УДК 577.152.353 : 616.379-008.64
DOI: 10.54503/0514-7484-2024-64.4-133

Влияние инсулинотерапии на взаимосвязь ферментов метаболизма L-аргинина в лейкоцитах и плазме крови при длительном сахарном диабете 1 типа

Н.Х. Алчуджян[1], М.Р. Оганнисян[1], Н.О.Мовсесян[1], А.А. Андреасян[1], Р.Л. Айрапетян[1], А.М. Мелконян[2], Е.М. Агаджанова[2]

[1]Институт биохимии им. Г. Бунятяна НАН РА
0014, Ереван, ул. П. Севака, 5/1,
[2]Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци
0025, Ереван, ул. Корюна, 2

Ключевые слова: аргиназа, инсулин, лейкоциты, сахарный диабет 1 типа, синтаза оксида азота

В 2021 году в мире насчитывалось около 8,4 млн человек с сахарным диабетом 1 типа (СД1Т): из них 1,5 млн – моложе 20 лет, и их численность продолжает расти во многих странах, в том числе в Армении [14, 21]. СД1Т характеризуется прогрессирующей деструкцией инсулинпродуцирующих β-клеток поджелудочной железы и метаболическими нарушениями, однако пробелы в понимании патофизиологии СД1Т остаются [11]. Появление в крови островковых аутоантиген-реактивных Т-клеток, инфильтрирующих поджелудочную железу с разрушением β-клеток, предшествует гипергликемии и клиническим симптомам СД1Т [28]. А нарушение регуляции метаболизма аминокислот предшествует островковому аутоиммунитету, и тяжесть и прогноз СД1Т связаны с изменениями в специфических биохимических путях, участвующих в иммунном ответе, которые различаются у мужчин и женщин [23]. В этой связи особый интерес представляет L-аргинин – важный иммунонутриент и иммуномодулятор, который регулирует активность естественных киллеров, Т-клеток, моноцитов / макрофагов, стимулирует синтез инсулина, секрецию инсулиноподобного фактора роста, гормона роста и таким образом вовлечен в патофизиологию диабета [19, 22]. L-аргинин расщепляется аргиназой (ARG) на L-орнитин и мочевину, а в реакции, катализируемой синтазой оксида азота (NOS), превращается в свободнорадикальный оксид азота (NO) и L-цитруллин, и оба фермента участвуют во врожденном и адаптивном иммунитете [6, 30]. Нарушения в экспрессии и активности этих ферментов влияют на возникновение и развитие сахарного диабета и его осложнений через множество сигнальных путей [17, 25]. Изучение их в иммунных клетках крови может усилить и уточнить диагноз, а также оценить влияние терапевтического вмешательства при СД1Т.

Материал и методы

Исследование одобрено Комитетом по этике Ереванского государственного медицинского университета им. Мхитара Гераци (Заключение Институционального наблюдательного совета № 7-1/2023). От всех участников получено согласие в соответствии со стандартами клинической практики и Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации [29].

Все пациенты в возрасте от 12 до 26 лет (n=52) с длительным СД1Т (1,8 – 17 лет), были рекрутированы из отделения эндокринологии Университетской больницы «Мурацан» (Ереван, Армения) и диагностированы в соответствии с рекомендациями Американской диабетической ассоциации [2]. Определялись аутоантитела островковых клеток к инсулину и декарбоксилазе глутаминовой кислоты. Критериями исключения были макро- и микрососудистые заболевания, острые или хронические заболевания печени, почек и сердца, злокачественные новообразования, артериальная гипертензия, беременность. Все участники обследовались рано утром, натощак. Лечение вели в соответствии со стандартным медицинским протоколом – пациенты ежедневно получали 4–5-кратные инъекции инсулина.

В клинической лаборатории больницы «Мурацан» определяли отсутствие микроальбуминурии, а также уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) в плазме [8].

