

UNIwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Natasza Balcer-Dymel

OCENA SKUTECZNOŚCI I BEZPIECZEŃSTWA DWUMIESIĘCZNEJ  
DOUSTNEJ SUPLEMENTACJI L-ARGININĄ U CHORYCH Z MIAŻDŻYCOWYM  
NIEDOKRWIENIEM KOŃCZYN DOLNYCH W ZALEŻNOŚCI OD RODZAJU  
ZABURZEŃ GOSPODARKI LIPIDOWEJ

PRACA NA STOPIEŃ DOKTORA NAUK MEDYCZNYCH  
W ZAKRESIE BIOLOGII MEDYCZNEJ  
Z ZAKŁADU FARMAKOLOGII KLINICZNEJ  
KATEDRY KARDIOLOGII UNIwersytetu Medycznego  
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

**PROMOTOR: PROF. DR HAB. ANNA JABŁECKA**

Poznań 2012

*Pani Prof. Dr hab. Annie Jabłeckiej  
za wybór tematu i pomoc w jego realizacji,  
za cenne rady oraz cierpliwość  
składam serdeczne podziękowania.*

Dziękuję wszystkim, bez których  
ta praca nie powstałaby  
*Amicus optima vitae possessio*

## SPIS TREŚCI

Wykaz ważniejszych skrótów użytych w pracy.....	5
1. Wstęp.....	7
1.1. Chromanie przestankowe – definicja.....	7
1.2. Ocena kliniczna.....	8
1.3. Patogeneza blaszki miażdżycowej .....	9
1.4. Znaczenie śródbłonka naczyniowego w patogenezie miażdżycy.....	11
1.4.1. Znaczenie tlenu azotu w dysfunkcji śródbłonka naczyniowego.....	12
1.4.2. Znaczenie L-argininy w biosyntezie tlenu azotu.....	14
1.4.3. Znaczenie asymetrycznej dimetyloargininy.....	16
1.4.4. Znaczenie homocysteiny.....	17
1.5. Farmakoterapia miażdżycowego niedokrwienia kończyn dolnych.....	19
1.6. L-arginina jako lek – historia i obecny stan wiedzy.....	22
1.7. Farmakokinetyka L-argininy.....	27
1.7.1. Wchłanianie.....	28
1.7.2. Dystrybucja.....	29
1.7.3. Eliminacja.....	29
1.8. L-arginina w zaburzeniach gospodarki lipidowej i miażdżycowym niedokrwieniu kończyn dolnych.....	30
2. Cel pracy.....	32
3. Materiał i metodyka.....	33
3.1. Charakterystyka grup.....	33
3.2. Wykonane badania.....	35
3.3. Metodyka badania.....	36
3.3.1. Dystans przejścia bezbólowego i wskaźnik kostka-ramię.....	36
3.3.2. Tlenek azotu.....	36
3.3.3. Całkowity potencjał antyoksydacyjny.....	37
3.3.4. Homocysteina.....	37
3.3.5. Analiza chromatograficzna asymetrycznej dimetyloargininy.....	38
3.3.6. Glukoza.....	40
3.3.7. Insulina.....	40
3.3.8. Badania laboratoryjne.....	41
3.4. Analiza statystyczna.....	41

4. Wyniki.....	42
4.1. Informacje ogólne.....	42
4.2. Parametry gospodarki lipidowej.....	42
4.3. Dystans przejścia bezbólowego (DPB).....	45
4.4. Wskaźnik kostka-ramię (WKR).....	47
4.5. Tlenek azotu (NO).....	48
4.6. Całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAS).....	49
4.7. Homocysteina (Hcy).....	51
4.8. Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA).....	52
4.9. Insulina.....	53
4.9.1. Wskaźnik insulinooporności HOMA-IR.....	54
4.10. Korelacje.....	55
4.10.1. Korelacje ADMA vs Hcy.....	55
5. Dyskusja.....	61
6. Wnioski.....	72
7. Streszczenie.....	73
8. Piśmiennictwo.....	78

## Wykaz skrótów użytych w pracy

- ABI** (ang. *ankle-brachial index*) – wskaźnik kostka ramię
- ADC** (ang. *arginine decarboxylase*) - dekarboksylaza argininowa
- ADMA** (ang. *asymmetric dimethylarginine*) - asymetryczna dimetyloarginina
- ADP** (ang. *adenosine diphosphate*) – difosforan adenozyiny
- ALAT** – aminotransferaza alaninowa
- AMP** (ang. *adenosine monophosphate*) – monofosforan adenozyiny
- ASPAT** – aminotransferaza asparaginianowa
- ATP** (ang. *adenosine triphosphate*) – trifosforan adenozyiny
- BH<sub>4</sub>** (ang. *tetrahydrobiopterin*) - tetrahydrobiopteryna
- BMI** (ang. *body mass index*) – wskaźnik masy ciała
- cGMP** (ang. *cyclic guanosine monophosphate*) - cykliczny monofosforan guanidyny
- ChC** – cholesterol całkowity
- ChP** – chromanie przestankowe
- cNOS** – konstytutywna synteza tlenku azotu
- CRP** (ang. *C reactive protein*) - białko C-reaktywne
- DDAH** – dimetyloaminohydrolaza dimetyloargininowa
- DPB** – dystans przejścia do wywołania bólu
- DPM** – dystans przejścia maksymalnego
- EDCFs** (ang. *endothelium-derived contracting factors*) - substancje o działaniu wazokonstrykcyjnym
- EDHF** (ang. *endothelium-derived hyperpolarizing factor*) - śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący
- EDRF** (ang. *endothelium-derived relaxing factor*) - śródbłonkowy czynnik rozszerzający naczynia
- ET-1** (ang. *endothelin*) - endotelina 1
- FGF 2** (ang. *fibroblast growth factor*) – czynnik wzrostu fibroblastów
- Hb** (ang. *hemoglobin*) – hemoglobina
- Hcy** - homocysteina
- HDL** (ang. *high density lipoprotein*) – lipoproteiny osocza o dużej gęstości
- HOMA-IR** (ang. *homeostasis model of assessment - insulin resistance index*) – wskaźnik insulinooporności

**ICAM-1** (ang. *intercellular adhesion molecule-1*) – międzykomórkowa cząstka adhezyjna 1

**IL** - interleukina

**Km** – stała Michaelisa-Menten

**lizo-PC** - lizofosfatydylocholina

**LDL** (ang. *low density lipoprotein*) – lipoproteiny osocza o małej gęstości

**NADP** (ang. *nicotinamide adinine dinucleotide phosphorous*) - fosforan dinukleotydu nikotynamidoadeninowego

**NO** (ang. *nitric oxide*) – tlenek azotu

**NOS** (ang. *nitric oxide synthase*) - syntaza tlenku azotu

**ONOO** (ang. *peroxynitrite*) – anion nadtlenoazotowy / nadtlenoazotyn

**ox-LDL** (ang. *oxidized low density lipoprotein*) - utlenione cząsteczki lipoprotein

**PAI-1** (ang. *plasminogen activator inhibitor*) - inhibitor aktywatora plazminogenu 1

**PGI<sub>2</sub>** (ang. *prostacyclin*) – prostacyklina

**PDECGF** (ang. *platelet-derived endothelial cell growth factor*) - czynnik stymulujący proliferację komórek śródbłonna

**PDGF** (ang. *platelet-derived growth factor*) - czynnik stymulujący proliferację fibroblastów i miocytów

**ROS** (ang. *reactive oxygen species*) - reaktywne formy tlenu

**SOD** (ang. *superoxide dismutase*) - dysmutaza ponadtlenkowa

**TAS** (ang. *total antioxidant status*) - całkowity status / potencjał antyoksydacyjny osocza

**TASC-II** (ang. *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease*)

**TG** – triacyloglicerol

**TGF-β** (ang. *tumor growth factor beta*) - czynnik wzrostowy beta

**TNF-α** (ang. *tumor necrosis factor alpha*) – czynnik martwicy nowotworu alfa

**t-PA** (ang. *tissue plasminogen activator*) – tkankowy aktywator plazminogenu

**WKR** – wskaźnik kostka – ramię

**WKR- P** - wskaźnik kostka – ramię, strona prawa

**WKR- L** - wskaźnik kostka – ramię, strona lewa

**VCAM-1** (ang. *vascular cell adhesion molecule-1*) - cząstka adhezyjna komórek naczyniowych 1

**VEGF** (ang. *vascular endothelial growth factor*) - czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego

## 1. Wstęp

### 1. 1. Chromanie przestankowe – definicja

Miażdżyca to choroba tętnic, polegająca na powstaniu w błonie wewnętrznej i środkowej wieloogniskowych zmian prowadzących do zmniejszenia elastyczności i zwężenia ich światła. W konsekwencji upośledzony zostaje przepływ krwi, co powoduje niedokrwienie w zaopatrywanych tkankach.

Czynnikami inicjującymi proces powstawania zmian miażdżycowych są zmodyfikowane oksydacyjnie lipoproteiny o małej gęstości (LDL) oraz uszkodzenie komórek śródbłonka naczyniowego [1,2]. Uszkodzenie śródbłonka wywołuje odpowiedź obronną o charakterze przewlekłego procesu zapalno-proliferacyjnego [3,4,5,6].

Długotrwały proces miażdżycowy może doprowadzić również do całkowitego zamknięcia światła tętnicy [7,8]. W zależności od umiejscowienia zmian miażdżycowych, może dojść m.in. do ostrych zespołów wieńcowych, zawału serca, udaru mózgu, tętniaka aorty, zamknięcia naczynia tętniczego kończyny dolnej lub zakrzepicy innych narządów [9, 10,11].

W przewlekłym miażdżycowym niedokrwieniu kończyn dolnych najwcześniejszym i najczęstszym objawem jest chromanie przestankowe (ChP).

Określenie „chromanie przestankowe” (*claudicatio intermittens*) odnosi się do bólu kończyny dolnej, o natężeniu zmuszającym chorego do zatrzymania się, wywoływanego wysiłkiem fizycznym i ustępującego w spoczynku, a spowodowanego zwężeniem lub niedrożnością tętnicy. Przyczyną objawów klinicznych jest podrażnienie receptorów bólowych produktami beztlenowej przemiany materii, do powstawania których dochodzi podczas pracy niedostatecznie ukrwionych mięśni. Ból ten jest w sposób powtarzalny wywoływany przez określony, taki sam wysiłek fizyczny i ustępuje w ciągu kilku minut odpoczynku [12].

Schorzenie nasila się z wiekiem i występuje częściej u mężczyzn (dotyczy 3-6% mężczyzn w wieku około 60 lat) niż u kobiet (stosunek mężczyzn do kobiet wynosi w różnych badaniach 3:1, 2:1) [13]. Pomimo, iż chromanie osłabia zdolność poruszania się i ogranicza w sposób istotny jakość życia, u wielu pacjentów ma ono raczej stabilny i łagodny przebieg. Tylko u około 5% chorych w ciągu 5 lat obserwacji konieczna jest przeszskórna bądź chirurgiczna rewaskularyzacja. Należy jednak pamiętać, iż chromanie przestankowe jest wyznacznikiem bezobjawowej lub objawowej miażdżycy tętnic. Nawet u 40-60% pacjentów dotkniętych chromaniem stwierdza się chorobę wieńcową, a u 26-50% pacjentów chorobę

naczyń mózgowych [13]. W rezultacie pacjenci z chromaniem przestankowym są przynajmniej trzykrotnie bardziej narażeni na występowanie zawału serca, udaru mózgu i śmierci spowodowanej procesami miażdżycowymi niż osoby w tym samym wieku bez występowania tego objawu [14,15].

Dlatego właściwymi celami diagnostyki i terapii chorych z chromaniem przestankowym powinno być zarówno zapobieganie miejscowemu postępowi choroby jak i prewencja zdarzeń sercowo-naczyniowych. Ważną kwestią jest także poprawa jakości życia w tej grupie chorych.

## 1.2. Ocena kliniczna

Nasilenie i rodzaj objawów klinicznych u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn jest zróżnicowany, ponieważ zależą one od umiejscowienia i rozległości zmian miażdżycowych oraz ogólnej sprawności pacjenta.

Biorąc pod uwagę anatomiczne rozmieszczenie zmian miażdżycowych w łożysku naczyniowym kończyn dolnych, wyróżnia się:

- zmiany umiejscowione w dystalnym odcinku aorty brzusznej i tętnic biodrowych (tzw. zespół Leriche'a – zespół objawów wynikających z niedrożności aortalno-dwuudowej, występujący np. w postaci chromania pośladkowego, zaburzeń potencji itp.),
- niedrożność udowo-podkolanową,
- postać obwodową miażdżycy (najczęściej występującą w cukrzycy),
- zmiany wielopoziomowe.

W warunkach klinicznych powszechnie stosowana jest klasyfikacja zaproponowana przez R. Fontanie'a [12,16]. Ukazuje ona etapy zaawansowania przewlekłego niedokrwienia kończyn. Jednym z elementów tej skali jest określenie dystansu przejścia bez bólu w jednakowych warunkach badania:

- I stopień – brak objawów lub nieznaczne objawy kliniczne w postaci mrowienia, drętwienia kończyny i zwiększonej wrażliwości na zimno,
- II stopień – IIa - ból przy wysiłku - chromanie przestankowe powyżej 200m,  
– IIb - ból przy wysiłku - chromanie przestankowe poniżej 200m,
- III stopień – IIIa – ból spoczynkowy - ciśnienie na wysokości kostek powyżej 50mmHg,  
– IIIb – ból spoczynkowy - ciśnienie na wysokości kostek poniżej 50mmHg,
- IV stopień – owrzodzenie, zgorzel, martwica.



Prawidłowo przeprowadzona diagnostyka różnicowa pozwala bardzo precyzyjnie odróżnić miażdżycową przyczynę bólu od innych patologii m.in. chromania żylnego, zakrzepicy żył głębokich i/lub powierzchniowych, przewlekłego zespołu usidlenia, choroby Buergera. Dokładny wywiad z pacjentem, badania przedmiotowe, obejmujące m.in. badanie palpacyjne tętna w miejscach typowych oraz określenie dystansu chromania, zazwyczaj umożliwiają rozpoznanie i umiejscowienie zmian w tętnicach oraz ich zaawansowanie.

Według wytycznych TASC-II (ang. *Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease*) [13] u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych wykonuje się także rutynowe badania pomocnicze w celu wykrycia usuwalnych czynników ryzyka miażdżycy oraz chorób towarzyszących. Należą do nich podstawowe badania hematologiczne i biochemiczne obejmujące:

- pełną morfologię krwi obwodowej,
- glikemię na czczo i/lub hemoglobinę glikowaną HbA1c,
- szczegółowy lipidogram,
- stężenie kreatyniny w osoczu,
- badanie ogólne moczu,
- badania dodatkowe w kierunku nadkrzepliwości i hiperhomocysteinemii.

Wstępne rozpoznanie kliniczne można potwierdzić również wykonując nieinwazyjne badania diagnostyczne, w tym pomiar ciśnień segmentarnych, pletyzmografię, a w wybranych przypadkach (np. planowanego leczenia inwazyjnego) badania obrazowe tj. dopplerowskie badanie techniką duplex, angiografię i angiografię rezonansu magnetycznego lub spiralną tomografię komputerową. Cennym i jednocześnie prostym badaniem jest pomiar ciśnienia w tętnicach na poziomie kostki i ramienia oraz wyznaczenie wskaźnika kostka-ramię (WKR). Wskaźnik ten stanowi iloraz ciśnienia skurczowego w okolicy kostki i okolicy ramienia po tej samej stronie. Wartości WKR poniżej 0,9 wskazują na obecność zmian miażdżycowych w układzie tętniczym kończyn dolnych [13].

### 1.3. Patogeneza blaszki miażdżycowej

Patogeneza miażdżycy jest niezwykle złożona i nie do końca wyjaśniona. Przyjmuje się, że tworzenie blaszki miażdżycowej jest wynikiem odpowiedzi naczynia krwionośnego na długotrwałe działanie czynników uszkadzających między innymi hipercholesterolemii, hiperhomocysteinemii, ciśnienia tętniczego, reaktywnych nadtlenków, toksyn, wirusów i innych [9,17,18].

Według aktualnie przyjętej teorii patogenezы miażdżycy, pierwszym etapem aterogenezy jest dysfunkcja komórek śródbłónka, która prowadzi do nadmiernej ekspresji cząstek adhezyjnych (np. VCAM-1, ICAM-1, ang. *vascular/intercellular adhesion molecule-1*) odpowiedzialnych za adhezję oraz akumulację monocytów i limfocytów T w błonie wewnętrznej naczynia. Ponadto w wyniku pobudzenia komórek śródbłónka wzrasta ich przepuszczalność, co może skutkować nadmiernym gromadzeniem się lipoprotein o niskiej gęstości - LDL (ang. *low density lipoproteins*) i lipoproteiny(a) w przestrzeni podśródbłónkowej, gdzie są wiązane z proteoglikanami macierzy. Pozostawanie w tym obszarze naraża lipoproteiny na oksydacyjną modyfikację pod wpływem działania różnych, biologicznie aktywnych czynników, wśród których szczególne znaczenie mają wolne rodniki tlenowe i enzymy proteolityczne [1,2,17]. Najbardziej niebezpieczne dla śródbłónka są minimalnie zmienione przez wolne rodniki cząstki LDL (mmLDL – ang. *minimally modified LDL*), które na zasadzie „konia trojańskiego” wprowadzają do komórki produkty oksydacji cholesterolu i nienasyconych kwasów tłuszczowych. Przekształcone z monocytów w błonie naczynia makrofagi mają zdolność usuwania na drodze fagocytozy wszelkich produktów apoptozy komórek, a także patologicznie zmienionych lipoprotein. Nadmiar przyswajanych przez makrofagi oksydowanych form LDL (oxLDL) powoduje utratę ich funkcji i przekształcenie do tzw. komórek piankowatych zawierających w cytoplazmie charakterystyczne złogi estrów cholesterolu [14]. Pobudzone przez czynniki wzrostu komórki mięśni gładkich tętnic produkują zwiększone ilości czynnika martwicy guza alfa (TNF- $\alpha$ ), interleukiny-1b (IL-1b) oraz kolagenu i elastyny [18].

Typowa blaszka miażdżycowa składa się zatem z zewnętrznej pokrywy zbudowanej z komórek miocytów przerośniętych włóknami kolagenu oraz z rdzenia, który stanowią komórki piankowate. W wyniku toczących się przewlekłych zmian zapalnych w obrębie blaszki oraz współistniejących czynników ryzyka, wśród których podkreślić należy zaburzenia gospodarki lipidowej, może dojść do jej destabilizacji i pęknięcia. Wykazano, że płytka miażdżycowa predysponowana do pęknięcia charakteryzuje się dużą zawartością komórek zapalnych, w tym makrofagów i limfocytów T [7,9]. Makrofagi stanowią źródło enzymów proteolitycznych należących do grupy metaloproteinaz (kolagenaza, żelatynaza i stromolizyna), które trawią tkankę włóknistą w pokrywie blaszki miażdżycowej. Natomiast limfocyty T w niestabilnych blaszkach miażdżycowych wydzielają interferon  $\gamma$ , który hamuje syntezę kolagenu w miocytach. Połączenie działania obu tych czynników prowadzi do scieńczenia zewnętrznej warstwy blaszki, a następnie do powstawania szczelin i pęknięć [11,18].

Pęknięcie blaszki miażdżycowej powoduje aktywację płytek, ich adhezję w obrębie miejsca uszkodzenia i uszczelnienie poprzez agregację oraz miejscowe tworzenie skrzepliny. Agregujące płytki mają zdolność sekrecji tromboksanu oraz czynników wzrostowych: czynnika stymulującego proliferację komórek śródbłonka (PDECGF) i czynnika stymulującego proliferację fibroblastów i miocytów (PDGF). Agregaty płytkowe i skrzepliny mogą doprowadzić do całkowitego zamknięcia światła tętnicy. W zaawansowanej miażdżycy czynnikiem wywołującym uszkodzenie blaszki miażdżycowej może być silny skurcz naczyń bądź wysokie ciśnienie krwi [7,11].

#### 1.4. Znaczenie śródbłonka naczyniowego w patogenezie miażdżycy

Jak zaznaczono, kluczową rolę w początkowej fazie aterogenezy przypisuje się najbardziej wewnętrznej warstwie błony wewnętrznej naczynia krwionośnego – śródbłonkowi (*endothelium*) [3,6,11,19].

Śródbłonek naczyniowy jest narządem parakrynnym i endokrynnym, odgrywającym istotną rolę w utrzymaniu homeostazy organizmu [20]. Pełni on wielorakie funkcje: reguluje miejscową cyrkulację krwi, wpływa na strukturę ściany naczynia oraz procesy krzepnięcia krwi poprzez wydzielanie wielu aktywnych biologicznie substancji. Wydzielając substancje rozkurczające naczynia, takie jak: śródbłonkowy czynnik polaryzujący (EDHF), bradykinina, prostacyklina, tlenek azotu (NO) oraz kurczące naczynia takie jak: endotelina, angiotensyna II i tromboksan A<sub>2</sub>, śródbłonek kontroluje napięcie i przepuszczalność ściany naczyń [21]. Sekrecja regulowana jest przez ciśnienie krwi, niedotlenienie, siły przepływu oraz obecność mediatorów modulujących wydzielanie wymienionych substancji aktywnych. Poprzez bezpośredni jak i pośredni wpływ na procesy zapalne oraz immunologiczne w obrębie ściany naczyniowej, proliferację miocytów ściany tętnic, procesy prozakrzepowe i fibrynolityczne, oksydację lipidów oraz adhezję monocytów i makrofagów, a także adhezję i agregację płytek krwi do swojej powierzchni, śródbłonek włączony jest w patogenezę miażdżycy i związane z miażdżycą powikłania sercowo-naczyniowe [17,22,23,24].

Zgodnie z definicją, miażdżycę charakteryzuje się m.in. upośledzeniem elastyczności tętnic. Uważa się, że obniżona zdolność chorobowo zmienionych naczyń do rozkurczu jest konsekwencją niedostatecznego uwalniania przez śródbłonek czynników rozszerzających naczynia, w tym tlenku azotu i prostacykliny. Tlenek azotu oprócz relaksacji mięśniówki gładkiej naczyń, ma także znaczący wpływ na hamowanie rozwoju miażdżycy praktycznie w każdym z jej etapów. Zapobiega on przebudowie ściany naczynia poprzez hamowanie proliferacji i migracji miocytów, agregacji płytek krwi oraz osłabienie ekspresji genów

cząstek adhezyjnych, takich jak VCAM-1 i MCP-1. Utrudnia przenikanie limfocytów, makrofagów i lipoprotein do śródbłonka, a także hamuje oksydacyjną modyfikację LDL [17,23].

Wiele danych wskazuje, że przyczyną niedoborów tlenu azotu w zmienionych chorobowo naczyniach jest jego degradacja przez aktywne formy tlenowe i/lub jego zmniejszona synteza przez śródbłonek naczyniowy. Postuluje się brak substratu L-argininy, niedobór kofaktorów, obniżoną ekspresję NOS, nadmiar endogennych inhibitorów NOS, w tym szczególnie ADMA [25,26,27]. Dlatego skutecznym sposobem przywrócenia prawidłowej funkcji wydzielniczej śródbłonka wydaje się być zwiększenie podaży lub zahamowanie degradacji czynników pobudzających syntezę tego wazodylatatora oraz obniżenie poziomów inhibitorów NOS [28,29].

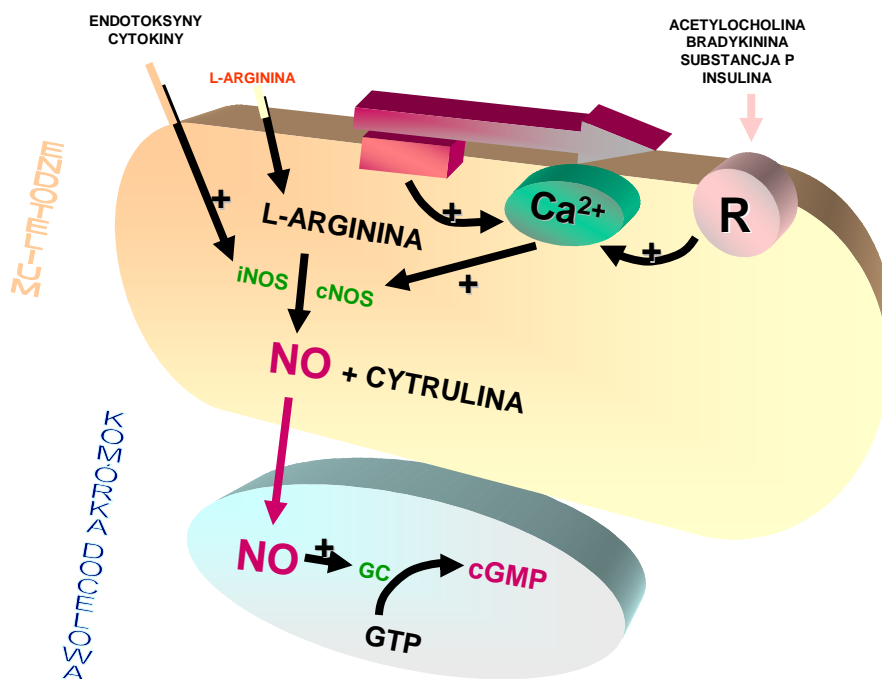
Uważa się, że u chorych z miażdżycą jednymi z najistotniejszych elementów powodujących obniżoną biodostępność NO obok zwiększonej produkcji  $O_2^-$  są markery dysfunkcji śródbłonka tj. asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) i homocysteina (Hcy) [24,25,27].

#### 1.4.1. Znaczenie tlenu azotu w dysfunkcji śródbłonka naczyniowego

Nie ulega wątpliwości, że tlenek azotu pełni niezwykle korzystną rolę w działaniu ochronnym na naczynia. Wiadomo, że dysfunkcja śródbłonka naczyniowego związana jest ściśle z niskim stężeniem lub całkowitym brakiem tego związku. Jego niedobory odnotowano w przebiegu wielu chorób, m.in. w hipercholesterolemii i innych zaburzeniach gospodarki lipidowej, miażdżycy, cukrzycy, nadciśnieniu tętniczym, astmie oskrzelowej, chorobach neurodegeneracyjnych [14,24,25,31,32,33,34,35,36,37].

Tlenek azotu jest wolnym rodnikiem zaliczanym do reaktywnych form azotu. Jest związkiem nietrwałym, bardzo reaktywnym, łatwo wytwarzającym wiązania kowalencyjne. Tlenek azotu jest unieczynniany przez anionorodnik ponadtlenkowy  $O_2^-$ , który natychmiast utlenia NO do nadtlenoazotynu [38,39,40].

Należy zaznaczyć, że tlenek azotu nie działa na drodze receptorowej lecz bezpośrednio penetruje do wnętrza komórek (Ryc 1).



Ryc 1. Mechanizm działania tlenu azotu na komórkę docelową.

Dzięki ciągłej syntezie w śródbłonku naczyń tlenek azotu zapewnia utrzymanie stałego napięcia ścian tętnic i tętniczek. W neuronach nieadrenergicznych i niecholinergicznym jest jednym z neurotransmiterów odgrywającym podstawową rolę w rozszerzaniu mięśniówki gładkiej [41,42]. Działa przeciwegregacyjnie i wykazuje synergizm z działaniem prostacyklin. Jest również produkowany przez makrofagi, fibroblasty i inne komórki jako „odpowiedź” na bodźce zapalne lub mitogenne. W tych przypadkach pełni funkcję obronną przed patogenami.

Bardzo istotną funkcją tlenu azotu jest udział w mechanizmach obronnych poprzez cytostaticzny wpływ na proliferację limfocytów T i hamowanie ekspresji limfocytów Th1 [43,44,45]. Ten toksyczny efekt wynika głównie z działania nadtlenu azotu, który jest produktem reakcji tlenu azotu z tlenem cząsteczkowym lub anionorodnikiem ponadtlenu azotu. Nadtlenu azot inaktywuje szereg enzymów m.in. nieodwracalnie hamuje transport mitochondrialny elektronów zmniejszając ilość ATP, utlenia lipidy, degraduje węglowodany i uszkodza struktury DNA.

Zaburzenia wytwarzania tlenu azotu w układzie sercowo-naczyniowym zdaniem wielu badaczy stanowią istotny czynnik patogenetyczny. Są także przyczyną zmian naczyniowych i narządowych w ostrym oraz przewlekłym niedotlenieniu i niedokrwieniu [46,47,48].

Alternatywnym sposobem poprawy czynności śródbłonka jest wzrost ilości biologicznie czynnego tlenu azotu. Jego syntezę można nasilić przez wzrost dostępności agonistów pobudzających uwalnianie tlenu azotu do komórek śródbłonka lub dostarczenie substratu bądź kofaktora enzymu. Jak zaznaczono, zasadniczym substratem dla śródbłonkowej izoformy syntazy tlenu azotu – eNOS jest aminokwas – L-arginina.

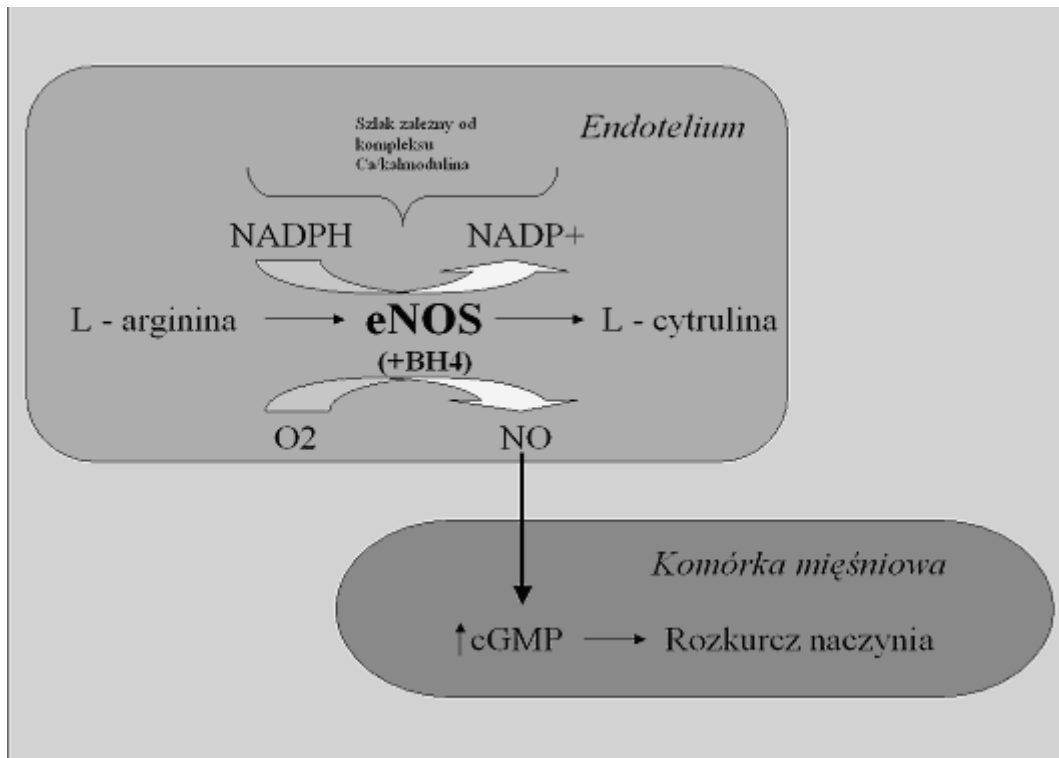
W badaniach *in vitro* stwierdzono, że podanie tetrahydrobiopteryny (BH<sub>4</sub>) i/lub L-argininy zwiększa dimeryzację enzymu syntazy, co indukuje powstawanie tlenu azotu i hamuje powstawanie jonów nadadtlenkowych [49].

Doniesienia naukowe potwierdzają również korzyści płynące ze stosowania przeciwutleniaczy w celu wyeliminowania niekorzystnej dezaktywacji tlenu azotu. Terapia antyoksydantami między innymi witaminą E oraz statynami wyraźnie poprawia stan czynnościowy śródbłonka zmniejszając generację reaktywnych form tlenowych [50,51].

Istnieją także coraz liczniejsze dane wskazujące na niekorzystny udział tlenu azotu np. w procesie kancerogenezy polegające na promowaniu rozwoju choroby poprzez inicjację kancerogenezy, stymulację przerzutów i angiogenezy, a także supresję mechanizmów obronnych [52,53,54].

