

І.В. Бродяк, Н.О. Сибірна

## Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету

*При експериментальному стрептозотоцициндуцированому діабеті в лейкоцитах периферической крові змінюється активність ферментів, маючих обциий субстрат – L-аргінін. Это приводить до порушення балансу між різними шляхами обміну аргініна: активується NO-синтазний (окислителный) и угнетається аргіназний (неокислителный). Введення L-аргініна при діабеті активизувало неокислителный метаболізм, о чьм свідельствуєть достовірне зниження активності NO-синтази на фоні незмінної активності аргінази. При введенні больным животным аміногуанідину в лейкоцитах понижается ефективність обох шляхів, что может бати основой востановлення фізіологического пула относительно незаменимой амінокислоти L-аргініна.*

### ВСТУП

L-аргінін бере участь в окисному перетворенні за допомогою ферменту NO-синтази (NOS) до оксиду азоту (NO) і в неокисному – за допомогою аргінази до сечовини та орнітину. Співвідношення між ними забезпечує в клітинах відповідний фізіологічний пул L-аргініну, а також генерацію активних форм азоту для здійснення лейкоцитами своїх функцій. Активація неокисного метаболізму L-аргініну може також спричинити обмеження в синтезі NO як через пригнічення активності NOS карбамідом, так і в результаті конкуренції за розподіл потоку аргініну між аргіназою та NOS. При порівнянні констант Міхаеліса видно, що спорідненість NOS до аргініну на три порядки вища, ніж у аргінази [13]. Інший продукт аргіназної реакції – орнітин є попередником у синтезі поліамінів, для яких доведена інгібуюча роль у синтезі NO de novo [1].

Цукровий діабет можна охарактеризувати як захворювання, при якому змінюється синтез і транспорт L-аргініну в клітинах [12]. Зменшення внутрішньоклітинного пулу L-аргініну може бути наслідком порушення

надходження цієї амінокислоти в клітини [15] та зниження синтезу аргініну в орнітиновому циклі на тлі розвитку гіпоксичного стану [2]. Відомо, що фізіологічний пул L-аргініну поновлюється за рахунок екзогенних джерел через кровообіг, внутрішньоклітинної деградації білків та ендogenous синтезу аргініносукцинатсинтазою й аргініносукцинатліазою [7]. З літератури відомо, що при експериментальному цукровому діабеті (ЕЦД) у тканинах і плазмі крові знижується вміст вільного L-аргініну [12]. Надмірна активація в лейкоцитах NOS або аргінази може призвести до виснаження фізіологічного пулу відносно незамінної амінокислоти аргініну.

Підвищення потужності NO-продукуючих систем сприяє адаптації різних систем організму за умов патології [1]. Однак відомо, що при надлишковій продукції NO втрачає свої захисні функції і виявляє вазодепресивну та цитотоксичну дію. Організм, у якому продукція NO прогресуючи наростає, „знешкоджує” його надлишок через зв'язування у депо [8]. Виявляється, що ефективність депонування NO збільшується при тривалій підтримці високого його вмісту у плазмі крові і, навпаки,

© І.В. Бродяк, Н.О. Сибірна

зменшується за умов NO-дефіцитних станів [15]. Отже, зміна ефективності депонування NO є одним із механізмів адаптації клітин до хронічної зміни його продукції за умов ЕЦД. Механізми захисної дії депо NO пов'язані зі зниженням активності і/або експресії NOS за принципом негативного зворотного зв'язку або вилученням надлишку активного NO [8].

Метою нашої роботи було дослідити активність ферментів і вміст продуктів окисного та неокисного обміну аргініну (NO-синтазога та аргіназного) в лейкоцитах у нормі і за умов ЕЦД на тлі введення шурам *per os* субстрату досліджуваних ферментів – L-аргініну та селективного неконкурентного інгібітора індукцибельної ізоформи NOS (iNOS) – аміногуанідину.