Выделение лейкоцитов и плазмы крови. Свежеполученную венозную кровь стабилизировали антикоагулянтом, 3,9% цитратом натрия ($C_6H_9Na \cdot 5H_2O$), смешивали с 6% декстраном (Mr 100 000), приготовленном на 0,9% NaCl, и инкубировали при 37°C в течение 60 минут для седиментации эритроцитов. Верхний слой плазмы, содержащий лейкоциты и тромбоциты, декантировали и центрифугировали при 1000 об/мин 5 мин с осаждением лейкоцитов, которые дважды промывали и гомогенизировали в 20 мМ HEPES буфере pH 7,4 [9]. Из полученного супернатанта осаждали тромбоциты центрифугированием при 15000 об/мин 3 мин с получением плазмы в надосадке.

Общая активность NOS определялась по аккумуляции стабильных метаболитов NO при долговременной инкубации биоматериала (20 ч, 37°C) в 20 мМ HEPES буфере pH 7,4, при добавлении субстрата, 5,3 мМ L-аргинин·HCl и кофакторов NOS: 0,2 мМ NADPH, 20 мкМ (6R)-5,6,7,8-тетрагидробиоптерин, 6 мкМ FAD, 5,5 мкМ FMN и 1,7 мМ $CaCl_2$. В контрольных экспериментах пробы инкубировали в присутствии 5 мМ N^G-монометил-L-аргинина, природного конкурентного неселективного ингибитора NOS. Реакцию останавливали 0,5 N NaOH и 10% $ZnSO_4$ и белок осаждали центрифугированием при 15000 об/мин 3 мин при комнатной температуре, и в супернатантах определяли образование стабильных метаболитов NO по содержанию нитритов. Активность NOS выражали в нмоль $(NO_2^-) \cdot 20$ ч$^{-1}$ $\cdot$ мг$^{-1}$ белка.

Содержание нитритов определяли реакцией диазотирования реактивом Грисса, который добавляли к пробам в соотношении 1:1 по объему, сме-

шивали и спустя 15 мин спектрофотометрировали при длине волны 546 нм [27]. Концентрацию нитритов рассчитывали по калибровочной кривой.

Активность аргиназы определяли по образованию мочевины в реакционной смеси. Пробы инкубировали в течение 1 ч при 37°C в 20 мМ HEPES буфере pH 7,4 с добавлением 0,05 М $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ и 0,2 М L-аргинин·HCl. В контрольных экспериментах пробы инкубировали в присутствии ингибитора аргиназы гидрохлорида 2(S)-амино-6-бороногексановой кислоты. Реакцию останавливали 10% ТХУ и белок осаждали центрифугированием при 15000 об/мин 3 мин при комнатной температуре. Активность аргиназы выражали в мкмоль мочевины $\cdot$ $ч^{-1} \cdot мг^{-1}$ белка.

Определение содержания мочевины. Супернатанты депротеинизированных проб смешивали с 1 мл кислотной смеси (H_2SO_4, H_3PO_4, 0,05 % $MnCl_2$, содержащий 0,5 % $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, в соотношении 1:3:4 по объему) и 0,1 мл 3 % диацетилмонооксима, кипятили 15 мин в водяной бане и после охлаждения определяли содержание мочевины спектрофотометрически при длине волны 478 нм. Концентрацию мочевины рассчитывали по калибровочной кривой.

Содержание белка определяли по Лоури с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина [18].

Статистика. Данные выражали средним значением (M) ± стандартная ошибка среднего (±SEM). Для сравнения показателей применяли параметрический однофакторный дисперсионный анализ (one-way Anova) с использованием критерия Холма-Сидака. Для оценки взаимосвязи между переменными использовался коэффициент линейной корреляции Пирсона (r). Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Метаболизм L-аргинина в лейкоцитах и плазме крови исследовался у подростков и молодых армян, в возрасте, когда наиболее выражены половозрастные различия, обусловливающие метаболические различия в разных популяциях человека, которые влияют на иммунную систему, частоту встречаемости и тяжесть протекания аутоиммунных болезней [10, 16]. Взаиморегуляция индуцибельной NOS и аргиназы играет роль в иммунных процессах и, по-видимому, является эволюционно древней программой — она обнаружена и в лейкоцитах рыб [15]. Оба фермента селективно регулируются TH1/TH2-цитокинами и коиндуцируются в моноцитах / макрофагах липополисахаридами клеточной стенки бактерий, при этом разновременная индукция изоформ ARG регулирует активность NOS [26].

