УДК 616.379-008.64:611.018.53:577.112.385

І. В. Ференц, М. Я. Люта, І. В. Бродяк, В. А. Бурда, А. М. Федорович, Н. О. Сибірна
ЛЬВІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ ІВАНА ФРАНКА

ВПЛИВ АГМАТИНУ НА СИСТЕМУ L-АРГІНІН/NO В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧНОЇ КРОВІ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ

Досліджено вплив агматину на NO-синтазний та аргіназний шляхи метаболізму L-аргініну в лейкоцитах за умов експериментального цукрового діабету. Встановлено, що агматин як селективний інгібітор індуцибельної NO-синтази викликає пригнічення окисного й активацію неокисного перетворення L-аргініну. Знижуючи надпродукцію оксиду азоту, агматин попереджує розвиток оксидативно-нітративного стресу в клітинах периферичної крові за умов даної патології.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: **експериментальний цукровий діабет, агматин, лейкоцити, NO-синтаза, нітрити, аргіназа, орнітин.**

ВСТУП. Основною причиною виникнення та прогресування хронічних ускладнень при цукровому діабеті (ЦД) є множинні патологічні зміни у функціонуванні сигнальних та метаболічних шляхів, які відбуваються в організмі на фоні тривалої гіперглікемії [4]. Нагромадження в крові кінцевих продуктів неензиматичного глікозилювання стимулює утворення великої кількості прозапальних цитокінів (ТНФα, ІЛ-2, ІЛ-6 та ін.) [6]. Внаслідок цього у багатьох типах клітин, зокрема у лейкоцитах, відбуваються експресія гена індуцибельної ізоформи NO-синтази (iNOS) та надмірне утворення оксиду азоту (NO). Кінцеві продукти метаболізму NO посилюють цитотоксичну дію лейкоцитів периферичної крові та поглиблюють ускладнення, які супроводжують ЦД 1-го типу [3].

Субстратом для ензиматичного утворення NO в клітинах є L-аргінін, біодоступність якого виступає основним механізмом регуляції синтезу NO, оскільки більшість типів клітин не здатні синтезувати цю амінокислоту і потребують надходження її ззовні [2].

Продукція NO в клітині регулюється також з участю ферменту аргінази (КФ 3.5.3.1.), який конкурує з NOS за спільний субстрат – L-аргінін, перетворюючи його на орнітин та сечовину. Орнітин є попередником для синтезу різних продуктів, включаючи поліаміни та пролін, що визначає його важливу роль у процесах проліферації лейкоцитів [13].

© І. В. Ференц, М. Я. Люта, І. В. Бродяк, В. А. Бурда, А. М. Федорович, Н. О. Сибірна, 2011.

Метою даної роботи було дослідити вплив селективного конкурентного інгібітора iNOS – агматину на активність ферментів і вміст продуктів окисного та неокисного метаболізму L-аргініну в лейкоцитах у нормі та за умов експериментального цукрового діабету (ЕЦД).

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідження проводили на білих безпородних щурах-самцях масою 160–200 г. ЕЦД викликали шляхом внутрішньочеревного введення стрептозотоцину (“Sigma”, США) в дозі 6 мг на 100 г маси тіла. Розвиток діабету контролювали за вмістом глюкози в крові, який визначали глюкозооксидазним методом з використанням набору реактивів “Фелісіт-Діагностика” (Україна). В експерименті використовували тварин із рівнем глюкози понад 14 мМ. Через 72 год з моменту індукції діабету тваринам внутрішньом’язово починали вводити агматин (“Sigma”, США) у розрахунку 20 мг/кг протягом 14 днів.

Щурів декапітували під ефірним наркозом. Лейкоцити виділяли з гепаринізованої крові у градієнті густини фікол-тріомбраст та двічі відмивали забуференим фізіологічним розчином (рН 7,4). Життєздатність клітин у тесті з трипановим синім була не меншою ніж 98 %.

Лізис лейкоцитів проводили протягом 60 хв на льодяній бані буфером, який містив набір інгібіторів протеїназ (рН 7,4) [3]. У лізатах лейкоцитів визначали активність NOS [10] та аргінази [12]; вміст нітрит-аніона (NO_2^-) – в аліквотах безбілкової фракції лізатів клітин у колори-

метричній реакції за допомогою реактиву Гріса [5]; вміст орнітину – в аліквотах безбілкової фракції лізатів клітин в реакції з нінгідриновим реактивом [12]. Всі дослідження проводили в 96-лункових плоскодонних планшетах на мікропланшетному спектрофотометрі Epoch (BioTek, США). Вміст загального білка в пробах визначали за загальноприйнятим методом Лоурі.

