

УДК 616.32+616.(36):612.815].014.6/.015.112-08

© Коллектив авторів, 2012.

ЗМІНИ АКТИВНОСТІ NO-СИНТАЗ ТА АРГІНАЗИ У ТКАНИНІ ПІДШЛУНКОВОЇ ЗАЛОЗИ ПРИ ВВЕДЕННІ L-АРГІНІНУ АБО АМІНОГУАНІДИНУ ЗА УМОВ СТРЕПТОЗОЦИН-ІНДУКОВАНОЇ ГІПЕРГЛІКЕМІЇ

О.Б. Панчишин, Н.Б. Панасюк, Л.П. Білецька, О.Я. Склярів

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, кафедра біохімії (завідувач кафедри – проф. О.Я. Склярів), м. Львів

THE CHANGES OF NO-SYNTASES AND ARGINASE ACTIVITY IN PANCREATIC TISSUE UNDER CONDITIONS OF L-ARGININE AND AMINOGUANIDINE ADMINISTRATION IN STREPTOZOCIN-INDUCED HYPERGLYCEMIA

O.B. Panchyshyn, N.B. Panasyuk, L.P. Biletska, A.Y. Sklyarov

SUMMARY

The influence of L-arginine and selective inducible NO-synthase blocker aminoguanidine on the activity of NO-synthases and arginase in pancreatic tissue in rats under conditions of streptozotocin-induced hyperglycemia was investigated. It was shown, that both L-arginine and aminoguanidine decrease the activity of inducible NO-synthase, whereas L-arginine supplementation significantly decreases the glucose concentration in blood and increases the activity of arginase, giving evidence about the enhancement of non-oxidative pathway of its metabolism.

ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ NO-СИНТАЗ И АРГИНАЗЫ В ТКАНИ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ ВВЕДЕНИИ L-АРГИНИНА ИЛИ АМИНОГУАНИДИНА ПРИ СТРЕПТОЗОЦИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ГИПЕРГЛІКЕМИИ

О.Б. Панчишин, Н.Б. Панасюк, Л.П. Билецкая, А.Я. Склярів

РЕЗЮМЕ

При стрептозотозин-индуцированной гипергликемии у крыс изучали влияние L-аргинина и селективного блокатора индуцибельной NO-синтазы аминоганидина на активность NO-синтаз и аргиназы в ткани поджелудочной железы. Показано, что как L-аргинин, так и аминоганидин снижают активность индуцибельной NO-синтазы, при этом L-аргинин выражено понижает концентрацию глюкозы в крови и повышает активность аргиназы, что свидетельствует об усилении неокислительного пути его метаболизма.

Ключові слова: стрептозотозин, NO-синтази, аргінази, оксид азоту, L-аргінін, аміногуанідин.

Розвиток цукрового діабету супроводжується змінами активності двох ключових ензимів обміну L-аргінину – індукцибельної NO-синтази (iNOS) та аргінази. У клітинах обмін L-аргінину відбувається окисним шляхом за участю NO-синтаз, внаслідок чого синтезуються нітрогену оксиду та L-цитрулін та неокисним – за допомогою аргінази, що забезпечує утворення орнітину та сечовини. Ці ензими конкурують між собою за субстрат та визначають пул L-аргінину у клітині [2, 4, 7].

За умов цукрового діабету у тканині підшлункової залози (ПЗ) відбувається зростання активності iNOS, внаслідок чого синтезуються велика кількість нітрогену оксиду, який при взаємодії з супероксидним радикалом утворює пероксинітрит, що викликає дисфункцію ендотеліоцитів, генотоксичний ефект на структуру ДНК, інгібує проліферацію лімфоцитів, знижує експресію антиапоптичних білків, інгібує функції багатьох ферментів [5, 6]. Введення екзогенного L-аргінину та блокування рівня активності iNOS змінює вміст та обмін L-аргінину у тканині ПЗ за умов експериментального цукрового діабету.

Метою дослідження було вивчення зміни активності NO-синтаз та аргінази у тканині підшлункової залози та вмісту L-аргінину у плазмі крові при введенні екзогенного L-аргінину та блокування рівня активності індукцибельної NO-синтази аміногуанідином за умов стрептозотозин-індукованої гіперглікемії (СІГ).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проведені на 36 білих щурах масою 150-170 г і виконанні згідно правил передбачених Європейською Комісією по нагляду за проведенням лабораторних дослідів за участю експериментальних тварин. Було проведено 4 серій досліджень: перша – інтактні тварини; друга - тварини з стрептозотозин-індукованою гіперглікемією у дозі 40 мг/кг/день інтраперітонеально протягом 5 днів (концентрація глюкози у крові становила більше 15 ммоль/л) [14]; 3 - тварини, яким протягом двох тижнів внутрішньочеревинно вводили L-аргінін (в дозі 300 мг/кг); 4 – тварини, яким протягом двох тижнів внутрішньочеревинно вводили селективний блокатор iNOS аміногуанідин (в дозі 20 мг/кг). Активність NO-

синтаз оцінювали за методом Сумбаєва [9], аргінази за методом Geys J.W., Dabich D. [11] у тканині підшлункової залози та концентрацію L-аргініну в плазмі крові за методом [8].