Изучение активности ARG и NOS в лейкоцитах и плазме крови здоровых волонтеров выявило половые различия в корреляционной связи между ферментами. Так, в лейкоцитах здоровых девушек наблюдается сильная положительная корреляция и влияние (r= 0,67, R^2 = 0,45), тогда как в лейкоцитах юношей корреляция умеренная (r= 0,37) и влияние весьма малое (R^2 = 0,13) (рис.1).

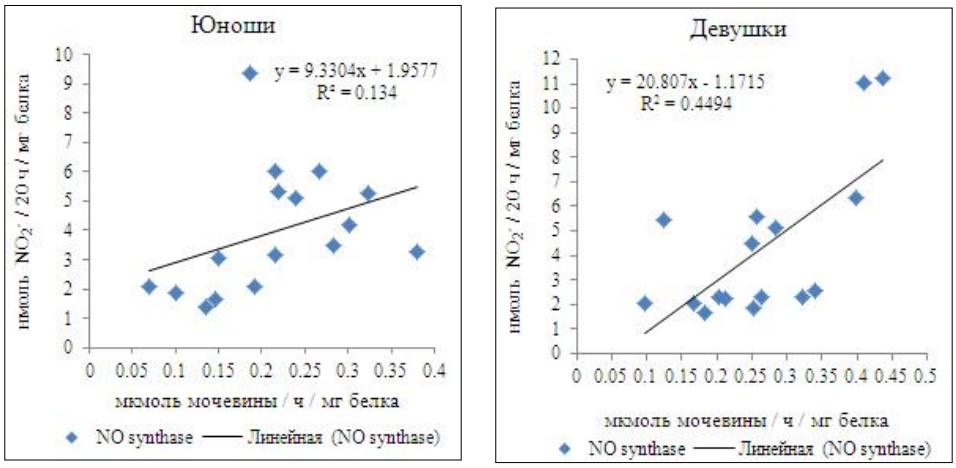

Рис. 1. Половые различия корреляции Пирсона между активностью аргиназы и синтазы оксида азота в лейкоцитах здоровых подростков и молодых армян. Здесь и далее: R2 – коэффициент детерминации

Возрастание половых гормонов в пубертате вносит свой вклад в выявленные различия. Так, эстрадиол, важнейший эстроген, стимулирует в нейтрофилах активность эндотелиальной NOS [12]. Женские эндотелиальные клетки человека экспрессируют больше мРНК NOS, чем мужские, как *in vitro,* так и *ex vivo,* что указывает на врожденный половой диморфизм и обеспечивает женщинам преимущественную защиту от сердечно-сосудистых заболеваний [7].

У юношей по сравнению с лейкоцитами в плазме крови положительная корреляция между активностями ARG и NOS возрастает, почти до сильной степени (r= 0,48; R^2 = 0,24), тогда как у девушек – сильная корреляция сменяется умеренной (r= 0,43), хотя и влияние довольно сильно (R^2 = 0,19) (рис. 2).

Различия в корреляции между активностями ARG и NOS, которые определяются в лейкоцитах и плазме крови, могут быть обусловлены тем, что эти ферменты попадают вследствие экзоцитоза в кровоток не только из лейкоцитов, но и из тромбоцитов, эритроцитов, а также различных тканей и органов, где они локализованы. Поэтому в плазме содержание ARG и NOS, их активность и изоферментный состав, на которые влияет и микроокружение, отражают системные изменения так же, как и корреляционная связь.