## МЕТОДИКА

Досліди проводили на білих щурах-самцях лінії Вістар масою 120–140 г (згідно з етичним кодексом МОЗ України). Тваринам було забезпечено вільний доступ до їжі та води із перебуванням у стандартних умовах (12-годинна зміна світла та темряви). ЕЦД у щурів викликали внутрішньоочеревинним введенням стрептозотоцину фірми “Sigma” (США) з розрахунку 7 мг/100 г. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, який визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів “Lachema” (Чехія). Через 72 год з моменту введення препарату тваринам до питної води додавали L-аргінін (“Reanal”, Угорщина) в концентрації 1,25 г/л протягом 14 діб або аміногуанідин (“Sigma”, США) у концентрації 1 г/л протягом 30 діб.

Лейкоцити виділяли з гепаринизованої крові (кінцеве розведення гепарин: венозна кров = 1:100) у градієнті густини з використанням Gradisol-G (“Aqua-medica”, Польща) згідно з інструкцією фірми-виробника. Після центрифугування клітини двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином

(рН 7,4). Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не меншою ніж 98 %. Лізис клітин проводили протягом 30 хв на льодяній бані буфером такого складу: 10 ммоль/л тріс-НСІ (рН 7,5), 150 ммоль/л NaCl, 1 % тритон X-100, 5 ммоль/л ЕДТА, 50 ммоль/л NaF, 1 ммоль/л фенолметилсульфонілфторид (“Fluka”, Швейцарія), 5 ммоль/л бензамідин (“Sigma”, США), 10 мкг/мл апротиніну (“Sigma”, США), 10 мкг/мл лейпептину (“Sigma”, США), 2 мкг/мл пепстатину (“Fluka”, Швейцарія), 0,25 ммоль/л  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  – у співвідношенні 1:10 за об'ємом.

Отриманий лізат клітин використовували для визначення активності NOS та аргінази, а також вмісту їх метаболітів. Для дослідження активності NOS використовували комбінацію класичного методу [17] та сучасну його модифікацію [12], пристосовану для спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – нітрит-аніона ( $\text{NO}_2^-$ ) [18].

Для визначення активності сумарної NOS (конститутивної NOS – cNOS та iNOS) аліквоти лізатів лейкоцитів інкубували в загальному об'ємі 1,8 мл субстратної суміші такого складу (мкмоль/мл):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 50,  $\text{MgCl}_2$  – 1,  $\text{CaCl}_2$  – 2, НАДФН – 1, L-аргінін – 2 (рН 7,0) протягом 60 хв при 37°C. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2 М  $\text{HClO}_4$ . Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш і попередньо денатурований за допомогою 2 М  $\text{HClO}_4$  білок. Суміш центрифугували при 3500  $\text{хв}^{-1}$  протягом 10 хв і в надосадовій рідині визначали вміст  $\text{NO}_2^-$  спектрофотометричним методом за кольоровою реакцією з реактивом Гріса.

Активність ферменту виражали в нанолях новоутвореного  $\text{NO}_2^-$  за 1 хв у розрахунку на 1 мг загального білка в пробі [12]. Вміст  $\text{NO}_2^-$  визначали в безбілкових надосадових аліквотах лізатів лейкоцитів у колориметричній реакції за допомогою реактиву Гріса [5, 6]. Активність аргінази вимірювали за утворенням сечовини [14], а вміст сечовини – за допомогою діагнос-

тичного набору фірми “Laheta” (Чехія). Концентрацію загального білка в пробах визначали загальноновживаним методом Петерсона [16].

Результати досліджень обробляли статистично з використанням критерію t Стьюдента. Розбіжності вважалися статистично вірогідними при  $P < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Попередніми нашими дослідженнями показало, що при ЕЦД у лейкоцитах крові вміст стабільних метаболітів оксиду азоту (нітриг- і нітрат-аніонів) був значно вищим, ніж у таких клітинах контрольної групи; активність cNOS вірогідно не змінювалася, а iNOS збільшувалася в 1,7 раза у порівнянні з контролем [2–4]. Цій ізоформі NOS властива висока продуктивність оксиду

азоту. Виходячи із отриманих результатів, для подальших досліджень з усіх сучасних інгібіторів NOS ми використали аміногуанідин, який є неконкурентним селективним інгібітором лише iNOS.