Результати оброблено за методом варіаційної статистики з використанням програмного забезпечення ANOVA з визначенням t-критерію Стюдента. Статистично достовірними вважали розбіжності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У тварин контрольної групи у тканині підшлункової залози домінувала активність cNOS, рівень активності iNOS був незначним. Дія стрептозотоцину викликала у тканині підшлункової залози підвищення рівня активності iNOS у 6,6 рази ($p < 0,01$), активність cNOS змінювалась недостовірно, в той час як рівень активності аргінази знижувався на 35% ($p < 0,05$), порівняно з показниками контрольних тварин (табл. 1). За цих умов концентрація L-аргініну у плазмі крові зменшувалась на 35% ($p < 0,05$).

Таблиця 1

Активність NO-синтаз і аргінази у тканині підшлункової та концентрація L-аргініну в плазмі крові за умов введення L-аргініну та блокування iNOS аміногуанідном у щурів з стрептозототин-індукованою гіперглікемією

Серії досліджень	NOS, (нмоль/хв·мг)	cNOS, (нмоль/хв·мг)	iNOS, (нмоль/хв·мг)	Аргіназа, (мкмоль/хв·мг)	L-аргінін, (мкг/мл)
Контроль	0,70±0,12	0,56±0,07	0,14±0,04	0,37±0,03	38,2±4,42
СІГ	1,36±0,13*	0,43±0,06	0,93±0,09*	0,24±0,04*	24,6±3,72*
СІГ+ L-аргінін	0,82±0,07 [#]	0,34±0,06	0,48±0,06 [#]	0,32±0,04 [#]	34,1±3,51 [#]
СІГ+аміногуанідин	0,88±0,11 [#]	0,34±0,03	0,49±0,07 [#]	0,25±0,04	32,0± 5,16

Примітка: * - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками контрольної групи; # - $p < 0,05$ у порівнянні з показниками при цукровому діабеті. Результати представлені $M \pm m$, $n=7-8$.

Наведені результати вказують про те, що розвиток гіперглікемії при дії стрептозотоцину спричинює активацію iNOS та знижує активність аргінази у тканині підшлункової залози, одночасно зменшується концентрація L-аргініну в плазмі крові.

Двотижневе введення L-аргініну на тлі стрептозототин-індукованої гіперглікемії викликало зниження концентрації глюкози у крові з $28,0 \pm 1,8$ до $16,7 \pm 1,2$ ммоль/л (на 40%, $p < 0,05$), активність iNOS зменшувалась – на 48% ($p < 0,05$), активність cNOS – мала тенденцію до зниження, тоді як активність аргінази зростала на 33% ($p < 0,05$) у тканині підшлункової залози; концентрація L-аргініну в плазмі крові зростала на 39% ($p < 0,05$). порівняно з даними при дії стрептозотоцину (табл. 1).

Попередніми дослідженнями було відзначено, що введення L-аргініну за умов експериментального цукрового діабету приводить до зростання концентрації ендogenous аргініну, інсуліну та рівня тригліцеридів у плазмі крові, зниження втрати ваги, зменшення рівня глюкози в плазмі крові, запобігає активації поліолового шляху метаболізму глюкози, знижує загальну активність протеїнази C, утворення кисневих радикалів, що свідчить про роль NO як регулятора даних процесів [10, 12, 13].

Двотижневе блокування iNOS аміногуанідном на фоні стрептозототин-індукованої гіперглікемії достовірно не змінювало рівень глюкози в плазмі крові, при цьому зменшувався рівень активності iNOS на 47% ($p < 0,05$), активність аргінази достовірно

не змінювалась у тканині підшлункової залози, концентрація L-аргініну в плазмі крові підвищувалась (на 30%) у порівнянні з показниками при стрептозототин-індукованій гіперглікемії (табл. 1). Отже, аміногуанідин блокує окисний шлях метаболізму L-аргініну, в той час як активність неокисного шляху метаболізму не змінюється.