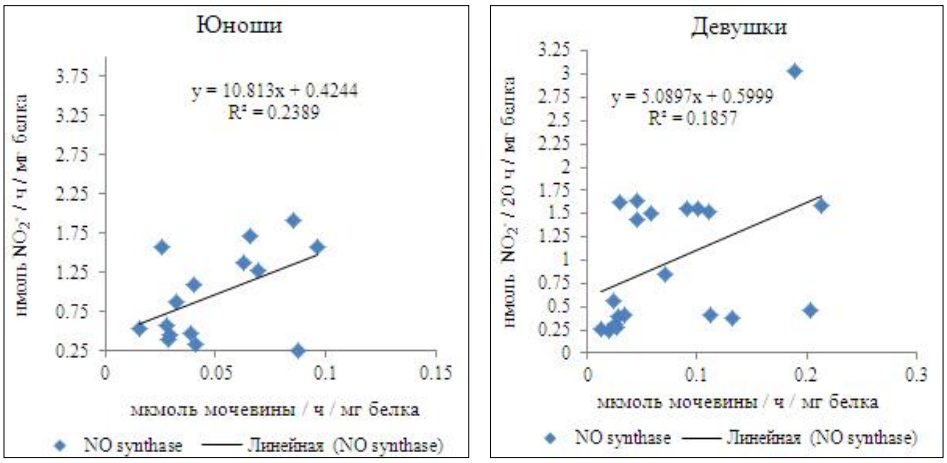

Рис. 2. Половые различия корреляции Пирсона между активностью аргиназы и синтазы оксида азота в плазме крови здоровых подростков и молодых армян

У пациентов с длительно текущим СД1Т, несмотря на продолжительную инсулинотерапию, полностью нарушалась связь между ARG и NOS по сравнению со здоровыми добровольцами того же пола и возраста. В лейкоцитах девушек с СД1Т была очень слабая отрицательная корреляция (r= -0,05) и практически отсутствие влияния (R^2= 0,002), а у юношей с СД1Т была весьма слабая, хотя и положительная, корреляция (r= 0,09; R^2 = 0,008) (рис. 3).

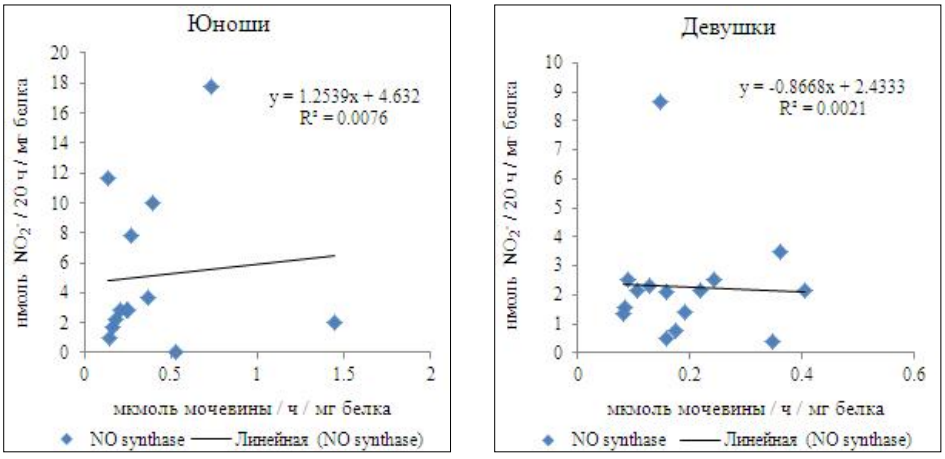

Рис. 3. Половые различия линейной корреляции Пирсона между активностью аргиназы и синтазы оксида азота в лейкоцитах подростков и молодых армян с СД1Т на фоне инсулинотерапии

В плазме крови девушек с СД1Т также положительная корреляция между ферментами сменялась на отрицательную (*r*= -0,2; R^2 = 0,12) и была выше по сравнению с лейкоцитами. И наоборот, в плазме юношей с СД1Т положительная корреляция между ферментами возрастала по сравнению со

здоровыми (r= 0,3; R^2 = 0,09) и была выше, чем в лейкоцитах (рис. 4). Такие разнонаправленные изменения в плазме могут быть связаны с различиями во влиянии инсулина на эстрогены и андрогены и требуют дальнейшего изучения.