При ЕЦД у лейкоцитах крові виявлено пригнічення неокисного обміну L-аргініну. Так, активність аргінази знижується в 2,5 раза (рис. 1,а), а концентрація внутрішньоклітинного пулу сечовини – в 3,8 раза порівняно зі значеннями у контрольних тварин (див. рис. 1,б). За умов досліджуваної патології в лейкоцитах крові вірогідно зростає активність iNOS (див. рис. 1,а). Підвищення активності NOS може бути результатом експресії гена цього ферменту, що підтверджується експериментально збільшенням внутрішньоклітинного рівня мРНК даного ензиму в лейкоцитах крові за умов гіперглікемії [9].

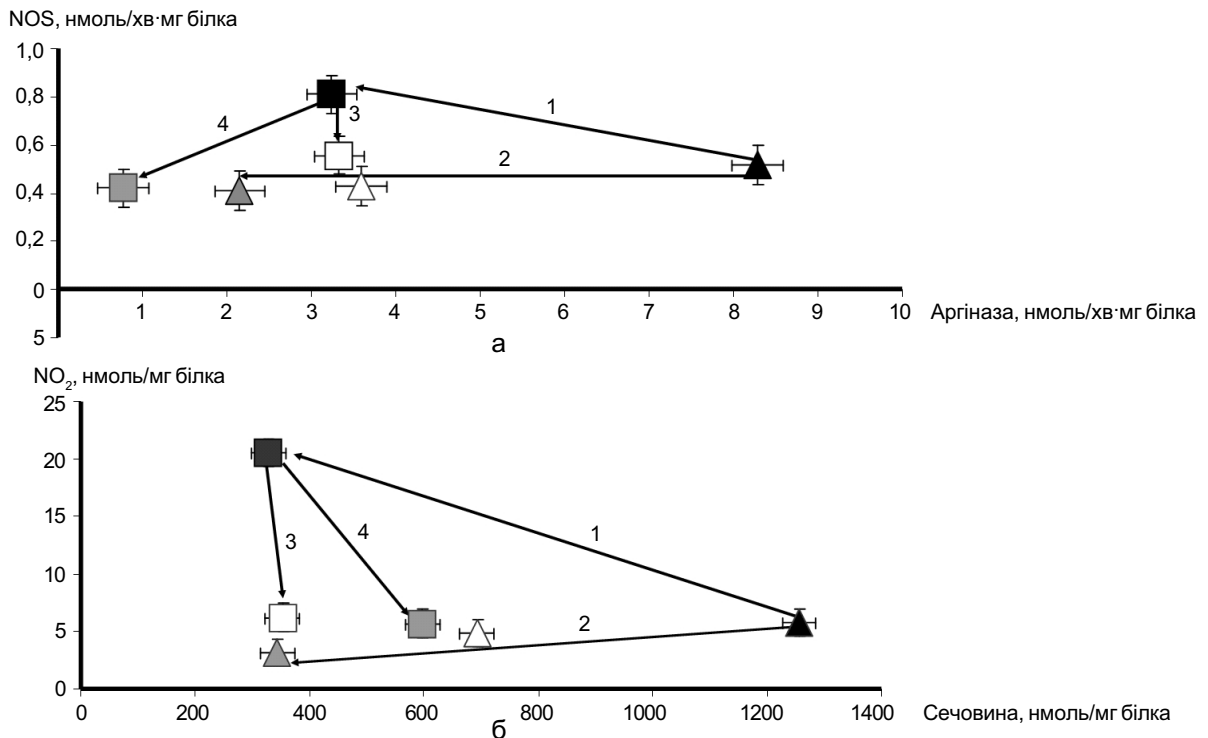


Рис. 1. Зміни активності ферментів (а) і продуктів метаболізму окисного та неокисного обміну L-аргініну (б) у лейкоцитах периферичної крові контрольних шурів і тварин з експериментальним цукровим діабетом: ▲ – контроль; △ – контроль і L-аргінін; ▴ – контроль і аміногуанідин; ■ – експериментальний цукровий діабет; □ – експериментальний цукровий діабет і L-аргінін; ▣ – експериментальний цукровий діабет і аміногуанідин. Напрямки змін досліджуваних показників зображено за допомогою стрілочок з номером, посилення на які в тексті вказано лише номером відповідної стрілочки

Отже, при ЕЦД порушується співвідношення окисного та неокисного метаболізму L-аргініну в напрямку активації окисного шляху. Такі зміни активності ферментів могли призвести до зменшення кількості вільного L-аргініну, який є спільним субстратом як для NOS, так і для аргінази. Тому на наступному етапі досліджень контрольним тваринам і щурам із ЕЦД ми вводили екзогенний L-аргінін і визначали зміни показників його обміну в лейкоцитах периферичної крові.