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою t-критерію Стьюдента. Дані представляли у вигляді M±m. Статистично значущими вважали дані при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Встановлено, що за умов ЕЦД в лейкоцитах периферичної крові щурів відбувається надмірна активація окисного шляху перетворення L-аргініну (табл. 1). Зростання сумарної активності NOS більш ніж у 2 рази за умов діабету, що зумовлене активацією індуцибельної ізоформи ферменту [3], супроводжувалось збільшенням продукції оксиду азоту.

При надлишковій продукції NO втрачає свої захисні функції і проявляє вазодепресивну та цитотоксичну дії [3], що визначається його здатністю при взаємодії із супероксидним радикалом утворювати пероксинітрит. Останній призводить до інтенсифікації процесів перекисного окиснення ліпідів, оксидації сульфгідрильних груп білків та пошкодження ДНК. Основним механізмом зниження токсичної дії NO є перетворення його в менш активні сполуки – іони нітритів та нітратів [7]. Як показали наші дослідження, за умов ЕЦД у лейкоцитах крові щурів вміст нітрит-аніона збільшується лише на 14 %. Отримані експериментальні дані можуть вказувати на те, що в умовах розвитку оксидативного стресу при діабеті більша частина NO в лейкоцитах перетворюється на цитотоксичний пероксинітрит.

При дослідженні неокисного шляху метаболізму L-аргініну нами встановлено зниження активності аргінази на 74 % та продукту аргіназної реакції – орнітину на 54 % порівняно з групою контрольних тварин (табл. 1). У разі активації iNOS проявляє регулюючу дію на аргіназу через продукцію N^{ω}-гідрокси-L-аргініну. Цей проміжний продукт NO-синтазної реакції має високу спорідненість до аргінази і є сильним ендогенним конкурентним інгібітором даного ферменту [9].

З метою пригнічення надмірної активації окисного перетворення L-аргініну та зниження надпродукції NO в роботі було використано агматин (4-амінобутил-гуанідин) – продукт декарбоксилування L-аргініну. Оскільки агматин є аналогом L-аргініну за рахунок наявності гуанідинової групи, він відіграє роль селективного конкурентного інгібітора iNOS (Ki=220 мкМ) [11].

При введенні агматину активність NOS знижувалась на 44 % у контрольних тварин та на 47 % у тварин з ЕЦД (табл. 1), що супроводжувалося зменшенням вмісту нітрит-аніона в обох дослідних групах. Таким чином, в лейкоцитах периферичної крові агматин пригнічує утилізацію L-аргініну окисним шляхом.

Необхідно відзначити, що в контрольній групі у випадку дії агматину достовірно знижується активність аргінази, тоді як вміст орнітину підвищується на 39 % порівняно з вихідним рівнем у контролі. Оскільки агматин пригнічує реакцію перетворення орнітину до поліамінів з участю орнітиндекарбоксилази, то нагромадження значної кількості продуктів аргіназної реакції в контролі викликає пригнічення активності ферменту за принципом негативного зворотного зв'язку [8].

На фоні введення агматину в лейкоцитах тварин з ЕЦД виявлено зростання активності аргінази та вмісту орнітину, що є результатом збільшення біодоступності L-аргініну для аргінази внаслідок інгібування NOS.

ВИСНОВКИ. В лейкоцитах периферичної крові тварин з ЕЦД відбуваються надмірна активація окисного метаболізму L-аргініну та пригнічення перетворення цієї амінокислоти неокисним шляхом. При введенні агматину інгібується активність NO-синтази та знижується вміст кінцевого стабільного метаболіту NO – нітрит-аніона, що призводить до підвищення активності аргінази та відновлення фізіологічного співвідношення між двома альтернативними шляхами обміну L-аргініну.

Таблиця 1 – **Вплив агматину на активність ферментів і вміст продуктів окисного та неокисного метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові (M±м, n=10–14)**

Показник	Група			
	контроль	контроль+Агм	ЕЦД	ЕЦД+Агм
NOS, нмоль/хв на 1 мг білка	0,41±0,07	0,23±0,04	0,87±0,10*	0,46±0,05**
NO_2^-, нмоль/мг білка	1,74±0,19	1,61±0,08	1,99±0,19	1,39±0,08**
Аргіназа, нмоль/хв на 1 мг білка	1,35±0,17	0,48±0,09*	0,35±0,05*	1,01±0,15**
Орнітин, нмоль/мг білка	3,57±0,49	4,98±0,59*	1,65±0,41*	2,06±0,35

Примітка. * – різниця вірогідна порівняно з контролем, $p<0,05$; ** – різниця вірогідна порівняно з діабетом, $p<0,05$.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Барська М. Л. Дослідження окремих ланок окисного та неокисного шляхів обміну L-аргініну в лейкоцитах при цукровому діабеті 1-го типу / М. Л. Барська, І. В. Бродяк, Н. О. Сибірна // Мед. хімія. – 2006. – **8**, № 3. – С. 67–69.