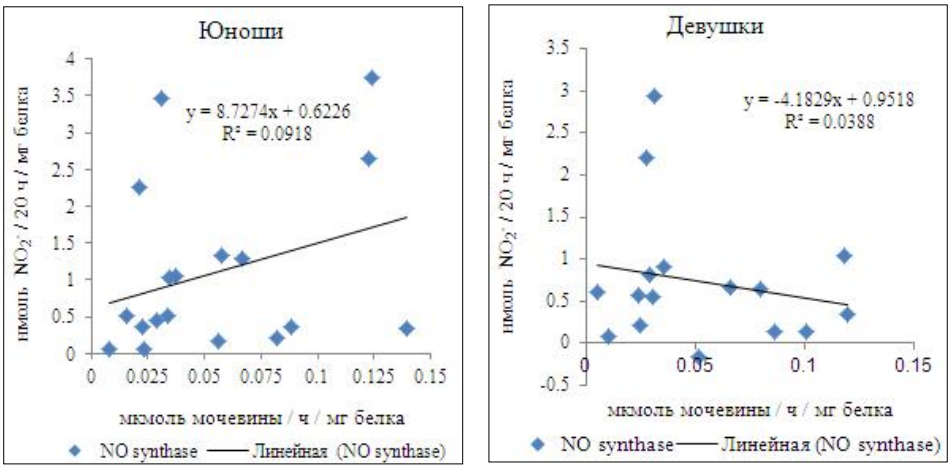

Рис. 4. Половые различия корреляции Пирсона между активностью аргиназы и синтазы оксида азота в плазме крови подростков и молодых армян с СД1Т на фоне инсулинотерапии

При диабете аутоокисление глюкозы запускает процессы окислительного стресса, которые стимулируют активирование и экспрессию обеих изоформ ARG [6]. Как следствие, они снижают уровень L-аргинина, который не только стабилизирует структуру всех изоформ NOS, но и повышает *in vivo* концентрацию тетрагидробиоптерина, кофактора NOS, который способствует самосборке активных димеров изоформ NOS и стабилизации их структуры, в еще большей мере, чем L-аргинин, и стимулирует синтез NO [13]. Вдобавок, мочевина, продукт аргиназной реакции, подавляет самосборку мономеров NOS в макрофагах [20]. При диабете в крови содержание мочевины также повышается как результат накопления продуктов метаболизма, что будет вносить свой вклад в дисбаланс метаболизма аргинина. В свою очередь первый интермедиат реакции NOS, N^G-гидрокси-L-аргинин, является мощным ингибитором аргиназы печени и макрофагов [4]. А цитруллин, который участвует в синтезе аргинина, является конечным продуктом реакции NOS и аллостерическим ингибитором аргиназы [24]. В результате наблюдается нарушение корреляции между ферментами.

ARG вызывает «разобщение» эндотелиальной NOS и внутриклеточного L-аргинина, что приводит к преимущественному образованию ферментом супероксида и взаимодействию последнего с NO с образованием пероксинитрита, мощного окислителя и нитрующего агента, который участвует в образовании аутоантигенов и аутоантител [1]. В результате снижается уровень биодоступного NO в лейкоцитах и эндотелиальных клетках и, как следствие, раз-

виваются эндотелиальная дисфункция и осложнения при диабете, а также гиперхолестеринемия и гипертония [5]. Следует отметить, что именно биодоступность NO, а не его синтез, является одним из главных наследуемых факторов чувствительности к инсулину, и его снижение при окислении предшествует появлению инсулинрезистентности [3].

Таким образом, у подростков и молодых армян с СД1Т нарушение взаиморегуляции ферментов метаболизма аргинина в иммунных клетках крови на фоне длительной инсулинотерапии зависит от пола и свидетельствует о глубинных метаболических пертурбациях, которые не корректируются инсулином. В то же время в плазме обнаружено положительное влияние инсулинотерапии у юношей и отрицательное – у девушек. Половые различия во взаимосвязи между аргиназой и синтазой оксида азота в лейкоцитах и плазме крови могут отражать состояние больного и течение терапии аутоиммунного диабета.

Поступила 04.06.24

Ինսուլինային թերապիայի ազդեցությունը L-արգինինի նյութափոխանակության ֆերմենտների վրա լեյկոցիտներում և արյան պլազմայում 1-ին տիպի երկարատև շաքարային դիաբետի ժամանակ

Ն.Խ. Ալչուջյան, Մ.Ռ. Հովհաննիսյան, Ն.Հ.Մովսեսյան, Ա.Ա. Անդրեասյան, Հ.Լ. Հայրապետյան, Ա.Մ. Մելքոնյան, Ե.Մ. Աղաջանովա