Введення L-аргініну призводило до зниження активності аргінази (див. рис. 1,а) та вмісту сечовини (див. рис. 1,б) в 3,8 і 3,6 рази відповідно у контрольних щурів, але не впливало на зміну досліджуваних показників у тварин з ЕЦД. На тлі введення L-аргініну у контролі та за умов діабету, індукованого стрептозотоцином, в лейкоцитах зменшується вміст  $\text{NO}_2^-$  (див. рис. 1,б), що може корелювати зі зниженням вмісту оксиду азоту і, як наслідок, активності NOS (див. рис. 1,а).

У разі введення щурам L-аргініну інгібування активності NOS та аргінази відбувається за такими механізмами: продукти

аргіназної реакції (орнітин і сечовина) є інгібіторами iNOS; цитрулін – продукт окисного метаболізму L-аргініну є, з одного боку, попередником синтезу L-аргініну *de novo*, а з іншого – інгібітором окисного метаболізму за механізмом негативного зворотного зв'язку (рис. 2). Так само орнітин і сечовина інгібують неокисний метаболізм L-аргініну [8, 9].

Пригнічення активності NOS може здійснюватися за принципом негативного зворотного зв'язку в умовах підвищеної концентрації кінцевого продукту, адже NO зв'язується з гемом ферменту і цим самим пригнічує його активність або обмежує димеризацію iNOS [10, 11]. Таким чином, інгібування досліджуваних ензимів відбувається не їхнім субстратом – аргініном, а лише продуктами цих ферментативних реакцій.

Отже, введення L-аргініну контрольним тваринам призводило до використання досліджуваної амінокислоти за окисним шляхом для синтезу NO, а у щурів з ЕЦД навпаки, до пригнічення утилізації L-аргініну. Активація аргінази в лейкоцитах при діабеті, індукованому стрептозотоцином, спричинює конкуренцію за L-ар-

