УДК 616.36-02:616.379-008.64]085-092.9

©М.І. Швед, О.О. Чернухіна
Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

ВПЛИВ ГЛУТАРГІНУ ТА АМІНОГУАНІДИНУ ПРИ Х ОКРЕМОМУ ТА ПОЄДНАНОМУ ЗАСТОСУВАННІ НА СТАН ПЕЧІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ

ВПЛИВ ГЛУТАРГІНУ ТА АМІНОГУАНІДИНУ ПРИ Х ОКРЕМОМУ ТА ПОЄДНАНОМУ ЗАСТОСУВАННІ НА СТАН ПЕЧІНКИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ – У дослідах на білих нелінійних щурах-самцях встановлено, що при цукровому діабеті (ЦД) (моделювали одноразовим інтраперитонеальним введенням стрептозотоцину з розрахунку 50 мг/кг маси тіла) відбувається зростання рівнів глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові, у печінці – активація процесів перекисного окиснення ліпідів, компенсаторне підвищення активності каталази та супероксиддисмутази, зниження рівня відновленого глутатіону, активності сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази мітохондрій, пригнічення синтезу оксиду азоту (NO). Прекурсор синтезу NO глутаргін відновлює утворення NO, що супроводжується зниженням рівня глюкози у сироватці крові, зменшенням проявів оксидаційного стресу в печінковій тканині, підвищенням активності антиоксидантно системи. Блокатор індуцибельно NO-синтази аміногуанідин при ЦД спричиняє подальше прогресування у печінці процесів перекисного окиснення ліпідів на тлі гальмування синтезу NO. Аміногуанідин дещо знижує рівні глюкози та глікозильованого гемоглобіну. Поєднане застосування глутаргіну та аміногуанідину при гепатопаті , яка розвивається на тлі ЦД, супроводжується погіршенням стану печінки порівняно з групою тварин, яким вводили лише глутаргін, що підтверджує важливість активаці синтезу NO у реалізаці гепатопротекторно ді глутаргіну при цій патологі .

ВЛИЯНИЕ ГЛУТАРГИНА И АМИНОГУАНИДИНА ПРИ ИХ РАЗДЕЛЬНОМ И КОМБИНИРОВАННОМ ПРИМЕНЕНИИ НА СОСТОЯНИЕ ПЕЧЕНИ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ – В опытах на белых нелинейных крысах-самцах установлено, что при сахарном диабете (СД) (моделировали однократным интраперитонеальным введением стрептозотоцина из расчета 50 мг/кг массы тела) наблюдается возрастание уровней глюкозы и гликозилированного гемоглобина в крови, в печени – активация процессов перекисного окисления липидов, компенсаторное повышение активности супероксиддисмутазы и каталазы, снижение уровня восстановленного глутатиона, активности сукцинатдегидрогеназы и цитохромоксидазы митохондрий, угнетение синтеза оксида азота (NO). Прекурсор NO глутаргин восстанавливает образование NO, что сопровождается снижением уровня глюкозы сыворотки крови, уменьшением проявлений оксидативного стресса в печеночной ткани, восстановлением активности антиоксидантной системы. Блокатор индуцибельной NO-синтазы аминогуанидин при СД вызывает дальнейшее прогрессирование в печени процессов перекисного окисления липидов на фоне торможения синтеза NO. Аминогуанидин несколько снижает уровни глюкозы и гликозилированного гемоглобина. Комбинированное применение глутаргина и аминогуанидина при гепатопатии, которая развивается на фоне СД, сопровождается ухудшением состояния печени, по сравнению с группой животных, которым вводили только глутаргин, что подтверждает важность активации синтеза NO в реализации гепатопротекторного действия глутаргина при этой патологии.

EFFECTIVENESS OF SINGLE AND COMBINED ADMINISTRATION OF GLUTARGIN AND AMINOGUANIDINE FOR HEPATOPATHY IN EXPERIMANTAL DIABETES MELLITUS – It was shown in experiments on male albino rats that diabetes mellitus (DM) (single intraperitoneal injection of streptozotocine, 50 mg/kg) is accompanied with the increase of glucose and glycated hemoglobin in blood, lipid peroxidation, activities of superoxyde dismutase and catalase, the decrease of glutathione level, activities of mitochondrial succinate dehydrogenase and cytochrome oxidase, oppressing of nitric oxide synthesis in liver. NO precursor glutargin renews NO synthesis with concomitant decrease of glucose level in blood, signs of oxidative stress in liver tissue, restoration of antioxidant activity. Inhibitor of inducible NO-synthase aminoguanidine provokes the progression of oxidative stress in liver, but partially decreases the levels of glucose and glycated hemoglobin. Combined administration of glutargin and aminoguanidine for hepatopathy in DM is less beneficial as compared with single administration of glutargin. The fact confirms the importance of proper NO synthesis in realization of glutargin hepatoprotective activity in diabetes.