#### 1.4.2. Znaczenie L-argininy w biosyntezie tlenu azotu

Jedynym endogennym substratem do syntezy tlenu azotu w organizmie człowieka jest L-arginina. Podczas przemiany w L-cytrulinę, L-arginina wraz z tlenem cząsteczkowym przy udziale enzymu syntazy tlenu azotu i licznych kofaktorów reakcji (zredukowany dinukleotyd nikotynamidoadeninowy (NADPH), tetrahydrobiopteryna (BH<sub>4</sub>), mononukleotyd flawinowy (FMN), tlen (O<sub>2</sub>) i protoporfiryna IX) indukuje wytwarzanie NO (Ryc.2).



Ryc. 2. Przemiana L-argininy w L-cytrulinę z wytworzeniem tlenu azotu.

Enzymy NOS istnieją w trzech izoformach:

- typ I NOS (NOS-1) lub neuronalna NOS (nNOS) występuje w neuronach ośrodkowych i obwodowych oraz niektórych tkankach nienerwowych,
- typ II NOS (NOS-2) lub indukowana NOS (iNOS); ekspresja tej formy następuje po pobudzeniu makrofagów przez produkty procesu zapalnego. Występuje w komórkach mięśni gładkich naczyń, serca, jelit,
- typ III NOS (NOS-3) lub śródbłonkowa (endotelialna) NOS (eNOS) była zidentyfikowana jako pierwszy enzym wytwarzający EDRF. Znajduje się w śródbłonku naczyń, w płytkach krwi, w sercu.

Syntazy: NOS-1 i NOS-3 określa się mianem konstytutywnych NOS (cNOS). Obie formy są stale obecnymi składnikami komórek. Formy konstytutywne wytwarzają w sposób pulsacyjny niewielkie ilości tlenu azotu, natomiast indukowalna NOS (iNOS) syntetyzuje duże ilości tlenu azotu w sposób ciągły aż do wyczerpania substratu [55,56,57].

Formy konstytutywne są zależne od kompleksu wapń-kalmodulina. Regulatorami ekspresji mRNA dla śródbłonkowej NOS są siły ścinania (shear stress), liczni fizjologiczni agoniści, np. estrogeny, bądź substancje farmakologicznie czynne takie jak statyny czy acetylocholina [59,60]. Mechanizm działania tlenu azotu związany jest ze stymulacją

cyklazy guanylowej, co zwiększa stężenie cGMP, który rozkurcza mięśniówkę gładką naczyń, hamuje adhezję i agregację płytek krwi oraz działa antyproliferacyjnie [57].

Forma indukowalna jest niezależna od jonów wapnia. Tlenek azotu syntetyzowany przez syntazę indukowalną także aktywuje cyklazę guanylową, ale jego obecność w wysokich stężeniach powoduje inaktywację enzymów zawierających metale grup przejściowych. Tlenek azotu powstaje w wyniku enzymatycznego utleniania przez tlen cząsteczkowy (O<sub>2</sub>) grupy iminowej reszty guanidynowej L-argininy co prowadzi do powstania L-cytruliny i tlenku azotu [57,58,61,62], (Ryc.2). W komórkach śródbłonna L-cytrulina reaguje z kwasem L-asparginowym, co prowadzi do resyntezy L-argininy, a proces ten jest hamowany przez kwas L-glutaminowy [63].

#### 1.4.3. Znaczenie asymetrycznej dimetyloargininy

ADMA uważana jest za główny endogeny inhibitor NOS (mniejsze znaczenie ma monometylo-L-arginina, czyli L-NMMA) [30]. ADMA jest tworzona po metylacji reszt argininowych uwalnianych z hydrolizowanych białek. Najprawdopodobniej ADMA jest tworzona w sposób ciągły w czasie normalnego obrotu białek, a jej akumulacji zapobiega metabolizm przez dimetylohydrolazę dimetylargininy (DDAH). Podwyższone poziomy glukozy, ox-LDL oraz homocysteiny związane są z obniżonymi poziomami DDAH. Ponadto część tradycyjnych czynników ryzyka może obniżać aktywność tego enzymu przez zwiększenie stresu oksydacyjnego [64,65,66,67]. Farmakologiczna inhibicja DDAH zwiększa stężenie ADMA i zmniejsza produkcję NO [68]. Zatem podwyższone poziomy ADMA w różnych jednostkach chorobowych, m. in. w hipercholesterolemii, nadciśnieniu i cukrzycy mogą być rezultatem zmian aktywności tego enzymu, a podanie egzogennej L-argininy, która odwraca kompetytywną inhibicję NOS może zapobiec negatywnym efektom działania asymetrycznej dimetyloargininy. Udowodniono, że egzogenna L-arginina konkuruje z endogenną ADMA o przyłączenie się do NOS, dlatego wzrost stężenia L-argininy może skutecznie przeciwdziałać hamowaniu syntazy tlenku azotu [30,61,69,70,71].

Coraz liczniejsze badania wskazują na korzystny wpływ podawania egzogennej L-argininy u osób z podwyższonymi poziomami ADMA, ale także na poprawę statusu klinicznego wybranych grup pacjentów z chorobami układu sercowo-naczyniowego, w których wykazano związek przyczynowy między podwyższeniem poziomu ADMA i wieloma czynnikami ryzyka takimi jak: hiperhomocysteinemia, hipercholesterolemia, insulinooporność i inne [25,26,72,73,74].



Wykazano, że poziomy ADMA w osoczu korelują z zaburzeniami gospodarki lipidowej (chorzy z hiperlipidemią mają znacząco podwyższone poziomy ADMA w porównaniu z osobami zdrowymi) oraz efektami działania farmakologicznego statyn [25,72,73]. W badaniach Bogera i wsp. stwierdzono, że simwastatyna nie poprawia zależnego od śródbłonna rozkurczu naczyń u osób z podwyższonym stężeniem ADMA, podczas gdy wywiera takie działanie u pacjentów z fizjologicznym stężeniem ADMA. Natomiast kombinacja simwastatyny z doustną L-argininą istotnie statystycznie poprawia zależny od śródbłonna rozkurcz naczyń zarówno u osób z niskim jak i wysokim stężeniem ADMA. Zdaniem badaczy można przypuszczać, że pośrednio NO-zależne mechanizmy mogą wywierać istotną rolę w terapeutycznych efektach działania statyn, a poziomy ADMA to ważny czynnik, który może na nie wpływać [75].

Obecnie ADMA uważana jest przez niektórych badaczy za marker ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego [76,77,78]. Coraz liczniejsze doniesienia o związkach pomiędzy ADMA, a chorobami układu sercowo-naczyniowego mogą pomóc w wyjaśnieniu, dlaczego część pacjentów nie obciążonych tradycyjnymi czynnikami ryzyka doświadcza epizodów sercowo-naczyniowych, podczas gdy inni, obciążeni choroby nigdy ich nie doświadczają.

#### 1.4.4. Znaczenie homocysteiny

Liczne badania kliniczne potwierdzają silny związek pomiędzy podwyższonym poziomem homocysteiny, a chorobami układu sercowo-naczyniowego [79,80,81, 82,83,84,85]. U osób z wysokimi stężeniami tego aminokwasu występuje prawie dwukrotnie wyższa umieralność z powodu chorób układu sercowo-naczyniowego [86].

Niekorzystny wpływ homocysteiny przede wszystkim na komórki śródbłonna naczyń krwionośnych ujawnia się, gdy jej poziom we krwi przez wiele lat przekracza 12-30  $\mu\text{mol/l}$  i gdy współlistnieją dodatkowe czynniki ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego. W niektórych przypadkach homocysteina samoistnie może wywoływać niekorzystne zmiany naczyniowe, mimo iż nie ma ugruntowanej pozycji niezależnego czynnika ryzyka. Wpływ homocysteiny na naczynia jest złożony i nie do końca wyjaśniony [87]. Większość obserwacji to badania *in vitro*, które nie zostały jak dotąd potwierdzone w warunkach *in vivo* [88,89]. Pomimo tego faktu uważa się obecnie, że najistotniejsze mechanizmy szkodliwego działania homocysteiny na naczynia krwionośne związane są z:

a) cytotoksycznym wpływem na komórki śródbłonna - homocysteina upośledza metylację białka p21ras, czego konsekwencją jest zmniejszenie syntezy DNA i hamowanie wzrostu

oraz odbudowy uszkodzonej ściany naczynia, co z kolei może nasilać powstawanie uszkodzeń miażdżycowych [88,90];

b) upośledzaniem rozszerzalności tętnic zależnej od śródbłonna - uszkodzenie śródbłonna wynika z przewlekłe podwyższonego poziomu homocysteiny skutkuje ograniczoną zdolnością do wytwarzania tlenku azotu (NO) [89]. NO może ograniczać szkodliwe działania Hcy poprzez tworzenie S-nitrozohomocysteiny (SNOHcy) - związku pozbawionego właściwości utleniających, o właściwościach wazodylatacyjnych i antyagregacyjnych [91]. Jednakże jest to mało efektywny mechanizm ochronny, ponieważ powstające przy udziale homocysteiny wolne rodniki inaktywują NO oraz obniżają poziom tetrahydrobiopteryny (kofaktora syntazy NO) [92].

Ponadto homocysteina obniża syntezę NO używając prekursorów tetrahydrobiopteryny (tetrahydrofoliany - THF) we własnym metabolizmie oraz stymuluje powstawanie asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) [90,91,92]. Krótkotrwałe oddziaływanie homocysteiny stymuluje wydzielanie NO, natomiast długotrwałe, ogranicza jego biodostępność w ścianie naczyń, co może przyczyniać się do powstawania powikłań w układzie sercowo-naczyniowym [88,89,93,94];

c) generowaniem stresu oksydacyjnego oraz zdolności do peroksydacji lipidów - w badaniach *in vivo* dowiedziono, że homocysteina indukuje stres oksydacyjny, w którym istotną rolę odgrywa nadtlenek wodoru ( $H_2O_2$ ) [88]. Powstaje on obok m.in. rodnika hydroksylowego i anionu ponadtlenkowego podczas autooksydacji grup tiolowych homocysteiny. Nadtlenek wodoru w obecności jonów metali przejściowych tworzy bardzo reaktywne rodniki hydroksylowe zdolne do zapoczątkowania peroksydacji lipidów.

Wolnorodnikowe działanie homocysteiny przejawia się również nasileniem toksyczności reaktywnych form tlenu, poprzez zmniejszenie aktywności peroksydazy glutationowej (PG), która ma zdolność redukcji nadtlenków lipidów oraz nadtlenku wodoru [89,95].

Homocysteina inicjuje także proces utleniania frakcji lipoprotein o małej gęstości (LDL), co zwiększa ich aterogenność [87,89,95,97].

d) działaniem prozakrzepowym – podwyższony poziom homocysteiny powoduje potwierdzone w badaniach *in vivo* zmniejszenie zdolności wiązania antytrombiny III na powierzchni śródbłonna, nasiloną aktywację, adhezję i agregację płytek krwi oraz tworzenie zakrzepów w miejscach uszkodzenia śródbłonna, jak również zmniejszenie zdolności wiązania tkankowego aktywatora plazminogenu z komórkami śródbłonna oraz nasilenie ekspresji genu inhibitora 1 tkankowego aktywatora plazminogenu (PAI-1) [88,89,96].

Pierwszym badaczem, który zwrócił uwagę na możliwy związek pomiędzy podwyższonym stężeniem homocysteiny we krwi a miażdżycą był Kilmer McCully [98]. W 1969 r., u dwojga dzieci zmarłych w wyniku powikłań homocystynurii – zespołu zaburzeń metabolicznych objawiających się wysokim stężeniem homocysteiny we krwi (pomiędzy 300 a 500  $\mu\text{mol/l}$ ) i w moczu, stwierdził rozległą zakrzepicę i zmiany miażdżycowe tętnic. Na tej podstawie sformułował hipotezę, że skoro wysokie stężenie homocysteiny może doprowadzić do śmierci w wieku młodzieńczym z powodu powikłań miażdżycowych, to jej umiarkowanie podwyższone stężenia mogą wywoływać odpowiednio mniej nasilone zmiany, dające istotne objawy kliniczne po wielu latach (najczęściej około czterdziestego roku życia) [98,99].

Szereg badań klinicznych potwierdziło hipotezę McCully'ego. Obecnie wiemy, iż nie tylko ciężka hiperhomocysteinemia, ale także jej umiarkowana postać związana jest z podwyższonym ryzykiem miażdżycy tętnic, w tym miażdżycowego niedokrwienia kończyn dolnych [79,80,81,82,83,84,85,100,101,102].

#### 1.5. Farmakoterapia miażdżycowego niedokrwienia kończyn dolnych.

Chorzy z chromaniem przestankowym obarczeni są stosunkowo niewielkim ryzykiem utraty kończyny. Z tego powodu wiodącą formą leczenia jest terapia zachowawcza, w tym nakierowana przede wszystkim na zmniejszenie ryzyka wystąpienia groźnych powikłań układu sercowo-naczyniowego, będących pochodną zmian miażdżycowych w naczyniach wieńcowych i mózgowych. Dlatego głównymi celami leczenia chromania przestankowego są:

- 1) działania doraźne, których celem jest poprawa jakości życia poprzez złagodzenie bólu kończyn dolnych podczas chodzenia, a tym samym wydłużenie dystansu przejścia bezbólowego i maksymalnego,
- 2) działania bezterminowe, których celem jest zmniejszenie ryzyka powikłań układu sercowo-naczyniowego, w tym zawału mięśnia sercowego oraz niedokrwiennego udaru mózgu.

Wymienione cele osiągnąć można poprzez modyfikację czynników ryzyka miażdżycy, do których należą:

- tzw. tradycyjne czynniki ryzyka [12]:
  - nadciśnienie tętnicze;
  - zwiększone stężenie cholesterolu LDL w surowicy;
  - otyłość z hiperinsulinemią i zaburzoną tolerancją glukozy;
  - palenie papierosów;
  - brak aktywności fizycznej.
- tzw. nowe czynniki ryzyka [13]:

- przerost lewej komory serca;
- hiperhomocysteinemia;
- hipertriglicydemia i inne zaburzenia lipidowe;
- zwiększona aktywność białka C-reaktywnego;
- nadmiar lipoproteiny (a) w surowicy;
- hiperfibrynogenemia.

Modyfikacja przede wszystkim tzw. tradycyjnych czynników ryzyka miażdżycy jest stałym elementem terapii każdej postaci klinicznej miażdżycy tętnic kończyn dolnych.

Bardzo istotnym elementem w leczeniu chromania przestankowego jest także regularny trening marszowy, który powoduje wydłużenie dystansu przejścia bezbólowego i rozwój krążenia obocznego [103,104]. Jak dotąd nie dysponujemy jednak farmakoterapią, której stosowanie w sposób znaczący wydłużałoby dystans przejścia bezbólowego u chorych. Dotychczasowe próby kliniczne z różnymi lekami pozwoliły na wyróżnienie 3 podstawowych grup leków (zgodnie z wytycznymi TASC II – *TransAtlantic Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease*) [13]:

1) leki o udowodnionym, choć niewielkim korzystnym wpływie na chromanie:

- pentoksyfilina;
- naftydrofuryl;
- buflomedil;
- cilostazol.

2) leki o co najwyżej minimalnym korzystnym wpływie na chromanie przestankowe:

- leki przeciwplatekcyjne;
- leki rozszerzające naczynia;
- ketanseryna;
- werapamil;
- hemodylucja izowolemiczna;
- aminofilina;
- witamina E;
- defibrotyd;

3) leki o potencjalnie korzystnym wpływie na chromanie przestankowe, ale niewystarczająco przebadane:

- karnityna;
- prostaglandyny;
- naczyniowy czynnik wzrostu śródbłonna;

- L-arginina.

Najszerzej stosowanym obecnie lekiem w leczeniu chromania przestankowego jest pentoksyfilina, która między innymi poprawia właściwości reologiczne krwi, zmniejsza zdolność erytrocytów do adhezji i agregacji, a także zmniejsza zdolność do tworzenia zakrzepów. Istnieją jednakże doniesienia naukowe, które podważają skuteczność tego leku w wydłużaniu dystansu przechodzenia bez bólu. Badanie opublikowane przez Dawsona i wsp. to największa randomizowana i prospektywna próba kliniczna [105]. Nie wykazała ona istotnych statystycznie różnic w dystansie chromania przestankowego u chorych przyjmujących pentoksyfilinę, w porównaniu z pacjentami przyjmującymi placebo. Natomiast odnotowano istotne statystycznie wydłużenie dystansu przejścia bezbólowego u chorych przyjmujących cilostazol w porównaniu z wymienionymi grupami.

Cilostazol jest inhibitorem fosfodiesterazy III, który blokując degradację cAMP, powoduje zmniejszoną agregację płytek krwi i rozkurcz naczyń krwionośnych [106,107]. W kilku badaniach wykazano istotny wpływ cilostazolu na wydłużenie dystansu przejścia bezbólowego (od 32 do 73% w porównaniu z grupą otrzymującą placebo) w miażdżycowym niedokrwieniu kończyn dolnych [108,109,110]. Mimo dość dobrze poznanych mechanizmów działania cilostazolu nadal brak jest dużych, randomizowanych badań, które jednoznacznie potwierdziłyby wpływ leku na poprawę kliniczną.

Innymi lekami o udowodnionym, jednakże niewielkim korzystnym wpływie na chromanie przestankowe są naftydrofuryl i buflomedil. Naftydrofuryl jest antagonistą receptora serotoninowego i wpływa na poprawę metabolizmu tlenowego w niedokrwionych tkankach [111]. Buflomedil wykazuje działanie  $\alpha_1$  i  $\alpha_2$  adrenolityczne, zmniejsza skurcz naczyń. Wpływa na płytki krwi, odkształcalność erytrocytów oraz ma słabe właściwości antagonistów wapnia [13].

Liczne próby kliniczne potwierdziły korzystne działanie w łagodzeniu objawów chromania zarówno naftydrofurylu [112], jak i buflomedilu [113].

Kolejne leki o minimalnym korzystnym wpływie na chromanie przestankowe, do których należą między innymi leki przeciwplatekcyjne [114], leki rozszerzające naczynia [115], ketanseryna [116], werapamil [117] i witamina E [118], wymagają dalszych badań. Poszukuje się substancji leczniczych o znacznie lepszym profilu skuteczności i bezpieczeństwa u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych. W tym celu zwraca się uwagę szczególnie na substancje, których obniżona synteza przyspiesza progresję zmian miażdżycowych. Należą do nich np. prostaglandyny oraz leki z grupy antagonistów płytkowych o właściwościach wazodylatacyjnych. Potwierdzone badaniami korzystne

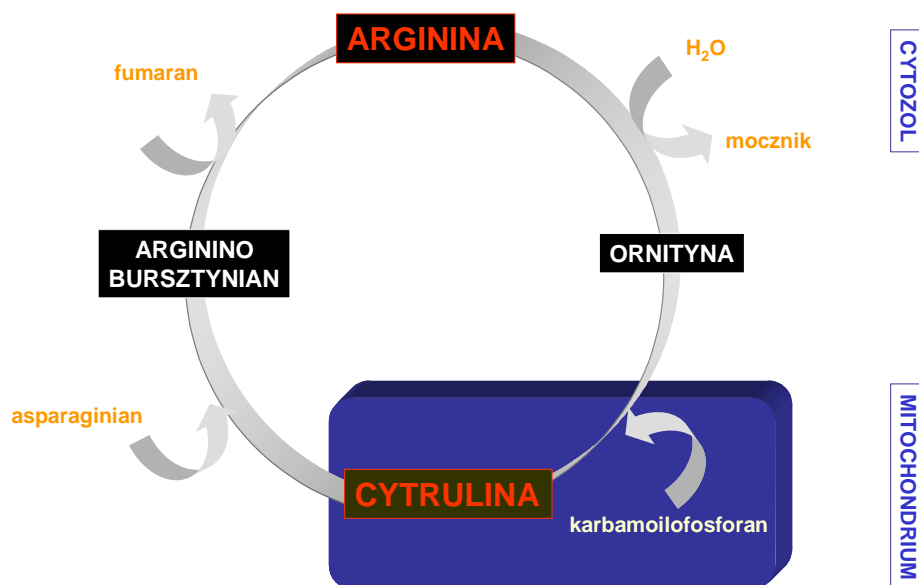
działanie prostaglandyny I2 i E2 w leczeniu krytycznego niedokrwienia kończyn dolnych przyniosło także obiecujące wyniki w terapii chromania przestankowego [119,120]. W innych badaniach zaobserwowano, iż podawanie metabolitów stymulujących metabolizm niedokrwionego mięśnia sercowego, do których należy między innymi propionilo-L-karnityna, powoduje wydłużenie odcinka przejścia bezbólowego [121]. Kolejną grupę substancji o potencjalnie korzystnym wpływie na śródbłonek u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych stanowią mitogeny, m.in. śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) oraz czynniki wzrostowe fibroblastów (b-FGF, FGF-2). Mechanizm ich działania opiera się na stymulacji proliferacji komórek naczyń krążenia obocznego, co może korzystnie wpływać na perfuzję niedokrwionych tkanek. Jednakże niejednoznaczne wyniki badań i poważne działania niepożądane podczas prób ich stosowania jak dotąd nie pozwoliły na ich wprowadzenie do terapii [122].

Brak skutecznego leku, który przy zachowaniu korzystnego profilu bezpieczeństwa w sposób istotny wydłużałby dystans przejścia bezbólowego u chorych z przewlekłym niedokrwieniem kończyn dolnych, zmusza do ciągłego poszukiwania nowych substancji leczniczych. Obiecującą substancją wymienianą w dokumencie TASC i TASC II jako potencjalnie korzystną w miażdżycowym niedokrwieniu kończyn dolnych ale niewystarczająco przebadaną jest L-arginina. Poważnym argumentem przemawiającym za jej stosowaniem jest fakt, iż jest to naturalny substrat do produkcji silnego wazodylatatora - tlenku azotu.

#### 1.6. L-arginina jako lek – historia i obecny stan wiedzy

L-arginina to aminokwas cieszący się od lat dużym zainteresowaniem naukowców, ze względu na wiele funkcji jakie pełni w organizmie oraz na potencjalne możliwości zastosowania w wielu jednostkach chorobowych i zespołach klinicznych.

Początki zainteresowania tym aminokwasem sięgają 1886 r., kiedy to został on po raz pierwszy wyodrębniony z kiełków łubinu [123]. Jednak kluczowe dla „popularności” L-argininy w świecie naukowym stało się odkrycie w 1904 r. arginazy – enzymu wątrobowego, który hydrolizuje argininę do ornityny i mocznika. Dało to podwaliny do odkrycia przez Krebsa i Henseleita w 1932 r. cyklu ornitynowego zwanego też cyklem mocznikowym [124].



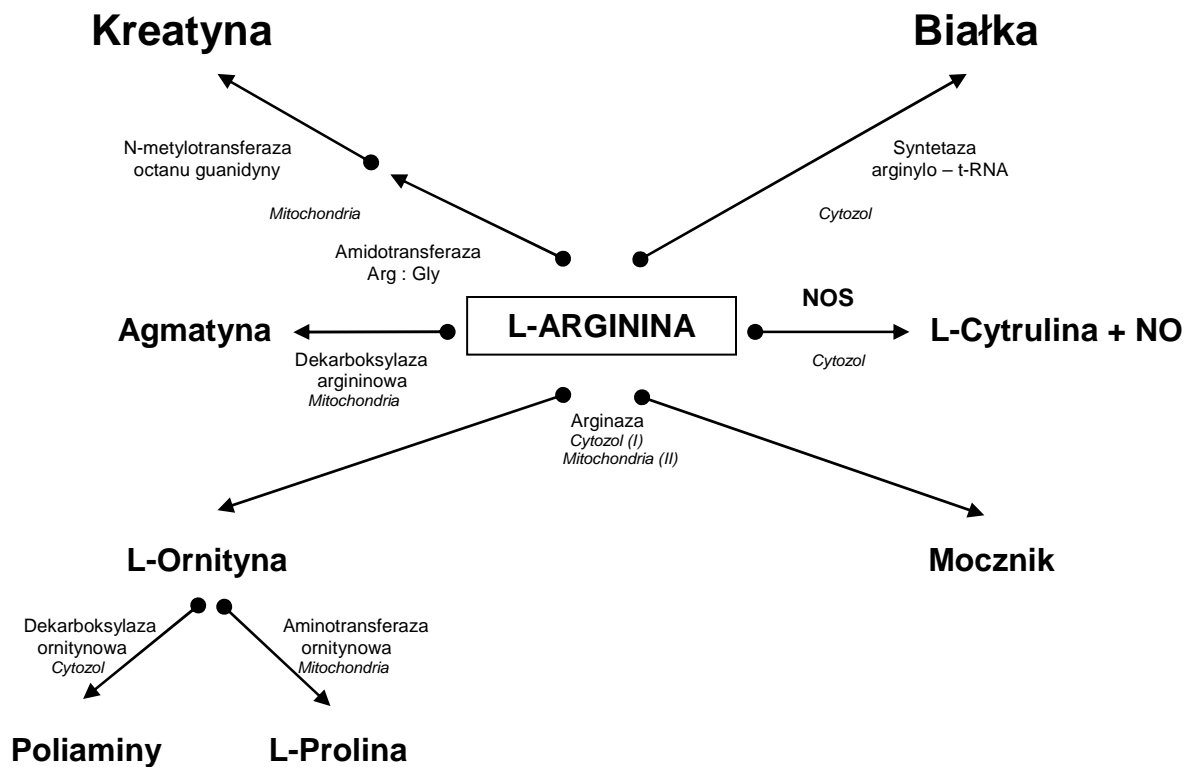
Ryc. 3. Cykl mocznikowy.

Kolejnym ważnym krokiem było odkrycie i opisanie przez Furchgott'a i Zawadzkiego w 1980r., mechanizmu uwalniania i czynności śródbłonkowego czynnika rozkurczającego naczyń EDRF (ang. Endothelial Derived Relaxing Factor) [125,126]. Czynniki te, nazywany początkowo endogennym nitratem, dzięki swej zdolności do aktywacji cykazy guanylowej (cGMP) w ścianie naczyń, warunkował rozkurcz naczyń [127]. W 1987r. EDRF został zidentyfikowany przez Moncadę i wsp. jako tlenek azotu (NO) uwalniany u ssaków bezpośrednio w procesie oksydacji L-argininy [62,128].

L-arginina jest aminokwasem, częściowo niezbędnym w pożywieniu. Zawiera w budowie chemicznej cząsteczki cztery atomy azotu, co czyni ją największym nośnikiem tego pierwiastka w organizmie człowieka. Jest syntetyzowana de novo z glutaminy, soli kwasu glutaminowego i proliny, jednakże jej endogenna biosynteza nie jest w pełni wystarczająca. Metabolizm L-argininy (Ryc. 4) jest złożony. Oprócz uwalniania tlenu azotu aminokwas ten podlega cyklom przemian do:

- kreatyny, przez amidotransferazę arginina/glicyna, zlokalizowaną w mitochondriach,
- białek, przy udziale syntetazy arginylo- t-RNA,
- mocznika i ornityny, przez arginazę, zlokalizowaną w cytozolu i mitochondriach.

Ornityna jest prekursorem syntezy poliamin, katalizowanej przez dekarboksylazę ornitynową. Przemiana do agmatyny przez dekarboksylazę argininową, zlokalizowaną w mitochondriach prowadzi do efektu hipotensyjnego o mechanizmie działania podobnym do klonidyny, gdyż agmatyna reaguje z tymi samymi receptorami ( $\alpha_2$ -adrenoreceptorami i receptorami imidazolowymi) w ośrodkowym układzie nerwowym [129,130,131,132]. Niewykluczone, że agmatyna dzięki obniżeniu napięcia układu współczulnego jest metabolitem mogącym odgrywać ważną rolę w działaniu wazodylatacyjnym L-argininy. Uważa się, że działanie hipotensyjne L-argininy jest wynikiem wpływu agmatyny na rdzeniowy ośrodek regulacji krążenia.



Ryc. 4. Przemiany metaboliczne L-argininy w komórkach ssaków [48].

Jak wcześniej zaznaczono, poznanie metabolizmu argininy w cyklu mocznikowym oraz syntezie kreatyny umożliwiło zastosowanie jej w zaburzeniach czynności wątroby związanych z nieprawidłowym przebiegiem cyklu mocznikowego, w zatruciach amoniakiem, stanach astenicznych, niedożywieniu, a także jako aminokwasu zwiększającego odporność mięśni na zmęczenie w trakcie długotrwałego wysiłku [133]. Dożylny preparat chlorowodorku L-argininy znalazł zastosowanie jako preparat zakwaszający w skrajnych zasadowicach metabolicznych [134].



Chlorowodorek L-argininy może być również podawany we wlewie dożylnym w celu podwyższenia zapasu hormonu wzrostu u chorych z jego niedoborem, a także w diagnostyce wykrywania niedoboru hormonu wzrostu w różnych schorzeniach, między innymi w uogólnionym niedoborze hormonów przysadki, karłowatości przysadkowej, gruczolaku barwnikoopornym, pochirurgicznym czaszkogardlaku, wycięciu lub urazie przysadki [134,135,136,137].

Odkrycie szlaku metabolicznego arginina - NO ujawniło także cały szereg nowych możliwości zastosowania L-argininy w farmakoterapii. Wiadomo, że w przypadku wielu chorób występują istotne niedobory tlenu azotu. Stąd też poszukuje się możliwości zastosowania takiego leku, który powodowałby wzrost ilości tlenu azotu w miejscach występowania jego niedoboru. Na podstawie obserwacji klinicznych i wyników badań naukowych wykazano, że istnieje możliwość substytucji endogenego NO przez podanie substancji egzogennej, które go uwalniają (donory NO, np. nitrogliceryna). Substratem dla NO jest także egzogeny aminokwas L-arginina, pobudzający jego wydzielanie przez aktywację syntazy (eNOS). W warunkach fizjologicznych eNOS jest wysycona L-argininą, ponieważ  $K_m$  tego enzymu dla L-argininy wynosi  $2,9 \mu\text{mol/l}$ , a stężenie L-argininy w komórkach śródbłonna waha się w granicach  $1-2 \text{ mmol/l}$  [138]. Ograniczony wpływ L-argininy na enzym powoduje, że zwiększenie jej podaży nie wywołuje żadnych zmian produkcji NO [139,140,141].

Jednakże liczne badania naukowe wykazują, że w niektórych sytuacjach podawanie L-argininy powoduje wzrost produkcji NO i wazodylatację naczyń zależną od śródbłonna. Występująca „sprzeczność” określana jest „paradoksem” L-argininy. Aktualnie istnieje kilka hipotez próbujących wyjaśnić to zjawisko [139,140].

Wykazano, że białko nośnikowe CAT-1, odpowiedzialne za transport L-argininy, występuje bardzo często na powierzchni błony łącznie z eNOS. Razem tworzą kompleks odpowiedzialny za dostarczanie substratu w postaci L-argininy dla eNOS. Taki mechanizm bezpośredniego kierowania pozakomórkowej L-argininy do syntezy NO optymalizuje jego wytwarzanie w komórkach śródbłonna. Jest to również przykład mechanizmu, w którym substrat reguluje aktywność związanego z jego przemianą enzymu [140,142,143].