2. Бондарь Т. Н. Система L-аргинин/оксид азота и иммунитет / Т. Н. Бондарь // Эксперим. і клін. медицина : науково-практичний журнал. – 2009. – № 3. – С. 4–8.

3. Бродяк І. В. Особливості метаболізму L-аргініну в лейкоцитах крові за умов експериментального цукрового діабету / І. В. Бродяк, Н. О. Сибірна // Фізіол. журн. – 2008. – **54**, № 1. – С. 63–68.

4. Дрель В. Р. Основні механізми виникнення та розвитку діабетичних ускладнень: роль нітративного стресу / В. Р. Дрель // Біологічні Студії / Studia Biologica. – 2010. – **4**, № 2. – С. 141–158.

5. Метельская В. А. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке / В. А. Метельская, Н. Г. Гуманова // Клин. лаб. диагностика. – 2005. – № 6. – С. 15–18.

6. Науменко В. Г. Патогенетична терапія ускладнень цукрового діабету / В. Г. Науменко // Міжнар. ендокрин. журн. – 2006. – № 1. – С. 55–60.

7. Оксид азота как активная форма кислорода / Т. В. Звягина, И. Е. Белик, А. А. Кривошей, В. К. Гринь // Укр. мед. альманах. – 2001. – **4**, № 6. – С. 203–206.

8. Agmatine Suppresses Proliferation by Frameshift Induction of Antizyme and Attenuation of Cellular Polyamine Levels / J. Satriano, S. Matsufujii, Y. Murakamii [et al.] // The Journal of Biological Chemistry – 1998. – **273**, № 25. – P. 15313–15316.

9. Ash D. E. Structure and Function of Arginases / D. E. Ash // J. Nutr. – 2004. – **134**, № 10 – P. 2760–2764.

10. Dawson J. Microtiter-Plate Assay of Nitric Oxide Synthase Activity / J. Dawson, R. G. A. Knowles // Molecular Biotechnology. – 1999. – **12**, № 3 – P. 275–279.

11. Inhibition of mammalian nitric oxide synthases by agmatine, an endogenous polyamine formed by decarboxylation of arginine / E. Galea, S. Regunathan, V. Eliopoulos [et al.] // Biochem. J. – 1996. – **316**. – P. 247–249.

12. Iyamu E. W. A colorimetric microplate assay method for high-throughput analysis of arginase activity in vitro / E. W. Iyamu, T. Asakura, G. M. Woods // Analytical Biochemistry. – 2008. – **382**, № 2. – P. 332–334.

13. Morris S. M. Enzymes of Arginine Metabolism / S. M. Morris // J. Nutr. – 2004. – **134**. – P. 2743–2747.

И. В. Ференц, М. Я. Лютая, И. В. Бродяк, В. А. Бурда, А. Н. Федорович, Н. А. Сибирная
ЛЬВОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ИВАНА ФРАНКО

ВЛИЯНИЕ АГМАТИНА НА СИСТЕМУ L-АРГИНИН/NO В ЛЕЙКОЦИТАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО САХАРНОГО ДИАБЕТА

Резюме

Исследовано влияние агматина на NO-синтазный и аргиназный пути метаболизма L-аргинина в лейкоцитах при экспериментальном сахарном диабете. Установлено, что агматин как селективный ингибитор индуцибельной NO-синтазы вызывает угнетение окислительного и активацию неокислительного превращения L-аргинина. Снижая сверхпродукцию оксида азота, агматин предупреждает развитие оксидативно-нитративного стресса в клетках периферической крови в условиях данной патологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: **экспериментальный сахарный диабет, агматин, лейкоциты, NO-синтаза, нитриты, аргиназа, орнитин.**

I. V. Ferents, M. Ya. Lyuta, I. V. Brodyak, V. A. Burda, A. M. Fedorovych, N. O. Sybirna
IVAN FRANKO LVIV NATIONAL UNIVERSITY

THE EFFECT OF AGMATINE ON L-ARGININE/NO SYSTEM IN PERIPHERAL BLOOD LEUKOCYTES UNDER EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Summary

The effects of agmatine on NO synthase and arginase metabolic pathways of L-arginine were investigated in peripheral blood leukocytes under experimental diabetes mellitus. It was indicated, that agmatine as selective inhibitor of inducible NO synthase causes depression of oxidative conversion of L-arginine and activation of non-oxidative one. By reducing the overproduction of nitric oxide, agmatine prevents the development of oxidative-nitrosative stress in peripheral blood cells under mentioned pathology.

KEY WORDS: **experimental diabetes mellitus, agmatine, leukocytes, NO synthase, nitrite, arginase, ornitine.**

Отримано 04.10.11

Адреса для листування: *Н. О. Сибірна, вул. Дорошенка, 50, кв. 4, Львів, 79000, Україна.*