Ключові слова: діабет, стрептозотоцин, печітка, глутаргін, аміногуанідин.

Ключевые слова: диабет, стрептозотоцин, печень, глутаргин, аминогуанидин.

Key words: diabetes, streptozotocine, liver, glutargin, aminoguanidine.

ВСТУП Встановлено роль системи L-аргінін-NO у розвитку ускладнень при цукровому діабеті (ЦД) [28, 23, 17, 25] та позитивний вплив попередника синтезу NO L-аргініну на порушення, які при цьому спостерігаються [15, 24, 21]. Попередніми дослідженнями доведено, що прекурсори утворення NO L-аргінін та, більшою мірою, глутаргін (L-аргініну-L-глутамат) сприяють зменшенню структурних та функціональних проявів гепатопаті при цукровому діабеті (ЦД); інгібітори NO-синтази – аміногуанідин (селективно ді) та, особливо, N-нітро-L-аргінін (блокатор конститутивних та індуцибельно ізоформ ферменту), навпаки, викликають прогресування ураження печінки [9, 7, 8]. Для підтвердження ролі стимуляці утворення NO у регресі ознак гепатопаті при ЦД є доцільним вивчення стану печінки при поєднаному введенні попередника та блокатора синтезу NO при цій патологі .

Метою дослідження стало з'ясування впливу глутаргіну та аміногуанідину при х окремому та поєднаному застосуванні на стан печінки при експериментальному ЦД.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ЦД моделювали у 40 білих нелінійних щурів-самців шляхом одноразового інтраперитонеального введення стрептозотоцину (STZ) з розрахунку 50 мг/кг маси тіла (контроль – 10 інтактних тварин). Через 2 тижні після розвитку ЦД щурів поділили на IV групи. I група – контроль патологі , решті тварин починали вводити (внутрішньоочеревинно, щодня, протягом 14 днів): II групі – глутаргін – по 45 мг/кг, III – аміногуанідин – по 10 мг/кг маси, IV – комбінацію цих препаратів у зазначених дозах. Біохімічні дослідження у всіх групах проводили через місяць від початку моделювання патологі . Визначали: у сироватці крові – рівень глюкози, глікозильованого гемоглобіну (HbA1C) (за стандартними наборами реактивів), у гомогенатах печінки – активність каталази [5], супероксиддисмутази (СОД) [6], цитохромоксидази (ЦХО) [4], сукцинатдегідрогенази (СДГ) [3], вміст відновленого глутатіону (G-SH) [16], гідроперекисів ліпідів (ГПЛ) [2], ТБК-активних продуктів (ТБП) [1]. Про рівень утворення NO у гомогенатах печінки робили висновок за кількістю його стабільного метаболіту

– нітрит-аніону (NO_2^-) [10]. Статистичну обробку результатів досліджень проводили з використанням t-критерію Стьюдента та програми Excel. Роботу виконували відповідно до правил Європейсько конвенці про гуманне ставлення до лабораторних тварин (European convention the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes – Consul of Europe. Strasbourg, 1986) та "Загальних принципів експериментів на тваринах", ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (2003).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ У щурів із STZ-діабетом концентрація глюкози і HbA1C у крові зростала відповідно у 3,1 та 2,6 раза, вміст NO_2^- знижувався на 22 % (табл.). На цьому тлі спостерігалась активація процесів перекисного окиснення ліпідів у печінці: вміст ГПЛ зростав на 28 %, ТБП – в 1,9 раза. Одночасно відмічене компенсаторне збільшення активності СОД (на 33 %) та каталази (на 14 %). Рівень G-SH у цій сері , навпаки, знизився на 25 % порівняно з контрольним показником. У щурів з STZ-діабетом відмічене зменшення активності мітохондріальних ферментів СДГ та ЦХО – відповідно на 24 та 18 % (див. табл.).

Під впливом глутаргіну рівень гюкози у сироватці крові знижувався порівняно з тваринами I групи, на 22 %, у випадку застосування аміногуанідину – на 32 %, при поєднанні препаратів – на 24 % (див. табл.). Достовірне зменшення вмісту HbA1C спостерігалось під впливом аміногуанідину. При введенні глутаргіну або його поєднання з аміногуанідином відмічено стійку тенденцію до зниження цього показника.