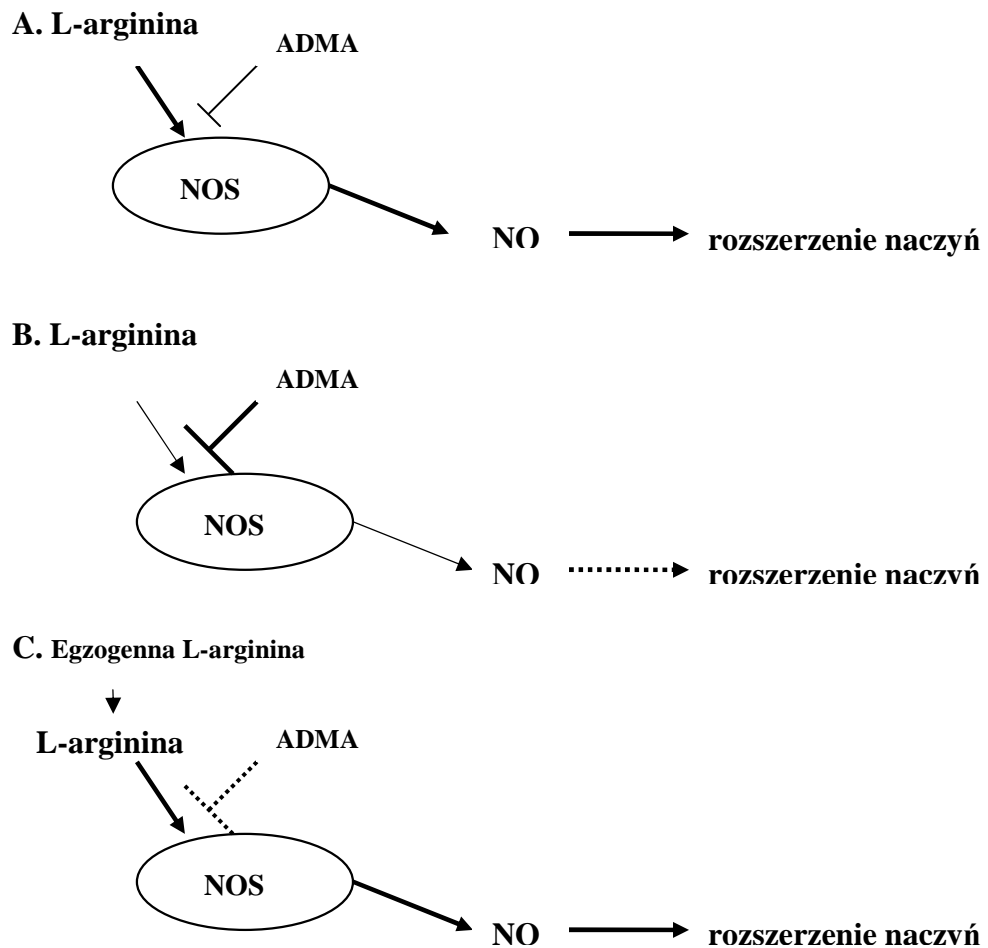
Kolejną próbą wyjaśnienia paradoksu argininy jest uznanie roli ADMA w tym zjawisku [144]. Jest ona kompetycyjnym inhibitorem aktywności NOS. Jak wspomniano wcześniej, kluczową rolę w metabolizmie ADMA odgrywa dimetyloaminohydrolaza dimetyloargininy (DDAH), której zmiany aktywności wydają się odpowiadać za podwyższone poziomy ADMA. ADMA konkurując z L-argininą o wiązanie z eNOS

kompetycyjnie hamuje jego aktywność. Pozwala to przypuszczać, iż działanie L-argininy może być korzystniejsze u pacjentów z podwyższonymi poziomami ADMA, natomiast u chorych z niskimi poziomami tego związku, podanie L-argininy może wywierać jedynie ograniczony wpływ na mechanizmy zależne od NO (Ryc.5).

A. W badaniach wykazano, że fizjologiczne poziomy L-argininy pozwalają na całkowite wysycenie enzymu NOS i jego pełną aktywność w obecności fizjologicznie niskiego poziomu ADMA.

B. W przypadku podwyższonego poziomu ADMA następuje inhibicja enzymu skutkująca upośledzonym wydzielaniem NO.

C. W takim przypadku dostarczenie nawet niewielkich ilości L-argininy może skutkować przywróceniem wytwarzania NO do pierwotnego poziomu.



Ryc. 5. Paradoks L-argininy [145].

Innym wyjaśnieniem paradoksu L-argininy jest przypuszczenie, że istnieją nie odkryte jak dotąd inhibitory NOS, zmniejszające transport L-argininy do/lub między komórkami śródbłonna, bądź też upośledzające otrzymywanie L-argininy z L-cytruliny.

Liczne doniesienia naukowe wskazują na skuteczność i bezpieczeństwo stosowania L-argininy zwłaszcza w chorobach przebiegających z dysfunkcją śródbłonna naczyniowego. Dotychczasowe obserwacje kliniczne wykazały, że L-arginina jest skuteczna w leczeniu i w prewencji chorób układu sercowo-naczyniowego [25,146,147], w leczeniu zaburzeń erekcji [148], chorób nerek [149] i może być pomocna w przyspieszeniu gojenia ran [150]. Wykazano także jej efekty immunomodulacyjne [35,151,152].

Nadal poszukuje się nowych potencjalnych kierunków zastosowania klinicznego tego aminokwasu. Obecne badania koncentrują się na próbach jej zastosowania w nadciśnieniu tętniczym samoistnym, nadciśnieniu płucnym, stabilnej chorobie niedokrwiennej serca, niewydolności serca, miażdżycy tętnic kończyn dolnych, fenomenie Raynauda, hipercholesterolemii, jaskrze, przewlekłej niewydolności nerek, prewencji restenozy po pomostowaniu naczyń wieńcowych oraz prewencji udarów mózgu [141,153,154].

W ostatnich latach pojawiły się także prace wskazujące na konieczność intensyfikacji badań dotyczących działania L-argininy, ze względu na niepożądane skutki jej długotrwałego stosowania. W badaniu klinicznym VINTAGE MI (*The Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction*) u chorych po zawale mięśnia sercowego nie stwierdzono korzystnego wpływu podawania L-argininy w dawce 3x3g/dobę przez 6 miesięcy na sztywność naczyń, a nawet podejrzewano związek pomiędzy podawaniem tego aminokwasu, a kilkoma zgonami w grupie badanej [155]. Należy także brać pod uwagę nieliczne doniesienia o możliwym wpływie tego aminokwasu na angiogenezę w przebiegu chorób nowotworowych, a także na udział L-argininy w wytworzeniu insulinooporności oraz możliwy mechanizm tolerancji tego leku. Z wymienionych powodów należy zawsze rozważyć celowość długotrwałego stosowania L-argininy u ludzi oraz przeprowadzić dalsze badania nad efektami takiej terapii [156, 157,158,159].

### 1.7. Farmakokinetyka L-argininy

Fizjologiczne stężenia L-argininy we krwi wahają się między 95-250  $\mu\text{mol/L}$  [160] i różnią się w zależności od wieku, płci i stanu odżywienia. W badaniach Möller'a i wsp. określono średnie poziomy L-argininy u osób młodych i w wieku podeszłym. Wynosiły one odpowiednio: u młodych mężczyzn  $81,6 \pm 7,3 \mu\text{mol/L}$  i kobiet  $72,4 \pm 6,7 \mu\text{mol/L}$ , a u starszych mężczyzn  $113,7 \pm 19,8 \mu\text{mol/L}$  i kobiet  $88,0 \pm 7,8 \mu\text{mol/L}$  [161,162]. Źródłem L-

argininy w organizmie jest pokarm, wewnątrzkomórkowa degradacja białek oraz jej endogenna synteza.

Główna synteza endogennej L-argininy z L-cytruliny odbywa się w kanalikach proksymalnych nerek. Jest ona pośrednim produktem cyklu mocznikowego Krebsa-Henseleita. Prekursorami syntezy L-argininy są L-ornityna i L-cytrulina. L-arginina jest przekształcana do mocznika i L-ornityny przy pomocy arginazy. Część L-argininy, która nie jest przekształcana do mocznika osiąga układ krążenia, ulega dystrybucji do różnych tkanek i narządów organizmu i jest metabolizowana. Niewielkie ilości L-argininy są tworzone w wątrobie, z czego większość jest natychmiast metabolizowana i nie osiąga układu krążenia [163].

### 1.7.1 Wchłanianie

Źródłem L-argininy w pokarmie są białka zwierzęce i roślinne. Szczególnie bogate w argininę są białka roślinne. Dorosły człowiek spożywa z dietą prawie 5,4 g argininy na dobę [164]. Arginina dostarczona z pokarmem jest uwalniana z białek w procesie trawienia i wchłaniana w jelicie cienkim. Głównym miejscem jej absorpcji jest jelito kręte i czcze. Ze światła jelita cienkiego jest wchłaniana do enterocytów przy pomocy transportu aktywnego. Duża aktywność arginazy w jelicie cienkim powoduje, iż około 40% argininy pochodzącej z pokarmu jest tutaj degradowane, a pozostała część trafia do żyły wrotnej.

Stężenie maksymalne we krwi osiąga po około 2 godzinach od podania doustnego. W różnych badaniach dostępność biologiczna argininy oscyluje między 21 +/- 4% (od 5 do 50%) i 68 +/- 9% (od 51 do 87%) [165,166,167,168]. Pomimo iż powody tych rozbieżności nie są dokładnie poznane, niewątpliwie znaczna frakcja dawki doustnej jest metabolizowana przedukładowo (m.in. przez arginazę) lub wydalana przez jelito, a pozostała trafia do enterocytów przy pomocy transportu aktywnego. 5-15% argininy w osoczu krwi dorosłego człowieka stanowi arginina zsyntetyzowana endogennie z cytruliny.

Biologiczny okres półtrwania ( $T_{0,5}$ ) L-argininy wynosi 1,5–2 h po doustnym podaniu 6g tego aminokwasu [166]. Przy zastosowaniu wyższych dawek dożylnych  $T_{0,5}$  jest krótszy, co może być spowodowane przez tzw. zjawisko „przelewania” się nadmiaru L-argininy do moczu, w sytuacji gdy zostaną osiągnięte jej skrajnie wysokie stężenia w osoczu [168].

Po wlewie dożylnym maksymalne stężenie L-argininy występuje średnio po 20-30 minutach i według różnych badań wynosi odpowiednio: 0,8 mM po wlewie 6g L-argininy, 4,8 mM po wlewie 14g oraz 6,2 mM, 6,5 mM i 8,0 mM po wlewie 30g L-argininy [25,166,168]. Po podaniu doustnym 6g L-argininy maksymalne stężenie w osoczu wynosi

0,31 mM, a  $T_{max}$  90 minut [166], natomiast po podaniu 10g L-argininy maksymalne stężenie 0,29 mM osiągane jest w czasie  $T_{max}$  wynoszącym 60 minut [168]. Dane te sugerują nieproporcjonalnie mały wzrost stężenia L-argininy w osoczu po podaniu dużych dawek, co wskazuje na jej znaczne wydalanie nerkowe po przekroczeniu nerkowego progu reabsorpcji [168].

### 1.7.2. Dystrybucja

We wnętrzu enterocytów znaczna część tj. około 60% argininy zostaje zmetabolizowana, natomiast pozostała część (ok. 40%) przechodzi do krążenia wrotnego i jest transportowana do wątroby. Również w wątrobie część argininy jest metabolizowana, natomiast pozostała niezmetabolizowana część osiąga krążenie ogólne i jest transportowana do różnych tkanek i narządów organizmu. L-arginina ulega dystrybucji do wszystkich tkanek organizmu człowieka.

### 1.7.3 Eliminacja

Poprzez hydrolizę grupy guanidynowej arginazy L-arginina jest metabolizowana w wątrobie do kreatyny, mocznika, L-cytruliny, L-ornityny, L-proliny, L-glutaminy i poliamin np. putrescyny [169,170].

Z L-argininy w reakcji dekarboksylacji katalizowanej przez dekarboksylazę argininową (ADC) powstaje  $CO_2$  i agmatyna [4-(aminobutyl)-guanina] [169,170,171,172].

Ornityna bierze udział w wielu szlakach metabolicznych i anabolicznych -włącznie z cyklem kwasu cytrynowego oraz poprzez fosfoenolopirogronian może być włączona w proces syntezy glukozy [173].

W warunkach fizjologicznych wydalanie nerkowe nie pełni istotnej roli w eliminacji L-argininy. Aminokwas ten jest filtrowany w kłębuszkach nerkowych (>99%) i ulega prawie całkowitej reabsorpcji w części proksymalnej kanalików nerkowych oraz w części wstępującej ramienia pętli Henlego [169,173,174,175].

1.8. L-arginina w zaburzeniach gospodarki lipidowej i miażdżycowym niedokrwieniu kończyn dolnych

Tab. 1. L-arginina w zaburzeniach gospodarki lipidowej - przegląd badań klinicznych.

Badanie	Wyniki
<i>Drexler H. Lancet 199; 338: 1546-1550 [146]</i>	<b>przywrócenie prawidłowego metabolizmu cholesterolu u pacjentów z hipercholesterolemią</b>
<i>Chowienzyk PJ. et al. Lancet 1994; 344: 305-306 [176]</i>	<b>wazodylatacja tętnic ramiennych u mężczyzn z hipercholesterolemią</b>
<i>Tsao PS. et al. Circulation 1994; 89: 2176-2182 [177]</i>	<b>hamowanie adhezji monocytów do śródbłonka naczyń u pacjentów z hipercholesterolemią</b>
<i>Clarkson P. et al. J Clin Itig 1996; 97: 1989-1994 [178]</i> <i>Thorne S. et al. J Am Convesll Cardiol 1998; 32: 110-116 [179]</i>	<b>poprawa zależnej od śródbłonka wazodylatacji tętnic przedramiennych u chorych z hipercholesterolemią</b>
<i>Chęciński P., Micker M. i wsp. Acta Angologica 2002; 8(4): 137-142 [180]</i>	<b>wzrost dystansu przejścia bezbólowego i stężenia TAS oraz NO u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem tętnic kończyn dolnych</b>
<i>Kawano H. et al. Atherosclerosis 2002; 161: 375-380 [181]</i>	<b>poprawa funkcji śródbłonka oraz obniżenie stężeń markerów stresu oksydacyjnego u chorych z hipercholesterolemią</b>
<i>West SG. et al. J Nutr 2005; 135: 212-217 [182]</i>	<b>obniżenie poziomu homocysteiny w osoczu u chorych z hipercholesterolemią</b>

Coraz większa ilość gromadzonych danych przemawia za ważną rolą L-argininy, jedyne go endogenne go substratu do syntezy NO w organizmie ludzkim. Mechanizm jej działania jest wielokierunkowy. Działa jako bezpośredni substrat dla enzymu syntazy tlenu azotu, a także pośrednio wykazuje działanie antyoksydacyjne [183,184]. Jak wynika z dotychczasowych badań L-arginina w niedokrwionych tkankach ma protekcyjny wpływ na

endotelialną syntazę tlenku azotu (eNOS), wpływa także hamująco na uwalnianie rodnika ponadtlenkowego zwiększając ogólną ilość dostępnych przeciwutleniaczy [185]. Działanie antyoksydacyjne L-argininy szczególnie widoczne jest u chorych z hiperlipidemią [184,186]. Do tej pory nie poznano w pełni mechanizmów tego zjawiska. Przypuszcza się natomiast, że egzogenne podanie tego aminokwasu hamuje efekt działania endogennego inhibitora NOS – asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), której podwyższone stężenie obserwuje się u pacjentów z hiperlipidemią [346,75,186,187].

Korzystny wpływ suplementacji L-argininą odnotowano w badaniu przeprowadzonym u chorych miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych w Klinice Chirurgii Ogólnej i Naczyń Uniwersytetu Medycznego im.K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Eksperyment ten wykazał istotny statystycznie wzrost dystansu przejścia bezbólowego i maksymalnego u chorych z chromaniem przestankowym po 28 dniach doustnej suplementacji L-argininą w dawce 12g/dobę. Odnotowano także istotny statystycznie wzrost stężenia tlenku azotu, całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza oraz wzrost aktywności enzymów stresu oksydacyjnego tj. dysmutazy ponadtlenkowej i katalazy. Zdaniem autorów L-arginina wywoływała wyżej wymienione korzystne działania nie tylko poprzez dostarczenie substratu dla e-NOS, zwiększając w ten sposób syntezę NO, ale także poprzez pośrednie działanie antyoksydacyjne, wyrażające się zmniejszeniem uwalniania anionu nadtlenkowego ze śródbłonna [188].

Korzystne działanie L-argininy wykazano także u chorych z hipercholesterolemią. Dowiedziono, że L-arginina przywraca prawidłowy metabolizm cholesterolu [146], poprawia funkcję śródbłonna oraz obniża stężenie markerów stresy oksydacyjnego [181], wpływa na obniżenie poziomu homocysteiny [182] oraz hamuje adhezję monocytów do śródbłonna [177].

Obiecujące wyniki licznych badań, w których L-arginina była podawana chorym z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych [183,185,188,189] oraz pacjentom z zaburzeniami gospodarki lipidowej [178,184,187,188] uzasadniają cel prezentowanej pracy.

## 2. Cel pracy

Celem pracy była ocena skuteczności i bezpieczeństwa dwumiesięcznej doustnej suplementacji L-argininą u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych w zależności od rodzaju zaburzeń gospodarki lipidowej.

Dla realizacji tego celu przeprowadzono:

1. Analizę wpływu 60-dniowej suplementacji L-argininą na parametry gospodarki lipidowej u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych.
2. Ocenę wpływu tak stosowanej L-argininy na stężenie w osoczu:
  - tlenku azotu (NO),
  - homocysteiny (HC),
  - asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA),
  - całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza (TAS),
  - insuliny.
3. Oszacowanie wpływu 60-dniowej suplementacji L-argininą na stan kliniczny chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych na podstawie wskaźnika kostka-ramię (WKR) i dystansu przejścia bezbólowego.
4. Ocenę bezpieczeństwa dwumiesięcznej suplementacji poprzez analizę występowania działań niepożądanych w czasie badania.

Hipotezy badawcze:

1. Dwumiesięczna, doustna suplementacja L-argininą u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych wpływa korzystnie na parametry gospodarki lipidowej chorych (TC, HDL-C, LDL-C oraz TG).
2. Istnieje zależność pomiędzy parametrami gospodarki lipidowej a:
  - poprawą kliniczną,
  - stężeniem tlenku azotu (NO),
  - całkowitym potencjałem antyoksydacyjnym osocza (TAS),
  - stężeniem insuliny,
  - czynnikami ryzyka chorób układu sercowo-naczyniowego takimi jak asymetryczna dimetyloarginina (ADMA) i homocysteina (HC).
3. Doustna suplementacja L-argininą nie wywiera poważnych działań niepożądanych.



### 3. Materiał i metodyka

#### 3.1. Charakterystyka grup

Badanie wykonano w latach 2008-2010 u chorych będących pod opieką Poradni Kliniki Chirurgii Ogólnej i Naczyń Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu.

Do randomizowanego badania włączono 100 pacjentów (62 mężczyzn i 38 kobiet) powyżej 50-tego r. ż. z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych w II stopniu w skali Fontaine'a.

Chorych podzielono losowo na dwie grupy:

Grupa I. Chorzy przyjmujący L-argininę w dawce 6g/dobę (GB).

Grupa II. Chorzy przyjmujący placebo (grupa kontrolna GK).

W obu grupach wyodrębniono chorych z:

- a) hipertriacylglicerolemią,
- b) hipercholesterolemią,
- c) hiperlipidemią mieszaną.

Przyjęto następujące kryteria włączenia do badania:

1. Miażdżycowe niedokrwienie kończyn dolnych w II stopniu w skali Fontaine'a - kwalifikacja na podstawie danych klinicznych.
2. Wiek powyżej 50 lat.
3. Wskaźnik kostka - ramię w granicach 0,5 do 0,9.
4. Przyjmowanie simwastatyny w dawce 20mg/dobę.
5. Wyrażenie pisemnej świadomej zgody na udział w badaniu.

Ustalono następujące kryteria wyłączenia z badania:

- uszkodzenie wątroby (znacznie przekroczony poziom transaminaz : aminotransferaza alaninowa AlAT > 50 IU/l, aminotransferaza asparaginianowa AspAT > 47 IU/l);
- niewydolność nerek (poziom kreatyniny w osoczu > 400 µg/ml);
- świeży zawał mięśnia sercowego;
- choroba tarczycy;

- choroba nowotworowa czynna bądź w wywiadzie;
- udar mózgu przebyty w ciągu ostatnich 6 miesięcy;
- cukrzyca;
- przyjmowanie leków będących donorami tlenu azotu;
- czynna choroba wrzodowa żołądka i/lub dwunastnicy;
- przyjmowanie witamin antyoksydacyjnych, kwasu foliowego i witamin z grupy B w dawkach leczniczych;
- choroba psychiczna;
- wywiad w kierunku uzależnienia od alkoholu i/lub leków;
- istotne nieprawidłowości w badaniach laboratoryjnych;
- palenie tytoniu.

Obecność któregokolwiek z powyższych kryteriów powodowała wyłączenie pacjenta z badania. Po uzyskaniu wyczerpujących informacji wszyscy uczestnicy badania wyrazili pisemną zgodę na udział w badaniu. Szczegóły badania klinicznego zostały opisane przed jego rozpoczęciem w protokole badania, który został przedstawiony i zaaprobowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (Nr 290/06).

Badanie miało charakter podwójnej ślepej próby.

W toku badania wykluczonych zostało z niego 13 uczestników, z następujących przyczyn:

- niewystarczająca współpraca ze strony pacjenta (niesystematyczne przyjmowanie preparatu, zatajenie istotnych informacji, np. o paleniu tytoniu, niedotrzymywanie terminów wizyt) - 9 osób
  - zdiagnozowanie któregoś ze schorzeń będących kryterium wyłączenia z badania – 4 osoby.
- Pacjenci ci nie zostali ujęci w analizach statystycznych. Ostatecznie badanie ukończyło 87 osób - 50 mężczyzn (57,47%) i 37 kobiet (42,53%).

Tab. 2. Podział pacjentów na podgrupy.

	Liczba chorych przyjmujących L-argininę	Liczba chorych przyjmujących placebo
Hipercholesterolemia	16	14
Hipertriacyloglicerolemia	13	11
Hiperlipidemia mieszana	17	16

Charakterystykę kliniczną badanej grupy przedstawiono w tabeli 3.

Tab. 3. Wyjściowe wyniki badań laboratoryjnych pacjentów, którzy ukończyli badanie.

Zmienna	GB n= 46	GK n= 41	Poziom istotności
Wiek (lata)	58,74 ± 7,46	60,19 ± 9,05	NS
Płeć n[M/K]	46 [26/20]	41 [24/17]	NS
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,32 ± 1,13	24,41 ± 1,49	NS
Hb (mmol/l)	9,19 ± 0,67	9,02 ± 0,78	NS
Kreatynina (μmol/l)	79,34 ± 13,16	81,07 ± 12,76	NS
Mocznik (mmol/l)	4,79 ± 1,22	4,68 ± 1,31	NS
Alat (U/l)	27,17 ± 11,30	29,41 ± 9,85	NS
Aspat (U/l)	24,56 ± 9,13	25,81 ± 8,20	NS
CRP (mg/l)	3,85 ± 1,81	4,10 ± 1,47	NS
Na <sup>+</sup> (mmol/l)	141,35 ± 3,32	140,81 ± 2,95	NS
K <sup>+</sup> (mmol/l)	4,17 ± 0,39	4,23 ± 0,48	NS
Glukoza (mmol/l)	5,38 ± 0,59	5,41 ± 0,57	NS
Insulina (uIU/ml)	24,57 ± 4,12	23,89 ± 5,15	NS

W zakresie parametrów, w tym wieku oraz BMI (Body Mass Index) badane grupy nie różniły się istotnie statystycznie między sobą. W obu grupach dominowali mężczyźni (GB 26 mężczyzn, GK 20 mężczyzn) ale różnice te nie były istotne statystycznie.

Wszyscy chorzy objęci badaniem posiadali mieszczące się w normach parametry morfologii krwi obwodowej, gospodarki elektrolitowej, glukozy na czczo oraz wartości ciśnienia tętniczego krwi, poziomy CRP, kreatyniny i mocznika.

### 3.2. Wykonane badania.

W obu grupach przeprowadzono następujące badania w 0, 30 i 60 dniu suplementacji:

A.Badanie podmiotowe.

B.Badanie przedmiotowe:

- wskaźnik kostka-ramię,
- badanie dystansu chromania na bieżni ruchomej.

C.Badania biochemiczne krwi:

- szczegółowy lipidogram,
- stężenie tlenku azotu (NO),
- stężenie asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA),

- całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAS),
- stężenie homocysteiny,
- morfologia, stężenie glukozy, insuliny,
- stężenia mocznika i kreatyniny.

### 3.3. Metodyka badania

Krew do badań pobierano każdorazowo na czczo z żyły łokciowej w ilości 10 ml. Pobraną ilość krwi rozdzielano po 2 ml do probówek z K<sub>2</sub>EDTA (do oznaczeń ADMA i Hcy) lub heparyną (do oznaczeń NO i TAS).

W celu zminimalizowania wzrostu stężenia homocysteiny spowodowanego jej wytwarzaniem w krwinkach czerwonych oraz w celu zminimalizowania strat nietrwałego tlenu azotu, po pobraniu wszystkie próbki umieszczano w lodzie, gdzie były przechowywane przed odwirowaniem. Następnie krew wirowano (RCF=1000 x g) z chłodzeniem przez 10 min, a próbki przechowywano do momentu oznaczania NO, TAS, insuliny oraz ADMA w temp. -70°C, a homocysteiny w temp. -20°C.

#### 3.3.1. Dystans przejścia do wystąpienia pierwszego bólu (DPB) i wskaźnik kostka-ramię (WKR)

Dystans chromania przestankowego mierzono na poziomej bieżni ruchomej Cambridge 9800 o przesuwie taśmy 3,5 km/h i kącie nachylenia 12'.

Wskaźnik kostka-ramię określono mierząc każdorazowo ciśnienie skurczowe w tętnicy ramiennej, a następnie w tętnicach stopy (mankiet sfigomanometru zakładano w pobliżu kostek) po tej samej stronie. Wartość wskaźnika obliczano z ilorazu ciśnienia z obwodu kończyny dolnej i ciśnienia na ramieniu.

#### 3.3.2. Tlenek azotu (NO)

Tlenek azotu oznaczono w surowicy krwi zestawami testowymi firmy Oxis, przy użyciu mikroczytnika firmy Hyperion. Test ten opiera się na pośredniej metodzie ilościowego oznaczania azotynów w materiale biologicznym.

W roztworach wodnych tlenek azotu utleniany jest do azotanów i azotynów. Po enzymatycznej redukcji azotanów do azotynów reduktazą azotanową i zredukowana forma β-dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego dodaje się odczynnik Griessa. W reakcji Griessa z azotynów powstaje NO, który reaguje z kwasem sulfanilowym, a powstały pośredni produkt w reakcji z N-(1-naftyl)etylenodwuaminianem daje różowy produkt z maksimum

absorpcji  $\lambda=540$  nm. Spektrofotometrycznie mierzona zmiana ekstynkcji roztworu jest proporcjonalna do stężenia tlenu azotu. Wartości stężeń badanych prób odczytywano z krzywej wzorcowej absorpcji (540 nm) względem stężenia [ $\mu\text{M}$ ].

Badanie stężenia NO wykonano w Zakładzie Fizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

### 3.3.3. Całkowity potencjał antyoksydacyjny (TAS)

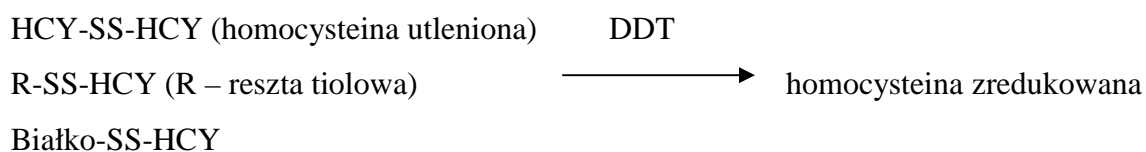
TAS w surowicy krwi oznaczono stosując test NX 2332 firmy Randox. Zasada testu polega na inkubacji ABTS (siarczanu 2,2'-azyno-di-[3-etylobenzotiazoliny]) z metmioglobina i  $\text{H}_2\text{O}_2$  z wytworzeniem kationorodnika  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . Rodnik ten posiada stałą, niebiesko-zieloną barwę przy długości fali 600 nm. Antyoksydanty obecne w próbce zmniejszają nasilenie tej barwy w stopniu proporcjonalnym do ich stężenia. Test zawierał bufor fosforanowy (5 mmol/l pH 7,4), metmioglobinę (6,1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (610  $\mu\text{M}$ ) oraz  $\text{H}_2\text{O}_2$  (250  $\mu\text{M}$ ). Aktywność przeciwutleniająca określa stopień redukcji kationorodnika  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , wyznaczony na podstawie poziomu spadku absorbancji przy długości fali 600 nm w czasie 3 minut. Odczytywano absorbancję początkową, a następnie dokładnie po 3 minutach absorbancję każdej próbki spektrofotometrem Specord M-40 firmy Carl-Zeiss Jena.

Badanie stężenia TAS wykonano w Zakładzie Fizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

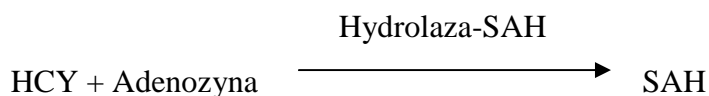
### 3.3.4. Homocysteina (Hcy)

Stężenie L-homocysteiny w osoczu oznaczano za pomocą metody immunochemicznej z pomiarem natężenia fluorescencji w świetle spolaryzowanym (*Fluorescence Polarization Immunoassay* – FPIA), przy użyciu analizatora IMx, stosując komercyjne zestawy firmy ABBOTT.

Obecne w próbce osocza: homocysteina (forma utleniona), formy mieszane dwusiarczku homocysteiny oraz homocysteina związana z białkami, ulegają pod wpływem dwutiotreitolu (DTT) redukcji do postaci wolnej homocysteiny (HCY).



Następnie, całkowita ilość wolnej homocysteiny przekształcana jest do S-adenozylu-L-homocysteiny (SAH) pod wpływem hydrolazy SAH i nadmiaru adenozyliny.



SAH oraz znakowana fluoresceiną S-adenozylu-L-cysteina konkurują o miejsca wiązania na cząsteczkach przeciwciał monoklonalnych. Natężenie spolaryzowanej fluorescencji jest mierzone przez układ optyczny FPIA. Stężenia homocysteiny w badanych próbkach są wyznaczone przy użyciu krzywej kalibracyjnej.

Badanie stężenia homocysteiny wykonano w Zakładzie Farmakologii Klinicznej Katedry Kardiologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

### 3.3.5. Analiza chromatograficzna asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA)

Analiza wykonana została na wysokosprawnym chromatografie cieczowym (HPLC) firmy Waters z pompą Waters 600 Controller, autosamplerem Waters 717plus oraz detektorami: typu diode-array Waters PDA 996 oraz fluorescencyjnym Waters 474 Scanning Fluorescence Detektor. Do oznaczeń użyto następujących odczynników:

- asymetryczna N<sup>G</sup>, N<sup>G'</sup>-dimetylo arginina (ADMA) - Sigma Chemicals (Steinheim, Niemcy),
- dialdehyd *ortho*-ftalowy (OPA) - Sigma Chemicals (Steinheim, Niemcy),
- kwas 3-merkaptopropionowy - Sigma Chemicals (Steinheim, Niemcy),
- etanol, metanol,
- acetonitryl czystości do analiz HPLC – Merck (Darmstadt, Niemcy),
- K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> oraz KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> - Merck (Darmstadt, Niemcy),
- Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>4</sub> - Merck (Darmstadt, Niemcy),
- HCl – POCh, Gliwice.

Przygotowanie próbek do analizy chromatograficznej:

25 μl osocza (EDTA) mieszano z 25 μl lodowatego etanolu, następnie przechowano w lodzie przez 10 minut, po tym czasie próbkę odwirowano (10 000g) przez kolejne 10 minut. Otrzymany supernatant zmieszano powtórnie z 25 μl lodowatego etanolu i procedurę powtórzono. Do 10 μl supernatantu dodano 70 μl buforu boranowego (pH 9,5) oraz 20 μl odczynnika derywatyzującego OPA; na kolumnę chromatograficzną podawano 20 μl tak przygotowanej próbki.

Oznaczanie asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA) metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Analizę chromatograficzną przeprowadzono według procedury opublikowanej przez Zhanga i Kaye [190].

Do rozdzielania chromatograficznego użyto kolumny Nova-Pak C18 (3,9 x 150 mm; 4  $\mu$ m) wraz z prekolumną typu  $\mu$ BondaPak C18 (10 $\mu$ m). Faza ruchoma zawierała: A – 20 mM bufor fosforowy o pH = 6,0 oraz B – mieszaninę acetonitrylu, metanolu i wody w stosunku objętościowym 4/3/3. Szybkość przepływu fazy ruchomej przez kolumnę ustalono na 0,8 ml/min. Warunki rozdzielania chromatograficznego zamieszczono w Tabeli 4.