За умов цукрового діабету аміногуанідин проявляє антиоксидатні властивості, інгібує неферментативне глікозилювання, попереджає посттрансляційне нітрозилювання і окиснювальну модифікацію білків, як інгібітор iNOS, послаблює токсичний вплив нітрогену оксиду [1, 3].

Отже, як L-аргінін, так і селективний блокатор iNOS аміногуанідин знижують активність iNOS, що призводить до зростання концентрації L-аргініну в плазмі крові, однак при цьому активність аргінази виражено не змінювалась.

ВИСНОВКИ

1. Двотижневе введення L-аргініну на тлі стрептозототин-індукованої гіперглікемії знижувало концентрацію глюкози у крові, активність NO-синтаз, підвищувало активність аргінази у тканині підшлункової залози, концентрація L-аргініну в плазмі крові зростала.

2. Двотижневе блокування індуцибельної NO-синтази аміногуанідном на тлі стрептозототин-індукованої гіперглікемії не змінювало рівень глюкози в плазмі крові, зменшувало активність iNOS та

підвищувало концентрацію L-аргініну в плазмі крові, тоді як активність аргінази у тканині підшлункової залози змінювалась недостовірно.

3. Введення L-аргініну на тлі стрептозотоцин-індукованої гіперглікемії гальмує окисний шлях обміну ендogenous L-аргініну та посилює активність неокисного шляху його метаболізму.

ЛІТЕРАТУРА

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

2. Вплив L-аргініну на функціональну активність ендотелію за умов експериментального цукрового діабету / Сагач В.Ф., Присяжна О.Д., Ткаченко М.М. та співав. // Фізіол. журн. - 2005. - Т.51, №2. - С.3-7.

3. Вплив L-аргініну та інгібіторів NO-синтази на стан антиоксидантної системи при цукровому діабеті 1 типу / Сибірна Н.О., Вовк О.І., Бурда В.А. та співав. // Лабораторна діагностика. – 2004. - №4. - С.47-51.

4. Гула Н.М. Вплив N-стеароїлетаноламіну на NO-синтазний шлях генерації оксиду азоту в аорті та серці щурів із стрептозотоциніндукованим діабетом / Н.М.Гула, Г.В.Косякова, А.Г. Бердишев // Укр. біохім. журн. - 2007. - Т.79, №5.- С.153-158.

5. Дрель В.Р. Основні механізми виникнення та розвитку діабетичних ускладнень: роль нитративного стресу/ В.Р. Дрель // Біологічні Студії. - 2010. – Т.4, №2. - С.141-158.

6. Ивашкин В.Т. Оксид азота в регуляции функциональной активности физиологических систем / В.Т. Ивашкин, О.М. Драпкина // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2000. - №4. - С.16-21.

7. Перетятко Ю.В. Особливості аргіназного та NO-синтазного шляхів метаболізму L-аргініну в лейкоцитах периферичної крові щурів за хронічного рентгенівського опромінення / Ю.В. Перетятко, Н.О. Сибірна // Укр. біохім. журнал. - 2009. - Т.81, №2. - С.40-48.

8. Руководство к практическим занятиям по биохимии/ Т.Л. Алейникова, Г.В.Рубцева, Н.А. Павлова. – М. : Медицина, 2000. – 128 с.

9. Сумбаев В.В. Влияние ДДТ на активность синтазы оксида азота в печени, легких и головном мозге крыс / В.В.Сумбаев, И.М Ясинская // Совр. пробл. токсикологии. И.М-2000. - №3. - С.3-7.

10. Beneficial effects of L-arginine-nitric oxide-producing pathway in rats treated with alloxan / Vasilijevic A., Buzadzic B., Korac A. et al. // J. Physiol. - 2007. - Vol.584, N3. - P.921-993.

11. Geyer J.W., Dabich D. Rapid method for determination of arginase activity in tissue homogenates. // Anal Biochem. – 1971.- Vol. 39. – N 2. – P. 412-417.

12. L-Arginine prevents metabolic effects of high glucose in diabetic mice / West M.B., Ramana K.V., Kaiserova K. et al. // FEBS Lett.- 2008. - Vol.582,N17 - P.2609-2614.

13. Mendez J.D. L-arginine and polyamine administration protect beta-cells against alloxan diabetogenic effect in Sprague-Dawley rats / J.D.Mendez, Rde H.Hernandez// Biomed. Pharmacother. – 2005. – Vol.59, N6. – P.283-289.

14. Wielosz-Tokarzewska E. The effect of ukraine on the serum vasoactive intesyinal polypeptide level in diabetic mice / E.Wielosz-Tokarzewska, E.Jagiello-Wojtowicz // Int. J. Immunotherapy XIX. - 2003. - N2-4. – P.189-191.