.. Insulin-stimulated activation of eNOS is independent of Ca<sup>2+</sup> but requires phosphorylation by Akt at Ser // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, № 32. – P. 30392–30398.
15. Quyyumi A.A. Endothelial function in health and disease: new insights into the genesis of cardiovascular disease // Amer. J. Med. – 1998. – **6**, №105. – P. 32–39.
16. Salter 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. Simon A., Castro A., Kaski JC. Assessment of endothelial dysfunction and its clinical usefulness // Rev. Esp. Cardiol. – 2001. – **542**. – P. 211–217.
18. Zhang Z., Naughton D., Winyard P.G. Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity // Biochem. and Biophys. Res. Comm. – 1998. – **249**, №3. – P.767–772.

*Ин-т фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ;  
Ин-т біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ*

*Матеріал надійшов до  
редакції 08.02.2007*