Tab. 4. Warunki rozdzielania chromatograficznego.

Czas [min]	A [%]	B [%]
0-8	86	14
8-16	84	16
16-18	51	49
18-25	45	55
25-30	86	14

Oznaczenie ilościowe przeprowadzono metodą krzywej wzorcowej.

Roztwór podstawowy wzorca ADMA przygotowano w 0,01M HCl. Zakres stężeń dla ADMA wynosił 0,0 - 1,5  $\mu$ M.

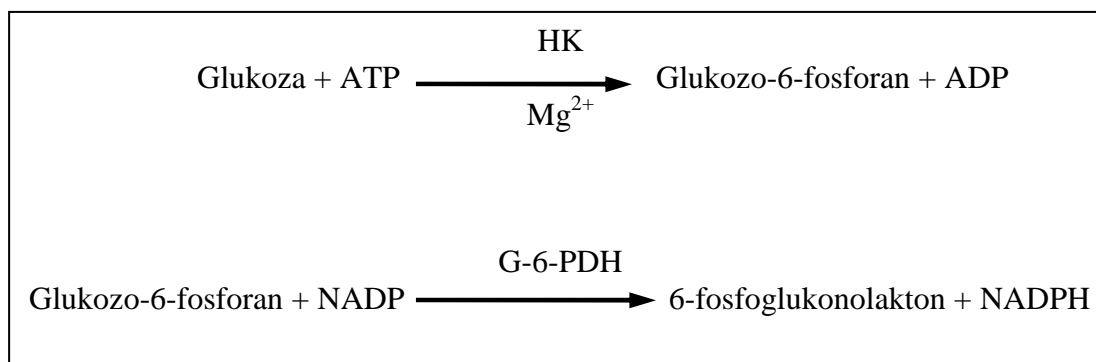
Chromatogramy rejestrowano przy użyciu detektora fluorescencyjnego przy długości fali wzbudzenia 350 nm i emisji 455 nm.

Badania HPLC wykonano w Katedrze Analizy Instrumentalnej Wydziału Towaroznawstwa Akademii Ekonomicznej w Poznaniu.

### 3.3.6. Glukoza

Poziom glukozy oznaczono testem Dimension<sup>®</sup> GLU firmy Dade Behring Inc. Stanowi ona adaptację metody opartej na zastosowaniu heksokinazy i dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej.

Heksokinaza (HK) katalizuje reakcję fosforylacji glukozy z udziałem ATP do glukozy-6-fosforanu, który następnie w reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę glukozy-6-fosforanową (G-6-PDH) zostaje utleniony do 6-fosfoglukonolaktonu, przy jednoczesnej redukcji NADP. Na każdy mol obecnej początkowo glukozy, przypada jeden mol NADP zredukowanego do 1 mola NADPH. Zależna od stężenia NADPH absorbancja roztworu jest określana bichromatyczną (340 i 383 nm) techniką pomiaru punktu końcowego.



Badanie stężenia glukozy wykonano w Zakładzie Fizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

### 3.3.7. Insulina

Stężenie insuliny w surowicy oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) w oparciu o test podwójnego wiązania (Sandwich ELISA) przy użyciu zestawu DRG Insulin ELISA Kit (nr kat. EIA-2935) firmy DRG Instruments GmbH (USA). Jest to metoda oparta na technice kanapkowej. Studzienki mikropłytki opłaszczane są monoklonalnym przeciwciałem przeciwko specyficznemu miejscu na cząsteczce insuliny. Surowica pacjenta zawierająca endogenną insulinę jest inkubowana w opłaszczonych studzienkach z konjugatem przeciwciała – enzymem. Konjugat ten stanowi mysie przeciwciało przeciwko insulinie związane z biotyną. Po inkubacji niezwiązany konjugat jest wypłukiwany. Następnie do konjugatu przyłącza się kompleks enzymatyczny, w którego skład wchodzi streptawidyna i peroksydaza chrzanowa. Ilość związanego kompleksu enzymatycznego jest proporcjonalna do stężenia insuliny w próbce.



Po dodaniu substratu do reakcji enzymatycznej (TMB) pojawia się zabarwienie, którego intensywność jest proporcjonalna do stężenia insuliny w próbce.

Wartości referencyjne wynosiły: 2-25  $\mu\text{IU/ml}$ . Czułość oznaczeń = 1,76  $\mu\text{IU/ml}$ .

Badanie stężenia insuliny wykonano w Zakładzie Fizjologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

### 3.3.8. Badania laboratoryjne

Badania laboratoryjne wykonano w Centralnym Laboratorium Szpitala Klinicznego Przemienienia Pańskiego Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu.

Morfologię oznaczano na analizatorze ABZ Penta 120.

Badania biochemiczne wykonano przy użyciu analizatora Konelab 30i.

### 3.4. Analiza statystyczna

Statystyczną analizę wyników przeprowadzono przy zastosowaniu programu komputerowego CSS STATISTICA v.7.0 Firmy StatSoft.

Średnie arytmetyczne i odchylenia standardowe obliczono modulem statystyki opisowej. Zgodność rozkładu zmiennych z teoretycznym rozkładem normalnym oceniano za pomocą testu Shapiro-Wilka. Ocenę istotności statystycznej różnic wartości średnich przeprowadzono przy pomocy Testu t dla prób niezależnych z oddzielną oceną wariancji dla rozkładu normalnego i przy pomocy Testu Manna-Whitneya dla rozkładu nienormalnego.

Poziom zależności liniowej pomiędzy porównywanymi zmiennymi oceniano na podstawie współczynnika korelacji rang Spearmana. Wszystkie hipotezy weryfikowano na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## **4. WYNIKI**

### **4.1. Informacje ogólne**

W celu jasnego przedstawienia uzyskanych wyników poszczególne podgrupy chorych oznaczono następującymi skrótami:

- a) GB - chorzy otrzymujący L-argininę n=46 (grupa badana)
  - GBTg - chorzy z hipertriacyloglicerolemią otrzymujący L-argininę n=13
  - GBCh - chorzy z hipercholesterolemią otrzymujący L-argininę n=16
  - GBLm - chorzy z hiperlipidemią mieszaną otrzymujący L-argininę n=17
  
- b) GK - chorzy otrzymujący placebo n=41 (grupa kontrolna)
  - GKTg - chorzy z hipertriacyloglicerolemią otrzymujący placebo n=11
  - GKCh - chorzy z hipercholesterolemią otrzymujący placebo n=14
  - GKLM - chorzy z hiperlipidemią mieszaną otrzymujący placebo n=16

### **4.2. Parametry gospodarki lipidowej**

Różnice w parametrach gospodarki lipidowej stały się podstawą zakwalifikowania chorych do odpowiednich podgrup w badaniu, tj. chorych z hipertriacyloglicerolemią, hipercholesterolemią bądź hiperlipidemią mieszaną. W wyróżnionych podgrupach nie odnotowano znamienych statystycznie różnic w badanych parametrach gospodarki lipidowej w 0, 30 i 60 dniu badania (tabele 5 – 9).

Tab. 5. Średnie wartości parametrów gospodarki lipidowej w grupie chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Parametry gospodarki lipidowej	GB n= 46	GK n= 41	Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
Ch 0 [mmol/L]	6,13 ± 0,94 [4,65÷8,21]	6,12 ± 0,90 [4,65÷8,06]	NS
LDL 0 [mmol/L]	3,53 ± 0,62 [2,20÷5,03]	3,47 ± 0,63 [2,38÷5,32]	NS
HDL 0 [mmol/L]	1,15 ± 0,29 [0,59÷1,68]	1,17 ± 0,25 [0,64÷1,76]	NS
Tg 0 [mmol/L]	2,12 ± 0,64 [0,74÷3,80]	2,14 ± 0,67 [1,19÷3,80]	NS
<b>Dzień 30</b>			
Ch 30 [mmol/L]	6,09 ± 0,90 [4,61÷8,00]	6,10 ± 0,88 [4,68÷8,10]	NS
LDL 30 [mmol/L]	3,46 ± 0,54 [2,19÷4,79]	3,44 ± 0,58 [2,35÷5,12]	NS
HDL 30 [mmol/L]	1,15 ± 0,27 [0,63÷1,71]	1,15 ± 0,24 [0,67÷1,71]	NS
Tg 30 [mmol/L]	2,11 ± 0,63 [0,77÷3,78]	2,15 ± 0,67 [1,20÷3,94]	NS
<b>Dzień 60</b>			
Ch 60 [mmol/L]	6,11 ± 0,91 [4,59÷8,03]	6,11 ± 0,91 [4,71÷8,06]	NS
LDL 60 [mmol/L]	3,46 ± 0,55 [2,20÷4,83]	3,46 ± 0,64 [2,36÷5,32]	NS
HDL 60 [mmol/L]	1,16 ± 0,26 [0,72÷1,68]	1,15 ± 0,25 [0,64÷1,76]	NS
Tg 60 [mmol/L]	2,08 ± 0,64 [0,75÷3,80]	1,17 ± 3,99 [1,19÷3,80]	NS

Tab. 6. Średnie stężenia cholesterolu całkowitego (Ch) w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie stężenia cholesterolu całkowitego (Ch) w podgrupach [mmol/L]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	5,04 ± 0,18 [4,65÷5,21]	5,12 ± 0,17 [4,65÷5,26]	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	6,56 ± 0,79 [5,22÷8,03]	6,34 ± 0,74 [5,22÷7,90]	NS
GBLm 0 vs GKLM 0	6,55 ± 0,75 [5,77÷8,21]	6,60 ± 0,79 [5,80÷8,06]	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	5,05 ± 0,18 [4,61÷5,23]	5,10 ± 0,17 [4,68÷5,26]	NS
GBCh 30 vs GKCh 30	6,55 ± 0,78 [5,24÷8,00]	6,33 ± 0,68 [5,36÷7,67]	NS
GBLm 30 vs GKLM 30	6,46 ± 0,69 [5,67÷7,93]	6,59 ± 0,78 [5,82÷8,10]	NS
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	5,10 ± 0,91 [4,59÷5,64]	5,09 ± 0,17 [4,71÷5,31]	NS
GBCh 60 vs GKCh 60	6,56 ± 0,79 [5,22÷8,03]	6,34 ± 0,74 [5,22÷7,90]	NS
GBLm 60 vs GKLM 60	6,46 ± 0,71 [5,69÷7,96]	6,60 ± 0,79 [5,80÷8,06]	NS

Tab. 7. Średnie stężenia cholesterolu frakcji LDL w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie stężenia cholesterolu frakcji LDL w podgrupach [mmol/L]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	3,13 ± 0,17 [2,80÷3,34]	3,05 ± 0,27 [2,38÷3,34]	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	3,28 ± 0,37 [2,20÷3,80]	3,26 ± 0,14 [2,98÷3,57]	NS
GBLm 0 vs GKLm 0	4,07 ± 0,65 [3,00÷5,03]	3,94 ± 0,76 [2,64÷5,32]	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	3,13 ± 0,18 [2,77÷3,36]	3,03 ± 0,29 [2,35÷3,34]	NS
GBCh 30 vs GKCh 30	3,28 ± 0,38 [2,19÷3,77]	3,29 ± 0,22 [2,88÷3,80]	NS
GBLm 30 vs GKLm 30	3,89 ± 0,60 [2,99÷4,79]	3,86 ± 0,69 [2,67÷5,12]	NS
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	3,11 ± 0,23 [2,78÷3,57]	3,02 ± 0,28 [2,36÷3,36]	NS
GBCh 60 vs GKCh 60	3,28 ± 0,37 [2,20÷3,80]	3,26 ± 0,14 [2,98÷3,57]	NS
GBLm 60 vs GKLm 60	3,89 ± 0,61 [2,89÷4,83]	3,94 ± 0,76 [2,64÷5,32]	NS

Tab. 8. Średnie stężenia cholesterolu frakcji HDL w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie stężenia cholesterolu frakcji HDL w podgrupach [mmol/L]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	1,26 ± 0,20 [0,96÷1,56]	1,20 ± 0,14 [1,06÷1,46]	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	1,22 ± 0,23 [1,00÷1,68]	1,24 ± 0,20 [0,99÷1,52]	NS
GBLm 0 vs GKLm 0	1,00 ± 0,35 [0,59÷1,62]	1,09 ± 0,34 [0,64÷1,76]	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	1,26 ± 0,18 [1,01÷1,54]	1,17 ± 0,11 [1,08÷1,45]	NS
GBCh 30 vs GKCh 30	1,20 ± 0,25 [0,91÷1,71]	1,22 ± 0,21 [0,99÷1,55]	NS
GBLm 30 vs GKLm 30	1,02 ± 0,31 [0,63÷1,51]	1,09 ± 0,31 [0,67÷1,71]	NS
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	1,27 ± 0,19 [0,99÷1,52]	1,13 ± 0,13 [0,97÷1,42]	NS
GBCh 60 vs GKCh 60	1,22 ± 0,23 [1,00÷1,68]	1,24 ± 0,20 [0,99÷1,52]	NS
GBLm 60 vs GKLm 60	1,03 ± 0,29 [0,72÷1,55]	1,09 ± 0,34 [0,64÷1,76]	NS

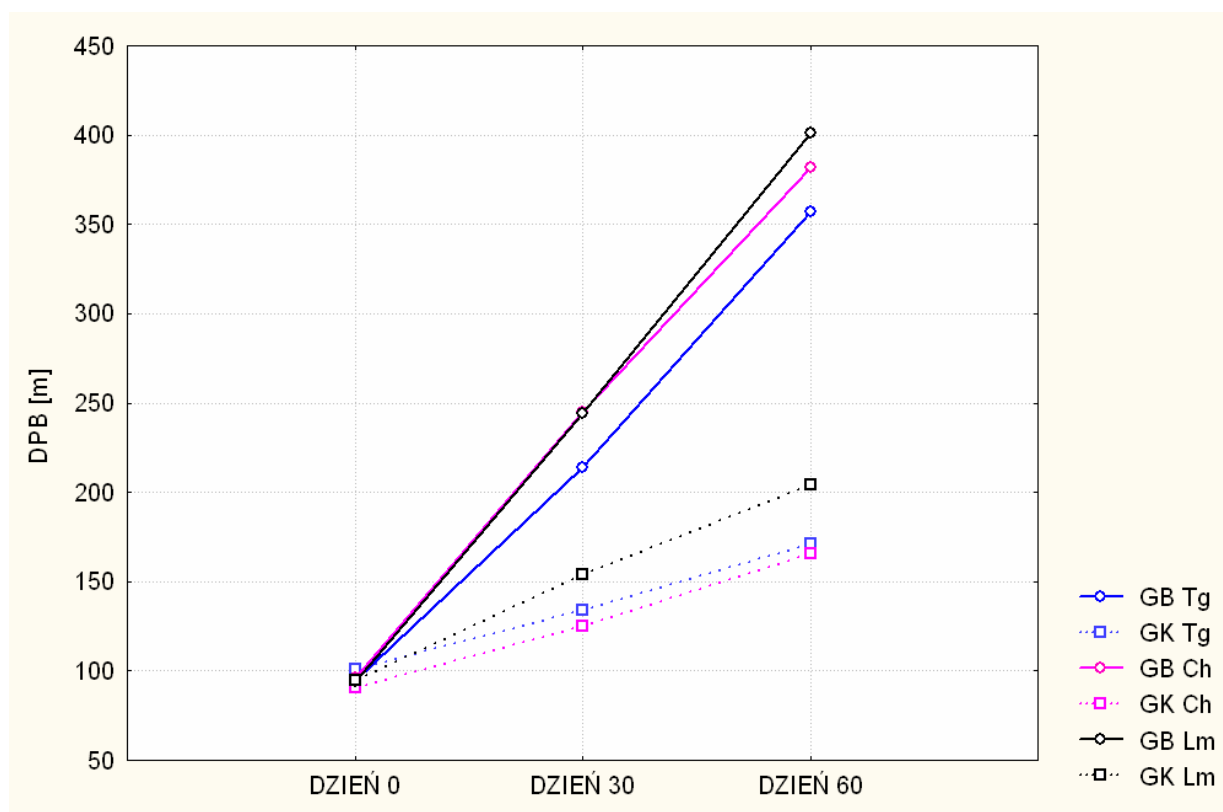
Tab. 9. Średnie stężenia triacyloglicerolu (Tg) w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie stężenia triacylogliceroli (Tg) w podgrupach [mmol/L]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	2,44 ± 0,48 [1,89÷3,22]	2,40 ± 0,57 [1,80÷3,54]	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	1,52 ± 0,25 [0,74÷1,71]	1,49 ± 0,19 [1,19÷1,72]	NS
GBLm 0 vs GKLM 0	2,44 ± 0,60 [1,69÷3,80]	2,53 ± 0,59 [1,72÷3,80]	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	2,45 ± 0,46 [1,83÷3,19]	2,41 ± 0,57 [1,80÷3,50]	NS
GBCh 30 vs GKCh 30	1,52 ± 0,26 [0,77÷1,73]	1,51 ± 0,19 [1,20÷1,74]	NS
GBLm 30 vs GKLM 30	2,41 ± 0,58 [1,67÷3,78]	2,53 ± 0,62 [1,69÷3,94]	NS
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	2,38 ± 0,51 [1,69÷3,29]	2,41 ± 0,55 [1,83÷3,48]	NS
GBCh 60 vs GKCh 60	1,52 ± 0,25 [0,75÷1,75]	1,49 ± 0,17 [1,17÷1,71]	NS
GBLm 60 vs GKLM 60	2,38 ± 0,62 [1,30÷3,80]	2,48 ± 0,91 [1,63÷3,99]	NS

#### 4.3. Dystans przejścia bezbólowego DPB

Tab. 10. Średnie wartości dystansu przejścia bezbólowego (DPB) w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie wartości DPB w podgrupach [m]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	95,75 ± 23,85	101,00 ± 22,04	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	96,37 ± 18,17	91,89 ± 19,81	NS
GBLm 0 vs GKLM 0	94,45 ± 16,06	95,21 ± 22,32	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	214,55 ± 53,74	134,78 ± 39,29	p=0,00041
GBCh 30 vs GKCh 30	245,68 ± 54,04	125,01 ± 41,81	p=0,00014
GBLm 30 vs GKLM 30	244,12 ± 66,54	154,29 ± 47,45	p=0,00125
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	357,26 ± 76,79	171,19 ± 48,53	p=0,00013
GBCh 60 vs GKCh 60	382,74 ± 77,41	166,56 ± 49,10	p=0,00014
GBLm 60 vs GKLM 60	401,98 ± 100,25	204,31 ± 61,03	p=0,00014



Ryc. 6. Graficzne zestawienie średnich wartości DPB w grupie otrzymującej L-argininę oraz placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

W punkcie początkowym badania (dzień 0) wszystkie podgrupy były jednorodne w zakresie dystansu przejścia bezbólowego. Brak istotnych statystycznie różnic między podgrupami chorych otrzymujących L-argininę oraz między podgrupami chorych otrzymujących placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

U wszystkich chorych otrzymujących L-argininę wystąpiło natomiast znamienne statystycznie wydłużenie DPB w 30 i 60 dniu badania.

W grupie chorych otrzymujących placebo we wszystkich podgrupach DPB uległ istotnemu statystycznie wydłużeniu w 60 dniu badania ( $p=0,0001$ ).

#### 4.4. Wskaźnik kostka –ramię WKR

Tab. 11. Średnie wartości wskaźnika kostka ramię dla strony prawej (WKR-P) w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie wartości WKR-P w podgrupach [m]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	0,71 ± 0,10	0,71 ± 0,12	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	0,68 ± 0,10	0,69 ± 0,11	NS
GBLm 0 vs GKLm 0	0,71 ± 0,10	0,70 ± 0,10	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	0,73 ± 0,10	0,72 ± 0,12	NS
GBCh 30 vs GKCh 30	0,69 ± 0,10	0,69 ± 0,12	NS
GBLm 30 vs GKLm 30	0,72 ± 0,11	0,71 ± 0,11	NS
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	0,75 ± 0,10	0,74 ± 0,12	NS
GBCh 60 vs GKCh 60	0,70 ± 0,10	0,70 ± 0,10	NS
GBLm 60 vs GKLm 60	0,74 ± 0,12	0,72 ± 0,12	NS

Brak istotnych statystycznie różnic w poprawie WKR-P u chorych otrzymujących L-argininę w 30 i 60 dniu badania we wszystkich podgrupach.

Brak istotnych statystycznie różnic w poprawie WKR-P u chorych otrzymujących placebo w 30 i 60 dniu badania we wszystkich podgrupach.

Tab. 12. Średnie wartości wskaźnika kostka ramię dla strony lewej (WKR-L) w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie wartości WKR-L w podgrupach [m]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	0,69 ± 0,10	0,71 ± 0,13	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	0,68 ± 0,10	0,69 ± 0,10	NS
GBLm 0 vs GKLm 0	0,71 ± 0,10	0,70 ± 0,10	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	0,70 ± 0,10	0,71 ± 0,13	NS
GBCh 30 vs GKCh 30	0,69 ± 0,10	0,69 ± 0,10	NS
GBLm 30 vs GKLm 30	0,72 ± 0,11	0,71 ± 0,12	NS
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	0,72 ± 0,10	0,72 ± 0,13	NS
GBCh 60 vs GKCh 60	0,71 ± 0,10	0,70 ± 0,10	NS
GBLm 60 vs GKLm 60	0,74 ± 0,12	0,71 ± 0,12	NS

Brak istotnych statystycznie różnic w poprawie WKR-L u chorych otrzymujących L-argininę w 30 i 60 dniu badania we wszystkich podgrupach.

Brak istotnych statystycznie różnic w poprawie WKR-L u chorych otrzymujących placebo w 30 i 60 dniu badania we wszystkich podgrupach.

#### 4.5. Tlenek azotu NO

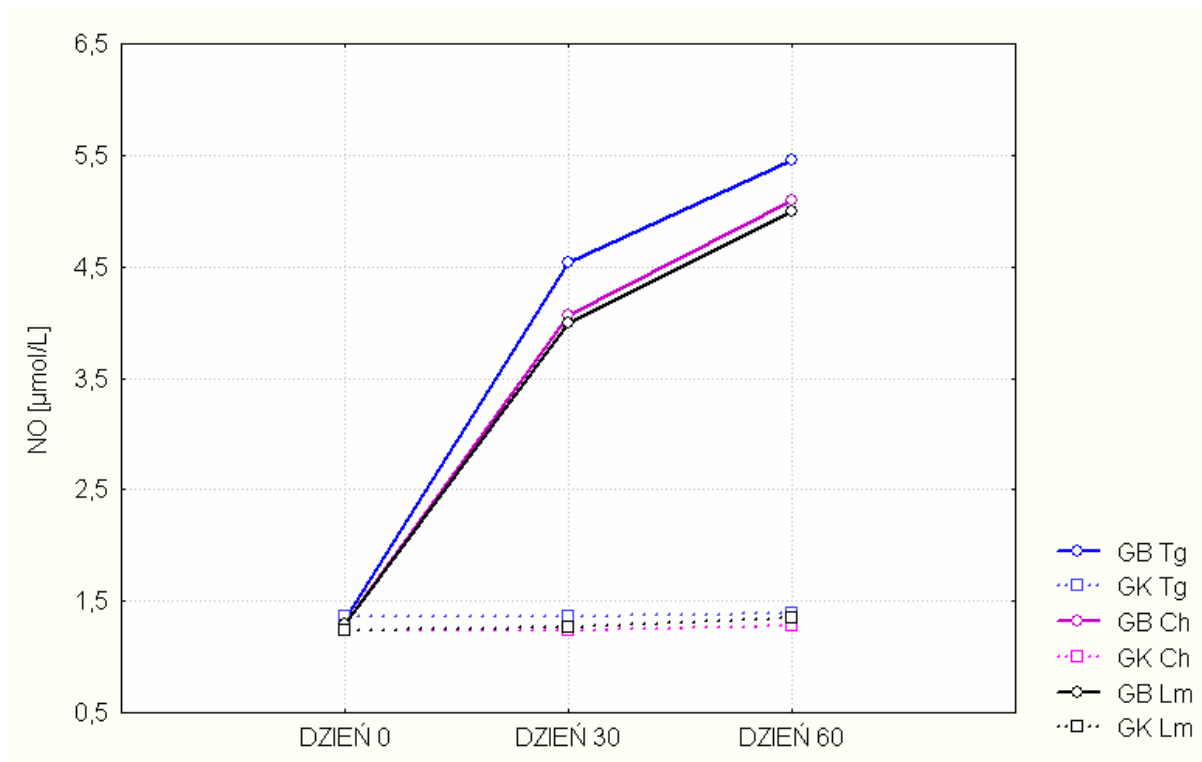
Tab. 13. Średnie stężenia tlenku azotu (NO) w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie stężenia NO w podgrupach [ $\mu\text{mol/L}$ ]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	1,34 $\pm$ 0,21	1,36 $\pm$ 0,19	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	1,29 $\pm$ 0,25	1,25 $\pm$ 0,19	NS
GBLm 0 vs GKLM 0	1,30 $\pm$ 0,24	1,25 $\pm$ 0,22	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	4,54 $\pm$ 1,08	1,36 $\pm$ 0,22	p=0,00015
GBCh 30 vs GKCh 30	4,06 $\pm$ 1,02	1,25 $\pm$ 0,19	p=0,00013
GBLm 30 vs GKLM 30	4,01 $\pm$ 1,01	1,27 $\pm$ 0,25	p=0,00012
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	5,46 $\pm$ 1,15	1,40 $\pm$ 0,19	p=0,00015
GBCh 60 vs GKCh 60	5,10 $\pm$ 1,26	1,28 $\pm$ 0,20	p=0,00013
GBLm 60 vs GKLM 60	5,00 $\pm$ 1,39	1,35 $\pm$ 0,24	p=0,00012

U chorych otrzymujących L-argininę nastąpił istotny statystycznie wzrost stężenia NO w 30 i 60 dniu badania. Różnice między podgrupami (GBTg, GBCh, GBLm.) były nieistotne statystycznie w 0, 30 i 60 dniu badania.

U chorych otrzymujących placebo nie nastąpił istotny statystycznie wzrost stężenia NO w trakcie badania.



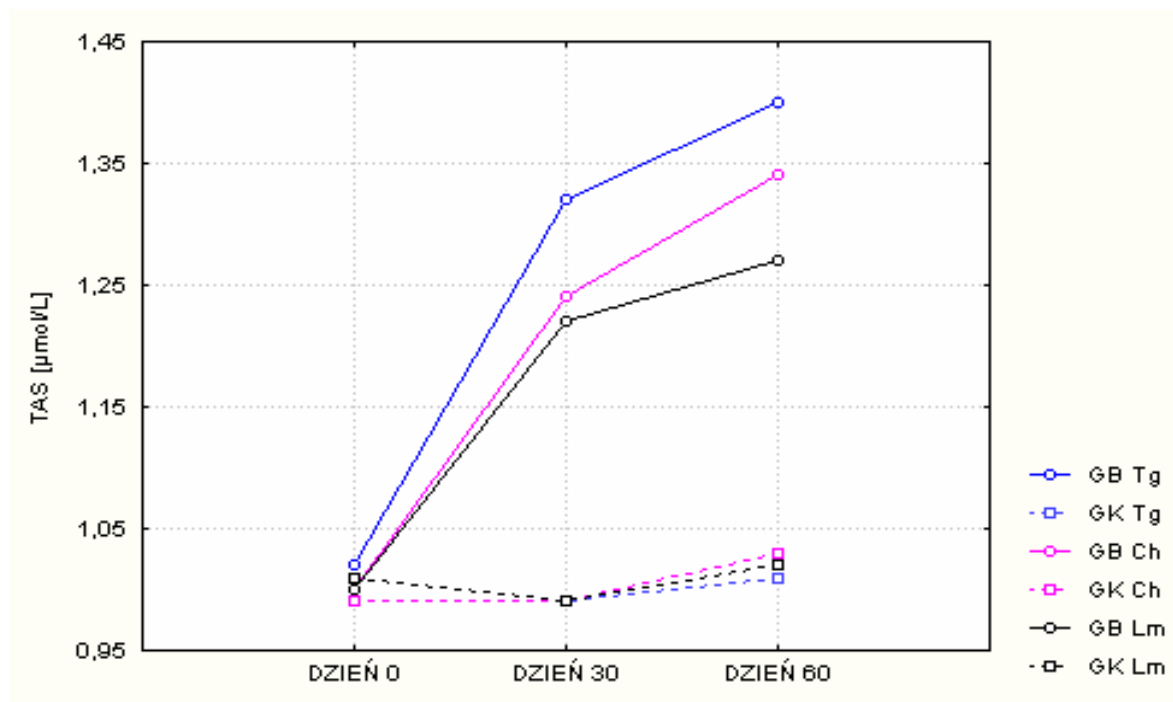


Ryc. 7. Graficzne zestawienie średnich stężeń NO w grupie otrzymującej L-argininę oraz placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

#### 4.6. Całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAS)

Tab. 14. Średnie stężenia TAS w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie stężenia TAS w podgrupach [mmol/L]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	1,02 ± 0,11	0,99 ± 0,11	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	1,00 ± 0,12	0,99 ± 0,10	NS
GBLm 0 vs GKLM 0	1,00 ± 0,11	1,01 ± 0,14	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	1,32 ± 0,11	0,99 ± 0,10	p=0,00013
GBCh 30 vs GKCh 30	1,24 ± 0,14	1,00 ± 0,10	p=0,00017
GBLm 30 vs GKLM 30	1,22 ± 0,16	0,99 ± 0,11	p=0,00075
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	1,40 ± 0,16	1,01 ± 0,10	p=0,00013
GBCh 60 vs GKCh 60	1,34 ± 0,14	1,04 ± 0,10	p=0,00014
GBLm 60 vs GKLM 60	1,27 ± 0,17	1,03 ± 0,13	p=0,00029



Ryc.8. Graficzne zestawienie średnich stężeń TAS w grupie otrzymującej L-argininę oraz placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

U chorych otrzymujących L-argininę nastąpił istotny statystycznie wzrost stężeń TAS w 30 i 60 dniu badania. Różnice między podgrupami (GBTg, GBCh, GBLm.) były nieistotne statystycznie w 0, 30 i 60 dniu badania.

U chorych otrzymujących placebo nie nastąpił istotny statystycznie wzrost stężeń TAS w trakcie badania w żadnej z podgrup.