Спостерігались різноспрямовані зміни концентраці NO_2^- у печінці: під впливом глутаргіну цей показник зростав на 81 %, аміногуанідин спричиняв подальше зменшення порівняно з I групою, вмісту стабільного метаболіту NO у печінці – на 25 %. При поєднаному введенні препаратів позитивний вплив глутаргіну на синтез NO нівелювався: рівень NO_2^- не відрізнявся від I групи і був на 78 % нижчим, ніж у тварин II групи (див. табл.).

При введенні глутаргіну відмічено зменшення проявів оксидаційного стресу у гомогенатах печінки: зниження вмісту ГПЛ (на 20 %) та ТБП (на 25 %) (див. табл.). На протилежність цьому, під впливом аміногуанідину інтенсивність переокиснення мембранних ліпідів у печінці зростала: вміст ГПЛ збільшувався на 12 %, а кількість ТБП проявляла тенденцію до підвищення порівняно з тваринами I групи (див. табл.). При поєднаному застосуванні препаратів кількість ГПЛ та ТБП у гомогенатах печінки не відрізнялась від показників I групи та була відповідно на 18 % та 25 % більшою, ніж у тварин, які отримували лише глутаргін.

Таблиця. Вплив глутаргіну та аміногуанідину (окреме та поєднане застосування) на стан печінки при STZ-діабеті (M±m)

Показник	Група тварин				
	Контроль	STZ-діабет	STZ-діабет+ глутаргін	STZ-діабет+ аміногуанідин	STZ-діабет+ глутаргін+ аміногуанідин
ГПЛ, ум.од. 10^3/кг	4,32±0,06	5,53±0,05 *	4,44±0,06 **	6,17±0,05 **	5,40±0,07 °
ТБП, ммоль/кг	4,56±0,04	8,44±0,30 *	6,36±0,30 **	8,84±0,28	8,25±0,20 °
СОД, ум.од.	2,07±0,07	2,74±0,06 *	1,94±0,05 **	3,05±0,06 **	2,45±0,06 ** °
Каталаза, кат/кг	12,8±0,6	15,1±0,5 *	12,6±0,1**	15,1±0,2	12,9±0,2**
G-SH, ммоль/кг	5,34±0,13	4,03±0,09 *	5,09±0,11**	3,62±0,13 **	4,69±0,13 **
СДГ, ммоль/(кг·хв.)	8,87±0,29	7,09±0,20 *	8,11±0,23 **	8,71±0,27 **	8,61±0,19 **
ЦХО, ммоль/(кг·хв.)	5,98±0,14	4,84±0,10 *	5,67±0,04 **	4,75±0,01	4,04±0,11** °
NO_2^- , мкмоль/кг	1,17±0,07	0,98±0,04 *	1,67±0,02 **	0,69±0,04 **	0,94±0,03 °

Примітки: * – достовірність відносно контролю, ** – відносно STZ-дібету, ° – відносно групи STZ-діабет+ глутаргін.

Під впливом попередника синтезу NO нормалізувалась активність антиоксидантних ферментів у печінці: СОД та каталази (див. табл.). При застосуванні аміногуанідину відбувалось подальше зростання рівня СОД у печінці – на 11 % порівняно з I групою. При поєднанні препаратів рівень СОД був на 11 % нижчим, ніж при патологі , але водночас на 20 % перевищував величину, яка реєструвалась у групі тварин, що отримували глутаргін. Рівень каталази у гомогенатах печінки у тварин III групи не відрізнявся від контрольно патологі , а у тварин IV групи знижувався на 14 %.

Вміст G-SH у печінці при введенні глутаргіну також нормалізувався, а під впливом аміногуанідину знижувався на 10 % порівняно з I групою (див. табл.). При поєднанні препаратів його рівень перевищував показник нелікованих тварин на 16 % і був на 23 % вищим, ніж при монопризначенні аміногуанідину, але на 8 % нижчим, ніж у II групі.

Активність СДГ у досліджуваних серіях зростала відповідно на 14 %, 23 % та 21 %. Рівень ЦХО збільшувався на 17 % під впливом глутаргіну, а при його поєднанні з аміногуанідином позитивний вплив препарату на цей показник повністю зникав (див. табл.).