Երկարատև տիպ 1 շաքարային դիաբետով տառապող դեռահասների և երիտասարդների շրջանառվող լեյկոցիտներում արգինազի և ազոտի օքսիդի սինթազի ակտիվության կոռելյացիան խախտվում է անկախ ինսուլինաթերապիայից: Միաժամանակ պլազմայում տղաների մոտ գրանցվել է թերապիայի դրական ազդեցությունը ֆերմենտների միջև կոռելյացիոն կապի վրա, իսկ աղջիկների մոտ՝ բացասական: Լեյկոցիտներում և արյան պլազմայում արգինազի և ազոտի օքսիդի սինթազի փոխազդեցության սեռային տարբերությունները կարող են արտացոլել հիվանդի վիճակը և աուտոիմուն շաքարախտի բուժման ընթացքը:

Effect of Insulin Therapy on the Relationship between Enzymes of L-arginine Metabolism in Leukocytes and Blood Plasma in Long-Term Type 1 Diabetes Mellitus

N.Kh. Alchujyan, M.R. Hovhannisyan, N.H. Movsesyan, A.A. Andreasyan, R.L. Hayrapetyan, A.M. Melkonyan, E.M. Aghajanova

In circulating leukocytes of adolescents and young Armenians with long-term type 1 diabetes mellitus, a correlation between the activities of arginase and nitric oxide synthase was significantly reduced despite treatment with insulin. At the same time a positive effect of insulin therapy on the correlation was found in the plasma of boys, a negative effect was found in the plasma of girls. Sex differences in the relationship between arginase and nitric oxide synthase in leukocytes and blood plasma may reflect the patient's condition and the course of therapy for autoimmune diabetes.

Литература

1. *Ahmad R., Hussain A., Ahsan H.* Peroxynitrite: cellular pathology and implications in autoimmunity. J Immunoassay Immunochem., 2019, 40:123–138. DOI: 10.1080/1532 1819.2019.1583109.
2. American Diabetes Association. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of medical care in diabetes. 2019, Diabetes Care, 2019, 42:S13–S28. DOI:10.2337/dc19-S002.
3. *Blouet C., Mariotti F., Mathe V.,* et al. Nitric oxide bioavailability and not production is first altered during the onset of insulin resistance in sucrose-fed rats. Exp Biol Med (Maywood). 2007, 232:1458–1464. doi: 10.3181/0703-RM-64.
4. *Buga G.M., Singh R., Pervin S., et al.* Arginase activity in endothelial cells: inhibition by NG-hydroxy-L-arginine during high-output NO production. Am J Physiol., 1996, 271:H1988–H1998. DOI:10.1152/ajpheart.1996.271.5.H1988.
5. *Cai H., Harrison DG.* Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res., 2000, 87:840–844. DOI: 10.1161/01.res.87.10.840.
6. *Caldwell RW., Rodriguez PC., Toque HA., et al.* Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease. Physiol Rev. 2018, 98:641–665. DOI:10.1152/ physrev.00037.2016.
7. *Cattaneo MG., Vanetti C., Decimo I., et al.* Sex-specific eNOS activity and function in human endothelial cells. Sci Rep., 2017, 7(1):9612. doi: 10.1038/s41598-017-10139-x.
8. *Chang J., Hoke C., Ettinger B., Penerian G.* Evaluation and interference study of hemoglobin A1c measured by turbidimetric inhibition immunoassay. Am J Clin Pathol., 1998, 109:274–278. DOI:10.1093/ajcp/109.3.274.
9. *Dagur P., McCoy J.* Collection, storage, and preparation of human blood cells. Curr Protoc Cytom., 2015, 73:5.1.1–5.1.16. DOI:10.1002/0471142956.cy0501s73.
10. *de la Cuesta-Zuluaga J., Kelley ST., Chen Y., et al.* Age- and sex-dependent patterns of gut microbial diversity in human adults. Msystems, 2019, 4 e00261-19 1-12. DOI: 10.1128/mSystems.00261-19.
11. *DiMeglio LA., Evans-Molina C., Oram RA.* Type 1 diabetes. Lancet, 2018, 391(10138):2449-2462. DOI: 10.1016/S0140-6736(18)31320-5.
12. *Durán MG., Gálvez GG., de Frutos T. et al.* 17 Beta-estradiol-stimulated nitric oxide production by neutrophils: effect on platelet activation. Obstet Gynecol., 2000, 95(2):284-290. DOI: 10.1016/s0029-7844(99)00567-0.