#### 4.7. Homocysteina (Hcy)

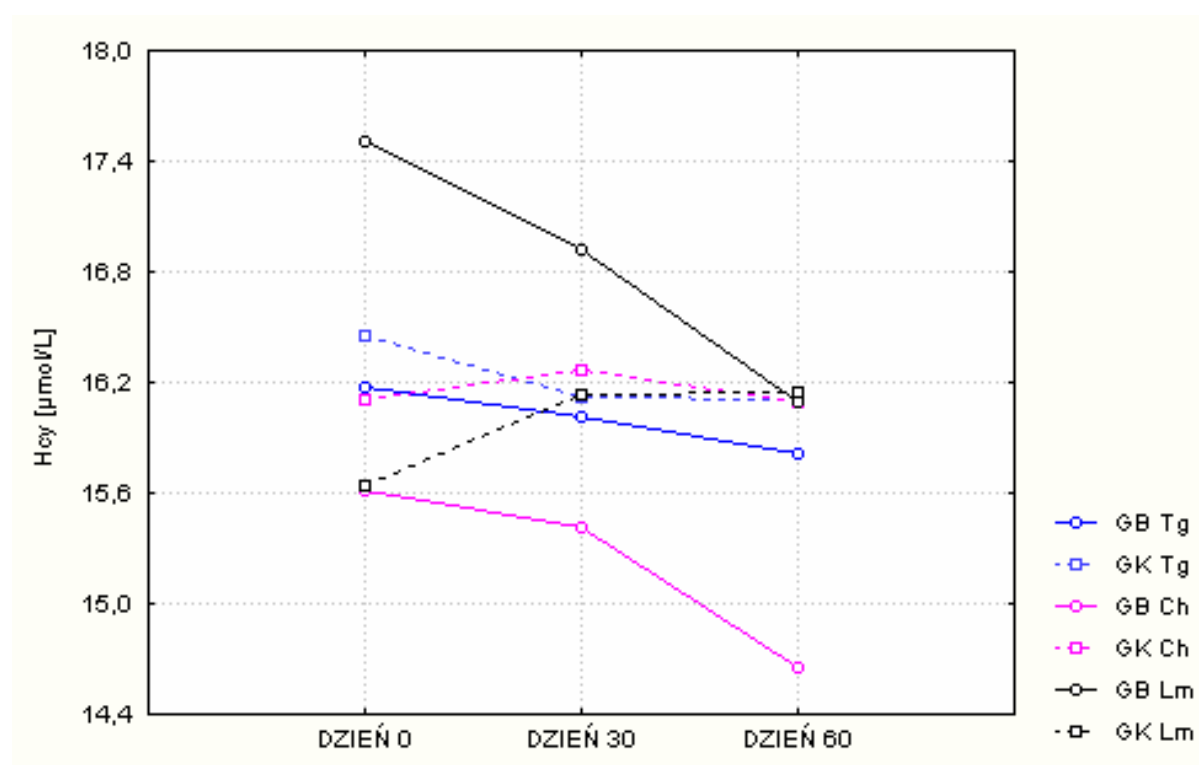
Tab. 15. Średnie stężenia Hcy w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana	Średnie stężenia Hcy [ $\mu\text{mol/L}$ ]		
	Dzień 0	Dzień 30	Dzień 60
<b>GBTg</b>	16,18 $\pm$ 3,11	16,02 $\pm$ 3,15	15,82 $\pm$ 3,00
<b>GBCh</b>	15,61 $\pm$ 2,74	15,42 $\pm$ 2,93	14,67 $\pm$ 3,24*
<b>GBLm</b>	17,51 $\pm$ 3,23	16,92 $\pm$ 3,15*	16,10 $\pm$ 2,71*

\* statystycznie istotne różnice ( $p < 0,05$ )

Tab. 16. Średnie stężenia Hcy w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie stężenia Hcy w podgrupach [ $\mu\text{mol/L}$ ]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	16,18 $\pm$ 3,11	16,46 $\pm$ 3,09	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	15,61 $\pm$ 2,74	16,11 $\pm$ 3,31	NS
GBLm 0 vs GKLm 0	17,51 $\pm$ 3,23	15,65 $\pm$ 2,28	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	16,02 $\pm$ 3,15	16,12 $\pm$ 2,69	NS
GBCh 30 vs GKCh 30	15,42 $\pm$ 2,93	16,27 $\pm$ 3,20	NS
GBLm 30 vs GKLm 30	16,92 $\pm$ 3,15	16,13 $\pm$ 2,68	NS
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	15,82 $\pm$ 3,00	16,11 $\pm$ 3,03	NS
GBCh 60 vs GKCh 60	14,67 $\pm$ 3,24	16,10 $\pm$ 3,19	NS
GBLm 60 vs GKLm 60	16,10 $\pm$ 2,71	16,15 $\pm$ 2,50	NS



Ryc. 9. Graficzne zestawienie średnich stężeń Hcy w grupie otrzymującej L-argininę oraz placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

W grupie otrzymującej L-argininę nastąpiło istotne statystycznie obniżenie stężenia Hcy u chorych z hipercholesterolemią i lipidami mieszaną (GBCh, GBLm) w 30 i 60 dniu badania. W grupie GBTg nie zaobserwowano istotnego statystycznie obniżenia stężenia Hcy. U chorych otrzymujących placebo nie nastąpiło istotne statystycznie obniżenie stężenia Hcy w trakcie badania.

#### 4.8. Asymetryczna dimetyloarginina (ADMA)

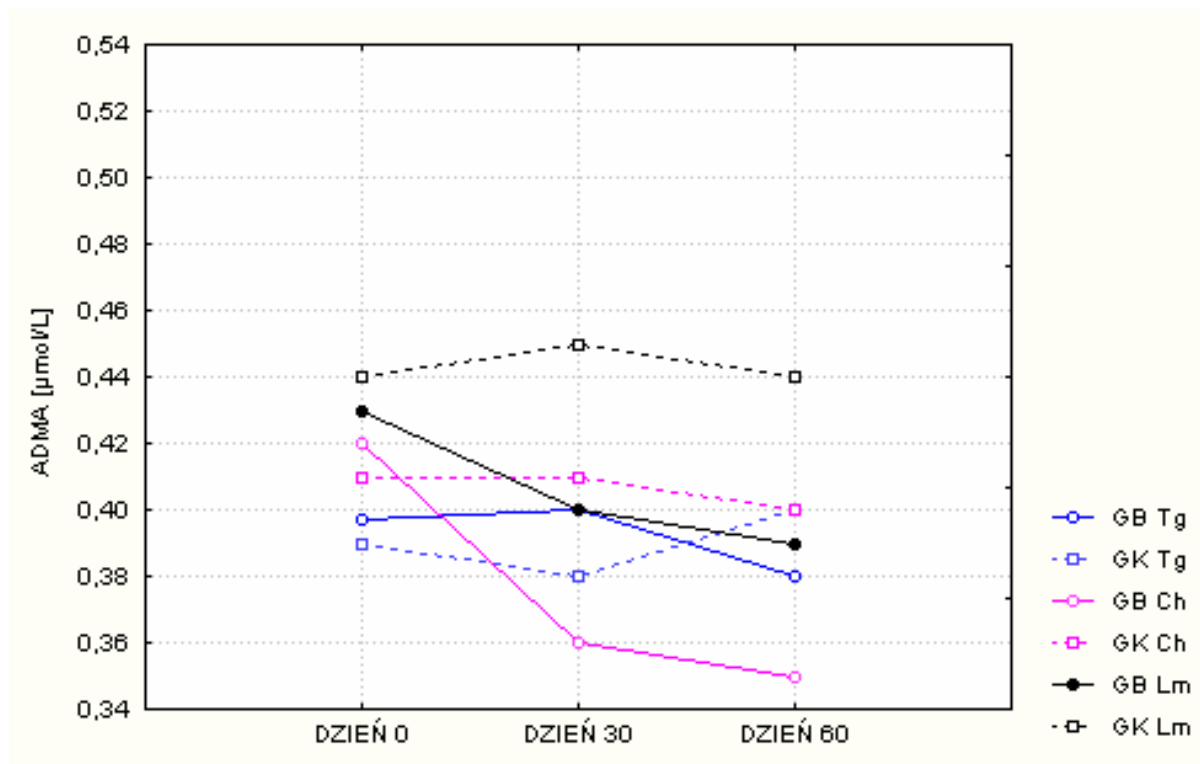
Tab. 17. Średnie stężenia ADMA w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana	Średnie stężenia ADMA [ $\mu\text{mol/L}$ ]		
	Dzień 0	Dzień 30	Dzień 60
GBTg	0,40 $\pm$ 0,06	0,40 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,07
GBCh	0,42 $\pm$ 0,07	0,36 $\pm$ 0,05 *	0,35 $\pm$ 0,04 *
GBLm	0,43 $\pm$ 0,09	0,41 $\pm$ 0,09	0,39 $\pm$ 0,09 *

\* statystycznie istotne różnice ( $p < 0,05$ )

Tab. 18. Średnie stężenia ADMA w podgrupach chorych otrzymujących L-argininę vs placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Grupa badana vs Grupa kontrolna	Średnie stężenia ADMA w podgrupach [ $\mu\text{mol/L}$ ]		Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
GBTg 0 vs GKTg 0	0,40 $\pm$ 0,06	0,39 $\pm$ 0,09	NS
GBCh 0 vs GKCh 0	0,42 $\pm$ 0,07	0,41 $\pm$ 0,08	NS
GBLm 0 vs GKLm 0	0,43 $\pm$ 0,09	0,44 $\pm$ 0,07	NS
<b>Dzień 30</b>			
GBTg 30 vs GKTg 30	0,40 $\pm$ 0,07	0,38 $\pm$ 0,10	NS
GBCh 30 vs GKCh 30	0,36 $\pm$ 0,05	0,41 $\pm$ 0,07	p=0,0483
GBLm 30 vs GKLm 30	0,41 $\pm$ 0,09	0,45 $\pm$ 0,07	NS
<b>Dzień 60</b>			
GBTg 60 vs GKTg 60	0,38 $\pm$ 0,07	0,40 $\pm$ 0,09	NS
GBCh 60 vs GKCh 60	0,35 $\pm$ 0,04	0,40 $\pm$ 0,07	p=0,0396
GBLm 60 vs GKLm 60	0,39 $\pm$ 0,09	0,44 $\pm$ 0,07	p=0,0437



Ryc. 10. Graficzne zestawienie średnich stężeń ADMA w grupie otrzymującej L-argininę oraz placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Odnotowano istotne statystycznie obniżenie stężenia ADMA u chorych z hipercholesterolemią (GBCh) i lipidemią mieszaną (GBLm) otrzymujących L-argininę w 30 i 60 dniu badania. U chorych z hipertriacylglicerolemią (GBTg) otrzymujących L-argininę mimo braku istotnych statystycznie różnic wystąpił trend spadkowy.

W grupie chorych otrzymujących placebo nie wykazano istotnych statystycznie różnic w stężeniach ADMA w 0, 30 i 60 dniu badania.

#### 4.9. Insulina

W grupie pacjentów przyjmujących L-argininę (n=46), u 56,5% (n=26) chorych stwierdzono istotny statystycznie wzrost stężenia insuliny. U 37,0% (n=17) zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie stężenia insuliny, natomiast u 6,5% (n=3) nie nastąpiła istotna zmiana tego parametru w 60 dniu badania. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy zmianami stężenia insuliny a parametrami gospodarki lipidowej. W grupie pacjentów otrzymujących placebo nie odnotowano istotnych statystycznie zmian stężenia insuliny pomiędzy 0 a 30 i 60 dniem badania.

Tab. 19. Ilościowe przedstawienie chorych przyjmujących L-argininę, u których nastąpiły istotne statystycznie zmiany stężenia insuliny w 60 dniu badania.

Grupa badana n=46	Liczba chorych u których nastąpiła istotna statystycznie (p=0,05) zmiana stężenia insuliny w 60 dniu badania		
	Wzrost stężenia insuliny	Obniżenie stężenia insuliny	Bez wpływu na stężenie insuliny
<b>Dzień 60</b>			
	n=26 (56,5%)	n=17 (37,0%)	n=3 (6,5%)
GBTg 0 n=13	8	5	0
GBCh 0 n=16	7	7	2
GBLm0 n=17	11	5	1

#### 4.9.1. Wskaźnik insulinooporności HOMA-IR

Tab. 20. Wartości wskaźnika insulinooporności HOMA-IR w grupie chorych przyjmujących L-argininę oraz placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

Zmienna	GB n= 46	GK n= 41	Poziom istotności
<b>Dzień 0</b>			
HOMA –IR ≤ 2	18 (20,7%)	19 (21,9%)	NS
HOMA-IR > 2	28 (32,2%)	22 (25,3%)	NS
<b>Dzień 30</b>			
HOMA –IR ≤ 2	18 (20,7%)	19 (21,9%)	NS
HOMA-IR > 2	28 (32,2%)	22 (25,3%)	NS
<b>Dzień 60</b>			
HOMA –IR ≤ 2	16 (18,4%)	18 (20,7%)	NS
HOMA-IR > 2	30 (34,5%)	23 (21,8%)	p=0,048

Z badanej populacji chorych insulinooporność wyrażoną wartością wskaźnika HOMA-IR >2 stwierdzono w 0 dniu badania u 50 pacjentów (57,4%), w tym u 28 chorych (32,2%) w grupie badanej i 22 (25,3%) w grupie kontrolnej. W 60 dniu badania insulinooporność stwierdzono u 53 pacjentów (60,9%) ale nie była to istotna statystycznie różnica. Natomiast istotne różnice wystąpiły w wartościach HOMA-IR w 60 dniu badania w grupie pacjentów z insulinoopornością przyjmujących L-argininę.

## 4.10. Korelacje

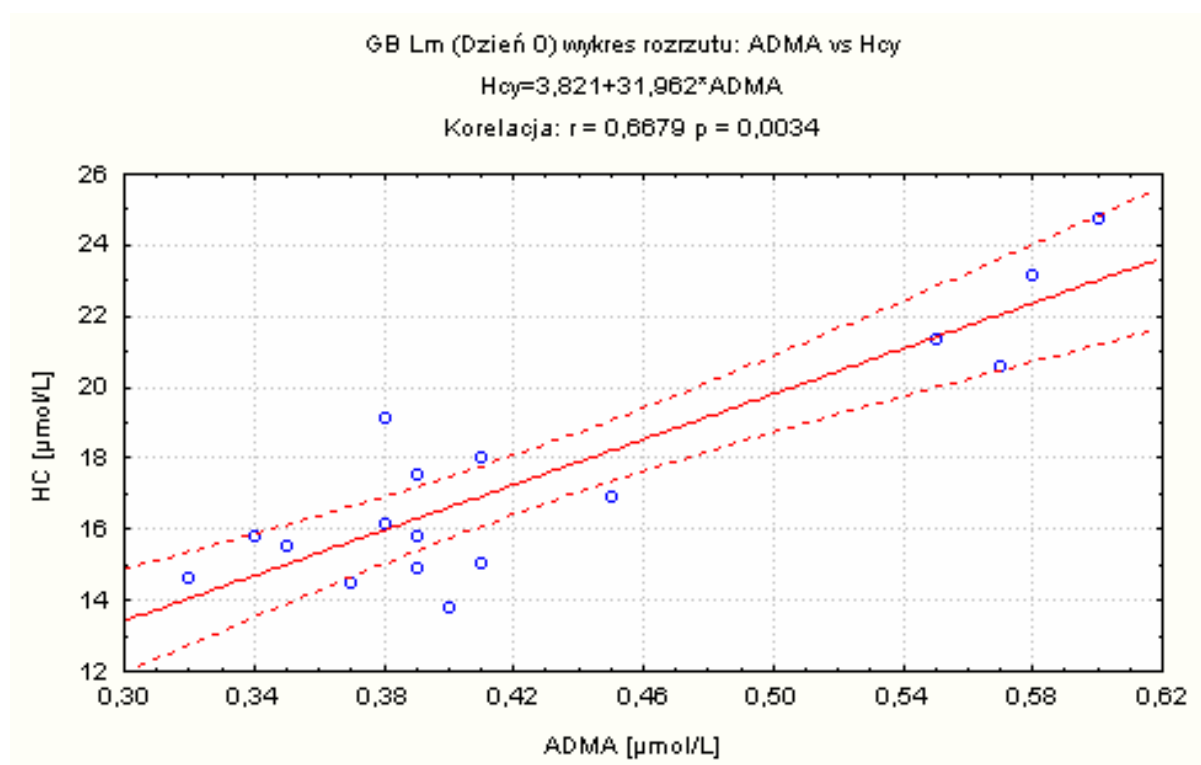
### 4.10.1. Korelacja ADMA vs Hcy

Tab. 21. Współczynniki korelacji rang Spearmana R (ADMA vs Hcy)

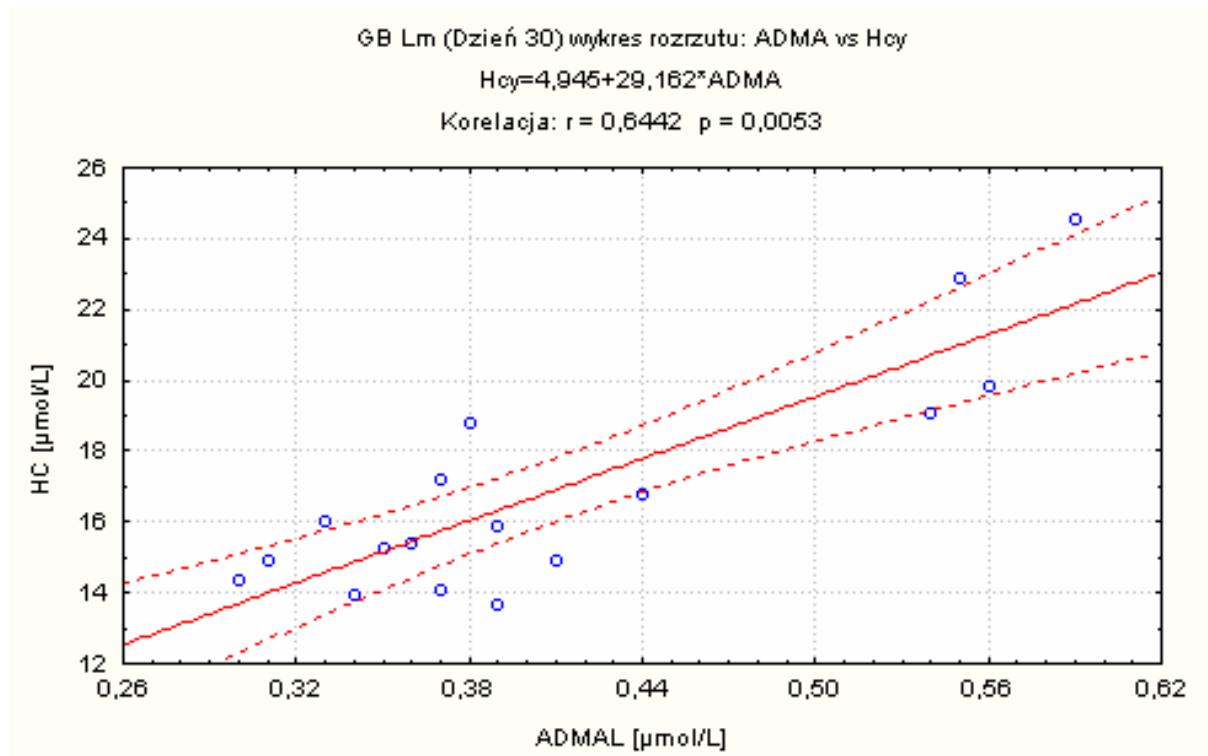
Grupa badana	R		
	Dzień 0	Dzień 30	Dzień 60
GBCh	0,8131 <i>p</i> = 0,0001	0,8005 <i>p</i> = 0,0010	0,8363 <i>p</i> = 0,0004
GBLm	0,6679 <i>p</i> = 0,0034	0,6442 <i>p</i> = 0,0053	0,7892 <i>p</i> = 0,0002
GBTg	0,4021 <i>p</i> = 0,1226	0,2861 <i>p</i> = 0,2827	0,5418 <i>p</i> = 0,0302

W grupie chorych z lipidemią mieszaną oraz hipercholesterolemią otrzymujących L-argininę istnieje silna dodatnia korelacja między stężeniami ADMA i Hcy w 0, 30 i 60 dniu badania.

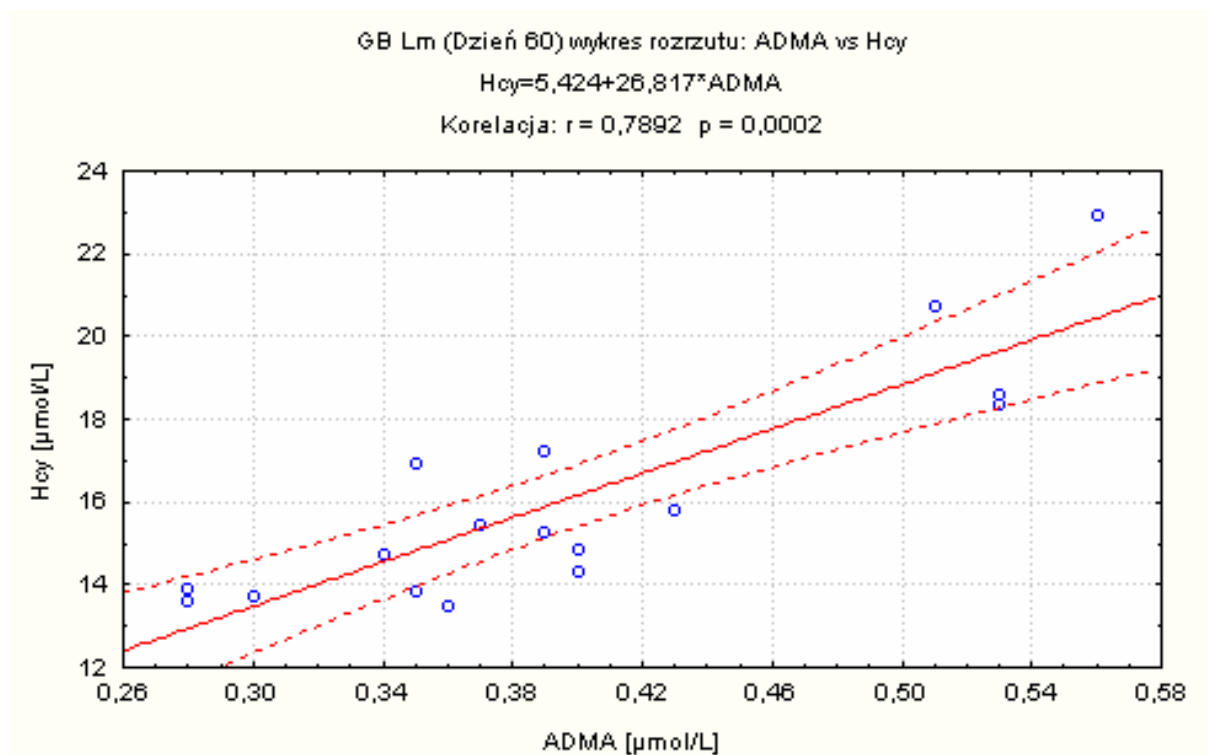
W grupie chorych z triacyloglicerolemią otrzymujących L-argininę dodatnia korelacja na granicy istotności statystycznej ( $p < 0,05$ ) wystąpiła w 60 dniu badania.



Ryc. 11. Graficzne przedstawienie korelacji ADMA vs Hcy w grupie GB Lm w 0 dniu badania.

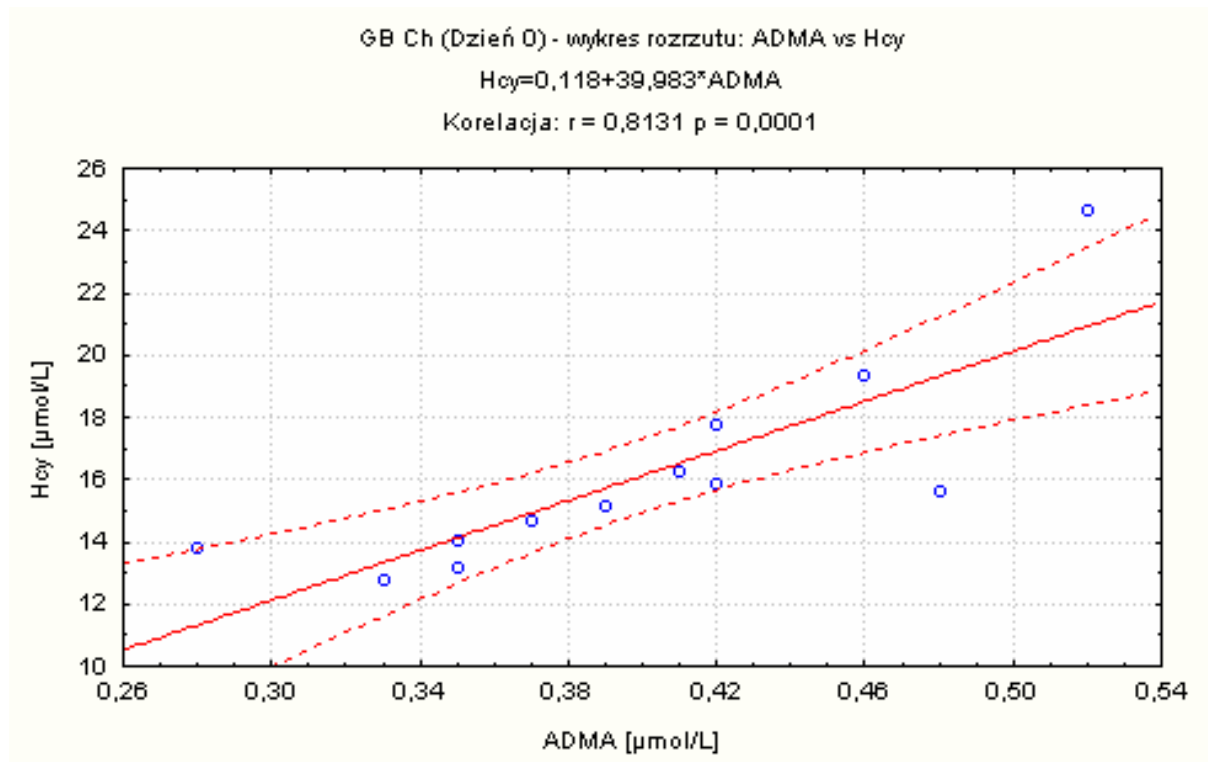


Ryc. 12. Graficzne przedstawienie korelacji ADMA vs Hcy w grupie GB Lm w 30 dniu badania.

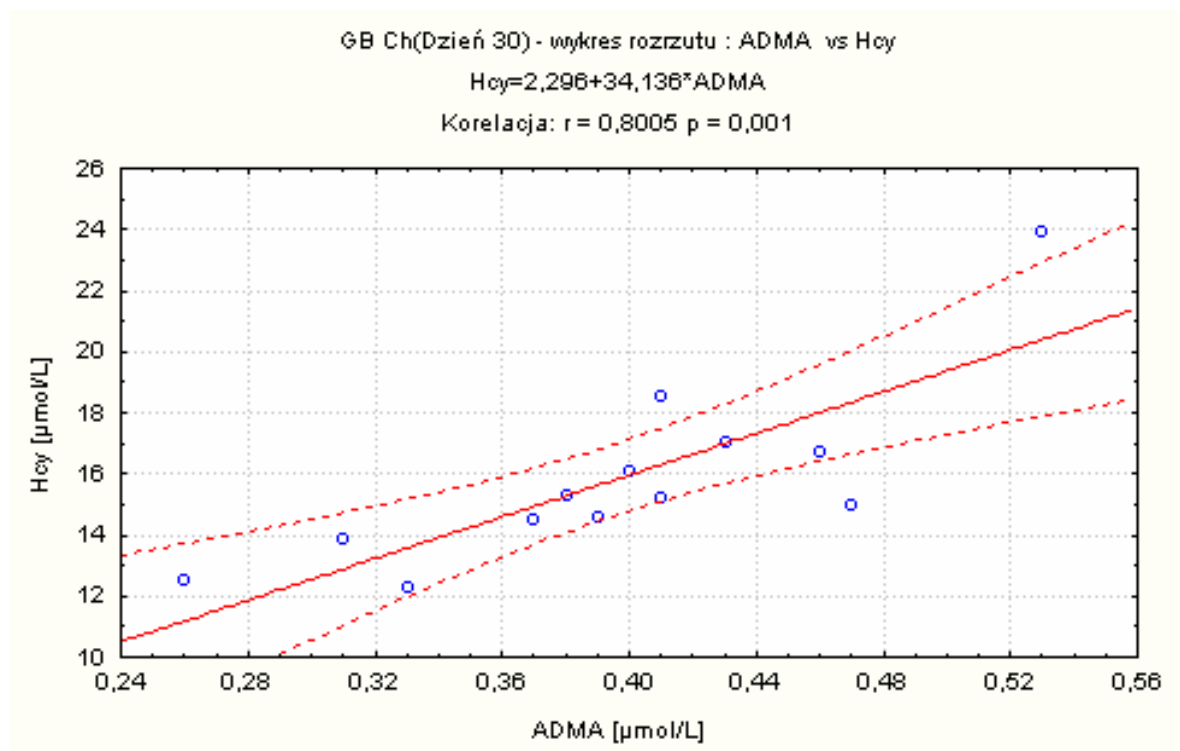


Ryc. 13. Graficzne przedstawienie korelacji ADMA vs Hcy w grupie GB Lm w 60 dniu badania.

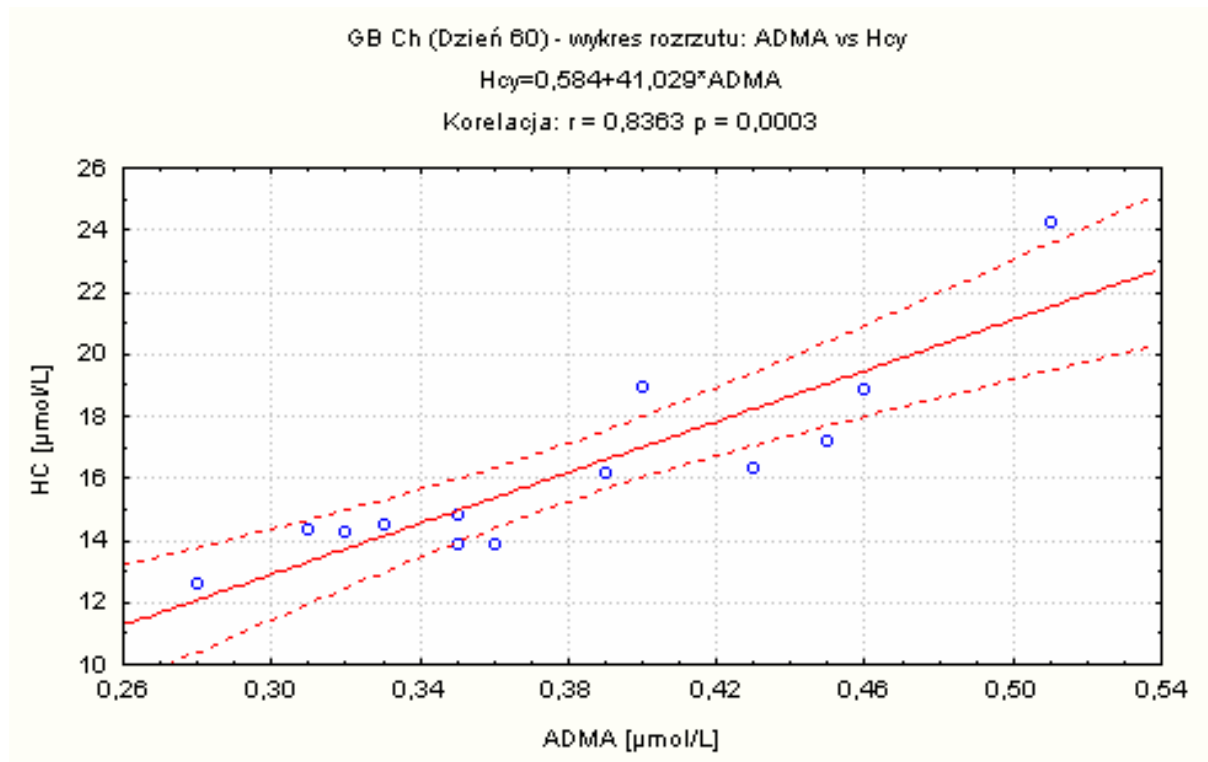




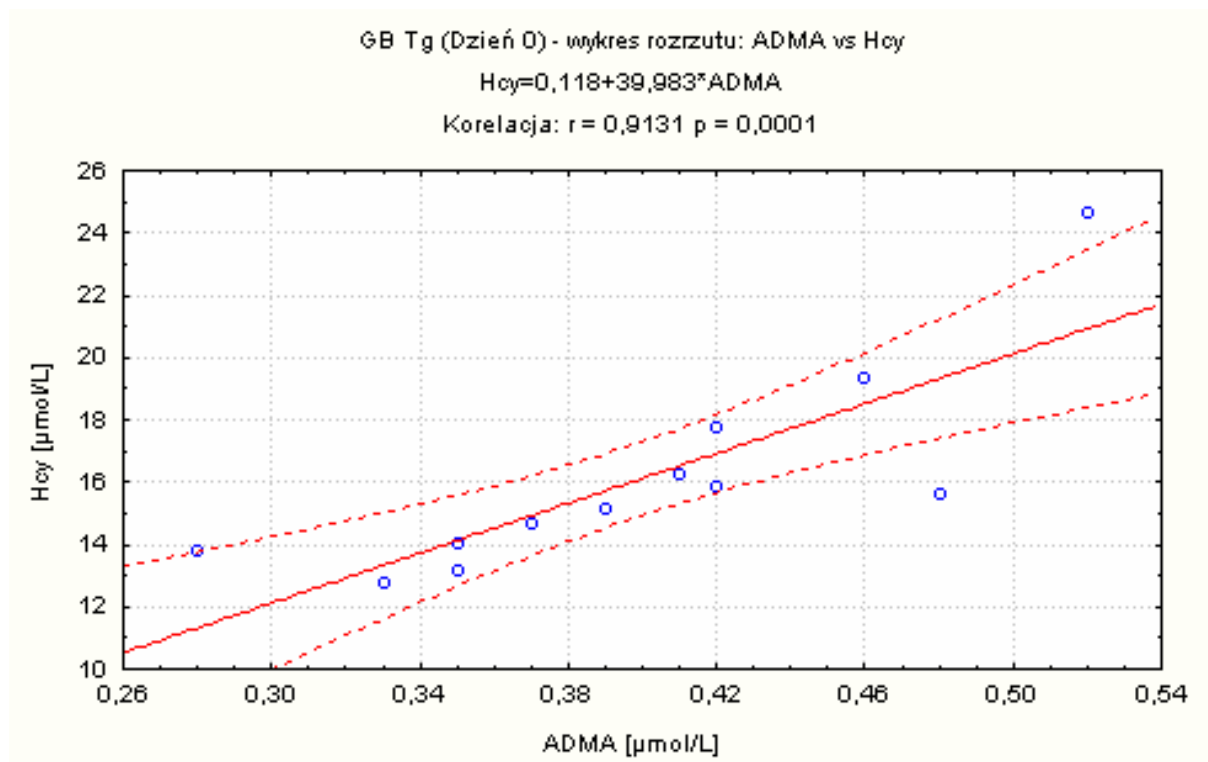
Ryc. 14. Graficzne przedstawienie korelacji ADMA vs Hcy w grupie GB Ch w 0 dniu badania.