Відомо, що в основі позитивного впливу прекурсорів синтезу NO при ЦД лежить здатність відновлювати синтез NO за рахунок постачання NO-синтази субстратом [12, 22, 17], блокувати утворення активних форм кисню та попереджувати нітрозування білків [19, 27, 13, 11], покращувати ендотелійзалежні судинні функці [12, 26, 20]. Встановлено також, що попередники NO діють через стимуляцію секреці інсуліну, оскільки відомо, що екзогенний NO (призначення прекурсорів ціє сполуки) та ендогенний NO, який продукується β-клітинами острівців Лангерганса у відповідь на стимуляцію глюкозою, активують вивільнення інсуліну [18, 14]. Відповідно, відмічене у наших дослідах погіршення стану печінки при експериментальному ЦД на тлі поєднаного застосування глутаргіну та аміногуанідину порівняно з групою тварин, які отримували лише прекурсор синтезу NO, може бути зумовлене блокадою утворення NO. Ця теза підтверджується зменшенням вмісту стабільного метаболіту ціє спо-

луки у гомогенатах печінки до рівня, що відмічений у групі контрольно патології .

ВИСНОВКИ 1. Експериментальний стрептозотоциновий діабет супроводжується зростанням рівнів глюкози та глікозильованого гемоглобіну в крові, у печінці – активацією процесів перекисного окиснення ліпідів, компенсаторним підвищенням активності каталази та супероксиддисмутази, зниженням рівня відновленого глутатіону, активності сукцинатдегідрогенази та цитохромоксидази мітохондрій, пригніченням синтезу оксиду азоту.

2. Попередник синтезу оксиду азоту глутаргін відновлює пригнічене при стрептозотоциновому діабеті утворення оксиду азоту, що супроводжується зниженням рівня глюкози у сироватці крові, зменшенням проявів оксидаційного стресу в печінковій тканині, відновленням активності антиоксидантно системи.

3. Блокатор синтезу оксиду азоту аміногуанідин при експериментальному цукровому діабеті спричиняє подальше прогресування у печінці процесів перекисного окиснення ліпідів на тлі гальмування синтезу оксиду азоту. Аміногуанідин дещо знижує рівні глюкози та глікозильованого гемоглобіну.

4. Поєднане застосування глутаргіну та аміногуанідину при гепатопаті , яка розвивається на тлі цукрового діабету, супроводжується погіршенням стану печінки порівняно з групою тварин, яким вводили лише глутаргін, що підтверджує важливість активаці синтезу оксиду азоту у реалізаці гепатопротекторно ді глутаргіну при цій патології .

5. Отримані результати обґрунтовують перспективу подальшого пошуку і вивчення сполук – попередників синтезу оксиду азоту, здатних зменшувати прояви та покращувати перебіг цукрового діабету.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Андреева Л.И. Модификация метода определения перекисей липидов в тесте с тиобарбитуровой кислотой / Л.И. Андреева, Л.А. Кожемякин, А.А. Кишкун // Лаб. дело. – 1988. – № 11. – С. 41-43.

2. Гаврилов В.Б. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови / В.Б. Гаврилов, М.И. Мишкорудная // Лаб. дело. – 1983. – № 3. – С. 33-35.

3. Ещенко Н.Д., Вольский Г.Г. Определение количества янтарной кислоты и активности сукцинатдегидрогеназы / Н.Д. Ещенко, Г.Г. Вольский // Методы биохимических исследований. – Л.: Изд-во Ленинградского университета, 1982. – С. 207-212.

4. Кривченкова Р.С. Определение активности цитохромоксидазы в суспензии митохондрий // Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича – М.: Медицина, 1977. – С. 47-49.

5. Метод определения активности каталазы / М.А. Королюк, Л.И. Иванова, И.Г. Майорова и др. // Лаб. дело. – 1988. – № 1. – С. 16-19.

6. Чевари С. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения её в биологических материалах / С. Чевари, И. Чаба, И. Секей // Лаб. дело. – 1985. – № 11. – С. 678-684.

7. Чернухіна О.О. Морфологічні зміни у печінці при експериментальному діабеті та призначенні попередників та блокаторів синтезу оксиду азоту / О.О. Чернухіна, К.А. Посохова, Т.В. Дацко // Вісник морфології . – 2009. – Т. 15, № 1. – С. 18-21.

8. Чернухіна О.О. Показники ураження печінки і нирок при цукровому діабеті та призначенні модуляторів синтезу оксиду азоту / О.О. Чернухіна // Мед. хімія. – 2009. – № 4. – С. 52-55.

9. Чернухіна О.О. Фармакологічна корекція системи L-аргінін-оксид азоту і стан печінки при цукровому діабеті / О.О. Чернухіна // Мед. хімія. – 2007. – № 4. – С. 47-50.

10. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, A.W. David, J. Glogovski et al.// Analyt. Biochem. – 1982. – Vol. 126, № 1. – P. 131-138.

11. Asymmetric dimethylarginine reduced erythrocyte deformability in streptozotocin-induced diabetic rats / Z.C. Yang, K. Xia, L. Wang et al.// Microvasc Res. – 2006. – Vol. 12. – P. 3401-09.

12. Boger R.H. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the “L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor / R.H. Boger // J Nutr. – 2004. – Vol. 134, № 10. – P. 2842-2847.

13. Cardounel A.J. Endogenous methylarginines modulate superoxide as well as nitric oxide generation from neuronal nitric-oxide synthase: differences in the effects of monomethyl- and dimethylarginines in the presence and absence of tetrahydrobiopterin / A.J. Cardounel, Y. Xia, J.L. Zweier // J Biol Chem. – 2005. – Vol. 280, № 9. – P. 7540-7549.

14. Dietary L-arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin-induced diabetic rats / R. Kohli, C.J. Meininger, T.E. Haynes et al. // J Nutr. – 2004. – Vol. 134, № 3. – P. 600-608.

15. Dietary L-arginine supplementation reduces fat mass in Zucker diabetic fatty rats / W.J. Fu, T.E. Haynes, R. Kohli et al. // J Nutr. – 2005. – Vol. 135, № 4. – P. 714-721.

16. Ellman G.L. Tissue sulfhydryl groups / G.L. Ellman // Arch. Biochem. Biophys. – 1959. – № 82. – P. 70-77.

17. Exercise and possible molecular mechanisms of protection from vascular disease and diabetes: the central role of ROS and nitric oxide / P. Newsholme, P.I. Homem De Bittencourt, C. O’ Hagan et al. // Clin Sci (Lond). – 2009. – 23;118(5) – P. 341-349.

18. Exogenous nitric oxide and endogenous glucose-stimulated в-cell nitric oxide augment insulin release / S.R. Smukler, Lan Tang, M.B. Wheeler et al. // Diabetes. – 2002. – Vol. 51. – P. 3450-3460.

19. High glucose-induced tyrosine nitration in endothelial cells: role of eNOS uncoupling and aldose reductase activation. / A.B. El-Remessy, G. Abou-Mohamed, R.W. Caldwell et al. // Invest Ophthalmol Vis Sci. – 2003. – Vol. 44, № 7. – P. 3135-3143.

20. Kabat A. L-arginine supplementation prevents the development of endothelial dysfunction in hyperglycaemia / A. Kabat, S. Dhein // Pharmacology. – 2006. – Vol. 76, № 4. – P. 185-191.

21. Kochar N.I. Beneficial effects of L-arginine against diabetes-induced oxidative stress in gastrointestinal tissues in rats / N.I. Kochar, S.N. Umathe // Pharmacol Rep. – 2009 Vol.; 61(4). – P. 665-672.

22. L-Arginine, the substrate for NO synthesis: an alternative treatment for premature atherosclerosis? / G. Siasos, D. Tousoulis, C. Antoniades et al. // Int J Cardiol. – 2007. – Vol.116(3). – P. 300-308.

23. Mason R.P. Nitric oxide mechanisms in the pathogenesis of global risk / R.P. Mason // J Clin Hypertens (Greenwich). – 2006. – № 8. Suppl 2. – P. 31-38.

24. McGrowder D. Modulation of glucose uptake in adipose tissue by nitric oxide-generating compounds / D. McGrowder, D. Ragoobirsingh, P. Brown P. // J Biosci. – 2006. – Vol. 31, № 3. – P. 347-354.

25. Plasma copeptin and the risk of diabetes mellitus / S. Enhцrning, T.J. Wang, P.M. Nilsson et al. // Circulation. – 2010 Vol. 121(19): – P. 2102-2108.

26. Role of oxidative stress in development of cardiovascular complications in diabetes mellitus M.A. Haidara, H.Z. Yassin, M. Rateb et al. // Curr Vasc Pharmacol. – 2006. – Vol. 4, № 3. – P. 215-227.

27. Three different oxygen-induced radical species in endothelial nitric-oxide synthase oxygenase domain under regulation by L-arginine and tetrahydrobiopterin / V. Berka, G. Wu, H.C. Yeh et al. // J Biol Chem. – 2004. – Vol. 279, № 31. – P. 32243-32251.

Отримано 31.05.10