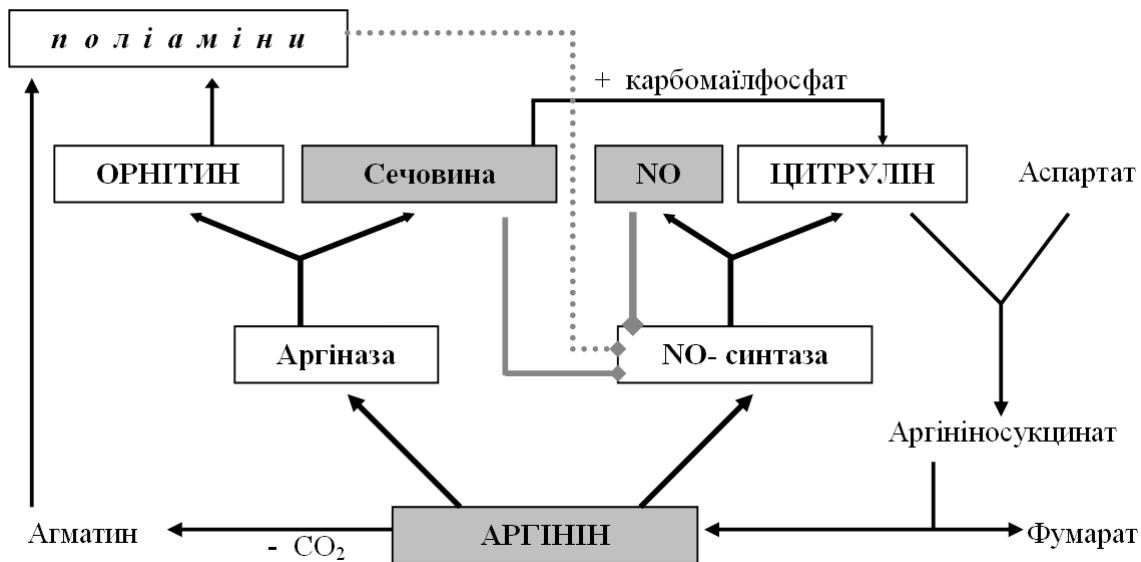


Рис. 2. Метаболізм L-аргініну: → інгібування, → напрям метаболічного перетворення

гінін із NOS, що провокує зміни у співвідношенні окисного та неокисного шляхів утилізації цієї амінокислоти.

У контролі при дії аміногуанідину зміни в аргіназному та NO-синтазному обміні L-аргініну мали таку саму спрямованість, як і за умов введення екзогенного L-аргініну. Під впливом аміногуанідину за умов діабету, індукованим стрептозотоцином, в лейкоцитах крові зменшувалась активність NOS і знижувався вміст  $\text{NO}_2^-$  (див. рис. 1,а,б). Це може свідчити про протекторний вплив аміногуанідину на лейкоцити при ЕЦД внаслідок зниження продукції NO ізоформою iNOS.

При введенні селективного інгібітора iNOS у щурів з ЕЦД пригнічується активність аргінази в 4,2 раза порівняно з вихідними значеннями при діабеті. Незважаючи на це, за умов дії аміногуанідину вміст сечовини в лейкоцитах при ЕЦД підвищується на 82 % (див. рис. 1,б). Це можна пояснити таким механізмом: при інгібуванні окисного шляху (знижується активність NOS [3]) відбувається активація неокисного метаболізму, що призводить до надсинтезу сечовини. Продукти аргіназної реакції (орнітин та сечовина) інгібують неокисний метаболізм за механізмом негативного зворотного зв'язку, що зрештою спричинює зниження активності аргінази на тлі високого вмісту сечовини.

## ВИСНОВКИ

При дослідженні двох альтернативних шляхів обміну L-аргініну встановлено, що на фоні введення L-аргініну та аміногуанідину контрольним щурам вміст сечовини та активність аргінази знижується, а вміст  $\text{NO}_2^-$  і активність NOS вірогідно не змінюється порівняно з контролем.

У щурів із діабетом, індукованим стрептозотоцином, на тлі введення L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові пригнічується лише окисний метаболізм даної амінокислоти. За умов ЕЦД введення аміногуанідину знижує активність як аргінази,

так і NOS, що, можливо, призводить до відновлення фізіологічного пулу відносно незамінної амінокислоти аргініну в організмі хворих тварин.

**I.V. Brodyak, N.A.Sybirna**

## PECULIARITIES OF THE L- ARGININE METABOLISM IN THE BLOOD LEUKOCYTES UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

In experimental streptozotocin-induced diabetes, the activity of enzymes which have common substrate (L-arginine) changes in leucocytes of peripheral blood. It leads to misbalance between different pathways of arginine metabolism: NO-synthase (oxidative) pathway is activated, whereas arginase (non-oxidative) one is depressed. The injection of L-arginine under diabetes activated nonoxidative pathway, which can be seen in possible decrease in NO-synthase activity with unchanged arginase activity. After injection of aminoguanidine in animals under diabetes the efficiency of both pathways in leucocytes decreases, which may be the basis of reconstitution of physiological pool to the relatively essential amino acid L-arginine.