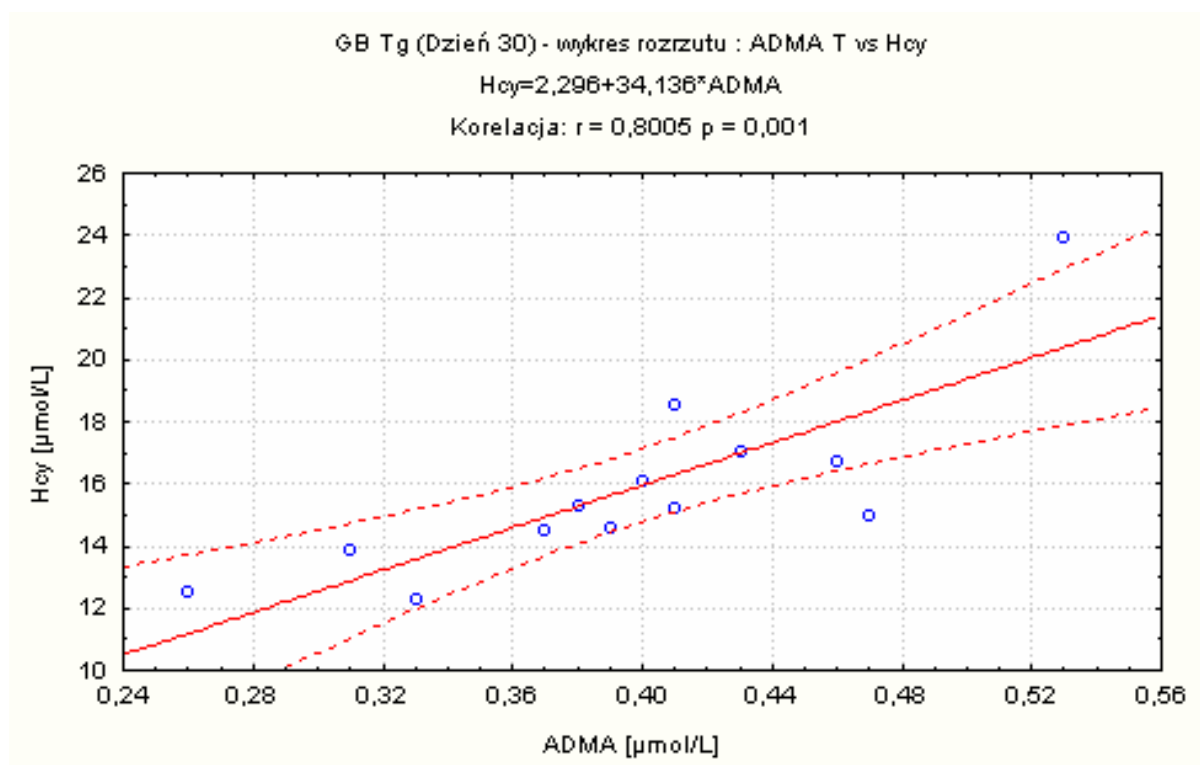
Ryc. 15. Graficzne przedstawienie korelacji ADMA vs Hcy w grupie GB Ch w 30 dniu badania.



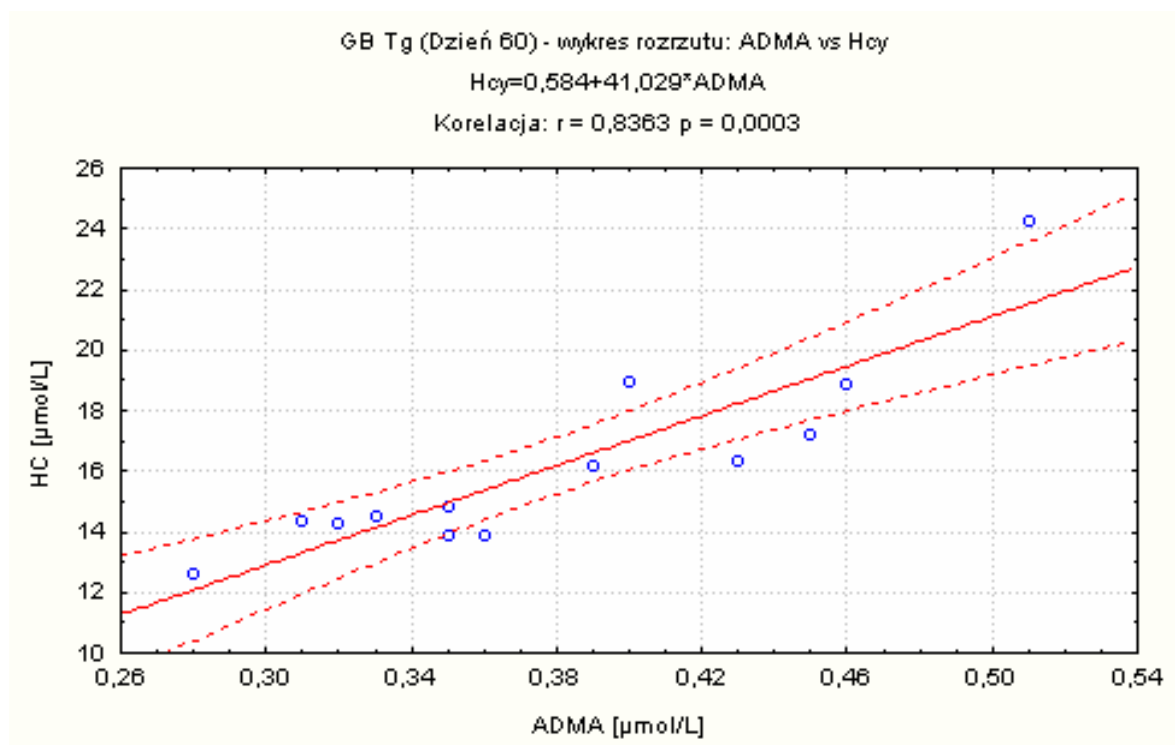
Ryc. 16. Graficzne przedstawienie korelacji ADMA vs Hcy w grupie GB Ch w 60 dniu badania.



Ryc. 17. Graficzne przedstawienie korelacji ADMA vs Hcy w grupie GB Tg w 0 dniu badania.



Ryc. 18. Graficzne przedstawienie korelacji ADMA vs Hcy w grupie GB Tg w 30 dniu badania.



Ryc. 19. Graficzne przedstawienie korelacji ADMA vs Hcy w grupie GB Tg w 60 dniu badania.

Nie odnotowano istotnych statystycznie korelacji między badanymi parametrami gospodarki lipidowej (Ch, HDL, LDL, TG) a DPB, WKR-P i WKR-L, poziomami TAS i ADMA we wszystkich podgrupach otrzymujących L-argininę oraz placebo w 0, 30 i 60 dniu badania.

W grupie otrzymującej L-argininę u pacjentów z hipercholesterolemią (GBCh) i hiperlipidemią mieszaną (GBLm) stwierdzono istotne statystycznie korelacje w 0, 30 i 60 dniu badania między stężeniami NO a parametrami gospodarki lipidowej wymienionymi w tabelach 20 i 21:

Tab. 22. Współczynniki korelacji rang Spearmana R (NO vs Ch, LDL) dla osób z hiperlipidemią mieszaną otrzymujących L-argininę(GBLm).

Parametr	NO		
	Dzień 0	Dzień 30	Dzień 60
<b>Ch</b>	-0,5980 <i>p = 0,0112</i>	-0,6765 <i>p = 0,0029</i>	-0,7426 <i>p = 0,0088</i>
<b>LDL</b>	-0,4847 <i>p = 0,0486</i>	-0,4994 <i>p = 0,0410</i>	-0,5171 <i>p = 0,0335</i>

Tab. 23. Współczynniki korelacji rang Spearmana R (NO vs Ch, LDL) dla osób z hipercholesterolemią otrzymujących L-argininę (GBCh).

Parametr	NO		
	Dzień 0	Dzień 30	Dzień 60
<b>Ch</b>	-0,3758 <i>p = 0,1514</i>	-0,4246 <i>p = 0,1301</i>	-0,7714 <i>p = 0,0012</i>
<b>LDL</b>	-0,3188 <i>p = 0,2287</i>	-0,5176 <i>p = 0,0579</i>	-0,5919 <i>p = 0,0258</i>

## 5. DYSKUSJA

Głównym celem pracy była próba określenia skuteczności 60-dniowej suplementacji L-argininy w miażdżycowym niedokrwieniu kończyn dolnych u chorych z różnymi zaburzeniami gospodarki lipidowej poprzez analizę zmian parametrów klinicznych (DPB, WKR-L, WKR-P) i biochemicznych (poziomy NO, TAS, Hcy, ADMA, insuliny) oraz ocena profilu bezpieczeństwa stosowania tego aminokwasu.

Kluczowe dla realizacji celu pracy stało się uznanie zasadniczej roli dysfunkcji śródbłonna naczyniowego w patogenezie miażdżycy i jej klinicznych manifestacji, w tym miażdżycy kończyn dolnych.

Komórki śródbłonna, jako najbardziej wewnętrzna warstwa błony wewnętrznej odgrywają decydującą rolę w aktywnej miejscowej regulacji przepływu krwi, a sam śródbłonek wytwarzający czynniki aktywne uznany został za największy organ wydzielania wewnętrznego u człowieka [191]. Uważa się, że miażdżycę charakteryzuje się między innymi ograniczoną zdolnością naczyń do rozkurczu zależnego od endotelium [2,4,5,9]. Dlatego przewlekłe działanie czynników uszkodzających prowadzi do niedoczynności śródbłonna, którą cechuje zwiększone wydzielanie mediatorów kurczących naczynia (m.in. wolnych rodników, endotelin, tromboksanu i śródbłonkowego czynnika kurczącego), zwiększona wrażliwość na działanie katecholamin, nasilenie proliferacji, wzrost potencjału prozakrzepowego i prozapalnego oraz upośledzenie uwalniania miejscowych czynników rozszerzających naczynia, do których należą m.in. prostacyklina, śródbłonkowy czynnik hiperpolaryzujący (EDHF) i tlenek azotu (NO) [21]. Do najważniejszych zmian funkcji wydzielniczej należy zmniejszenie syntezy i/lub biodostępności NO. Uwalnianie tlenu azotu hamują lizofosfatydylocholina (lizo-PC) i ox-LDL. Ox-LDL zmniejszają również ekspresję eNOS [19,49]. Reasumując, dysfunkcja śródbłonna manifestuje się zaburzeniem wydzielania NO oraz obniżeniem jego biodostępności, a także zahamowaniem wazodylatacji zależnej od śródbłonna, co prowadzi do całej kaskady niekorzystnych zjawisk proaterogennych, w tym miażdżycy kończyn dolnych. W prezentowanej pracy dla oceny zmian funkcji śródbłonna wykonano oznaczenia NO, TAS, Hcy, ADMA, a do oceny klinicznej DPB oraz WKR. Dodatkowo w całej populacji chorych zbadano stężenie insuliny oraz insulinooporność wyrażoną wartością wskaźnika HOMA-IR.

Za wiarygodny kliniczny wykładnik funkcji śródbłónka w chromaniu przestankowym uważany jest dystans przejścia bezbólowego (DPB). Doniesienia naukowe na temat wpływu L-argininy na DPB są niejednoznaczne, często sprzeczne.

Jako jedni z pierwszych przeciwbólowe działanie L-argininy opisali w latach 90-tych ubiegłego stulecia badacze japońscy po podaniu 30 g dożylnych wlewów L-argininy chorym skarżącym się na przewlekłe bóle różnego pochodzenia. Odnotowali oni u większości pacjentów złagodzenie bólu oraz uczucie ciepła w klatce piersiowej, a także w dolnych i górnych kończynach [192]. Także w naszym badaniu chorzy oprócz obiektywnej poprawy klinicznej zgłaszali poprawę ciepłoty rąk i nóg, a u kilku pacjentów zanotowano poprawę libido.

Wydaje się, że kluczowym czynnikiem decydującym o skuteczności suplementacji jest czas podawania. Polscy badacze ze Sławińskim i wsp. uzyskali obiecujące wyniki podając L-argininę w dawce 12,4g/dobę we wlewie dożylnym. Po tygodniu badacze ci odnotowali wydłużenie dystansu przechodzonego bez bólu, zwiększony przepływ krwi przez mięśnie podudzia oraz poprawę parametrów biochemicznych m.in. wzrost stężenia cGMP [193]. Wyniki te znalazły potwierdzenie w kolejnych badaniach opublikowanych niespełna dwa lata później, prowadzonych przez Jabłecką i wsp. oraz Mickera i wsp. które wykazały znamienne statystycznie wydłużenie dystansu przejścia bezbólowego u pacjentów cierpiących na miażdżycowe niedokrwienie kończyn dolnych suplementowanych L-argininą w dawce 6 i 12g/dobę w 28 dniu eksperymentu [185,188]. Przeciwnie, w badaniach Wilsona i wsp. u chorych z chromaniem przestankowym stwierdzono, iż mimo istotnie statystycznego wydłużenia dystansu przejścia do wywołania pierwszego bólu, jak i dystansu przejścia maksymalnego w grupie otrzymującej L-argininę w dawce 3g/dobę przez 6 miesięcy, otrzymano wyniki mniej korzystne w porównaniu do grupy placebo [156]. W badaniach własnych zarówno pacjenci otrzymujący L-argininę jak i placebo osiągnęli istotną statystycznie poprawę dystansu przejścia bezbólowego ( $p=0,0001$ ) w 60 dniu badania, jednakże u chorych suplementowanych tym aminokwasem poprawa była istotnie statystycznie lepsza w porównaniu z placebo ( $p=0,0001$ ). Być może różnice mogą wynikać z faktu, iż w badaniach własnych podawano pacjentom dwukrotnie wyższą dawkę aminokwasu (6g/dobę) niż Wilson i wsp. Alternatywnym wytłumaczeniem wydaje się być odnotowane również przez innych badaczy zjawisko „tolerancji” występujące przy długotrwałym podawaniu L-argininy.

Pojawiają się doniesienia, iż długoterminowe podawanie L-argininy nie tylko nie poprawia dystansu przejścia u chorych z chorobą naczyń obwodowych ale może pogorszyć

ich wydolność najprawdopodobniej poprzez niepożądane działanie na „reaktywność naczyń” [145,156]. Wyniki te nie potwierdzają wcześniejszych licznych doniesień o korzystnym wpływie krótkotrwałego podawania L-argininy u chorych z miażdżycą kończyn dolnych [146,185,188]. Przyczyną poprawy reaktywności naczyń jest prawdopodobnie metabolizm L-argininy do tlenku azotu, czego bezpośrednim skutkiem jest wzrost stężenia we krwi tego ostatniego oraz cGMP-drugiego przekaźnika w procesie wazodylatacji [194]. A zatem u pacjentów z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych poprawie powinien ulec przepływ krwi w kończynach oraz wydolność czynnościowa, co częściowo znalazło potwierdzenie w naszych obserwacjach w postaci wydłużenia DPB. Natomiast w żadnej z badanych grup nie zaobserwowaliśmy zmiany wartości WKR, który jest bardzo czułym i swoistym testem w prognozowaniu postępu choroby i skuteczności leczenia zarówno zachowawczego jak i inwazyjnego. Wzrost jego wartości o 0,1 zgodnie z wytycznymi TASC II świadczy o istotnej poprawie ukrwienia kończyn [13]. Wyniki uzyskane w badaniu własnym są sprzeczne z wcześniejszymi wynikami prac Mickera oraz Synowca, którzy uzyskali znamienne statystycznie wzrost WKR dla strony prawej i lewej ( $p=0,0001$ ) w 28 dniu badania podając odpowiednio L-argininę w dawce 6 i 12g/dobę [188,195]. Być może próbą wyjaśnienia różnic pomiędzy wynikami DPB oraz WKR może być coraz szerzej badana w ostatnich latach NO-zależna stymulacja angiogenezy i rozwoju krążenia obocznego. Procesy te odgrywają niezwykle istotną rolę w adaptacji mięśnia do wykonywanej pracy. Zaobserwowano bowiem, iż takie regulatory angiogenezy jak czynniki wzrostowe fibroblastów (m.in. FGF-2) oraz śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) działają za pośrednictwem EDRF [196,197,198,199]. A zatem angiogeneza może być regulowana zmianami biodostępności tlenku azotu czyli może zależeć od ilości dostępnej L-argininy. Oprócz działania proliferacyjnego, tlenkowi azotu przypisuje się także hamowanie angiostatyny, endogennego antagonisty angiogenezy [200]. Stymulacja wytwarzania nowych, drobnych naczyń krwionośnych może znacząco zwiększyć zaopatrzenie niedokrwionych mięśni w tlen, polepszyć ich tolerancję wysiłku oraz złagodzić objawy chromania. To ostatnie działanie wywierane jest również poprzez trening marszowy. Badacze wykazali korzystny wpływ wysiłku fizycznego na zwiększenie ekspresji śródbłonkowej syntazy tlenku azotu w tętnicach zaopatrujących mięśnie szkieletowe, co razem z dostarczaniem substratu L-argininy może przynieść dodatkowe korzyści w łagodzeniu objawów niedokrwienia [196,201]. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że podanie L-argininy w dawce 6g/dobę przez 60 dni niezależnie od typu zaburzeń gospodarki lipidowej wydłuża dystans przejścia bezbólowego.

W licznych badaniach odnotowano wzrost stężenia tlenu azotu po podaniu egzogennej L-argininy. W badaniach Mickera i Synowca wykazano np. znamienne statystycznie ( $p=0,0001$ ) wzrost stężeń tlenu azotu w grupach pacjentów otrzymujących L-argininę już w 7 oraz w 28 dniu badania [188,195]. Podobną tendencję, chociaż o mniejszym nasileniu zaobserwowano w prezentowanym badaniu. We wszystkich grupach przyjmujących L-argininę nastąpił istotny statystycznie wzrost stężenia NO w 30 i 60 dniu badania, w przeciwieństwie do grupy otrzymującej placebo. Wydaje się, że przyczynę różnic należy poszukiwać we wpływie tego aminokwasu na samą strukturę naczyń. Tlenek azotu, jako wazodylator, obniża ciśnienie krwi i poprawia elastyczność ściany naczyniowej. Hipoteza ta sprawdza się jedynie przy krótkotrwałym podawaniu L-argininy. Z badań Schulmana wynika, że wysoki poziom L-argininy w surowicy powoduje zwiększenie aktywności indukowalnej syntazy tlenu azotu oraz arginazy co ma skutkować wzrostem sztywności naczyń i zwiększać ryzyko wystąpienia zawału mięśnia serca [155, 202].

Wobec prawdopodobnych zmian naczyniowych, a szczególnie dysfunkcji śródbłonka naczyniowego w przebiegu miażdżycy kończyn dolnych wydaje się, że dostępność dla syntaz tlenu azotu i wchłanianie L-argininy mogą być w takich warunkach upośledzone. Z danych z piśmiennictwa wynika, że pozakomórkowe stężenia L-argininy są głównym determinantem wewnątrzkomórkowej dostępności L-argininy dla eNOS. W przypadku dysfunkcji śródbłonka dochodzi do obniżenia transportu L-argininy do komórek [136,203]. Skoro więc L-arginina konkuruje z innymi aminokwasami o transport do komórek przy pomocy specyficznych nośników białkowych, suplementacja L-argininą może prowadzić do wzrostu wewnątrzkomórkowego poziomu L-argininy. Osoby z dyslipidemią mają również podwyższone osoczowe poziomy ADMA, a w takich okolicznościach, suplementacja L-argininą może poprawić wytwarzanie tlenu azotu przez eNOS.

Inne mechanizmy poprawy biodostępności tlenu azotu dzięki suplementacji L-argininą są istotnie zróżnicowane i dyskusyjne. L-arginina ma bezpośrednie działanie antyoksydacyjne poprzez wpływ na TAS [183,184], co potwierdzono w badaniach własnych. Skuteczność mechanizmów antyoksydacyjnych w organizmie obrazuje całkowity potencjał antyoksydacyjny, rozumiany jako wypadkowa zdolność badanego układu do przeciwdziałania określonej reakcji utleniania. Na wartość TAS zasadniczo wpływają nieenzymatyczne niskocząsteczkowe antyoksydanty [204]. Wartości TAS otrzymane w badaniu były na początku eksperymentu (dzień 0) istotnie obniżone w całej grupie chorych i rosły u chorych przyjmujących L-argininę osiągając istotne statystycznie różnice w porównaniu do grupy placebo w 30 i 60 dniu badania. Wyniki te są zgodne z odnotowanym przez Jabłecką i wsp.

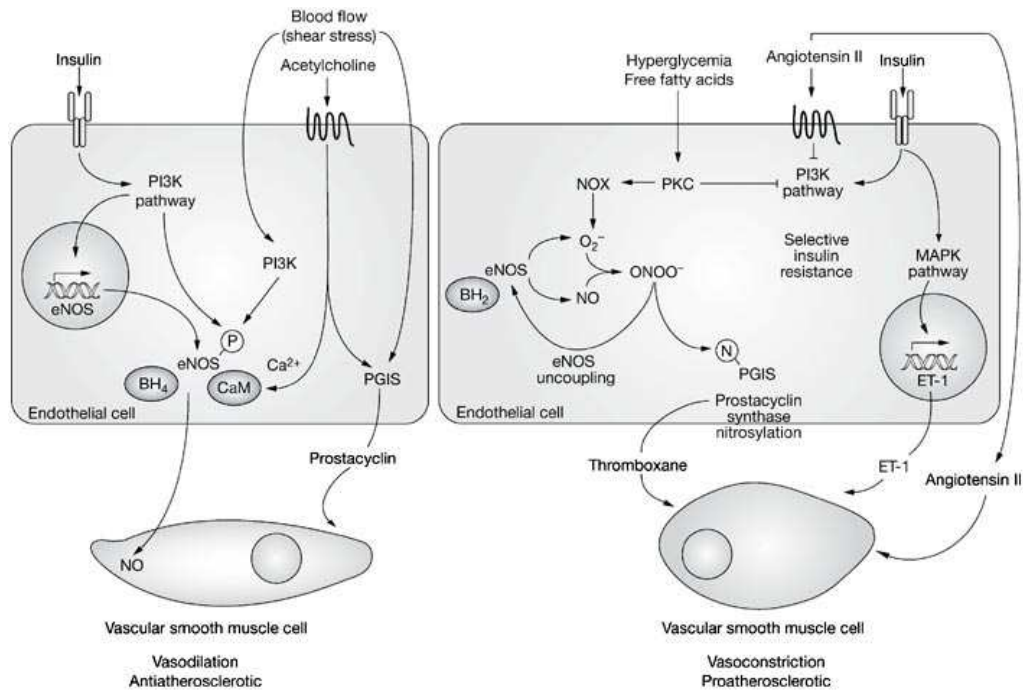


korzystnym wpływem L-argininy na wykładniki stresu oksydacyjnego u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych, którym podawano L-argininę w dawce 6 i 12g/dobę przez 4 tygodnie [185]. Podawanie egzogennej L-argininy i co za tym idzie zwiększenie stężenia tlenu azotu może powodować większy udział tego ostatniego w unieczynnianiu ROS oraz hamowaniu peroksydacji lipidów, nie upośledzając przy tym wazorelaksacji [31,181,205,206]. Reasumując, 60-dniowe podawanie L-argininy powoduje istotne statystycznie wzrosty stężenia NO oraz całkowitego potencjału antyoksydacyjnego osocza (TAS).

Oprócz działania antyoksydacyjnego, L-arginina stymuluje uwalnianie histaminy przez komórki tuczne, co prowadzi do wazodylatacji; obniża aktywność noradrenaliny, co nasila skutki działania endogennych wazodylatorów, takich jak tlenek azotu [207,208]. Wydaje się, że u części pacjentów te mechanizmy mogły zadecydować o wydłużeniu przejścia dystansu bezbólowego w przebiegu chromania przestankowego. Można uznać, iż u tych pacjentów mechanizmami odpowiedzialnymi za działanie L-argininy były: poprawa funkcji wazomotorycznych śródbłonna, potwierdzony w badaniach własnych wzrost syntezy NO w naczyniach, prawdopodobnie obniżenie aktywności endoteliny-1 i angiotensyny II, poprawa współczynnika L-arginina:ADMA, obniżenie stresu oksydacyjnego prezentowane w niniejszej pracy oraz poprawa wrażliwości na insulinę.

Obserwacje te potwierdzają doniesienia Loscalzo [209], który wskazuje potencjalne mechanizmy, poprzez które L-arginina poprawia funkcje śródbłonna naczyniowego. Są nimi: zwiększony transport do komórki i zwiększone poziomy L-argininy w komórce, kompetytywny antagonizm wobec ADMA, działanie antyoksydacyjne, stymulowanie uwalniania histaminy przez komórki tuczne, obniżenie aktywności noradrenaliny, zmiany wewnątrzkomórkowego pH i przeżywalności zależnego od pH oraz wzrost wydzielania insuliny.

Insulina jest słabą i fizjologicznie nieistotną substancją naczyniorozkurczową, istotnie wzmacniającą wazodylatacyjny efekt zależny od śródbłonna indukowany acetylocholiną. Wydaje się, że kluczowe znaczenie dla tego działania ma układ L-arginina- tlenek azotu – prostacyklina oraz współczulny układ nerwowy. Ten ostatni zwiększa swoją aktywność pod wpływem hiperinsulinemii i – jak wskazują badania doświadczalne – jest to raczej efekt pierwotnego działania insuliny niż pobudzenia metabolizmu węglowodanów [210].

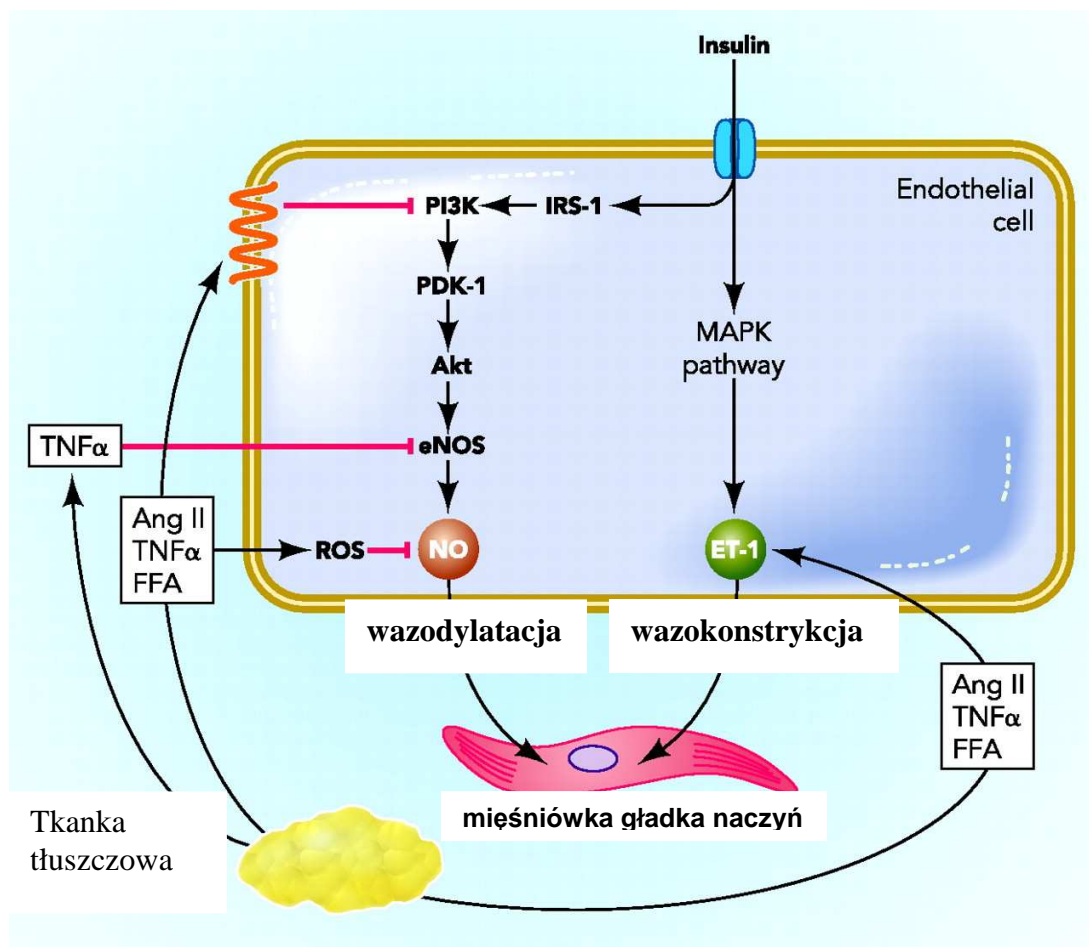


Ryc. 20. Wpływ insuliny na napięcie ściany naczyniowej [211].

U osób szczupłych nawet niewielki wzrost osoczowego stężenia insuliny wywołuje znaczącą aktywację układu współczulnego [210,212] w przeciwieństwie do osób otyłych, u których obserwuje się upośledzenie pobudzenia układu współczulnego na skutek hiperinsulinemii. Ta upośledzona reaktywność współczulna może być efektem współistniejącej insulinooporności i towarzyszącej przewlekłej hiperinsulinemii [213,214]. Jak wcześniej wspomniano, jeżeli efektem zależnego od insuliny pobudzenia współczulnego układu nerwowego, przynajmniej w części, jest działanie naczynioskurczowe, to istnieje wiele danych wskazujących, że insulina pobudza przepływ krwi i zmniejsza opór naczyniowy w mięśniach szkieletowych, co może wyjaśniać korzystny wpływ suplementacji L-argininą na wydłużenie dystansu przejścia bezbólowego u badanych pacjentów. Z danych piśmiennictwa wynika, że podanie NGmonometyl-L-argininy (L-NMMA) - specyficznego inhibitora syntazy tlenu azotu, prowadząc do zahamowania uwalniania tlenu azotu, znosi rozkurcz naczyniowy stymulowany insuliną [215,216]. Stwierdzono ponadto, że insulina wywiera działanie naczyniorozkurczowe poprzez zwiększenie zawartości w komórkach mięśni gładkich naczyń cyklicznego monofosforanu guanozyny (cGMP) w mechanizmie zależnym od tlenu azotu, aktywując transport L-argininy oraz syntazę tlenu azotu [217,218]. Innym możliwym mechanizmem poprawy funkcji śródbłonna jest zmniejszenie stresu

oksydacyjnego, stężenia produktów glikacji, małych gęstych cząstek LDL, a także podatności na oksydację krążących cząstek LDL i związana z tym większa biodostępność egzo- i endogennych nitratów [219,220,221,222]. Ponadto, z uwagi na znaną wrażliwość procesu lipolizy na insulinę, sugerowany jest także udział wolnych kwasów tłuszczowych w mechanizmie poprawy funkcji śródbłonna [223]. Poza tym, L-arginina podawana w formie chlorowodoru może zmieniać korzystnie wewnątrzkomórkowe pH, co wpływa na poziomy wapnia i aktywację eNOS oraz stymuluje nieenzymatyczną redukcję azotynu do tlenku azotu [224]. Jak wynika z wielu doniesień - L-arginina wzmacnia uwalnianie insuliny, która wywołuje wazodylatację [215,216,225]. To ostatnie działanie nie potwierdza się u wszystkich pacjentów uczestniczących w prezentowanym badaniu. Wzrost wydzielania insuliny po podaniu L-argininy obserwowano w badaniach własnych u 57% pacjentów. Wszyscy pacjenci z hiperinsulinemią mieli jednocześnie hiperglikemię, mimo że do badania zakwalifikowano osoby z prawidłowym poziomem glukozy w surowicy krwi. Świadczyć to może o tendencji do rozwoju insulinooporności w tej grupie chorych. Odmiennie wyniki zaprezentował w maju 2012r Monti i wsp. obserwując po 18 miesiącach podawania L-argininy (w dawce 6,4g/dobę) chorym z upośledzoną tolerancją glukozy oraz chorym z zespołem metabolicznym, istotną statystycznie poprawę tolerancji glukozy w obu grupach [226].