13. *Foxton RH., Land JM., Heales SJ.* Tetrahydrobiopterin availability in Parkinson's and Alzheimer's disease, potential pathogenic mechanisms. Neurochem Res., 2007, 32(4-5):751-756. DOI: 10.1007/s11064-006-9201-0.
14. *Gregory GA., Robinson TIG., Linklater SE. et al.* International Diabetes Federation Diabetes Atlas Type 1 Diabetes in Adults Special Interest Group, Magliano DJ, Maniam J, Orchard TJ, Rai P, Ogle GD. Global incidence, prevalence, and mortality of type 1 diabetes in 2021 with projection to 2040: a modelling study. Lancet Diabetes Endocrinol., 2022,10(10):741-760. DOI: 10.1016/S2213-8587(22)00218-2.
15. *Joerink M., Ribeiro CM., Stet RJ. et al.* Head kidney- derived macrophages of common carp (Cyprinus carpio L.) show plasticity and functional polarization upon differential stimulation. J Immunol., 2006, 77(1):61-69. DOI: 10.4049/jimmunol.177.1.61.
16. *Klein S.L., Flanagan K.L.* Sex differences in immune responses. Nat Rev Immunol., 2016, 16: 626-638. doi:10.1038/nri.2016.90.
17. *Król M., Kepinska M.* Human nitric oxide synthase-its functions, polymorphisms, and inhibitors in the context of inflammation, Diabetes and Cardiovascular Diseases. Int J Mol Sci., 2020, 22(1):56. DOI: 10.3390/ijms22010056.
18. *Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL., Randall RJ.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193: 265–275.
19. *Martí I Líndez AA., Reith W.* Arginine-dependent immune responses. Cell Mol Life Sci., 2021, 78(13):5303-5324. DOI: 10.1007/s00018-021-03828-4.
20. *Moeslinger T., Spieckermann PG.* Urea-induced inducible nitric oxide synthase inhibition and macrophage proliferation. Kidney Int Suppl., 2001, 78:S2-S8. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2001.59780002.x.
21. *Navasardyan LV.* Epidemiology of type 1 diabetes in children and adolescents in the Republic of Armenia. The New Arm Med., 2014, 8:89-93.
22. *Oh HS., Oh SK., Lee JS. et al.* Effects of l-arginine on growth hormone and insulin- like growth factor 1. Food Sci Biotechnol., 2017, 26(6):1749-1754. DOI: 10.1007/s10068-017-0236-6.
23. *Oresic M., Simell S., Sysi-Aho M. et al.* Dysregulation of lipid and amino acid metabolism precedes islet autoimmunity in children who later progress to type 1 diabetes. J Exp Med., 2008, 205(13):2975-2984. doi: 10.1084/jem.20081800.
24. *Pudlo M., Demougeot C., Girard- Thernier C.* Arginase inhibitors: A rational approach over one century. Medicin Res Rev., 2017, 37 (3): 475-513. doi: 10.1002/med.
25. *Ren Y., Li Z., Li W., Fan X. et al.* Arginase: biological and therapeutic implications in diabetes mellitus and its complications. Oxid Med Cell Longev., 2022, 2022:2419412. DOI: 10.1155/2022/2419412.
26. *Salimuddin, Nagasaki A., Gotoh T., et al.* Regulation of the genes for arginase isoforms and related enzymes in mouse macrophages by lipopolysaccharide. Amer. J. Physiol-Endocrinol Metab., 1999, 277(1): E110–E117. DOI:10.1152/ajpendo.1999.277.1.e110.
27. *Schmidt HHHW., Kelm M.* Determination of nitrite and nitrate by the Griess reaction. In Methods in Nitric Oxide Research. (Eds. Feelisch M, Stamler JS. Wiley, Chichester), 1996, 491.
28. *van Belle TL., Coppieters KT., von Herrath MG.* Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. Physiol Rev. 2011, 91(1):79-118. DOI: 10.1152/physrev.00003.2010.
29. World Medical Association, Declaration of Helsinki, Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects. (59th WMA General Assembly, Seoul), October 2008, https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/
30. *Xue Q., Yan Y., Zhang R., Xiong H.,* Regulation of iNOS on immune cells and its role in diseases. Int J Mol Sci. 2018, 19: 3805. DOI: 10.3390/ijms19123805.