*Ivan Franko L'viv National University*

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Амосова К.М., Гула Н.М., Гунський Ю.І. та ін. Стан NO-системи в еритроцитах крові хворих з первинною легеневою гіпертензією та його зміни під час лікування дилтіаземом // *Серце і судини*. – 2004. – №2. – С. 76–82.
2. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Вплив L-аргініну на активність NO-синтази та процес окисної модифікації білків при стрептозотоциновому діабеті у щурів // *Експерим. та клін. фізіологія і біохімія*. – 2005. – № 4. – С. 23–28.
3. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Вплив аміногуанідину на активність NO-синтази у лейкоцитах периферичної крові за умов стрептозотоцинового діабету у щурів // *Там само*. – 2006. – № 3. – С. 45–49.
4. Бродяк І.В., Сибірна Н.О. Вплив аміногуанідину на процес окисної модифікації білків за умов експериментального цукрового діабету у щурів // *Укр. біохім. журн.* – 2006. – 78, № 5. – С. 114–119.
5. Кіселик І.О., Луцик М.Д., Шевченко Л.Ю. Особливості визначення нітратів та нітритів в периферичній крові у хворих на вірусні гепатити та при синдромі жовтяниці іншої етіології // *Лаб. діагностика*. – 2001. – № 3. – С. 43–45.
6. Комаревцева І.О., Орлова О.А., Благодаренко Є.А. Вміст оксиду азоту в нирках за активації апоптозу // *Укр. біохім. журн.* – 2002. – 74, №4. – С.116–119.
7. Кургалюк Н.Н. Оксид азота как фактор адаптационной защиты при гипоксии // *Успехи физиол.*

- наук. – 2002. – **33**, № 4. – С. 65–79.
8. Манухина Е.Б., Ванин А.Ф., Смирин Б.В. Роль депо оксида азота в адаптации сердечно-сосудистой системы // Клін. та експерим. патологія. – 2004. – **3**, № 2. – С. 22–24.
  9. Марков Х.М. О биорегуляторной системе L-аргинин – окись азота // Пат. физиология и эксперим. терапия. – 1996. – №1. – С. 35–39.
  10. Меньшикова Е.Б., Зенков Н.К., Реутов В.П. Оксид азота и NO-синтазы в организме млекопитающих при различных функциональных состояниях // Биохимия. – 2000. – **65**, № 4. – С. 485–503.
  11. Покровский В.И., Виноградов Н.А. Оксид азота, его физиологические и патофизиологические свойства // Терап. архив. – 2005. – № 1. – С. 82–87.
  12. Сагач В.Ф., Присяжна О.Д., Ткаченко М.М., Коцюрба А.В. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету // Фізіол. журн. – 2005. – **51**, № 2. – С. 3–7.
  13. Albakri Q.A., Stuehr D.J. Intracellular assembly of inducible NO synthase is limited by nitric oxide-mediated changes in heme insertion and availability // J. Biol. Chem. – 1996. – **271**, № 10. – P. 5414–5421.
  14. Davis R.H., Mora J. Arginase Assay // J. Bacteriology. – 1968. – **96**. – P. 383–388.
  15. Iori E., Calo L., Valbusa D. Diabetic ketosis activates lymphomonocyte-inducible nitric oxide synthase // Diabet. Med. – 2002. – **19**, № 9. – P. 777–783.
  16. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable // Anal. Biochem. – 1977. – **83**, № 2. – P. 346–356.
  17. 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.
  18. 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 lipopolisaccharide // J. Immunology. – 1994. – **152**, №8. – P. 4110–4118.