Podsumowując, 60-dniowe podawanie L-argininy w dobowej dawce 6g wpływa na zróżnicowanie metaboliczne przejawiające się korzystnym, obojętnym bądź niekorzystnym działaniem na insulinooporność.



Ryc. 21. Wpływ insuliny na produkcję NO i endoteliny I [227].

Z kolei wykluczyć nie można wpływu prozapalnych cytokin (nie ocenianych w badaniach własnych) na wytwarzanie tlenku azotu poprzez zahamowanie aktywności śródbłonkowej syntazy NO i braku efektu wazodylatacyjnego u części badanych pacjentów. Niektóre cytokiny prozapalne takie jak czynnik martwicy nowotworu alfa (TNF- $\alpha$ ), a także angiotensyna II (AngII) i wolne kwasy tłuszczowe (FFA) hamują aktywność kinazy - PI3 (PI3K) i stymulując MAP – kinazę przyczyniają się do obkurczania mięśniówki gładkiej naczyń.

Wiadomo również, że rozkurcz naczyń zależny od śródbłonka pogarsza się z wiekiem, co potwierdzają badania na ludziach. Wykazano wzrost poziomów ADMA z wiekiem oraz bardzo silną zależność między podwyższeniem stężenia ADMA i osłabieniem wazodylatacji zależnej od śródbłonka niezależnie od obciążenia chorobami układu sercowo-naczyniowego [228].

Kolejni badacze znaleźli również zależności pomiędzy podwyższonymi stężeniami ADMA a chorobami układu sercowo-naczyniowego. Podwyższone stężenia asymetrycznej

argininy odnotowywuje się m.in. w chorobie wieńcowej i hipercholesterolemii [229,230]. Potwierdzono również dodatnią korelację pomiędzy stężeniem cholesterolu frakcji LDL (LDL-C) a ADMA [25]. Dlatego też terapia statynami u pacjentów z hipercholesterolemią może powodować obniżenie stężenia ADMA chociaż mechanizmy tego zjawiska pozostają niejasne [231].

Badanie WOSCOPS (*West of Scotland Coronary Prevention Study*), w którym pacjenci z hipercholesterolemią otrzymywali prawastatynę 40mg/doba wykazało obniżenie ryzyka ostrego incydentu wieńcowego w porównaniu z placebo niezależnie od wyjściowego stężenia LDL-C [232]. Badanie ASCOT-LLA (*Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm*) wykazało, iż terapia atorwastatyną (10mg/dobę) redukuje ryzyko zdarzeń sercowo-naczyniowych u pacjentów z nadciśnieniem i co najmniej trzema czynnikami ryzyka bez względu na wyjściowe parametry gospodarki lipidowej [233]. Z kolei Nishiyama i wsp. potwierdził istotną korelację pomiędzy terapią statynami a obniżeniem stężenia ADMA oraz obniżeniem stężenia cholesterolu frakcji LDL u pacjentów z udarem niedokrwiennym [234]. W naszym badaniu nie zaobserwowaliśmy istotnej statystycznie korelacji pomiędzy ADMA a LDL-C.

Nie wiadomo zatem czy korzystny wpływ na poziomy ADMA jest zależny od plejotropowego działania statyn czy wynika z obniżenia stężenia LDL-C przez te związki. Najprawdopodobniej trudności z odpowiedzią na to pytanie mogą być spowodowane niejednorodnym doborem badanych grup i różnicami między charakterystyką profili lipidowych badanych populacji. Jednakże, mimo iż mechanizm korzystnego działania statyn na dysfunkcję śródbłonna nie jest do końca wyjaśniony, bezsporny wydaje się fakt, iż efekt ten związany jest z przywróceniem upośledzonej biodostępności tlenu azotu [235]. Bardzo ważnym postulowanym mechanizmem działania statyn jest bezpośrednia regulacja aktywności eNOS. Wykazano, iż stosowanie statyn poprawia przepływ w naczyniach mózgowych, redukuje rozmiar niedokrwienia oraz poprawia wyniki badań neurologicznych zwierząt z prawidłowym cholesterolem [236]. Podobnie, atorwastatyna redukuje rozmiar niedokrwienia u normocholesterolemicznych myszy w mechanizmie niezależnym od wpływu na poziomy cholesterolu [237]. Powyższe badania sugerują, iż efekt wywierany przez statyny w zaburzeniach miażdżycowych, w tym incydentach niedokrwiennych, może być wyjaśniony wpływem na przywrócenie biodostępności NO, a zatem działaniem poprzez mechanizm niezależny od efektu hipolipemizującego statyn. W naszym badaniu zarówno grupa badana jak i kontrolna przyjmowała simwastatynę w dawce 20 mg/dobę w celu wykluczenia wpływu statyn na wyniki eksperymentu. Odnotowany istotny statystycznie wzrost stężenia tlenu

azotu i spadek stężenia ADMA oraz Hcy w 30 i 60 dniu terapii L-argininą w porównaniu z placebo wydaje się dowodzić korzystnego wpływu właśnie tego aminokwasu na badane parametry.

Kolejnym powodem obniżonej biodostępności tlenu azotu w badanej populacji chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych może być wpływ wyjściowego podwyższonego stężenia homocysteiny (Hcy). Jak wspomniano wcześniej, homocysteina generuje wolne rodniki, które reagując z endotelialnym NO obniżają jego dostępność [238]. Efekt ten może być wzmocniony przez kolejny mechanizm oparty na dodatniej korelacji pomiędzy Hcy a ADMA. Zatem wpływ Hcy na biodostępność tlenu azotu może być modulowany przez poziomy ADMA [239]. Wiele badań potwierdziło związek pomiędzy poziomami ADMA a stresem oksydacyjnym. Jak wspomniano wcześniej ADMA powstaje w komórkach organizmu po metylacji reszt argininowych podczas rozpadu białek. Jest to proces fizjologiczny. Metylowane reszty argininowe są wydalane z moczem, lub w przypadku ADMA i L-NMMA metabolizowane przy udziale enzymu dimetylohydrolazy dimetylargininy (DDAH) [240]. Aktywność tego enzymu jest kluczowa w regulacji metabolizmu ADMA i zapobieganiu jego akumulacji. Endotelialna aktywność DDAH jest redukowana przez Hcy, która przyłącza się do zmodyfikowanego w warunkach stresu oksydacyjnego enzymu hamując jego aktywność [64,65,241]. W badaniach własnych nie dokonywano pomiarów bezpośrednio poziomów DDAH ale odnotowano silną dodatnią korelację ( $p=0,0001$ ) pomiędzy Hcy i ADMA oraz ujemną korelację pomiędzy Hcy, ADMA a poziomami TAS oraz NO co zdaje się potwierdzać wyniki uzyskane przez innych naukowców.

Opierając się na licznych doniesieniach naukowych jak i na badaniach własnych można stwierdzić, iż efekty działania L-argininy zależą od wielu czynników, dlatego też niezbędne jest określenie warunków i wyselekcjonowanie grup pacjentów którzy mogą odnieść największe korzyści z suplementacji tym aminokwasem. Najprawdopodobniej suplementacja L-argininą jest najskuteczniejsza w sytuacjach klinicznych z upośledzoną endotelialną przemianą L-arginina – NO, która zostaje przywrócona po podaniu substratu. Takie sytuacje mogą mieć miejsce gdy następuje zwiększona utrata L-argininy (podczas dializ), podczas zwiększonego metabolizmu L-argininy przez mechanizmy NO-niezależne (indukcja arginazy) lub najczęściej przez obecność podwyższonych poziomów ADMA [242,243,244,245]. Wydaje się, że podawanie L-argininy skutkuje znacznie lepszymi rezultatami u pacjentów we wczesnej fazie aterosklerozy, gdy zmiany funkcjonalne są jeszcze odwracalne, niż u osób z zaawansowanymi zmianami strukturalnymi naczyń. Z badań wynika

również, że niektóre leki (m.in. ACE-inhibitory, blokery receptora AT<sub>1</sub>) stosowane we wtórnej prewencji zawału serca i innych chorób sercowo-naczyniowych nie tylko wpływają na poprawę naczyniową ale również mogą obniżać poziomy ADMA [246]. Zatem pacjenci poddani terapii wielolekowej potencjalnie słabiej mogą reagować na podawanie L-argininy.

Niektóre wyniki badań poddają w wątpliwość zasadność długoterminowej suplementacji L-argininą ze względu na możliwość wytworzenia insulinooporności oraz tolerancji na ten aminokwas.

Reasumując, zróżnicowanie metabolicznego działania L-argininy na parametry gospodarki lipidowej i węglowodanowej uniemożliwia wyodrębnienie subpopulacji chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych w II stopniu skali wg Fontaine'a, którzy odniosą korzyści z 60-dniowej suplementacji L-argininą w dobowej dawce 6g.

## 6. Wnioski

1. Wykazano, że 60-dniowe podawanie L-argininy chorym z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych, niezależnie od rodzaju towarzyszących zaburzeń gospodarki lipidowej, wydłuża dystans przejścia bezbólowego, powoduje wzrost stężenia tlenu azotu oraz zwiększa zdolność antyoksydacyjną osocza.
2. W grupie pacjentów z hipercholesterolemią i hiperlipidemią mieszaną odnotowano istotne statystycznie obniżenia stężenia Hcy i ADMA w osoczu w 60-dniu badania co sugeruje zróżnicowanie korzyści z przyjmowania L-argininy w zależności od rodzaju zaburzeń gospodarki lipidowej. Dodatkowo, zróżnicowanie metabolicznego działania L-argininy, przejawiające się korzystnym, obojętnym bądź niekorzystnym wpływem na insulinooporność oraz wybrane parametry gospodarki lipidowej sprawia, iż nie można jednoznacznie wskazać subpopulacji chorych z zaburzeniami gospodarki lipidowej, która odniosłaby rzeczywiste korzyści z takiej suplementacji.
3. Potwierdzono dobry profil bezpieczeństwa 60-dniowego stosowania L-argininy w dawce 6g/dobę.



## 7. Streszczenie

Dysfunkcja śródbłonna naczyniowego odgrywa kluczową rolę w patogenezie miażdżycy i jej klinicznych manifestacji, między innymi w chorobie niedokrwiennej serca, rozwoju niewydolności serca, udarach mózgu czy miażdżycy kończyn dolnych. Manifestuje się ona zaburzeniem wydzielania NO oraz obniżeniem jego biodostępności, a także zahamowaniem wazodylatacji zależnej od śródbłonna, co razem z towarzyszącym stresem oksydacyjnym prowadzi do całej kaskady niekorzystnych zjawisk proaterogennych, w tym miażdżycy kończyn dolnych. Mimo iż współczesna farmakoterapia przeciwmiażdżycowa obejmuje leki o uznanym działaniu hipolipemizującym oraz plejotropowym, nadal poszukiwane są substancje o innych punktach uchwytu mogące korzystnie wpływać na czynność śródbłonna. Należy do nich L-arginina, aminokwas którego protekcyjny wpływ na endotelium poparty został wieloma badaniami.

Wśród poznanych mechanizmów działania L-argininy na zmieniony miażdżycowo śródbłonek wymienia się między innymi poprawę jego funkcji wazomotorycznych, wzrost syntezy tlenu azotu w naczyniach, obniżenie aktywności endoteliny-1 i angiotensyny II, wpływ na insulinooporność, obniżenie stresu oksydacyjnego oraz antagonistyczne działanie względem asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA).

**Cel pracy:** określenie skuteczności i bezpieczeństwa 60-dniowej suplementacji L-argininy w miażdżycowym niedokrwieniu kończyn dolnych u chorych z różnymi zaburzeniami gospodarki lipidowej poprzez analizę zmian parametrów klinicznych (DPB, WKR-L, WKR-P) i biochemicznych (poziomy NO, TAS, Hcy, ADMA, insuliny). Analiza ta miała na celu udzielenie odpowiedzi na pytanie, czy istnieje zależność pomiędzy odpowiedzią kliniczną i biochemiczną, a rodzajem gospodarki lipidowej w tej grupie chorych.

**Materiał i metodyka.** Do randomizowanego badania włączono 100 pacjentów (62 mężczyzn i 38 kobiet) powyżej 50-tego r. ż. z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych w II stopniu w skali Fontaine'a. Ostatecznie badanie ukończyło 87 osób (50 mężczyzn i 37 kobiet). Badanie miało charakter podwójnie ślepej próby. Uczestników podzielono losowo na dwie grupy: GB - chorzy przyjmujący L-argininę w dawce 6g/dobę, GK - chorzy przyjmujący placebo (grupa kontrolna). W obu grupach wyodrębniono chorych z hipertriacylglicerolemią (TG), hipercholesterolemią (Ch) oraz hiperlipidemią mieszaną (Lm).

Średnia wieku pacjentów w GB wynosiła  $58,74 \pm 7,46$  lata, a w GK  $60,19 \pm 9,05$  lata, a BMI w GB  $24,32 \pm 1,13$  i GK  $24,41 \pm 1,49$ . W zakresie powyższych parametrów grupy były jednorodne. W obu grupach dominowali mężczyźni (GB 26 mężczyzn, GK 20 mężczyzn) ale różnice te również nie były istotne statystycznie. Warunkiem włączenia do

badania były prawidłowe wartości parametrów morfologii krwi obwodowej, gospodarki węglowodanowej, elektrolitowej oraz poziomy CRP, kreatyniny i mocznika. Zarówno grupa badana jak i kontrolna przyjmowała simwastatynę w dawce 20 mg/dobę w celu wykluczenia wpływu statyn na wyniki eksperymentu.

W obu grupach w 0, 30 i 60 dniu eksperymentu przeprowadzono pełne badania podmiotowe, badania przedmiotowe wskaźnika kostka-ramię (WKR), dystansu przejścia bezbólowego na bieżni ruchomej (DPB) oraz badania biochemiczne krwi obejmujące szczegółowy lipidogram, stężenie tlenku azotu (NO), stężenie asymetrycznej dimetyloargininy (ADMA), całkowity potencjał antyoksydacyjny osocza (TAS), stężenie homocysteiny (Hcy), morfologię, stężenie glukozy, insuliny, mocznika i kreatyniny. Do oceny zmian funkcji śródbłonna wybrano oznaczenie NO, TAS, Hcy, ADMA, a do oceny klinicznej DPB oraz WKR. Dodatkowo w całej populacji chorych oznaczono stężenie insuliny oraz insulinooporność wyrażoną wartością wskaźnika HOMA-IR. Statystyczną analizę wyników przeprowadzono przy zastosowaniu programu komputerowego CSS STATISTICA v.7.0 Firmy StatSoft.

**Wyniki.** W badaniu stwierdzono, że zarówno pacjenci otrzymujący L-argininę jak i placebo osiągnęli istotną statystycznie poprawę dystansu przejścia bezbólowego ( $p=0,0001$ ) w 60 dniu badania, jednakże u chorych suplementowanych L-argininą poprawa była istotnie statystycznie wyższa ( $p=0,0001$ ) i wystąpiła już w 30 dniu badania. Natomiast w żadnej z badanych grup nie zaobserwowano zmian wartości WKR, który jest bardzo czułym i swoistym testem w prognozowaniu postępu choroby i skuteczności leczenia zarówno zachowawczego jak i inwazyjnego. We wszystkich grupach przyjmujących L-argininę nastąpił istotny statystycznie wzrost stężenia NO oraz TAS w 30 i 60 dniu badania, w przeciwieństwie do grupy otrzymującej placebo co potwierdza jej pośrednie i bezpośrednie działanie antyoksydacyjne. Ponadto odnotowano także istotne statystycznie obniżenie stężenia ADMA oraz Hcy w podgrupach chorych z hipercholesterolemią i lipidemią mieszaną (GBC<sub>h</sub>, GBL<sub>m</sub>) w 30 i 60 dniu terapii L-argininą w porównaniu z placebo, co wskazuje na korzystny wpływ L-argininy na poprawę funkcji śródbłonna. U 37,0% ( $n=17$ ) chorych zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie stężenia insuliny, a u 6,5% ( $n=3$ ) nie nastąpiła istotna zmiana tego parametru w 60 dniu badania. Wzrost wydzielania insuliny po podaniu L-argininy odnotowano u 56,5% ( $n=26$ ) pacjentów i wszyscy pacjenci z hiperinsulinemią mieli jednocześnie hiperglikemię, mimo, że do badania zakwalifikowano osoby z prawidłowym poziomem glukozy w surowicy krwi. Świadczyć to może o tendencji do rozwoju

insulinooporności w tej grupie chorych. Nie wykazano istotnych statystycznie zależności pomiędzy zmianami stężenia insuliny, a parametrami gospodarki lipidowej.

**Wnioski.** 60-dniowe podawanie L-argininy chorym z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych niezależnie od rodzaju towarzyszących zaburzeń gospodarki lipidowej wydłuża dystans przejścia bezbólowego, powoduje wzrost stężenia tlenu azotu oraz zwiększa aktywność antyoksydacyjną osocza. Odnotowane w grupie pacjentów z hipercholesterolemią i hiperlipidemią mieszaną obniżenie stężenia Hcy i ADMA w osoczu w 60-dniu badania sugeruje zróżnicowanie korzyści z przyjmowania L-argininy w zależności od rodzaju zaburzeń gospodarki lipidowej. Dodatkowo, zróżnicowanie metabolicznego działania L-argininy, przejawiające się korzystnym, obojętnym bądź niekorzystnym wpływem na insulinooporność oraz wybrane parametry gospodarki lipidowej sprawia, iż nie można jednoznacznie wskazać subpopulacji chorych z zaburzeniami gospodarki lipidowej, która odniosłaby korzyści z takiego leczenia. Potwierdzono dobry profil bezpieczeństwa przy 60-dniowym podawaniu L-argininy w dawce 6g/dobę. Wnioski te mogą stanowić rekomendację dla przeprowadzenia dalszych badań nad zastosowaniem klinicznym L-argininy u chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych w zależności od braku bądź towarzyszącej insulinooporności.

## Summary

Endothelial dysfunction plays the crucial role in pathogenesis of ischemic heart disease, cerebral ischemia and atherosclerosis of lower limbs. The dysfunction manifests with disrupted nitric oxide secretion, its decreased bioavailability and endothelium-dependent vasodilatation as well. Along with oxidative stress, these mechanisms lead to proatherogenic cascade. Despite of hypolipemic or pleiotropic medications in atherosclerosis treatment, there is still need for new molecules which would improve endothelium functioning. One of them is L-arginine, which protective influence on endothelium has been shown in many trials.

It has been stated, that L-arginine improves endothelial vasomotoric functions, increases nitric oxide synthesis, reduces oxidative stress, activity of endothelin 1 and angiotensin II. It also has a beneficial effect on insulin resistance and acts antagonistically to asymmetric dimethylarginine (ADMA).

**Aim of the study.** The aim of the study was to assess the efficacy and safety of L-arginine supplementation for sixty days in patients with lipid dysregulation and with peripheral arterial disease of lower limbs. L-arginine efficacy was measured with clinical parameters such as pain-free walking distance and ankle-brachial index (ABI) and as a repeated laboratory tests

with nitric oxide, insulin, ADMA, total antioxidant status (TAS) and homocysteine evaluations. The assessment of association between clinical and laboratory parameters during L-arginine administration and sort of lipid disorder was primary aim of the study.

**Materials and methods.** One hundred patients (62 men and 38 women) were included into randomized, double-blind trial. All patients were above 55 years old and suffered from peripheral arterial disease of lower limbs, stage II in Fontaine scale. 87 patients completed the study (50 men and 37 women). Participants were randomized into group obtaining 6 g of L-arginine daily (GB group) and control group with placebo (GK group). Both groups were further divided into subgroups of patients with hypertriglyceridemia (Tg), hypercholesterolemia (Ch) and mixed hyperlipidemia (Lm).

Mean patients' age was  $58,74 \pm 7,46$  in GB group and  $60,19 \pm 9,05$  in GK group. Mean BMI value in GB group was  $24,32 \pm 1,13$  and  $24,41 \pm 1,49$  in GK group. There were no significant differences between groups regarding age and BMI value. In both groups men were in prevalence, however these differences were non-significant.

Before the beginning of the study every participant underwent laboratory tests which assured that the results of complete blood count, glucose, electrolytes, urea, creatinine and C-reactive protein were within limits. Tests were repeated after thirty and sixty days.

Full physical examination, ABI and pain-free walking distance assessment were performed at day 0, 30 and 60, accompanied by laboratory tests, which included Tg, Ch, LDL, HDL, nitric oxide, ADMA, TAS and homocysteine concentration. Changes of NO, ADMA, Hcy and TAS were chosen as indicators of endothelial functioning. Clinical changes were evaluated by comparing ABI and pain-free walking distance results. Additionally, insulin and insulin resistance as HOMA-IR were measured in every patient. Participants in both groups were administered 20 mg simvastatin daily in order to exclude its influence on results. Statistical analysis was performed using CSS STATISTICA 7.0 StatSoft software.

**Results.** The patients in both groups improved significantly their pain-free walking distance after 60 days of treatment, however in GB group improvement was higher than in GK group ( $p=0,0001$ ) and occurred already after 30 days. Neither in L-arginine, nor in placebo group changes in ABI were observed. NO and TAS concentrations increased significantly in GB group after 30 and 60 days. ADMA and Hcy levels were decreased in GB subgroups with hypercholesterolemia and mixed hyperlipidemia.

A significant decrease in insulin release was observed in 37,0% ( $n=17$ ) of patients. No changes in hormone output were observed in 6,5% of patients ( $n=3$ ) after 60 days. Increased insulin release was proved in 26 patients (56,5%), and every patient with hyperinsulinemia

had also hyperglycemia, although at the beginning of the study the results were within range. No association between changes in insulin concentrations and lipid balance was found.

**Conclusions.** 60-day L-arginine supplementation of patients with peripheral arterial disease of lower limbs improved pain-free walking distance, increased NO and TAS levels, independently from the accompanying lipid disorders. Decreased concentration of ADMA and Hcy in patients with hypercholesterolemia and mixed hyperlipidemia after 60 days of L-arginine administration suggests that the beneficial effect of L-arginine differs according to underlying lipid disorders. Observed differences in metabolic effect of L-arginine on lipid profile and insulin resistance make it impossible, at the moment, to decide in which subgroup of patients with lipid disorders L-arginine administration could be favorable. The good safety profile of 60-day L-arginine supplementation in a dose of 6g/day was confirmed. These conclusions can provide a recommendation for further research to clinical application of L-arginine in patients with peripheral arterial disease of lower limbs, depending on the absence or presence of insulin resistance.

## 8. Piśmiennictwo

1. Bolewski A, Plewa R, Siminak T: Udział czynników zapalnych w patogenezie miażdżycy. *Pol Prz Kard* 2003; 5 (1): 61-9.
2. Skoczyńska A: Teorie powstawania miażdżycy. Rozdz. w: „Patogeneza miażdżycy.” Elsevier Urban & Partner Sp. z.o.o., Wrocław 2006: 1-6.
3. Banach M, Markuszewski L, Zastónka J i wsp.: Rola zapalenia w patogenezie miażdżycy. *Przeegl Epidemiol* 2004; 58: 663-70.
4. Skoczyńska A: Patogeneza miażdżycy. Rozdz. w: „Miażdżycy u dzieci i młodzieży.” Red.: Urban M., Cornetis Sp. z.o.o., Wrocław 2007: 22-47.
5. Dziekiewicz M, Wiśniewski P: Miażdżycy – co obecnie o niej wiadomo?. *Acta Angiol* 2007; 13 (4): 137-43.
6. Ross R: Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-26.
7. Pasiński T, Gaciong Z: Rozwój i regresja miażdżycy. *Angiologia, PZWL* 2004.
8. Witz JJ, Byrne J, Clagett GP i wsp.: Diagnosis and treatment of chronic arterial insufficiency of the lower extremities: Critical Review. *Circulation* 1996; 94 (11): 3026-49.
9. Banach M, Okoński P: Patogeneza miażdżycy– aktualny stan wiedzy. *Lek w Polsce* 2004; Vol 14, (163): 34-48.
10. Bręborowicz A: Choroba niedokrwienności serca. w: *Zarys Patofizjologii Narządowej*. DWU AM im.K.Marcinkowskiego Poznań 2003; 150-2.
11. Schneider Z: Molekularne aspekty miażdżycy. *Postępy Biologii Komórki* 1998; 25 (10): 157-94.
12. Management of peripheral arterial disease (PAD). TransAtlantic Inter Society Consensus (TASC).Section B: intermittent claudication. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000 Jun;19 Suppl A:S47-S243.
13. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA i wsp.: TASC II Working Group: Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg* 2007; 45 (1): S5A-S67A.
14. Meru AV, Mitra S, Thyagarajan B i wsp.: Intermittent claudication: An overview. *Atherosclerosis* 2006; 187(2): 221-37.
15. Criqui MH, Langer RD, Fronek A i wsp.: Mortality over a period of 10 years in patients with peripheral arterial disease. *N Engl J Med* 1992; 326 (6): 381-6.

16. Zapalski S: Chirurgiczne choroby naczyń. Nadciśnienie wrotne. Rozdz. w: „Chirurgia dla studentów medycyny”. Red.: Fibak J. i wsp., PZWL Warszawa 1996: 313-9.
17. Mugge A: The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Z Kardiol* 1998; 87(11): 851-64.
18. <http://www.terapia.com.pl/archiwum/pub.html?pub=13&edition=8>
19. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE i wsp.: Beyond cholesterol modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989; 320(14): 915-24.
20. Luscher TF, Oemar BS, Boulanger CM i wsp.: Molecular and cellular biology of endothelin and its receptors -Part II. *J Hypertens* 1993; 11(2): 121-6.
21. Davies MG, Hagen PO: The vascular endothelium. A new horizon. *Ann of Surgery* 1993; 218: 593-609.
22. Rossi GP, Seccia TM, Nussdorfer GG. Reciprocal regulation of endothelin-1 and nitric oxide: relevance in the physiology and pathology of the cardiovascular system. *Int Rev Cytol* 2001; 209: 241-72
23. Skoczyńska A: Patogeneza miażdżycy. W: (red.) Urban M. Miażdżycza u dzieci i młodzieży. Cornetis Wrocław 2007; (2) 34-7.
24. Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA i wsp.: Investigation of decreased availability of nitric oxide precursor as the mechanism responsible for impaired endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23(4): 844-50.
25. Boger RH, Bode-Boger SM, Szuba A. i wsp.: Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk factor for endothelial dysfunction: its role in hypercholesterolemia. *Circulation* 1998; 98(18): 1842-7.
26. Chan JR, Böger RH, Bode-Böger SM i wsp.: Asymmetric dimethylarginine increases mononuclear cell adhesiveness in hypercholesterolemic humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(4): 1040-6.
27. Kojda G, Harrison D.: Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 1999; 43(3): 562-71.
28. Sibal L, Agarwal SC, Home PD i wsp.: The role of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in endothelial dysfunction and cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev* 2010; 6(2): 82-90.
29. Cooke JP: ADMA: its role in vascular disease. *Vasc Med* 2005;10:S11.

30. Cooke JP: Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(9): 2032-7.
31. O'Donnell VB, Freeman BA: Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways: implications for vascular disease. *Circ Res* 2001; 88(1): 12-21.
32. Stroes ES, Koomans HA, de Bruin TW i wsp.: Vascular function in the forearm of hypercholesterolaemic patients off and on lipid-lowering medication. *Lancet* 1995; 346:467-71.
33. Williams S, Cusco J, Roddy M i wsp.: Impaired ntric oxide-mediated vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 567-74.
34. Gokce N: L-Arginine and Hypertension. *J Nutr* 2004; 134(10): 2807S-2811.
35. Salvemini D, Ischropoulos H, Cuzzocrea S: Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods Mol Biol* 2003; 225: 291–303.
36. Maas R, Schwedhelm E, Boger RH i wsp.: Simultaneous assessment of endothelial function, nitric oxide synthase activity, nitric oxide–mediated signaling, and oxidative stress in individuals with and without hypercholesterolemia. *Clin Chem* 2008; 54(2): 292-300.
37. Maarsingh H, Leusink J, Bos IS i wsp.: Arginase strongly impairs neuronal nitric oxide-mediated airway smooth muscle relaxation in allergic asthma. *Respir Res* 2006; 7 :6.
38. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA: Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-41.
39. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *The FASEB Journal* 1992; 6: 3051-64.
40. Anggard E: Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *The Lancet* 1994, 343:1199-1206.
41. Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol* 1995; 57: 707-36.
42. Mayer B. Biochemistry and molecular pharmacology of nitric oxide synthases. W: (red.) Vincent SR Nitric oxide in the nervous system. Academic Press, London, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo and Toronto. 1995, 21-42.
43. O'Connor R, Jenson J, Devaney: NO contributes to proliferative suppression in a murine model of filariasis. *Infection and Immunity* 2000; 68: 6101-7.



44. Huang F, Niedbala W, Wei X i wsp.: Nitric oxide regulates Th 1 cell development through the inhibition of IL- 12 synthesis by macrophages. *European Journal of Immunology* 1998; 28: 4062-4070.
45. Wei X, Charles I, Smith A i wsp.: Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375: 408-411.
46. Napoli C, Ignarro LJ: Nitric oxide and atherosclerosis. *Biol.Chem.*2001; 5 (2): 88-97
47. Cylwik D, Mogielnicki A, Buczek W: L-arginine and cardiovascular system. *Pharmacological Reports* 2005; 57: 14-22.
48. Raghavan SAV, Dikshit M: Vascular regulation by the L-arginine metabolites, nitric oxide and agmatine. *Pharmacol Res* 2004; 49:397-414.
49. Pritchard KA, Groszek L, Smalley DM i wsp.: Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide generation of superoxide anion. *Circ Res* 1995; 77: 510-8.
50. Gokce N, Keaney JF Jr, Frei B i wsp.: Long-term ascorbic acid administration reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1999; 99: 3234–40.
51. Yamamoto A, Hoshi K, Ichihara K: Fluvastatin, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, scavenges free radicals and inhibits lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Eur J Pharmacol* 1998; 361: 143–149.
52. Antos D, Enders G, Rieder G: Inducible nitric oxidessynthase expression before and after eradication of *Helicobacter pylori* different forms of gastritis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 30(2): 127-131.
53. Feng CW, Wang LD, Jiao LH i wsp.: Expression of p53, inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in gastric precancerous lesions: correlation with clinical features. *BMC-Cancer* 2002; 2(1): 8.
54. Xia HH, Halley NJ: Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(1): 16-26.
55. Weiner CP, Lizasoain I, Moncada S i wsp.: Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(11) :5212-6.
56. Tracey WR, Xue C, Klinghofer V i wsp.: Immunochemical detection of inducible NO synthase in human lung. *Am J Physiol* 1994;266(6 Pt 1):L722-7.
57. Marletta MA: Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268(17): 12231-4.

58. Marletta MA: Nitric oxide synthase: function and mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 1993, 338:281-4.
59. Kuchan MJ, Frangos JA: Role of calcium and calmoduline in flow-induced nitric oxide production in endothelial cells. *Am J Physiol* 1994; 266: C628-C636.
60. Uematsu M, Ohara Y, Navas JP i wsp.: Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 1995; 269: C1371-C1378.
61. Korbut R, Trąbka-Janik E, Gryglewski RJ: Cytoprotection of human polymorphonuclear leukocytes by stimulators of adenylate and guanylate cyclases. *Eur J Pharmacol* 1989; 165: 171-172.
62. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-526.
63. Hecker M, Mitchell JA, Swierkosz TA i wsp.: Inhibition by L-glutamine of the release of endothelium-derived relaxing factor from cultured endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1990, 101, 237 -239.
64. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S i wsp.: Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 1999; 99: 3092-5.
65. Stuhlinger MC, Tsao PS, Her JH i wsp.: Homocysteine impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation* 2001; 104:2569-75.
66. Lin KY, Ito A, Asagami T i wsp.: Impaired nitric oxide synthase pathway in diabetes mellitus: role of asymmetric dimethylarginine and dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Circulation* 2002; 106: 987-92.
67. Weis M, Kledal TN, Lin KY i wsp.: Cytomegalovirus infection impairs the nitric oxide synthase pathway: role of asymmetric dimethylarginine in transplant arteriosclerosis. *Circulation* 2004; 109: 500-5.
68. Azuma H, Sato J, Hamasaki H i wsp.: Accumulation of endogenous inhibitors for nitric oxide synthesis and decreased content of L-arginine in regenerated endothelial cells. *Br J Pharmacol* 1995; 115: 1001-4.
69. Leiper J, Nandi M, Torondel B i wsp.: Disruption of methylarginine metabolism impairs vascular homeostasis. *Nat Med* 2007; 13(2): 198-203.
70. Konya L, Bencsath P, Szenasi G i wsp.: Effect of free radicals in ischemic renal failure in the dog. *Acta Physiol Hungar* 1990; 76: 319-331.

71. Korthuis RJ, Granger DN: Mechanisms of Ischemia/reperfusion Injury. *Ann Rev Physiol* 1995; 57: 311-32.
72. Boger RH, Bode-Boger SM, Sydow K i wsp.: Plasma concentration of asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, is elevated in monkeys with hyperhomocyst(e)inemia or hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1557-64.
73. Palomo I, Contreras A, Alarcón LM i wsp.: Elevated concentration of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in individuals with metabolic syndrome. *Nitric Oxide* 2011; 24(4): 224-8.
74. Rector TS, Bank AJ, Mullen KA i wsp.: Randomized, double-blind, placebo-controlled study of supplemental oral L-arginine in patients with heart failure. *Circulation* 1996; 93(12): 2135-41.
75. Boger GI, Rudolph TK, Maas R. i wsp.: Asymmetric dimethylarginine determines the improvement of endothelium-dependent vasodilation by simvastatin: Effect of combination with oral L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(23): 2274-82.
76. Boger RH: The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res* 2003; 59(4): 824-33.
77. Cooke JP: Asymmetrical dimethylarginine: the Uber marker? *Circulation* 2004; 109(15): 1813-8.
78. Wanby P, Teerlink T, Brudin L i wsp.: Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as a risk marker for stroke and TIA in a Swedish population. *Atherosclerosis* 2006; 185: 271-7.
79. Wald DS, Law M, Morris JK: Homocysteine and cardiovascular disease: evidence an causality from a meta-analysis. *BMJ* 2002; 325: 1202.
80. Sierakowska-Fijałek A, Karczmarek P, Pokoca L i wsp.: Homocysteina i wybrane parametry przemiany lipidowej u dzieci z czynnikami ryzyka miażdżycy tętnic. *Pol Merk Lek* 2007; 22,128: 146-149.
81. Wieczorek P, Partyka R, Strawa R i wsp.: Przydatność oznaczeń homocysteiny w diagnostyce miażdżycy naczyń. *Ann Soc Stud Acad Med Siles* 2004; 30: 71-78.
82. Kokocińska D, Cierpka L, Chmiel B i wsp.: The usefulness of assessing the serum levels of homocysteine in diagnosis of atherosclerosis. *Acta Angiol* 2005; 11(2): 114-120.
83. Skorupski W, Łaciński M, Cieśliński A i wsp.: Ocena wpływu poziomu homocysteiny na rozwój zmian miażdżycowych w tętnicach wieńcowych na tle innych wybranych

- czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca – doniesienie wstępne. *Kard. Pol.* 2002; 57, 2: II-137.
84. Sawicki R, Musiał WJ, Skibińska E i wsp.: Choroba niedokrwienność serca a zespół metaboliczny – korelacja wybranych czynników ryzyka rozwoju miażdżycy z nasileniem zmian w tętnicach wieńcowych. *Prz Kardiodiabetol* 2007; 2(1): 19-26.
  85. Piechota W, Piechota W.: Korelacja stężeń homocysteiny ze zmianami w tętnicach wieńcowych u mężczyzn z objawami choroby niedokrwiennej serca. *Pol Prz Kard* 2004; 6(4): 401-406.
  86. Tykarski A, Posadzy-Mańczyńska A, Rywik S i wsp.: Stężenie homocysteiny w surowicy krwi – nowego czynnika ryzyka wieńcowego – u dorosłych mieszkańców naszego kraju. Wyniki programu WOBASZ. *Kard Pol* 2005; 63, 6 supl. 4: S659-S662.
  87. Bald E: Homocysteina, niegdyś egzotyczny metabolit. Rozdz. w: „Biotiole w warunkach fizjologicznych, patologicznych i w terapii.” Red.: Włodek L., Wydaw. Uniwersytetu Jagiellońskiego, Kraków 2003, 73-108.
  88. Domagała TB: Rodzinna hiperhomocysteinemia a miażdżycy tętnic. *Medycyna Praktyczna*, Kraków 2002, 9-29.
  89. Skoczyńska A: Homocysteina – czynnik aterogenny. Rozdz. w: „Patogeneza miażdżycy.” Elsevier Urban & Partner Sp. z.o.o., Wrocław 2006, 55-60.
  90. Naruszewicz M: Homocysteina w patogenezie miażdżycy. *Czyn Ryzyka* 2005; supl. 11: 4-5.
  91. Krzanowski M, Domagała TB, Frołow M i wsp.: Hiperhomocysteinemia po doustnym obciążeniu metioniną upośledza zależną od śródbłonna rozszerzalność tętnic u chorych z miażdżycą. *Kard Pol* 2000; 52(5): 345-346.
  92. Kraczkowska S, Suchocka Z, Pachecki J: Podwyższone stężenie homocysteiny we krwi jako wskaźnik zagrożenia zdrowia. *Biul Wyd. Farm AMW* 2005; 3: 4-13.
  93. Bogdański P, Dytfeld J, Kujawska-Łuczak M i wsp.: Ocena stężenia homocysteiny i wybranych markerów stanu zapalnego u chorych z nadciśnieniem tętniczym. *Endokr Otyłość* 2007; 3(2): 61.
  94. Gaciong Z: Nadciśnienie tętnicze, hiperhomocysteinemia i kwas foliowy. *Czyn Ryzyka* 2005; supl. 11: 11.
  95. Lewandowski K: Hyperhomocysteinemia jako czynnik ryzyka rozwoju zmian naczyniowych. *Acta Haemat Pol* 1998; 29(7): 157-169.

96. Banecka-Majkutlewicz Z, Gąsecki D, Jakóbkiewicz-Banecka J i wsp.: Hiperhomocysteinemia – ważny czynnik ryzyka udaru mózgu. *Udar Mózgu* 2005; 7(2): 61-65.
97. Moga M, Wysocki H: Aktualne koncepcje rozwoju blaszki miażdżycowej. *Forum Kard.* 2004; 9(2): 41-46.
98. McCully KS: Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969; 56: 111-128.
99. Sokołowska J: Historia badań nad miażdżycą oraz rolę homocysteiny w patogenezie zmian miażdżycowych. *Now Lek* 2003; 72(6): 473-476.
100. Piechota W, Piechota W: Hiperhomocysteinemia – znaczenie w chorobach sercowo-naczyniowych. *Kard Dypł* 2007; 6(2): 106-107, 110-114.
101. Supiński W, Głuszek J, Pawlak A i wsp.: Czy obniżenie homocysteiny po podaniu witamin B może zmniejszać liczbę powikłań sercowo-naczyniowych ? *Czyn Ryzyka* 2007; 2: 29-37.
102. Bogdański P, Pupek-Musialik D, Jabłecka A i wsp.: Ocena stężenia homocysteiny i wybranych markerów procesu zapalnego u chorych z klinicznymi cechami insulinooporności. *Diabet Dośw Klin* 2003; 3(3): 261-267.
103. Girolani B, Bernardi E, Prins MH i wsp.: Treatment of intermittent claudication with physical training, smoking cessation, pentoxifylline or nafronyl: a meta-analysis. *Arch Intern Med* 1999; 159: 337-45.
104. Pasternak RC, Grundy SM, Levy D i wsp.: Bethesda Conference matching the intensity of risk factor management with hazard for coronary disease events. Task Force 3 Spectrum of risk factors for coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 978-90.
105. Dawson DL, Cutler BS, Hiatt WR i wsp.: A comparison of cilostazol and pentoxifylline for treating intermittent claudication. *Am J Med* 2000; 109: 523-30.
106. Igawa T, Tani T, Chijiwa T i wsp.: Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. *Thromb Res* 1990; 57: 617-23.
107. Sorkin EM, Markham A: Cilostazol. *Drugs Aging* 1999; 14: 63-71.
108. Dawson DL, Cutler BS, Meissner MH i wsp.: Cilostazol has beneficial effects in treatment claudication: results from a multicenter, randomized, prospective, double-blind trial. *Circulation* 1998; 98: 678-86.

109. Money SR, Herd JA, Isaacsohn JL i wsp.: Effect of cilostazol on walking distances in patients with intermittent claudication caused by peripheral vascular disease. *J Vasc Surg* 1998; 27: 267-74.
110. Beebe HG, Dawson DL, Cutler BS i wsp.: A new pharmacological treatment for intermittent claudication: results of a randomized, multicenter trial. *Arch Intern Med* 1999; 159: 2041-50.
111. D'Hooge D, Leher P, Clement DL: Naftidrofuryl in quality of life (NIQOL). A Belgian Study. *Int Angiol* 2001; 20(4): 288-94.
112. Moody AP, Al-Khaffaf HS, Leher P i wsp.: An evaluation of patients with severe intermittent claudication and the effect of treatment with naftidrofuryl. *J Cardiovasc Pharma-col* 1994; 23 (Suppl. 3): S44-S47.
113. Truestein G, Bisler H, Kluken N i wsp.: Buflomedil in arterial occlusive disease: results of a controlled multicenter study. *Angiology* 1984; 35: 500-5.
114. Moher D, Pham B, Ausejo M i wsp.: Pharmacological management of intermittent claudication. A meta-analysis of randomized trials. *Drugs* 2000; 59: 1057-70.
115. Solomon SA, Ramsay LE, Yeo WW i wsp.: Beta blockade and intermittent claudication: placebo controlled trial of atenolol and nifedipine and their combination. *BMJ* 1991; 303: 1100-4.
116. Cameron HA, Walter PC, Ramsay LE: Placebo-control-led trial of ketanserin in the intermittent claudication. *Angiology* 1987; 38: 549-55.
117. Bagger JP, Helligsoe P, Randsbaek F i wsp.: Verapamil in intermittent claudication. *Circulation* 1997; 95: 411-14.
118. Kleijnen J, Mackerras D: Vitamin E for intermittent claudication (Cochrane Review). *The Cochrane Library* 2001; Issue 1.
119. The ICAI study group. Prostanoids for chronic critical leg ischemia: a randomized, controlled, open-label trial with prostaglandin E1. *Ann Intern Med* 1999; 130: 412-21.
120. Lievre M, Morand S, Besse B: Oral beraprost sodium, a prostaglandin 12 analogue, for intermittent claudication. A double-blind, randomized, multicenter controlled trial. *Circulation* 2000; 102: 426-31.
121. Brevetto G, Pena S, Saba C i wsp.: Propionyl-L-carnitine in intermittent claudication: double-blind, placebo-control-led, dose titration, multicenter study. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1411-16.

122. Ledermann RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD i wsp.: Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication. The TRAF-FIC study. *Lancet* 2002; 359: 2053-8.
123. Hedin SG: Eine methode das lysin zu isolieren, nebst einigen Bemerkungen uber das lysatinin. *Z Physiol Chem* 1895; 21:297–305.
124. Krebs HA, Henseleit H: Untersuchungen ueber die Harnstoffbildung im Tierkoerper. *Z Physiol Chem* 1932; 210:33–66.
125. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373–76.
126. Furchgott RF: Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ Res* 1983; 53: 557-573.
127. Rapoport LJ, Murad F: Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in the rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 1983; 52: 352-357.
128. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S: Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664–66.
129. Lev-Ram V, Makings L, Keitz P i wsp.: Long-term depression in cerebellar Purkinje neurons results from coincidence of nitric oxide and depolarization-induced  $Ca^{2+}$  transients. *Neuron* 1995; 15: 407-415. NOS inhibitors decrease hypoxia-induced ATP reductions in respiring cerebrocortical slices.
130. Litt L, Espanol MT, Hasegawa K I wsp.: *Anesthesiology* 1999; 90(5): 1392-401.
131. Lepore DA, Kozlov AV, Stewart AG i wsp.: Nitric oxide synthase - independent generation of nitric oxide in rat skeletal muscle ischemia - reperfusion injury. *Nitric oxide* 1999; 3: 75-84.
132. Li RCX, Ping P, Zhang Z i wsp.: PKC Modulates NF -and AP-1 via Mitogen Activated Protein Kinases in Adult Rabbit Cardiomyocytes. *Am J Physiol* 2000; 279: 1679-89.
133. Kędziora - Kornatowska K, Tkaczewski W, Błaszczuk J i wsp.: Oxygen metabolism in blood of patients with gastric and duodenal ulcer disease .*Hepatogastroenterology* 1995; 42(3): 246-9.
134. Maher TJ: L-arginine. Continuing education module. 2000; New Hope Institute.
135. Merimee TJ, Rabinowitz D, Riggs L i wsp.: Plasma growth hormone after arginine infusion. Clinical experiences. *N Engl J Med* 1967; 276(8): 434-9.

136. Kikuta K, Sawamura T, Miwa Si wsp.: High-affinity arginine transport of bovine aortic endothelial cells is impaired by lysophosphatidylcholine. *Circ Res* 1998; 83(11): 1088-96.
137. Kurose I, Wolf R, Grisham MB: Microvascular responses to inhibition of nitric oxide: role of active oxidants. *Circ Res* 1995; 76: 30-39.
138. Loscalzo J: What we know and don't know about L-arginine and NO. *Circulation* 2000; 101: 2126-9.
139. McDonald KK, Zharikov S, Block ER i wsp.: A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric-oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* 1997; 272(50): 31213-6.
140. Nakaki, T. and K. Hishikawa, [The arginine paradox]. *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 2002. 119(1): p. 7-14.
141. Boger RH: The Pharmacodynamics of L-arginine. *J Nutr* 2007; 137: 1650S-5S.
142. Li C, Huang W, Harris MB i wsp.: Interaction of the endothelial nitric oxide synthase with the CAT-1 arginine transporter enhances NO release by a mechanism not involving arginine transport. *Biochem J* 2005; 386(Pt 3): 567-74.
143. Shin S, Mohan S, Fung HL: Intracellular L-arginine concentration does not determine NO production in endothelial cells: implications on the "L-arginine paradox". *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 414(4): 660-3.
144. Boger RH: Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, Explains the "L-Arginine Paradox" and Acts as a Novel Cardiovascular Risk Factor. *J Nutr* 2004; 134(10): 2842S-2847.
145. Boger RH: L-arginine therapy in cardiovascular pathologies: beneficial or dangerous? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2008; 11: 55-61.
146. Drexler H, Zeiher AM, Meinzer K i wsp.: Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine. *Lancet* 1991; 338(8782-8783): 1546-50.
147. Creager MA, Gallagher SJ, Girerd XJ i wsp.: L-arginine improves endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1992; 90(4): 1248-53.
148. Gonzalez-Cadavid NF, Rajfer J: The pleiotropic effects of inducible nitric oxide synthase (iNOS) on the physiology and pathology of penile erection. *Curr Pharm Des* 2005; 11(31): 4041-6.



149. Herrera M, Garvin JL: Recent advances in the regulation of nitric oxide in the kidney. *Hypertension* 2005; 45(6): 1062-7.
150. Kapoor M, Kojima F, Appleton I i wsp.: Major enzymatic pathways in dermal wound healing: current understanding and future therapeutic targets. *Curr Opin Investig Drugs* 2006; 7(5): 418-22.
151. Luiking YC, Poeze M, Ramsay G i wsp.: The role of arginine in infection and sepsis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 2005; 29(1 Suppl): S70-4.
152. Bronte V, Zanovello P: Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(8): 641-54.
153. Wu G, Meiniger CJ: Arginine nutrition and cardiovascular function. *J Nutr* 2000; 130: 2626-9.
154. Preli RB, Klein KP, Herrington DM: Vascular effects of dietary L-arginine supplementation. *Atherosclerosis* 2002; 162:1-15.
155. Schulman SP, Becker LC, Kass DA i wsp.: L-arginine Therapy in Acute Myocardial Infarction. The Vascular Interaction With Age in Myocardial Infarction (VINTAGE MI) Randomized Clinical Trial. *JAMA* 2006; 295 (1): 58-64.
156. Wilson AM, Harada R, Nair N i wsp.: L-arginine Supplementation in Peripheral Arterial Disease: No Benefit and Possible Harm. *Circulation* 2007; 116: 188-195.
157. Chen L, Zeng X, Wang J i wsp.: Roles of tetrahydrobiopterin in promoting tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 2010; 177(5): 2671-80.
158. Vanella L, Di Giacomo C, Acquaviva R i wsp.: The DDAH/NOS pathway in human prostatic cancer cell lines: antiangiogenic effect of L-NAME. *Int J Oncol* 2011; 39(5): 1303-10.
159. Ma Q, Wang Z, Zhang M i wsp.: Targeting the L-arginine-nitric oxide pathway for cancer treatment. *Curr Pharm Des* 2010; 16(4): 392-410.
160. Goumas G, Tentolouris C, Tousoulis D i wsp.: Therapeutic modification of the L-arginine-eNOS pathway in cardiovascular diseases. *Atherosclerosis* 2001; 154: 255-267.
161. Moller P, Bergström J, Eriksson S i wsp.: Effect of aging on free amino acids and electrolytes in leg skeletal muscle. *Clin Sci* 1979; 56: 427-32.
162. Moller P, Alvestrand A, Bergstrom J i wsp.: Electrolytes and free amino acids in leg skeletal muscle of young and elderly women. *Gerontology* 1983; 29:1-8.

163. Schwedhelm E, Maas R, Freese R i wsp.: Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of oral L-citrulline and L-arginine: impact on nitric oxide metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 2008; 65(1): 51-9.
164. Wu G, Meininger CJ, Knabe DA i wsp.: Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000; 3(1): 59-66.
165. Bode-Boger SM, Boger RH, Galland A i wsp.: L-arginine-induced vasodilation in healthy humans: pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship. *Br J Clin Pharmacol* 1998; 46(5): 489-97.
166. Boger RH, Bode-Boger SM: The clinical pharmacology of L-arginine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 79-99.
167. Tangphao O, Grossmann M, Chalon S i wsp.: Pharmacokinetics of intravenous and oral L-arginine in normal volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1999; 47:261–66
168. Bode-Boger SM, Boger RH, Creutzig A i wsp.: L-arginine infusion decreases peripheral arterial resistance and inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Clin Sci* 1994; 87: 303–10
169. Aoyagi K: Inhibition of arginine synthesis by urea: a mechanism for arginine deficiency in renal failure which leads to increased hydroxyl radical generation. *Mol Cell Biochem* 2003; 244(1-2): 11-5.
170. Reis DJ, Regunathan S: Agmatine: an endogenous ligand at imidazoline receptors is a novel neurotransmitter. *Ann N Y Acad Sci* 1999; **881**: 65-80.
171. Reis DJ, Regunathan S: Is agmatine a novel neurotransmitter in brain? *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21(5): 187-93.
172. Li G, Regunathan S, Barrow CJ i wsp.: Agmatine: an endogenous clonidine-displacing substance in the brain. *Science* 1994; 263(5149): 966-9.
173. Gonçalves ES, Rabelo CM, Prado Neto AX i wsp.: Effect of short-term ornithine alpha-ketoglutarate pretreatment on intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2011; 26 Suppl 1:2-7.
174. Silbernagl S: The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev* 1988; 68: 911-1007
175. Dantzer WH, Silbernagl S: Basic amino acid transport in renal papilla: microinfusion of Henle's loops and vasa recta. *Am J Physiol Renal Physiol* 1993; 265: F830–F838.
176. Chowienczyk PJ, Watts GF, Cockcroft JR i wsp.: Sex differences in endothelial function in normal and hypercholesterolaemic subjects. *Lancet* 1994; 344(8918): 305-6.

177. Tsao PS, McEvoy LM, Drexler H i wsp.: Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 1994; 89(5): 2176-82.
178. Clarkson P, Adams MR, Powe AJ i wsp.: Oral L-arginine improves endothelium-dependent dilation in hypercholesterolemic young adults. *J Clin Invest* 1996; 97(8): 1989-94.
179. Thorne S, Mullen MJ, Clarkson P i wsp.: Early endothelial dysfunction in adults at risk from atherosclerosis: different responses to L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32(1): 110-6.
180. Micker M, Chęciński P, Jabłecka A i wsp.: Influence of L-arginine oral supplementation on oxidative stress in patients with intermittent claudication. *Acta Angiol* 2002; 8(4): 137–142.
181. Kawano H, Motoyama T, Hirai N i wsp.: Endothelial dysfunction in hypercholesterolemia is improved by L-arginine administration: possible role of oxidative stress. *Atherosclerosis* 2002; 161(2): 375-80.
182. West SG, Likos-Krick A, Brown P i wsp.: Oral L-arginine improves hemodynamic responses to stress and reduces plasma homocysteine in hypercholesterolemic men. *J Nutr* 2005; 135(2): 212-7.
183. Jabłecka A, Bogdański P, Balcer N i wsp.: The effect of oral L-arginine supplementation on fasting glucose, HbA1c, nitric oxide and total antioxidant status in diabetic patients with atherosclerotic peripheral arterial disease of lower extremities. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2012; 16(3): 342-50
184. Boger RH, Bode-Boger SM, Mugge A i wsp.: Supplementation of hypercholesterolemic rabbits with L-arginine reduces the vascular release of superoxide anions and restores NO production. *Atherosclerosis* 1995; 117: 273-284.
185. Jabłecka A, Chęciński P, Krauss H i wsp.: The influence of two different doses of L-arginine oral supplementation on nitric oxide (NO) concentration and total antioxidant status (TAS) in atherosclerotic patients. *Med Sci Monit* 2004; 10 (1): CR29-32.
186. Schulze F, Wesemann R, Schwedhelm E i wsp.: Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin Chem Lab Med* 2004; 42 (12): 1377-1383.
187. Vallance P, Leone A, Calver A, Collier J, Moncada S: Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *The Lancet* 1992; 339: 572- 575.

188. Micker M: Ocena wartości L-argininy w leczeniu chorych z miażdżycowym niedokrwieniem kończyn dolnych. Rozprawa doktorska; Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Poznań 2004.
189. Sławiński M, Grodzińska L, Kostka-Trąbka E i wsp.: Placebo-controlled trial of L-arginine in the treatment of peripheral arterial obstructive disease patients. *Med Sci Monit* 1998; 4: 640-645.
190. Zhang WZ, Kaye WD: Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Anal Biochem* 2004; 326(1): 87-92.
191. Ross MR, Gordon IK, Romrell JL: *Histology: A Text and Atlas*. Williams & Wilkins, 1995, Baltimore.
192. Harima A, Shimuzu H, Takagi H: Analgesic effect of L-arginine in patients with persistent pain. *Eur Neuropsychopharmacol* 1991; 1:529-33.
193. Sławiński M, Grodzińska L, Kostka-Trąbka E i wsp.: L-arginine substrate for NO-synthesis – its beneficial effects in therapy of patients with peripheral arteria disease: comparison with placebo – preliminary results. *Acta Physiol Hung* 1996; 84: 457-458.
194. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W i wsp.: Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32(5): 1336-44.
195. Synowiec T: Porównanie skuteczności terapii pentoksyfiliną, bencyklanem i L-argininą oraz ich wpływu na potencjał antyoksydacyjny osocza i czynność śródbłonna u pacjentów z chromaniem przestankowym. Rozprawa doktorska; Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; Poznań 2007.
196. Suzuki J: Microvascular angioadaptation after endurance training with L-arginine supplementation in rat heart and hindleg muscles. *Exp Physiol* 2005; 90(5): 763-71.
197. Yang HT, Prior BM, Lloyd PG i wsp.: Training-induced vascular adaptations to ischemic muscle. *J Physiol Pharmacol* 2008; 59 Suppl 7: 57-70.
198. Suzuki J: L-arginine supplementation causes additional effects on exercise-induced angiogenesis and VEGF expression in the heart and hind-leg muscles of middle-aged rats. *J Physiol Sci* 2006; 56(1): 39-44.
199. Wu HM, Yuan Y, McCarthy M i wsp.: Acidic and basic FGFs dilate arterioles of skeletal muscle through a NO-dependent mechanism. *Am J Physiol* 1996; 271: 1087-93.

200. Matsunaga T, Weihrauch DW, Moniz MC i wsp.: Angiostatin inhibits coronary angiogenesis during impaired production of nitric oxide. *Circulation* 2002; 105: 2185-91.
201. Laughlin MH, Pollock JS, Amann JF i wsp.: Training induces nonuniform increase in eNOS content along in the coronary arterial tree. *J Appl Physiol* 2001; 90: 501-10.
202. Brooks WW, Conrad CH, Robinson KG i wsp.: L-arginine fails to prevent ventricular remodeling and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Hypertens* 2009; 22(2): 228-34.
203. Jay MT, Chirico S, Siow RC i wsp.: Modulation of vascular tone by low density lipoproteins: effects on L-arginine transport and nitric oxide synthesis. *Exp Physiol* 1997; 82(2): 349-60.
204. Ghiselli A, Serafini M, Natella F i wsp.: Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med* 2000; 29(11): 1106-14.
205. Jessup W: Oxidized lipoproteins and nitric oxide. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7(5): 274-80.
206. Oka RK, Szuba A, Giacomini JC i wsp.: A pilot study of L-arginine supplementation on functional capacity in peripheral arterial disease. *Vasc Med* 2005; 10(4): 265-74.
207. Giraldeho CM, Zappellini A, Muscará MN i wsp.: Effect of arginine analogues on rat hind paw oedema and mast cell activation in vitro. *Eur J Pharmacol* 1994; 257(1-2): 87-93.
208. Chin-Dusting JP, Alexander CT, Arnold PJ i wsp.: Effects of in vivo and in vitro L-arginine supplementation on healthy human vessels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 28(1): 158-66.
209. Loscalzo J: L-Arginine and Atherothrombosis. *J Nutr* 2004; 134(10): 2798S-2800.
210. Vollenweider P, Randin D, Tappy L i wsp.: Impaired insulin-induced sympathetic neural activation and vasodilation in skeletal muscle in obese humans. *J Clin Invest* 1994; 93: 2365-71
211. Rask-Madsen C, King GL: Mechanisms of Disease: endothelial dysfunction in insulin resistance and diabetes. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2007; 3: 46–56.
212. Scherrer U, Vollenweider P, Randin D i wsp.: Suppression of insulin induced sympathetic activation and vasodilation by dexamethasone in humans. *Circulation* 1993; 88: 388-94.

213. Spraul M, Ravussin E, Fontvieille AM i wsp.: Reduced sympathetic nerve activity: a potential mechanism predisposing to body weight gain. *J Clin Invest* 1993; 92: 1730-5.
214. Grassi G, Seravalle G, Cattaneo BM i wsp. Sympathetic activation in obese normotensive subjects. *Hypertension* 1995; 25 [part 1]: 560-3.
215. Scherrer U, Randin D, Vollenweider P i wsp.: Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J Clin Invest* 1994; 94: 2511-5.
216. Steinberg HO, Brechtel G, Johnson A i wsp.: Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent: a novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J Clin Invest* 1994; 94: 1172-9.
217. Trovati M, Massucco P, Mattiello L i wsp.: Insulin increases cyclic nucleotide content in human vascular smooth muscle cells: a mechanism potentially involved in insulin-induced modulation of vascular tone. *Diabetologia* 1995; 38: 936-41.
218. Sobrevia L, Nadal A, Yudilevich DL i wsp.: Activation of L-arginine transport (system y+) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *J Physiol (Lond)* 1996; 490: 775-81.
219. Tesfamariam B, Cohen RA. Free radicals mediate endothelial cell dysfunction caused by elevated glucose. *Am J Physiol* 1992; 263: H321-H326.
220. Hattori Y, Kawasaki H, Abe K i wsp.: Superoxide dismutase recovers altered endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta. *Am J Physiol* 1991; 261: H1086-H1094.
221. Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest* 1991; 87: 432-8.
222. Rabini RA, Fumelli P, Galassi R i wsp.: Increased susceptibility to lipid oxidation of low-density lipoproteins and erythrocyte membranes from diabetic patients. *Metabolism* 1994; 43: 1470-4.
223. Taskinen M-R, Sane T, Helve E i wsp.: Bedtime insulin for suppression of overnight fatty-free acid, blood glucose, and glucose production in NIDDM. *Diabetes* 1989; 38: 580-8.
224. Zweier JL, Samouilov A, and Kuppusamy P: Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411(2-3): 250-62.
225. Giugliano D, Marfella R, Verrazzo G i wsp.: The Vascular Effects of L-Arginine in Humans . The Role of Endogenous Insulin. *J Clin Invest* 1997; 99(3): 433-438.

226. Monti LD, Setola E, Lucotti PC i wsp.: Effect of a long-term oral L-arginine supplementation on glucose metabolism: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Diabetes Obes Metab* 2012 May 4. doi: 10.1111/j.1463-1326.2012.01615.x.
227. Jonk AM, Houben AJ, de Jongh RT i wsp.: Microvascular dysfunction in obesity: a potential mechanism in the pathogenesis of obesity-associated insulin resistance and hypertension. *Physiology* 2007; 22(4): 252-260.
228. Ardigo D, Stuehlinger M, Franzini L i wsp.: ADMA is independently related to flow-mediated vasodilation in subjects at low cardiovascular risk. *Eur J Clin Invest* 2007; 37(4): 263-9.
229. Valkonen VP, Paiva H, Salonen JT i wsp.: Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet* 2001; 358:2127-8.
230. Kuwahata S, Hamasaki S, Ishida S i wsp.: Effect of uric acid on coronary microvascular endothelial function in women: Association with eGFR and ADMA. *J Atheroscler Thromb* 2010; 17: 259-69.
231. Lu TM, Ding YA, Leu HB i wsp.: Effect of rosuvastatin on plasma levels of Asymmetric dimethylarginine in patients with hypercholesterolemia. *Am J Cardiol* 2004; 94: 157-161.
232. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998; 97(15):1440-5.
233. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR i wsp.: Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361(9364):1149-58.
234. Nishiyama Y, Ueda M, Otsuka T i wsp.: Statin treatment decreased serum asymmetric dimethylarginine (ADMA) levels in ischemic stroke patients. *J Atheroscler Thromb* 2011; 18(2): 131-7.
235. Di Napoli P, Taccardi AA, Oliver M i wsp.: Statins and stroke: evidence for cholesterol-independent effects. *Eur Heart J* 2002; 23: 1908-21.
236. Endres M, Laufs U, Huang Z i wsp.: Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 8880-5.

237. Laufs U, Gertz K, Huang P i wsp.: Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 2000; 31(10): 2442-9.
238. Weiss N, Zhang YY, Heydrick S i wsp.: Overexpression of cellular glutathione peroxidase rescues homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 12503-8.
239. Stuhlinger MC, Oka RK, Graf EE i wsp.: Endothelial dysfunction induced by hyperhomocyst(e)inemia: role of asymmetric dimethylarginine. *Circulation*. 2003; 108(8): 933-8.
240. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M i wsp.: Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1533-40.
241. Murray-Rust J, Leiper J, McAlister M i wsp.: Structural insights into the hydrolysis of cellular nitric oxide synthase inhibitors by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Nat Struct Biol* 2001; 8(8):679-83.
242. Lee J, Ryu H, Ferrante RJ i wsp.: Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 4843-8.
243. Morris SM Jr: Arginine metabolism in vascular biology and disease. *Vasc Med* 2005; 10 (1): S83-7.
244. Boger RH: Asymmetric dimethylarginine (ADMA): a novel risk marker in cardiovascular medicine and beyond. *Ann Med* 2006; 38: 126-136.
245. Boger RH, Ron ES: L-arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern Med Rev* 2005; 10: 14-23.
246. Maas R: Pharmacotherapeutic interventions and their influence on ADMA levels. *Vasc Med* 2005; 10 (1): S49-S57.